

## **CAT** **Critically Appraised Topic**

### **Analytische waarde van eenvoudige testen voor gamma-hydroxyboterzuur (GHB) in urine**

Author: Erika De Bont  
Supervisor: Steven Pauwels, Peter Declercq, Sara Vijgen  
Date: 30/04/2019

#### **CLINICAL BOTTOM LINE**

---

Gamma-hydroxy-boterzuur (GHB) is een endogeen korte-keten vetzuur; doch wordt ook gebruikt als drug of abuse recreational en date rape drug. Het belangrijkste effect van exogeen GHB is depressie van het centrale zenuwstelsel.

Ondanks de beperkte richtlijnen en kwalitatieve studies, zoeken artsen vaak naar objectief bewijs voor hun klinisch vermoeden te bevestigen. De goudenstandaard (chromatografie gekoppeld aan MS) is niet overal beschikbaar (specifieke apparatuur en expertise noodzakelijk) en heeft bovendien vaak een lagere turn around time (TAT). Daarom is er een vraag naar specifieke sneltesten.

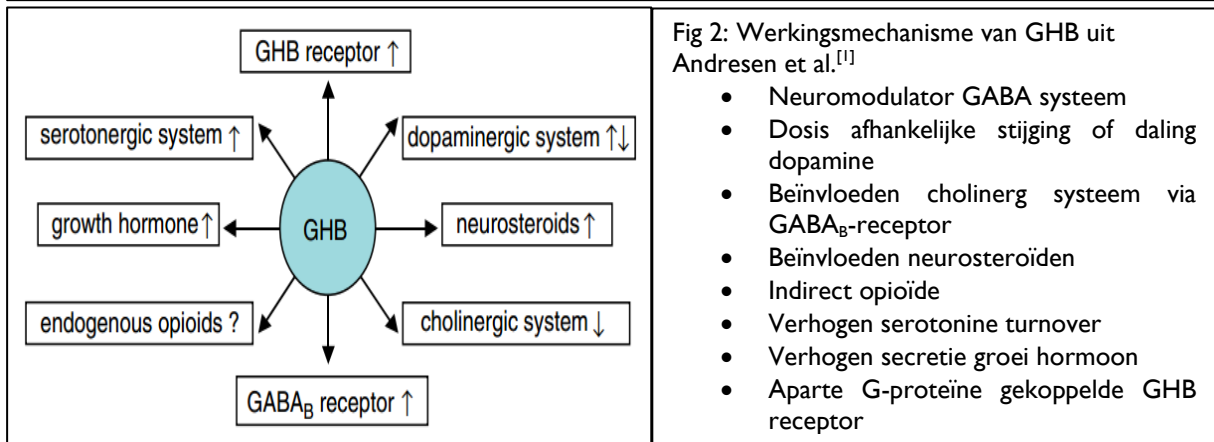
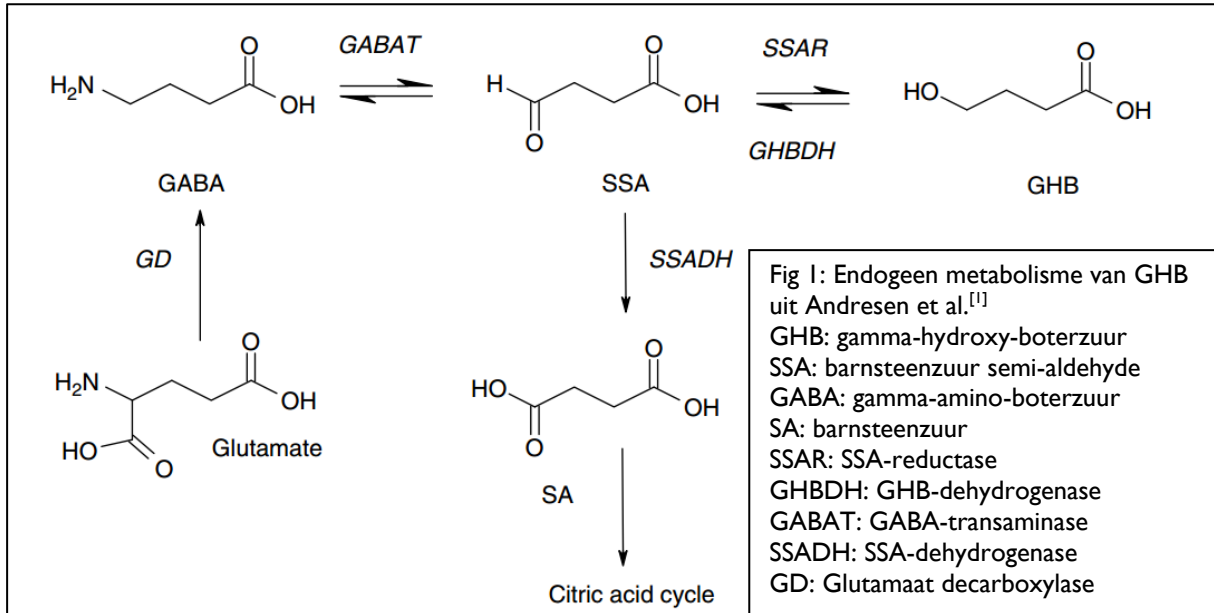
In de literatuur worden er verschillende methoden beschreven als screeningsmethode. Als eerste zijn er de colorimetrische testen. Deze zijn meestal snel en eenvoudig, maar hebben een gebruik aan sensitiviteit (LOD:  $\geq 100$  mg/L). Verder zijn er de enzymatische methoden. Tussen deze methoden zijn er grote verschillen in detectie limiet (LOD: 5-100 mg/L), selectiviteit, en TAT. Een algemeen voordeel is het kleine staalvolume ( $\leq 10\mu\text{L}$ ) dat nodig is. Tot slot zijn er ook enkele artikels die een chromatografische methode naar voor schuiven als screeningsmethode. Het grote nadeel is dat deze dezelfde specifieke apparatuur en expertise nodig hebben als de gouden standaard.

Wij hebben twee verschillende enzymatische testen vergeleken met een LC-MS/MS techniek ("dilute-and-shoot" UPLC-MS/MS met gedeutereerde interne standaard voor directe kwantificatie). De GHB Rapid Test Cassette van Alltest, die een paarse kleur (LOD: 10 mg/L) produceert in de aanwezigheid van GHB, vertoonde een overeenkomst van 61%. Er is een onaanvaardbaar hoge frequentie aan vals-positieve resultaten zonder duidelijk verklaarbare interferentie, wat de Test Cassette ongeschikt maakt voor klinisch gebruik. De GHB kit van Bühlmann, geïmplementeerd op Cobas c502, bepaalt de concentratie van GHB via de toename in absorptie bij 340 nm. Ethanol, een gekende interferent, geeft laag positieve resultaten. Bijkomend vertoont de bepaling ook een kruisreactiviteit van 0.1% met ethyleenglycol. Een vergelijking van 364 routine stalen toont een goede overeenkomst met LC-MS/MS (geen vals positieve of negatieve resultaten). Enkel voor de resultaten in de categorie "grenswaarden" lijkt confirmatie noodzakelijk voor een correcte interpretatie.

**Gamma-hydroxy-boterzuur**

Gamma-hydroxy-boterzuur (GHB) is een endogeen korte-keten vetzuur voornamelijk aanwezig in het CZS.<sup>[1]</sup> GHB is een structuuranaloog, precursor en metaboliet van gamma-amino-boterzuur (GABA).<sup>[2]</sup> (Fig 1) Ondanks vele studies is de precieze functie van GHB nog niet opgeklaard.<sup>[1]</sup> Er wordt verondersteld dat het fungeert als neurotransmitter in het CZS.<sup>[2-3]</sup> (Fig 2)

Het natrium zout van GHB is een wit poeder dat een kleurloze oplossing geeft in water.<sup>[2,4]</sup> De oplossing heeft een zoute, milde zeep smaak.<sup>[2]</sup>

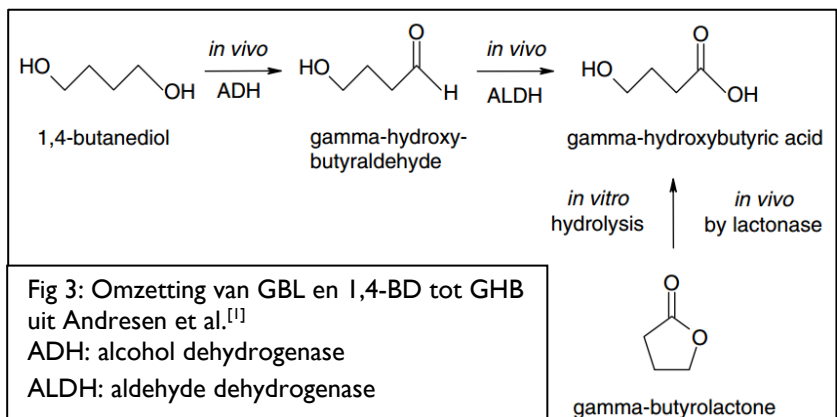


**Geschiedenis**

In 1960 is GHB voor het eerst gesynthetiseerd als GABA derivaat dat door de bloed-hersens barrière kan. In sommige landen wordt GHB gebruikt als anestheticum. Grote nadelen zijn echter het onvoldoende analgetisch effect en de ernstige neveneffecten. Daarnaast zijn dosis en duur van de effecten moeilijk controleerbaar.<sup>[1,5]</sup>

Momenteel zijn er twee geneesmiddelen geregistreerd op basis van GHB: Xyrem® voor de behandeling van narcolepsie en Alcover® voor de verlichting van de eerste ontweningsverschijnselen en de handhaving van alcoholonthouding.<sup>[3,5]</sup>

In 1980 is GHB vrij in omloop gekomen als voedingssupplement. Na het optreden van verschillende intoxicaties werd de verkoop verboden.<sup>[1]</sup> Sinds GHB onder de



verboden middelen valt, worden legale substituten als gamma-butyrolacton (GBL) en 1,4-butanediol (BD) gebruikt (solvents chemische industrie). Deze verbindingen kunnen worden omgevormd naar GHB door een simpele chemische reactie of als dusdanig ingenomen worden. In het lichaam worden GBL en BD omgezet tot GHB.<sup>[1]</sup> (Fig 3) In België vallen GBL en 1,4-BD wel onder de regeling van verdovende middelen en psychotrope stoffen.<sup>[6]</sup>

### Farmacokinetiek.

GHB wordt snel geabsorbeerd na orale inname ( $T_{max}$  20-60min) en daarna snel verdeeld over het lichaam, waardoor klinische effecten snel na inname voorkomen (5-15min). Er is geen eiwitbinding. GHB wordt snel gemetaboliseerd via de citroenzuurcyclus wat leidt tot de vorming van  $CO_2$  en  $H_2O$  ( $t_{1/2}$  = 30-50 min). Minder dan 5% wordt onveranderd uitgescheiden in de urine.<sup>[2,5]</sup> (Fig 4)

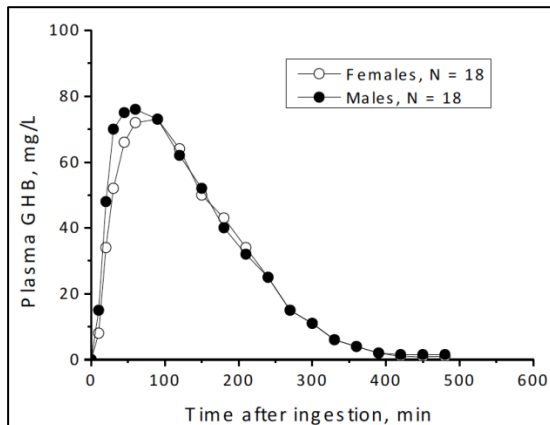


Fig 4: Voorbeeld van concentratie-tijd profiel uit Busardò and Jones.<sup>[5]</sup>

### Kliniek

De effecten van GHB zijn dosis/concentratie afhankelijk en van korte duur (1-4u) door 'fast-in, fast-out' effect.<sup>[1,5]</sup> Primaire symptomen van het centraal zenuwstelsel gaan van stimulatie (wegvallen van inhibitie) tot verschillende niveaus van sedatie (bewusteloosheid-coma). Verder worden ook verwardheid, duizeligheid, geheugenverlies, agitatie/agressie, ataxie, nystagmus, hallucinaties, toeval-achtige symptomen en hypothermie waargenomen. Tot slot zijn er ook respiratoire (ademhalingsdepressie, apneu), cardiovasculaire (bradycardie, hypotensie) en gastro-intestinale (misselijkheid, braken) effecten.<sup>[1-3,5,7-8]</sup>

### Diagnostiek

De belangrijkste aanvragers van de bepaling van GHB zijn artsen op spoed en psychiaters.

#### Acute intoxicatie.

De diagnose van GHB intoxicatie wordt gesteld op basis van de kliniek, karakteristieke patronen en het uitsluiten van andere oorzaken.<sup>[7,9]</sup> Tot de differentieel diagnose behoren intoxicatie (medicatie, drugs of abuse), trauma aan het hoofd, hersenbloeding, verhoogde intracraniale druk, hypo/hyperglycemie, shock, hypoxie, acidose, CSV infectie en renaal of lever falen.<sup>[7]</sup>

Meestal is er een spontaan herstel binnen de 6-8u.<sup>[1-2,7,10]</sup> Monitoring van de vitale functies en een symptoomgerichte/supportieve behandeling kunnen nodig zijn.<sup>[1-2,5,7,10]</sup> Soms kan intubatie met mechanische ventilatie nodig zijn om de luchtwegen te beschermen.<sup>[7,10]</sup>

De definitieve diagnose wordt gesteld door bevestiging van de aanwezigheid van GHB in bloed of urine door chromatografie gekoppeld aan massaspectrometrie (MS).<sup>[7]</sup> Dit resultaat is vaak niet op tijd om klinische beslissingen te nemen.<sup>[7]</sup> Over het gebruik van specifieke sneltesten zijn er geen kwalitatieve studies of richtlijnen.

Onderzoek naar de accurateid van het aanwijzen van GHB als oorzaak van intoxicatie, op basis van historiek en kliniek, toont een goede sensitiviteit (97%) en specificiteit (91%).<sup>[11]</sup> Een correcte klinische identificatie van de verantwoordelijke drug wordt gevonden in 70-80% van de gevallen.<sup>[11-12]</sup>

Over de betrouwbaarheid van de informatie gegeven door de patiënt of zijn directe omgeving bekomt men tegenstrijdige informatie. De resultaten zijn afhankelijk van graad van overeenkomst tussen anamnesegegevens en toxicologische analyse, bv. complete overeenkomst of enkel klinisch significante verschillen. In ongeveer 80% van de gevallen is de verkregen informatie goed genoeg vanuit klinisch oogpunt.<sup>[13]</sup>

In zeldzame gevallen geeft noch de patiënt noch zijn omgeving informatie die kan wijzen op intoxicatie.<sup>[13]</sup> In deze gevallen kan de patiënt onnodige onderzoeken ondergaan. Bij veranderd bewustzijn is het nodig om een acute intoxicatie uit te sluiten.<sup>[12,14]</sup> Andere onderzoeken die in deze patiënten worden uitgevoerd zijn CT of MRI,

lumbaalpunctie, ECG en EEG.<sup>[14-17]</sup> Er kan ook onnodig gestart worden met een empirische behandeling voor bacteriële meningitis of virale encefalitis.<sup>[17]</sup>

### Ontwenning.

Bij chronisch (meerdere keren per dag) gebruik van GHB kunnen tolerantie en fysieke afhankelijkheid ontstaan. Bij het stoppen of verminderen van GHB gebruik kunnen ontwenningssverschijnselen optreden.<sup>[18]</sup> (Fig 5) Symptomen ontstaan kort (1-12u) na de laatste dosis en kunnen tot enkele weken aanhouden.<sup>[18-20]</sup> Het symptoomverloop is vaak variabel en onvoorspelbaar, zelfs binnen dezelfde patiënt.<sup>[20-21]</sup>

licht (prevalentie)	ernstig (prevalentie)
tremor (67%)	hallucinaties (63%)
slapeloosheid (58%)	tachycardie (63%)
transpireren, misselijkheid en braken (35%)	hevige angst (46%)
rusteloosheid	hypertensie (44%)
milde angst of onrust	motorische onrust of agitatie (40%)
	delirium (12%)
	rabdomyolyse (7%)
	insulten (7%)

Fig 5: Klinische onthoudingsverschijnselen van GHB uit van Noorden et al.<sup>[18]</sup>

De diagnose van GHB ontwenning is klinisch, op basis van symptomen en gekende voorgeschiedenis van chronisch GHB gebruik.<sup>[20,22]</sup> Onder de differentieeldiagnose vallen ontwenningssverschijnselen van andere sedatieve geneesmiddelen en alcohol, intoxicatie met sympathomimetica, anticholinerg syndroom, hypoglycemie, epilepsie, serotonine syndroom, thyroid storm, maligne neuroleptisch syndroom, hoofdonden en CSV infectie.<sup>[20,23]</sup>

De behandeling van GHB ontwenningssverschijnselen bestaat uit monitoring van de vitale functies en sedatie, meestal met benzodiazepines, om de symptomen te onderdrukken.<sup>[18,20,24]</sup>

### Psychiatrie.

In de psychiatrie wordt de bepaling van GHB gebruikt om persisterend middelengebruik te staven. Hiervoor is een relatief snel en accuraat antwoord wenselijk. Het al dan niet positief testen heeft soms zware implicaties voor de patiënt.

### Algemene problemen.

#### *Detectievenster*

GHB heeft een korte halfwaardetijd ( $t_{1/2} = 30-50$  min) en is daarom al ondetecteerbaar in plasma ongeveer 6u na inname.<sup>[1,5]</sup> In urine blijft GHB langer detecteerbaar, ongeveer tot 12u na inname.<sup>[1]</sup> Door het smalle detectie venster kan GHB intoxicatie gemist worden.<sup>[25]</sup> Vooral in het kader van seksuele aanranding, waar de slachtoffers zich vaak laat presenteren is dit een probleem.<sup>[7]</sup>

#### *Endogeen GHB/cutoff*

GHB is een endogene stof die voornamelijk aanwezig is in het CZS, maar ook voorkomt in bloed, urine en perifere weefsels.<sup>[1]</sup> Bij het interpreteren van analyse resultaten is het dus belangrijk onderscheid te maken tussen endogeen en exogeen GHB. In een juridische of psychiatrische context moet men met zekerheid kunnen stellen dat een persoon illegale drugs heeft ingenomen.<sup>[5]</sup>

In verschillende studies heeft men de endogene concentraties in bloed en urine bepaald en op basis hiervan een cutoff waarde proberen op te stellen. De meeste studies lijken een cutoff van 5 mg/L voor bloed en 10 mg/L voor urine te bevestigen.<sup>[1-2,5,7,26-30]</sup>

Ondanks de beperkte richtlijnen en kwalitatieve studies, zoeken artsen in de contexten hierboven beschreven vaak naar objectief bewijs voor hun klinisch vermoeden. Chromatografie gekoppeld aan MS is niet overal beschikbaar (specifieke apparatuur en expertise noodzakelijk) en heeft bovendien vaak een lagere turn around time (TAT). Daarom is er een vraag naar specifieke sneltesten. Wij gaan kijken welke sneltesten er beschreven zijn in de literatuur. Van de beschikbare sneltesten wordt er voor een selectie een verificatie ten opzichte van LC-MS/MS uitgevoerd.

### QUESTION(S)

- 1) *Vraag 1:* Welke eenvoudige, snelle testen zijn er beschikbaar?
- 2) *Vraag 2:* Vergelijking van een selectie sneltesten met LC-MS/MS.

## RELEVANT EVIDENCE/REFERENCES

---

1. Andresen, Aydin, Mueller, Iwersen-Bergmann: **An overview of gamma-hydroxybutyric acid: pharmacodynamics, pharmacokinetics, toxic effects, addiction, analytical methods, and interpretation of results.** *Drug testing and analysis* 2011, **3**:560-568
2. Grouls, Bindels, Roos, Keizer: **Monografie Gamma-Hydroxy-Boterzuur (GHB) (versie 1).** <https://toxicologie.org/monografie/ghb> (14/12/2018)
3. Li, Stokes, Woeckener: **A tale of novel intoxication: a review of the effects of  $\gamma$ -hydroxybutyric acid with recommendations for management.** *Annals of emergency medicine* 1998, **31**:729-736
4. Morris-Kukoski:  **$\gamma$ -Hydroxybutyrate: bridging the analytical gap.** *Toxicological reviews* 2004, **23**:33-43
5. Busardo, Jones: **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
6. Koninklijk besluit houdende regeling van verdovende middelen, psychotrope stoffen. 6 september 2017
7. Zvosec, Smith: **Gamma hydroxybutyrate (GHB) intoxication.** *UpToDate* <https://www.uptodate.com/contents/gamma-hydroxybutyrate-ghb-intoxication> (28/12/2018)
8. van Rij, Wilhelm, van Loenen: **Herkenning en behandeling van hydroxyboterzuurintoxicaties.** *Nederlands tijdschrift voor geneeskunde* 2004, **148**:844-846
9. Franken, Andrews, Slooff, de Wildt, Koch: **Intoxication of a young girl reveals the pitfalls of GHB rapid screening.** *Therapeutic drug monitoring* 2016, **38**:1-3
10. Hillebrand, Olszewski, Sedefov: **GHB and its precursor GBL: an emerging trend case study.** *EMCDDA thematic papers* 2008
11. West, Cameron, O'Reilly, Drummer, Bystrycki: **Accuracy of current clinical diagnosis in recreational drug-related attendance to the emergency department.** *Emergency medicine Australasia* 2008, **20**:333-338
12. Bjornaas, Hovda, Mikalsen, Andrew, Rudberg, Ekeberg, Jacobsen: **Clinical vs. laboratory identification of drugs of abuse in patients admitted for acute poisoning.** *Clinical toxicology* 2006, **44**:127-134
13. Pohjola-Sintonen, Kivistö, Vuori, Lapatto-Reiniluoto, Tiula, Neuvonen: **Identification of drugs ingested in acute poisoning: correlation of patient history with drug analyses.** *Therapeutic drug monitoring* 2000, **22**:749-752
14. Helliwell, Hampel, Sinclair, Huggett, Flanagan: **Value of emergency toxicological investigations in differential diagnosis of coma.** *British medical journal* 1979, **2**:819-821
15. Liakoni, Walther, Nickel, Liechi: **Presentations to an urban emergency department in Switzerland due to acute  $\gamma$ -hydroxybutyrate toxicity.** *Scandinavian journal of trauma, resuscitation and emergency medicine* 2016, **24**:1-9
16. Heytens, Neels, Van Regenmortel, van den Brink, Henckes, Schouwers, Dockx, Crunelle: **Near-fatal persistent anion- and osmolal-gap acidosis due to massive gamma-butyrolactone/ethanol intoxication.** *Annals of clinical biochemistry* 2015, **52**:283-287
17. Young: **Stupor and coma in adults.** *UpToDate* <https://www.uptodate.com/contents/stupor-and-coma-in-adults> (29/03/2019)
18. van Noorden, Kamal, de Jong, Vergouwen, Zitman: **GHB-afhankelijkheid en -onthoudingssyndroom.** *Nederlands tijdschrift voor geneeskunde* 2010, **154**:1-6
19. von Theobald, Rousselet, Cholet, Debar, Boels, Victorri-Vigneau, Grall-Bronnec: **Inpatient gamma-hydroxybutyrate detoxification: a case report describing day-to-day therapeutic management.** *Journal of addiction medicine* 2017, **11**:231-234
20. Zvosec, Smith: **Gamma hydroxybutyrate (GHB) withdrawal and dependence.** *UpToDate* <https://www.uptodate.com/contents/gamma-hydroxybutyrate-ghb-withdrawal-and-dependence> (13/02/2019)
21. Gasper, McDonough, Bearn: **Within-patient variability in clinical presentation of gamma-hydroxybutyrate withdrawal: a case report.** *European addiction research* 2005, **11**:152-154
22. Wojtowicz, Yarema, Wax: **Withdrawal from gamma-hydroxybutyrate, 1,4-butanediol and gamma-butyrolactone: a case report and systematic review.** *Canadian journal of emergency medicine* 2008, **10**:69-74
23. Dyer, Roth, Hyma: **Gamma-hydroxybutyrate withdrawal syndrome.** *Annals of emergency medicine* 2001, **37**:147-153
24. Gonzalez, Nutt: **Gamma hydroxy butyrate abuse and dependency.** *Journal of psychopharmacology* 2005, **19**:195-204
25. Hoffman: **Testing for drugs of abuse (DOA).** *UpToDate* <https://www.uptodate.com/contents/testing-for-drugs-of-abuse-doa> (28/12/2018)
26. Elian: **Determination of endogenous gamma-hydroxybutyric acid (GHB) levels in antemortem urine and blood.** *Forensic science international* 2002, **128**:120-122
27. Shima, Miki, Kamata, Katagi, Tsuchihashi: **Urinary endogenous concentrations of GHB and its isomers in healthy humans and diabetics.** *Forensic science international* 2005, **149**:171-179

28. Elliott: **Gamma hydroxybutyric acid (GHB) concentrations in humans and factors effecting endogenous production.** *Forensic science international* 2003, **133**:9-16
29. Yeatman, Reid: **A study of urinary endogenous gamma-hydroxybutyrate (GHB) levels.** *Journal of analytical toxicology* 2003, **27**:40-42
30. LeBeau, Christenson, Levine, Darwin, Huestis: **Intra- and interindividual variations in urinary concentrations of endogenous gamma-hydroxybutyrate.** *Journal of analytical toxicology* 2002, **26**:340-346
31. Ingels, Wille, Samyn, Lambert, Stove: **Screening and confirmation methods for GHB determination in biological fluids.** *Analytical and bioanalytical chemistry* 2014, **406**:3533-3577
32. Alston, Ng: **Rapid colorimetric screening test for  $\gamma$ -hydroxybutyric acid (liquid X) in human urine.** *Forensic science international* 2002, **126**:114-117
33. Badcock, Zotti: **Rapid screening test for gamma-hydroxybutyric acid (GHB, fantasy) in urine.** *Therapeutic drug monitoring* 1999, **21**:376
34. Bravo, Harris, Parsons: **Reliable, sensitive, rapid and quantitative enzyme-based assay for gamma-hydroxybutyric acid (GHB).** *Journal of forensic sciences* 2004, **49**:379-387
35. Sciotti, Hasan, Scholer, Jermann, Weber, Gygax: **Development and characterization of an enzymatic method for the rapid determination of gamma hydroxybutyric acid.** *Chimia* 2010, **64**:793-798
36. Hasan, Jermann, Weber, Abrahamsson, Sciotti, Böttcher, Jöchle, Gygax, Scholer: **An enzymatic method to determine  $\gamma$ -hydroxybutyric acid in serum and urine.** *Therapeutic drug monitoring* 2011, **33**:757-765
37. <http://drugcheck.com/drugcheck-ghb-test> (26/12/2018)
38. Grenier, Huppé, Lamarche, Mireault: **Enzymatic assay for GHB determination in forensic matrices.** *Journal of analytical toxicology* 2012, **36**:523-528
39. Bendinskas, Sattelberg, Crossett, Banyikwa, Dempsey, MacKensie: **Enzymatic detection of gamma-hydroxybutyrate using aldo-keto reductase 7A2.** *Journal of forensic sciences* 2011, **56**:783-787
40. Mortier, Vijgen, Pauwels, Declercq: **UPLC-MS/MS method for rapid urinary GHB confirmation.** *MSACL 2018 EU Abstract* [https://www.msaccl.org/view\\_abstract/MSACL\\_2018\\_EU.php?id=542](https://www.msaccl.org/view_abstract/MSACL_2018_EU.php?id=542) (28/04/2019)
41. AllTest: **GHB Rapid Test Cassette (urine): Package insert.** (Vers. 2017-11-03)
42. Bühlmann: **Application note: BÜHLMANN GHB Enzymatic Assay Cobas 6000, Roche Diagnostics.** (Vers: 2016-04-04)
43. Bühlmann: **GHB gamma-hydroxybutyric acid Enzymatic Assay.** (Vers. 2016-08-02)
44. Brigden, Edgell, McPherson, Leadbeater, Hoag: **High incidence of significant urinary ascorbic acid concentration in a West coast population – implications for routine urinalysis.** *Clinical chemistry* 1992, **38**:426-431
45. Viinamäki, Sajantila, Ojanperä: **Ethylene glycol and metabolite concentrations in fatal ethylene glycol poisonings.** *Journal of analytical toxicology* 2015, **39**:481-485
46. Fernandes, Blom: **Urinary lactate excretion in normal children and in children with enzyme defects of carbohydrate metabolism.** *Clinica chimica acta* 1976, **66**:345-352
47. McKelvie, Lindinger, Heigenhauser, Sutton, Jones: **Renal response to exercise-induced lactic acidosis.** *American journal of physiology* 1989, **257**:R102-R108
48. Liljestrand, Wilson: **The excretion of lactic acid in the urine after muscular exercise.** *Sage journals* 1924, **21**:773-782



Vraag 1: Welke eenvoudige, snelle testen zijn er beschikbaar?

Een verscheidenheid aan analytische methoden voor screening en confirmatie van GHB in lichaamsvloeistoffen is gerapporteerd. Ingels et al. geeft een overzicht van de sinds 1990 gepubliceerde methoden.<sup>[31]</sup> Er wordt een onderscheid gemaakt tussen screenings- en confirmatietechnieken. Colorimetrische en enzymatische testen worden vaak als screeningstest gebruikt. Deze testen maken snel een onderscheid tussen vermoedelijk positieve en negatieve stalen (kwalitatief). Confirmatie van de positieve stalen gebeurt met een kwantitatieve methode op basis van gaschromatografie (GC), vloeistofchromatografie (LC) of capillaire zone elektroforese (CZE).<sup>[31]</sup> De analytische goudenstandaard methoden zijn GC-MS, LC-MS, GC-MS/MS of LC-MS/MS.<sup>[5]</sup>

**Colorimetrische methoden.**

Colorimetrische testen zijn meestal gebaseerd op de chemische omzetting van GHB tot een gekleurd complex. Een vaak gebruikte tussenstap is de omzetting van GHB naar GBL. In enkele publicaties wordt, voor de screening in urine, gebruik gemaakt van de vorming van een paars complex met ijzer na de reactie van GBL met hydroxylamine hydrochloride of de vorming van een blauw/olijfgroene kleur met nitroprusside in een alkalische oplossing. (Fig 6) Als negatieve controle gebruikt men een parallelreactie waarbij de omzetting van GHB naar GBL niet is gebeurd; eventuele reactie wijst op de aanwezigheid van interferentie.<sup>[32-33]</sup> Het grootste nadeel van deze testen is het gebrek aan sensitiviteit (LOD:  $\geq 100$  mg/L).<sup>[31-33]</sup>

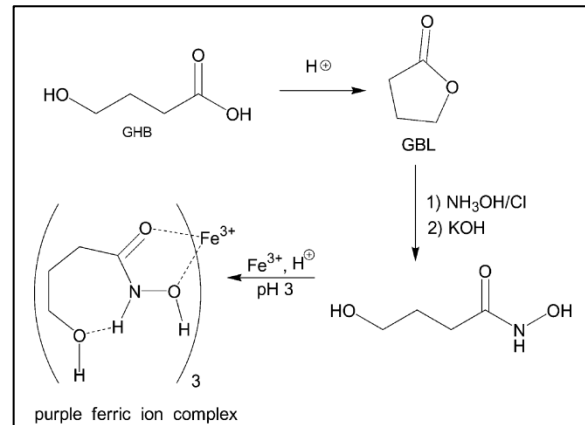


Fig 6: Voorbeeld van colorimetrische reactie uit Alston and Ng.<sup>[32]</sup>

**Enzymatische methoden.**

Het reactieprincipe van enzymatische assay's is gebaseerd op de oxidatie van GHB tot barnsteenzuur semi-aldehyde (succinic semi-aldehyde, SSA). In vivo gebeurt deze omzetting door GHB-dehydrogenase (GHB-DH).<sup>[31]</sup> (Fig 7) De meeste assay's maken gebruik van het GHB-DH van *Ralstonia eutropha*.<sup>[31,34-36]</sup> Het gebruik van dit enzym heeft twee belangrijke nadelen. Als eerste faciliteert GHB-DH een evenwichtsreactie met de voorkeur voor de vorming van GHB vanuit SSA. Ten tweede wordt er ook crossreactiviteit met ethanol beschreven.<sup>[1,34-36]</sup>

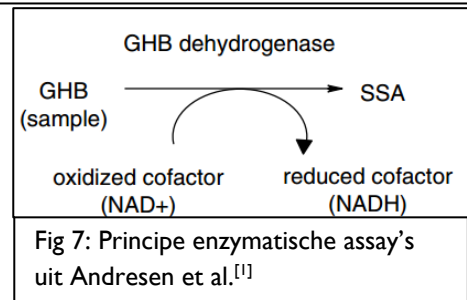


Fig 7: Principe enzymatische assay's uit Andresen et al.<sup>[1]</sup>

Bravo et al.<sup>[34]</sup> koppelt de oxidatiereactie van GHB aan de reductie van een tetrazolium kleurstof. Deze reactie verbruikt het gevormde NADH en zorgt ervoor dat alle GHB kan weg reageren. Zowel een fotometrische als een dipstick test werden ontwikkeld. Voor de fotometrische reactie gebruikt men XTT (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl-2H-tetrazolium-5-carboxanilide), dat na reductie een oranje kleur geeft. De concentratie van GHB wordt afgeleid uit de absorbantie bij 450 nm. De dipstick methode maakt gebruik van MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difentanyltetrazolium bromide), dat een onoplosbaar paars reactieproduct geeft. De concentratie van alcohol in urine is meestal relatief laag, zodat interferentie geen probleem vormt. Het grootste nadeel aan deze testen is de hoge detectie limiet van 100 mg/L.<sup>[31,34]</sup>

De commercieel beschikbare dipstick van Drugcheck zou een cutoff van 10 mg/L hebben.<sup>[31,37]</sup> Een teststrip voor vitamine C zit bij in de kit, wegens crossreactiviteit met de test.<sup>[31]</sup> Het reactie principe van de GHB dipstick van Drugcheck is niet terug te vinden.

Sciotti et al.<sup>[35]</sup> zorgde dat de oxidatie van GHB opging door de optimalisatie van de reactieomstandigheden (pH, concentratie substraat en product, verhouding staalvolume/reactievolume, inhibitie niet specifieke NADH vorming, ...). De concentratie van GHB wordt bepaald door de snelheid van NADH vorming (toename in absorptie over 175 seconden bij 340 nm) te meten. De methode is geautomatiseerd voor urine en serum en aanpasbaar voor de gebruikelijke klinische chemie analyzers.<sup>[31,35]</sup> De kit is commercieel beschikbaar bij Bühlmann Laboratories AG (<https://www.buhlmannlabs.ch/products-solutions/clinical-chemistry/ghb/>).<sup>[31,36,38]</sup>

Validatie op de Konelab 30 analyzer (Thermo Fisher Scientific) is uitgevoerd door Hasan et al.<sup>[36]</sup> Crossreactiviteit met GBL (4%) en ethanol (3 mg/L per 1.06 g/L ethanol) zijn aangetoond. Voor GBL is dit geen probleem aangezien dit in het lichaam vlug wordt omgezet tot GHB. De aanwezigheid van ethanol kan vals positieve resultaten geven, meestal laag positieve GHB concentraties (<20 mg/L).<sup>[31,36]</sup> Ook Grenier et al.<sup>[38]</sup> hebben de kit gevalideerd maar dan in de setting van gerechtelijk onderzoek.<sup>[31,38]</sup> Algemeen kan gesteld worden dat de kit gebruikt kan worden als screeningstest voor de toediening/inname van GHB.<sup>[31,36,38]</sup>

Tot slot zijn er ook nog enzymatische methoden ontwikkeld voor de detectie van GHB in drank. Belangrijk is dat er hier crossreactiviteit met ethanol moet uitgesloten worden. Het aldo-keto reductase 7A2 kan hiertoe gebruikt worden.<sup>[39]</sup>

### Chromatografische methoden.

Er zijn ook enkele publicaties waar chromatografische methoden gebruikt worden als screeningstechniek. De methoden vragen typisch een intensievere en tijdrovende monstervoorbereiding ten opzichte van colorimetrische of enzymatische methode. Vaak wordt er hier gebruik gemaakt van niet specifieke detectietechnieken. Er bestaan ook methoden die screenen op een verscheidenheid aan verbindingen (bv. gehydroxyleerde met methyl gederivatiseerde organische zuren, date rape drugs, ...). Naast deze screeningsmethoden zijn er ook vereenvoudigde en snelle procedures met een hoge doorvoer. Deze kunnen zowel voor screening als confirmatie gebruikt worden.<sup>[31]</sup>

De chromatografische methoden worden echter vooral gebruikt bij de confirmatie van de aanwezigheid van GHB. De meest gebruikte techniek is GC, mogelijk gemaakt door het gebruik van een geschikte staalvoorbereiding. GHB wordt gedetecteerd in gederivatiseerde vorm of als GBL. Koppeling aan MS/MS zorgt voor een grotere selectiviteit, wat de nood aan tijdrovende staal clean-up kan verminderen. Een kleiner aantal methoden maakt gebruik van LC. Het belangrijkste voordeel ten opzichte van GC is de meer eenvoudige staalvoorbereiding. Dikwijls volstaat verdunnen.<sup>[31]</sup>

### Andere screenings technieken.

<sup>1</sup>H nucleaire magnetische resonantiespectrometrie is een niet destructieve techniek die weinig monstervoorbereiding vraagt en kan gebruikt worden voor de detectie van GHB in urine, serum en speeksel. Ook ion mobiliteitsspectrometrie is een veelbelovende screeningsmethode voor GHB (en verwante verbindingen) in urine. Deze kan gebruikt worden zonder voorafgaande chromatografische scheiding. Tot slot is CZE met indirecte UV detectie ook in staat om hoge concentraties GHB in urine en serum te detecteren.<sup>[31]</sup> Dergelijke methodes zijn evenwel moeilijk of niet toepasbaar in een klinisch laboratorium.

Tabel 1: Overzicht beschikbare snelle testen met hun voor en nadelen.

Methode			Voordelen	Nadelen
Colorimetrische			Eenvoudig TAT ≤ 10 min	LOD ≥ 100 mg/L Staalvolume ≥ 250 µL Reagentia zelf maken
Enzymatisch	Kleurstof koppeling	Fotometrisch	Staalvolume ≤ 10 µL	LOD ≥ 37 mg/L (LOQ 100 mg/L) TAT (Fotospectrometer)
		Dipstick	Eenvoudig TAT ≤ 10 min Staalvolume ≤ 10 µL	Kruisreactie: vitamine C, ethanol
	NADH vorming		Eenvoudig Geautomatiseerd TAT ≤ 10 min Staalvolume ≤ 10 µL LOQ ≤ 5 mg/L	Kruisreactie: ethanol
Chromatografisch				(TAT) Expertise Apparatuur



## Vraag 2: Vergelijking van een selectie sneltesten met LC-MS/MS.

### Methoden.

#### LC-MS/MS.

Als referentiemethode werd de huidige routine confirmatietechniek, een dilute-and-shoot UPLC-MS/MS methode, gebruik maken van een gedeutereerde interne standaard voor directe kwantificatie, gebruikt.

UPLC-MS/MS analyses werden uitgevoerd met behulp van een Acquity UPLC H-class (Waters) gekoppeld aan een triple quadrupool massaspectrometer (Waters Xevo TQ-XS, Waters Corporation). Chromatografie werd uitgevoerd met behulp van een Acquity UPLC HSS T3 C18 kolom (150x2.1 mm; 1.7µm). De mobiele fase werd gevormd door eluens A (0.2% mierenzuur in water) en eluens B (methanol). Een gradiëntelutie werd toegepast, met 100% eluens A tot 45%/55% eluens A/B in 2.25 min bij een stroomsnelheid van 0.5 ml/min. Detectie na scheiding gebeurde met een tandem quadrupool massaspectrometer in multiple reaction monitoring modus via negatieve elektrospay ionisatie.

Aan 25 µL urine werd, na centrifugatie en filtratie, 25 µL interne standaard (d6-GHB, 100 µg/mL water) en 200 µL eluens A toegevoegd. Van deze verdunning werd 10 µL geïnjecteerd in het chromatografiesysteem. Kwantificatie gebeurde op basis van het piekoppervlak van de toegevoegde gedeutereerde interne standaard.<sup>[40]</sup>

#### Snelle enzymatische testcassette.

De GHB Rapid Test Cassette van Alltest was een snelle enzymatische test om de aanwezigheid van GHB (concentratie > 10mg/L) in de urine te detecteren. In de aanwezigheid van GHB werd een kleur geproduceerd die varieert van lichtpaars (≥ 10 mg/L) tot donkerpaars (≥ 50 mg/L). (Fig 8) Een teststrip om de aanwezigheid van het gekende interferent vitamine C uit te sluiten, was bijgevoegd in de verpakking.<sup>[41]</sup> (Fig 9)

De analyses werden uitgevoerd volgens de bijsluiter. Eén druppel GHB-buffer en vervolgens 2 druppels staal werden aangebracht. De test resultaten werden afgelezen na 10 minuten. Interpretatie gebeurde door vergelijking met de bijgeleverde kleurenkaart.<sup>[41]</sup>



Fig 8: Legende kleurreacties bijgevoegd bij GHB Rapid Test Cassette Alltest.



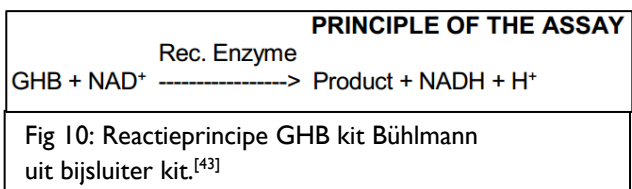
Fig 9: Inhoud van test pakket van GHB Rapid Test Cassette Alltest.

#### Geautomatiseerde enzymatische test.

De hierboven besproken kit van Bühlmann (Vraag1: Enzymatische methoden) werd gebruikt voor een directe en kwantitatieve bepaling van GHB in urine. De applicatie voor Roche Cobas 6000 werd geïmplementeerd op de Cobas c502.<sup>[42]</sup>

Analyses werden uitgevoerd volgens de bijsluiter. Aan een incubatiebuffer werden staal (6 µL), cofactor en enzym toegevoegd. Absorbantie bij 340 nm werd gemeten bij de start van de reactie en na 10 minuten.<sup>[42]</sup>

GHB wordt omgezet naar zijn metaboliet, SSA, door het enzym GHB-dehydrogenase. De toename in absorbantie bij 340 nm die voorkomt uit de reductie van NAD<sup>+</sup> naar NADH is proportioneel met de hoeveelheid GHB in het staal.<sup>[43]</sup> (Fig 10)



## Correlatie met LC-MS/MS.

### Snelle enzymatische testcassette.

#### Werkwijze

Opeenvolgende urinemonsters van patiënten (n=41) en QC's (n=6) werden geanalyseerd met de GHB Rapid Test Cassette (Alltest) volgens de instructies van de fabrikant. Kleurvorming werd beoordeeld door drie beoordelaars (consensus gebruikt). De urinemonsters werden ook onderzocht op mogelijke vitamine C interferentie. Stalen positief voor vitamine C of met een niet interpreteerbaar resultaat, werden verwijderd. De stalen werden ook geanalyseerd met de LC-MS/MS methode hierboven beschreven. Categorische overeenstemming, op basis van de voorgestelde endogene GHB-cut-off van 10 mg/L en een hogere cut-off van 50 mg/L, werd berekend (Excel Analyze It).

#### Resultaten

Aflezen van de test resultaten werd bemoeilijkt door de subtiliteit van de kleurverandering. Het matchen van de kleur van de test cassette met deze op de kleurenkaart was moeilijk en dus subjectief.

Acht stalen werden verwijderd wegens positieve of niet interpreteerbare vitamine C test. Dit resulteerde in 30 negatieve en 9 positieve stalen. Overeenkomst was 61% ( $\kappa$  0.28), met 36% vals-positieve en 3% vals-negatieve screeningsresultaten. (Tabel 2) Het vals-negatieve monster had een lage GHB concentratie (13 mg/L), net boven de afkapwaarde.

Tabel 2: Kruistabel vergelijking Alltest met LC-MS/MS.

		GHB Rapid Test Cassette		Totaal
		< 10 mg/L	≥ 10 mg/L	
LC-MS/MS	< 10 mg/L	16	14	30
	≥ 10 mg/L	1	8	9
Totaal		17	22	39

Als alleen stalen met een negatief (< 10 mg/L) of sterk positief (≥ 50mg/L) screeningsresultaat werden opgenomen (n=22) was de overeenkomst 91% ( $\kappa$ 0.74), met 5% vals-positieve en 5% vals-negatieve screeningsresultaten. (Tabel 3)

Tabel 3: Kruistabel vergelijking Alltest met LC-MS/MS, gebruik makend van negatieve en sterk positieve screeningsresultaten.

		GHB Rapid Test Cassette		Totaal
		< 10 mg/L	≥ 50 mg/L	
LC-MS/MS	< 10 mg/L	16	1	17
	≥ 10 mg/L	1	4	5
Totaal		17	5	22

De ethanol concentratie in gepaarde plasmastalen werd nagegaan. Uit de beschikbare resultaten werd er geen verband gevonden tussen de ethanolconcentraties en de vals positieve stalen.

#### Conclusie

Er was een onaanvaardbaar hoge frequentie aan vals-positieve resultaten met de GHB Rapid Test, waarvoor er geen duidelijke verklaring gevonden werd. Overeenkomst was beter als alleen negatieve (< 10 mg/L) en sterk positieve (≥ 50 mg/L) screeningsresultaten werden opgenomen. Dit liet echter bijna de helft van de monsters zonder resultaat. De GHB Rapid Test Cassette was dus ongeschikt voor klinisch gebruik.

## Geautomatiseerde enzymatische test.

De Bühlmann GHB kit in augustus 2018 in gebruik genomen als routine screeningsmethode. Resultaten werden ingedeeld in 3 categorieën: negatief (<8 mg/L), grenswaarde (8-14 mg/L) en positief (>14 mg/L). De categorie “grenswaarde” werd ingevoerd voor het opvangen van de meetonzekerheid. Elk resultaat werd geconfirmeerd met LC-MS/MS.

### Werkwijze

Er werd een vergelijking uitgevoerd van de resultaten bekomen vanaf de start in de routine tot en met 26/03/19, in totaal 364 stalen. Voor LC-MS/MS werd de endogene cutoff van 10 mg/L toegepast. De resultaten afkomstig van Cobas werden ingedeeld volgens de hierboven beschreven categorieën.

### Resultaten

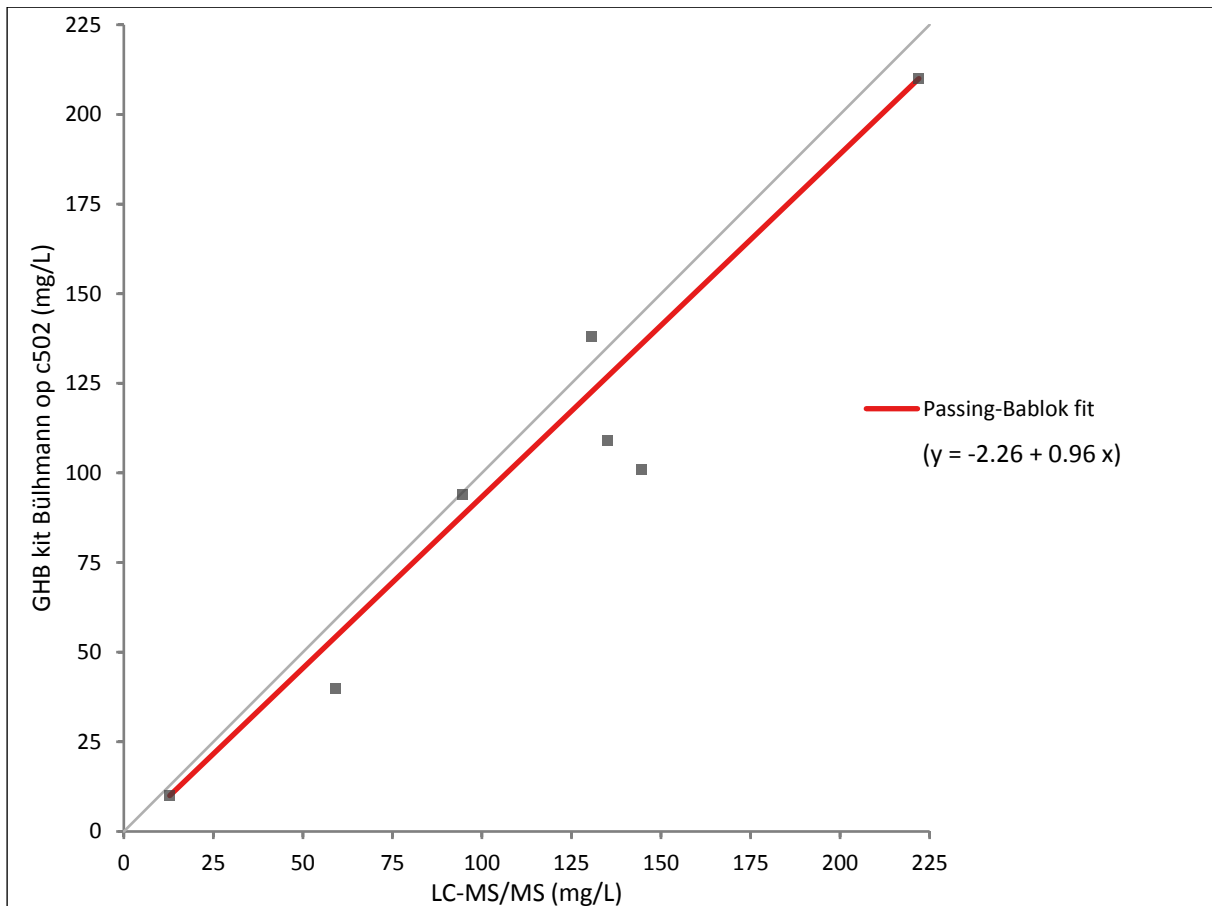
Alle stalen die negatief (n=316) of positief (n=23) testten op Cobas werden zo ook bevestigd met LC-MS/MS. (Tabel 4) In de categorie “grenswaarde” (n=25) was er één staal positief (12.82 mg/L) met LC-MS/MS. Het betrof een externe kwaliteitscontrole. Van de overige 24 hadden er 6 een resultaat  $\geq 10$  mg/L op Cobas. De ethanol (gekende interferentie) concentratie in gepaarde plasmastalen van de stalen in de categorie “grenswaarden” (19 beschikbaar) werd nagegaan. De waarden lagen tussen de 1.62 g/L en 3.85 g/L. Algemeen werd aangenomen dat de urinaire concentraties goed correleren met de bloedconcentraties. De aanwezige ethanol gaf een valse toename van 5 mg/L tot 12 mg/L voor het resultaat voor GHB op Cobas. Correctie voor de aanwezige ethanol gaf voor alle stalen een resultaat van < 8 mg/L op Cobas. (Attachment 1)

		GHB kit Bühlmann op c502			
		< 8 mg/L	8-14 mg/L	> 14 mg/L	Totaal
LC-MS/MS	< 10 mg/L	316	24	0	340
	$\geq 10$ mg/L	0	1	23	24
	Totaal	316	25	23	364

Passing-Bablok analyse ( $x = \text{LC-MS/MS}$ ;  $y = \text{Cobas}$ ) toonde een lineaire vergelijking met intercept -2.26 (95% CI -49.65 - +58.94) en helling 0.96 (95% CI 0.37-1.37). (Grafiek 1) De grote variatie kwam door het lage aantal (n=7) stalen waarvoor een kwantitatieve waarde ter beschikking was. De meeste concentraties lagen buiten het meetbereik van de methoden, <10 mg/L en > 250 mg/L voor LC-MS/MS en <8 mg/L en >250 mg/L voor Cobas.

### Conclusie

Er waren geen vals negatieve resultaten en door het aanwezig zijn van een derde categorie (grenswaarden) waren er ook geen vals positieve resultaten. De Bühlmann GHB kit op Cobas kon betrouwbaar gebruikt worden als screeningsmethode.



Grafiek I: Passing-Bablok curve vergelijking GHB kit Bülhmann met LC-MS/MS.

### Interferentie met geautomatiseerde enzymatische test.

Het merendeel van de structureel gelijkende substanties was door Bülhmann op kruisreactie getest. Gekende interferenties voor de GHB kit waren GBL en ethanol zoals hierboven vermeld (Vraag! Enzymatische methoden). Crossreactiviteit van enkele andere, volgens ons mogelijk relevante, substanties werd nog bijkomend nagegaan. Urinestalen met GHB concentraties < 8 mg/L werden gespiked met het mogelijke interferent. De eindconcentratie na spiking was ongeveer dubbel zo groot als de hoogste waarde gevonden in de literatuur. Daarna werd de GHB concentratie opnieuw bepaald met behulp van de Bülhmann kit. Spiking en analyse werden telkens in drievoud uitgevoerd.

### Vitamine C

Het was bekend dat vitamine C vals positieve resultaten kon uitlokken bij de snelle dipstick-GHB screening testen. (Fig 11)

Aan de westkust van Canada leverde een analyse van routine urinestalen concentraties van 71 tot 3408 mg/L vitamine C op. Vitamine C werd gebruikt als oraal supplement in de vorm van 500 mg of 1 g. Controle van urinestalen na 3 tot 7 dagen nemen van supplementen van 500 mg of 1 g gaf respectievelijk volgende concentraties 19-2254 mg/L en 22-2901 mg/L.<sup>[44]</sup>

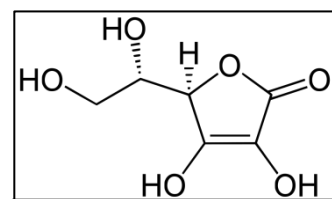


Fig 11: Structuurformule vitamine C

#### Werkwijze

In 2 mL water werd 0.575 g vitamine C (Sigma-Aldrich) opgelost. Van deze oplossing werd 175 µL toegevoegd aan 5 mL GHB negatieve urine. Zo werd een concentratie van 9.72 g/L bekomen. Pipetteren van de geconcentreerde oplossing gebeurde in drievoud. Concentratie van GHB werd op elk staal 3 maal bepaald.

#### Resultaten

Door spiking met vitamine C steeg de GHB concentratie gemiddeld met 3 mg/L. Geen van de stalen had na spiking een GHB resultaat > 10 mg/L. (Attachment 2)

#### Conclusie

Er werd geen klinisch significante interferentie van vitamine C waargenomen.

## Ethyleenglycol

Ethyleenglycol heeft structurele overeenkomsten met zowel GHB als ethanol (gekende interferentie). De drie moleculen hebben een eindstandige hydroxylgroep. (Fig 12)

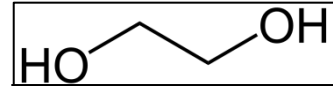


Fig 12: Structuurformule ethyleenglycol

In een Finse studie werden de post mortem concentraties van ethyleenglycol bepaald na fatale vergiftigingen. In de urine werden concentraties tot 18 g/L gevonden.<sup>[45]</sup>

### Werkwijze

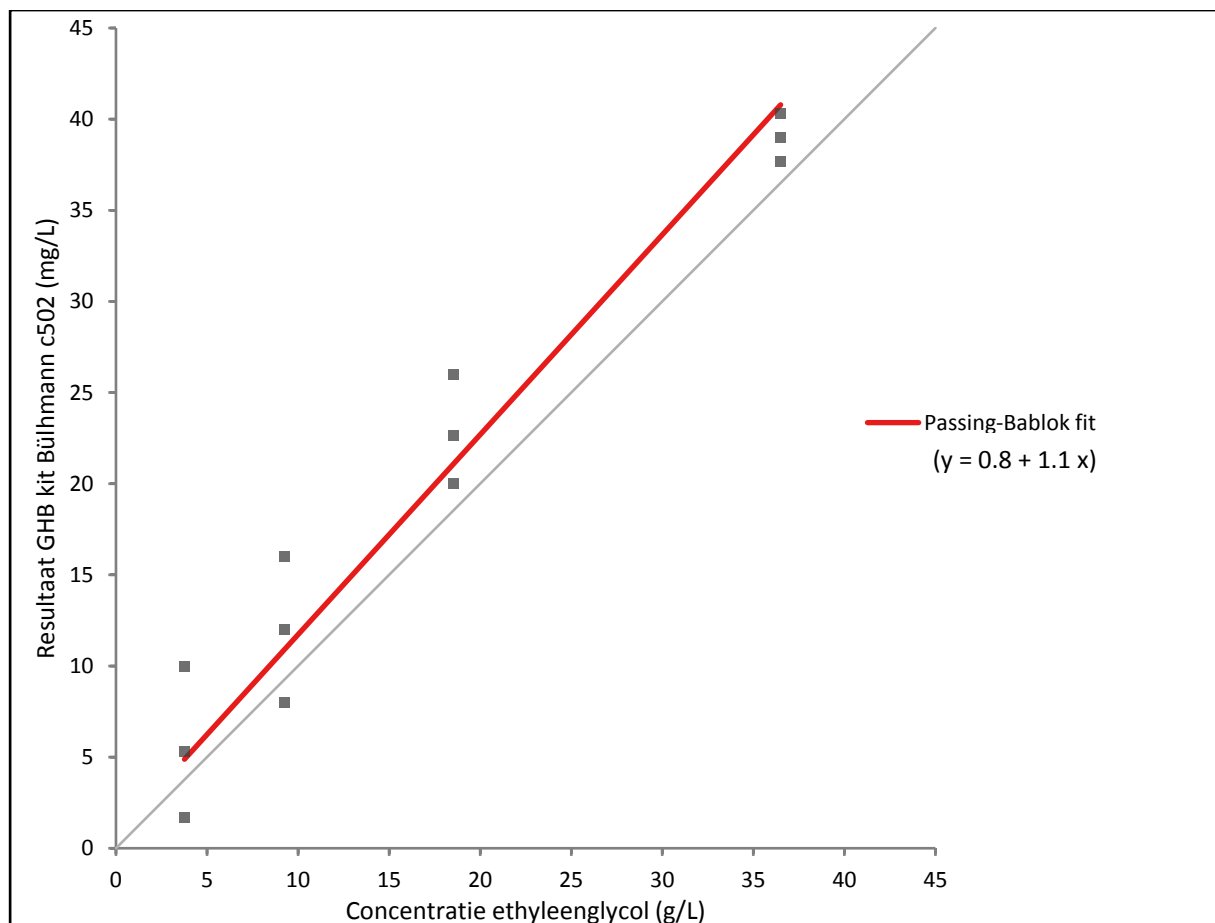
Er werd 170  $\mu$ L ethyleenglycol (Sigma-Aldrich) toegevoegd aan 5 mL GHB negatieve urine, wat een concentratie van ongeveer 36.5 g/L opleverde. Deze verdunning werd 3 maal bereid. Op elk werd de concentratie GHB 3 maal bepaald. Het experiment werd herhaald met lagere concentraties ethyleenglycol (18.6 g/L, 9.6 g/L en 3.8 g/L).

### Resultaten

De gemeten GHB concentratie steeg gemiddeld met 40 mg/L bij de hoogste ethyleenglycol concentratie. Een proportionele resultaat werd waargenomen bij de andere concentraties. Bij alle geteste ethyleenglycol concentraties werden er vals positieve GHB resultaten gevonden. (Attachment 2) Passing-Bablok analyse gaf volgende vergelijking: (Resultaat GHB (mg/L)) =  $0.8 + 1.1(\text{Conc ethyleenglycol (g/L)})$ . (Grafiek 2)

### Conclusie

Er was 0.1 % kruisreactiviteit. Vals positieve resultaten konden voorkomen vanaf ongeveer 4 g/L ethyleenglycol.



Grafiek 2: Passing-Bablok curve concentratie ethyleenglycol met bekomen resultaat met GHB kit Bühlmann.

## Oxalaat

Oxalaat, metaboliet van ethyleenglycol, heeft net zoals GHB een eindstandige carboxylgroep. (Fig 13)

In de Finse studie van ethyleenglycol werd ook gekeken naar de concentratie van oxaalzuur in urine. In de stalen van personen met een ethyleenglycol vergiftiging werden concentraties groter dan 500 mg/L gevonden. Ter vergelijking werd ook in urine van niet geïntoxiceerde personen de oxaalzuur concentratie bepaald. Ook hier werden sporadisch hoge (tot 850 mg/L) concentraties gevonden.<sup>[45]</sup>

### Werkwijze

In 0.5 mL water werd 0.047 g oxaalzuur (Sigma-Aldrich) opgelost. Van deze oplossing werd 100µL toegevoegd aan 5 mL GHB negatieve urine. Zo werd een concentratie van ± 1.8 g/L bekomen. Pipetteren van de geconcentreerde oplossing gebeurde in drievoud. Concentratie van GHB werd op elk staal 3 maal bepaald.

### Resultaten

Een gemiddelde GHB daling van 2 mg/L werd waargenomen. Geen van de stalen had na spiking een GHB resultaat > 10 mg/L. (Attachment 2)

### Conclusie

Er werd geen klinisch significante interferentie van oxalaat waargenomen.

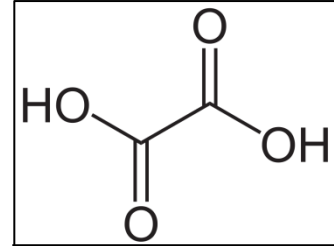


Fig 13: Structuurformule oxaalzuur

## Lactaat

Lactaat heeft ook structurele gelijkenissen met GHB, beide hebben een eindstandige carboxylgroep. (Fig 14)

Urinaire lactaat concentraties waren verhoogd bij bepaalde genetische afwijkingen, maar ook na inspanning waren deze tijdelijk verhoogd.<sup>[46]</sup> In de literatuur werd melding gemaakt van concentraties tot 18g/L na inspanning.<sup>[47-48]</sup>

### Werkwijze

Aan 5 mL GHB negatieve urine werd er 165 µL melkzuur (Sigma-Aldrich) toegevoegd. Een concentratie van 34.6 g/L werd bekomen. Deze handeling werd 3 maal uitgevoerd. Op elk staal werd de concentratie GHB driemaal bepaald.

### Resultaten

Een gemiddelde GHB stijging van 1 mg/L werd waargenomen. Geen van de stalen had na spiking een GHB resultaat > 10 mg/L. (Attachment 2)

### Conclusie

Er werd geen klinisch significante interferentie van lactaat waargenomen.

## Conclusie

De GHB Rapid Test Cassette van Alltest was ongeschikt voor klinisch gebruik wegens een onaanvaardbaar hoge frequentie aan vals-positieve resultaten.

Voor de GHB kit van Bühlmann werd een bijkomende interferentie met ethyleenglycol gevonden (0.1% kruisreactiviteit). De gekende interferentie met ethanol werd bevestigd. Vergelijking van 364 routine stalen toonde geen vals positieve of vals negatieve resultaten. Hierdoor was de GHB kit betrouwbaar voor klinisch gebruik.

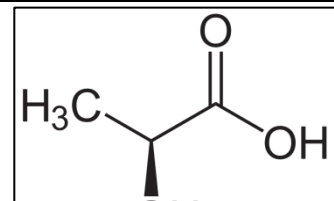


Fig 14: Structuurformule melkzuur



## **To do/ACTIONS**

---

- 1) Invoeren ethanolcorrectie op analyse van Bühlmann.
- 2) Overwegen van enkel confirmatie met LC-MS/MS voor resultaten in de categorie “grenswaarden” na alcoholcorrectie.

**ATTACHMENTS**Attachment I

Tabel met resultaten van stalen in de categorie “grenswaarden” bij analyse met de GHB kit van Bühlmann, met bijhorende ethanol concentratie en correctie.

Staalnummer	Resultaat GHB kit Bühlmann (mg/L)	Ethanol concentratie in plasma (g/L)	Berekende toename in GHB concentratie (mg/L)	Gecorrigeerd resultaat voor GHB kit Bühlmann (mg/L)
50342810	9	3,04	9	< 8
50342858	8	3,49	10	< 8
50343716	8	2,48	7	< 8
50345387	8	2,42	7	< 8
50346915	8	2,81	8	< 8
50346947	8	1,62	5	< 8
50352700	10	3,53	11	< 8
50352800	9	3,16	9	< 8
50354131	10	3,01	9	< 8
50354142	9	3,12	9	< 8
50361872	12	3,34	10	< 8
50363552	8	2,15	6	< 8
50370181	9	3,76	11	< 8
50370482	8	2,74	8	< 8
50370490	8	2,11	6	< 8
50370526	11	3,3	10	< 8
50372319	9	3,5	11	< 8
50372761	9	3,85	12	< 8
50373014	8	2,27	7	< 8

Attachment 2

Tabel met resultaten bekomen bij spiking experiment met mogelijke interferenties voor GHB kit Bühlmann.

Toegevoegde substantie	Hoogste concentratie in literatuur	Staal	Concentratie	Gemiddelde gemeten concentratie GHB	Kruisreactiviteit (%)
Vitamine C	3.408 g/L	1	9.72 g/L	< 8 mg/L	<0.1
		2	9.72 g/L	< 8 mg/L	0.1
		3	9.72 g/L	< 8 mg/L	<0.1
Ethyleenglycol	18 g/L	1	36.5 g/L	40 mg/L	0.1
		2	36.5 g/L	39 mg/L	0.1
		3	36.5 g/L	38 mg/L	0.1
		4	18.6 g/L	26 mg/L	0.1
		5	18.6 g/L	20 mg/L	0.1
		6	18.6 g/L	23 mg/L	0.1
		7	9.6 g/L	8 mg/L	0.1
		8	9.6 g/L	16 mg/L	0.1
		9	9.6 g/L	12 mg/L	0.1
		10	3.8 g/L	10 mg/L	0.2
		11	3.8 g/L	<8 mg/L	0.1
		12	3.8 g/L	<8 mg/L	<0.1
Oxaalzuur	0.85 g/L	1	1.8 g/L	<8 mg/L	0.1
		2	1.8 g/L	<8 mg/L	<0.1
		3	1.8 g/L	<8 mg/L	<0.1
Melkzuur	18 g/L	1	34.6 g/L	<8 mg/L	<0.1
		2	34.6 g/L	<8 mg/L	<0.1
		3	34.6 g/L	<8 mg/L	<0.1