

LC-MS/MS 法研究酒精对人体血液中内源性 GHB 的影响

罗芳¹⁾, 赵瑞斌¹⁾, 李国军²⁾, 付旭宪¹⁾, 范贤谋¹⁾, 苏少明¹⁾, 文云波³⁾, 黄齐林³⁾, 李斌³⁾

(1)昆明市公安局刑事科学技术研究所, 云南昆明 650500; 2)昆明医科大学法医学院, 云南昆明 650500; 3)云南省警官学院, 云南昆明 650221)

[摘要] 目的 运用 LC-MS/MS 法研究酒精对人体血液中内源性 GHB 含量的影响。方法 建立血液中 γ -羟基丁酸(GHB)、 γ -丁内酯(GBL)和1,4-丁二醇(1,4-BD)的LC-MS/MS法, 以22名健康受试者为研究对象, 模拟真实案例饮酒, 测定研究对象饮酒前、饮酒7h后血液中内源性GHB的含量, 比较饮酒前后血液中内源性GHB的含量。结果 GHB在0.1~50 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围、GBL和1,4-BD在0.15~50 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内, 线性关系良好($R^2 > 0.999$), GHB、GBL和1,4-BD的检出限分别为0.015 $\mu\text{g/mL}$, 0.025 $\mu\text{g/mL}$ 和0.01 $\mu\text{g/mL}$, 定量限分别为0.1 $\mu\text{g/mL}$, 0.15 $\mu\text{g/mL}$ 和0.15 $\mu\text{g/mL}$ 。3种目标物的基质效应在18.2%~20.1%之间, 回收率为81.6%~92.3%, 日内和日间精密度的RSD均小于10%, 准确度为-5.8%~7.0%。饮酒7h后血液中内源性GHB浓度范围为0.71~3.81 $\mu\text{g/mL}$, 相比饮酒前GHB含量升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 饮酒7h后人体血液中内源性GHB含量增高, 但浓度低于4 $\mu\text{g/mL}$, 为真实案例涉及的内外源性GHB的判定提供数据支持, 丰富了GHB的法医毒物学数据。

[关键词] γ -羟基丁酸; γ -丁内酯; 1,4-丁二醇; 酒精; LC-MS/MS法

[中图分类号] DF795.4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2095-610X(2024)05-0170-08

Researches on the Effect of Alcohol on Endogenous GHB in Human Blood by LC-MS/MS Method

LUO Fang¹⁾, ZHAO Ruibin¹⁾, LI Guojun²⁾, FU Xuxian¹⁾, FAN Xianmou¹⁾,

SU Shaoming¹⁾, WEN Yunbo³⁾, HUANG Qilin³⁾, LI Bin³⁾

(1) *Research Institution of Criminal Science and Technology of Kunming Public Security Bureau, Kunming Yunnan 650500*; 2) *College of Forensic Medicine, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500*; 3) *Yunnan Police College, Kunming Yunnan 650221, China*)

[Abstract] **Objective** To study the effect of alcohol on endogenous GHB content in human blood. **Methods** LC-MS/MS inspection method was established in the blood for γ -Hydroxybutyric acid (GHB), γ -butyrolactone (GBL) and 1,4-butanediol (1,4-BD). 22 healthy subjects were selected as the research subjects to simulate the real cases of drinking alcohol. The levels of GHB in their blood were detected before and after drinking to compare the endogenous GHB levels in the blood before and after drinking. **Results** GHB in the concentration range of 0.1 ~ 50 $\mu\text{g/mL}$ had a good linear relationship and there was a good linear relationship between GBL and 1,4-BD in the concentration range of 0.15 ~ 50 $\mu\text{g/mL}$ ($R^2 > 0.999$). The limits of detection of GHB, GBL and 1,4-BD were 0.015 $\mu\text{g/mL}$, 0.025 $\mu\text{g/mL}$ and 0.01 $\mu\text{g/mL}$, respectively, and the limits of GHB, GBL and 1,4-BD quantification were 0.1 $\mu\text{g/mL}$, 0.15 $\mu\text{g/mL}$ and 0.15 $\mu\text{g/mL}$. The matrix effects of the three compounds ranged from 18.2% to 20.1%, the recoveries were 81.6% to 92.3%, the intra-day and inter-day precision of RSD were less than 10%, and the accuracy was -5.8%~7.0%. The content of GHB in the blood after 7 hours of drinking were higher than

[收稿日期] 2024-01-12

[基金项目] 云南省刑事科学技术重点实验室创新研究基金资助项目(YNPL-S2021001)

[作者简介] 罗芳(1980~), 女, 重庆万州人, 理学学士, 高级工程师, 主要从事法医毒物分析工作。

[通信作者] 付旭宪, E-mail: 184152817@qq.com

that before drinking alcohol ($P < 0.05$), and the concentration range was 0.71–3.81 $\mu\text{g/mL}$. **Conclusion** The content of endogenous GHB in human blood has increased after 7 hours of drinking alcohol, but the concentration was lower than 4 $\mu\text{g/mL}$, which can provide the data support for the assessment of endogenous and exogenous GHB involved in real cases, enriching the forensic toxicology data of GHB.

[**Key words**] γ -hydroxybutyric acid; γ -Butyrolactone; 1,4-Butanediol; Alcohol; LC-MS/MS method

γ -羟基丁酸(γ -hydroxybutyric acid, GHB), 别名4-羟基丁酸, 分子式 $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_3$, 相对分子质量为104.106, 为粉末状或无色、无味液体, GHB为强效中枢神经系统抑制剂, 摄入人体后可导致暂时性记忆丧失, 又称“听话水”或“迷奸水”, 为我国规定管制的第一类精神药品。GHB目前滥用严重, 引发了大量的药物辅助性犯罪(drug-facilitated sexual assault, DSFA)案件^[1-2], 因此, GHB的分析检测已成为法医学实践中的重要工作之一。由于GHB为哺乳动物体内存在的内源性神经递质, 在处理GHB相关的DSFA案件时, 判定GHB的来源(内源性或外源性?), 已成为涉及GHB案/事件性质判定及死因认定的难题。在法医学实践中, 经常出现GHB与酒精共同使用的情形, 这使得司法鉴定的难度更大, 但目前鲜见酒精对人体血液中内源性GHB影响的报道, 因此, 研究酒精对内源性GHB的影响具有必要性。

酒精和GHB都属于中枢神经系统抑制剂, 外源性GHB能与GABA_B受体结合发挥镇静作用。同时, GHB还可与酒精竞争GABA_B受体, 具有缓解酒依赖或治疗酒精戒断综合征的作用^[3]。有关酒精对GHB的影响研究结果主要来源于动物实验或尸体检材的统计学数据。Moriya F等^[4]研究喝酒和吸烟对尿液中内源性GHB的影响, 发现尼古丁能够在夜间增加尿液中内源性GHB的释放, 而酒精对尿液中内源性GHB的释放无影响。Poldrugo F等^[5]研究认为酒精会增加内源性1,4-BD在大鼠组织中的分布, 并增强1,4-BD的毒性作用。Jung等^[6]研究了酒精和GHB的相互作用及药(毒)代动力学, 发现乙醇会诱导GHB的中枢抑制作用, 延长大鼠的睡眠时间。在法医学实践中常用50 $\mu\text{g/mL}$ 作为血液中内外源性GHB的判定阈值, 而该阈值浓度主要来源于尸体检材中GHB的统计学数据^[7-10], 目前, 鲜见关于酒精影响下血液中GHB的含量数据, 因此, 为实现精准法医学鉴定, 提升司法鉴定的证据效用, 亟需研究酒精对人体血液中内源性GHB的影响。

本研究为解决1例涉及疑似酒精和GHB合用的重特大案件的法医学问题, 首先建立了人体血

液中GHB及其2种前体物质GBL和1,4-BD的LC-MS/MS检测方法, 并以22名健康受试者为研究对象, 饮酒时模拟该案的案情经过, 测定研究对象饮酒前、饮酒7h后血液中内源性GHB的含量, 研究饮酒7h后人体(活体)血液中内源性GHB的含量变化, 为真实案例和类似案例涉及的内外源性GHB的判定提供数据支持, 丰富酒精对人体血液中内源性GHB影响的法医毒物学数据。

1 材料与方法

1.1 实验仪器与试剂

仪器: Agilent 1290/6470型LC-MS/MS液质联用仪(美国Agilent公司); 高速离心机(US Beckman公司); 涡旋混合仪(ShangHaiYiheng Technology Co., Ltd); 电子天平(美国METTLER TOLEDO公司); JOYN-308超声波清洗机(Shanghai Qiaoyue Electronic Technology Co., Ltd); 0.22 μm 有机微孔滤膜(Tianjin JintengCo, Ltd); 移液器(US Eppendorf Company)。

试剂: γ -羟基丁酸钠甲醇溶液(100 $\mu\text{g/mL}$)、GHB-D₆甲醇溶液(100 $\mu\text{g/mL}$)、GBL-丙酮溶液(100 $\mu\text{g/mL}$)、1,4-BD-甲醇溶液(100 $\mu\text{g/mL}$)均购于天津阿尔塔科技有限公司, 甲醇(HPLC级购于美国Fisher Scientific公司), 氟化钠(分析纯购于上海陆都化学试剂厂), 实验水为屈臣氏纯净水, 饮用酒为大理啤酒(云南大理啤酒股份有限公司, 酒精度为4度)。

1.2 饮酒过程及样品采集

1.2.1 研究对象 22名健康受试者均为自愿参加本研究, 并签署知情同意书。

1.2.2 实验分组 将22名健康受试者, 随机分为3组, 低饮酒量组7名(3次饮酒量共计1000 mL)、中饮酒量组8名(3次饮酒量共计2000 mL)、高饮酒量组7名(3次饮酒量共计4000 mL), 3组均模拟案情中的饮酒过程分3个时间段饮酒(用餐后2h第1次饮酒, 3次饮酒间隔时间均为2h, 在不同场所餐后或随餐饮酒期间, 均同时饮用冰红

茶/苏打水等饮料), 3 次饮酒量比例为 2 : 1 : 1。

1.2.3 静脉血的采集 依据静脉血液标本采集指南^[11](WS/T661-2020), 分别于饮酒前和饮酒 7 h 后采集静脉血 5 mL 于真空抗凝管中(内含肝素), 混匀后置于-20 °C 冷冻保存备用。

1.3 样品前处理

1.3.1 空白血样制备 取健康空白人血(筛选出 GHB 浓度最低的血液作为空白血)100 μ L, 加入 100 μ L 内标工作液 GHB-d6 (10 μ g/mL), 再加入 800 μ L 甲醇:水(1:1), 得到添加内标浓度为 1 μ g/mL 的空白血样, 涡旋混匀 30 s, 超声 10 min, 9000 r/min 离心 10 min, 移取上清液, 有机滤膜(0.22 μ m)过滤, 得到空白血样, 待检。

1.3.2 空白血添加样的制备 取健康空白人血 100 μ L 共 2 份, 加入 100 μ L 内标工作液 GHB-d6 (10 μ g/mL), 添加 10 μ L GHB 及其 2 种前体物质的混标溶液(浓度为 100 μ g/mL)后, 再加入 790 μ L 甲醇:水(1:1), 配制成 GHB 及其 2 种前体物质浓度为 1 μ g/mL 的空白血加标样, 按 1.3.1 方法处理, 得到空白血添加样(3 种目标物浓度均为 1 μ g/mL), 待检。

1.3.3 校准系列样品制备 取健康空白人血 100 μ L 共 20 份, 各加入 100 μ L 内标工作液 GHB-d6 (10 μ g/mL)后, 分别添加适量 GHB 及其 2 种前体物质的混标溶液后, 再加入适量的甲醇:水(1:1)使总体积为 1 mL, 配制成系列浓度的空白血加标样, 按 1.3.1 方法处理, 得到浓度为 0.1 μ g/mL、0.15 μ g/mL、0.2 μ g/mL、0.5 μ g/mL、1 μ g/mL、2.5 μ g/mL、5 μ g/mL、10 μ g/mL、25 μ g/mL、50 μ g/mL 的校准系列浓度样品(每个浓度 2 份平行样), 用于测绘校准曲线。

1.3.4 待测样品制备 分别取 22 名健康受试者饮酒前和饮酒 7 h 后的静脉血 100 μ L 各 2 份, 各加入 100 μ L 内标工作液 GHB-d6 (10 μ g/mL), 再加入 800 μ L 甲醇:水(1:1)后, 按 1.3.1 方法处理, 得到 22 名健康受试者饮酒前和饮酒 7 h 后的静脉血待测样品, 待检。

1.4 实验方法

1.4.1 色谱条件 色谱柱: Waters T3 (2.1 mm \times 100 mm, 1.8 μ m); 流动相 A: 超纯水, 流动相 B: 甲醇; 柱温: 30 °C; 流速: 0.3 mL/min; 进样量: 5 μ L; 后平衡时间 1.0 min, 梯度洗脱条件, 见表 1。

1.4.2 质谱条件 离子源: 电喷雾电离源(electrospray ionization, ESI), 动态多反应监测(dynamic

表 1 HPLC 梯度洗脱条件

Tab. 1 HPLC gradient elution conditions

时间/min	流动相A(%)	流动相B(%)
0.00	90	10
0.5	90	10
2.5	10	90
3.0	10	90
3.1	90	10
6.0	90	10

multiple reaction monitoring, d-MRM)正、负离子模式扫描。干燥气温度 300 °C; 干燥气流速 5 L/min; 鞘气温度 350 °C, 鞘气流速 11 L/min; 毛细管电压为: 3500 V, 喷嘴电压: 500 V; 喷雾器压力为 45 psi。

1.4.3 方法学考察 (1)线性和灵敏度考察。在 1.4.1 检测条件下, 分别测定 1.3.3 得到的校准系列样品(浓度为 0.1 μ g/mL、0.15 μ g/mL、0.2 μ g/mL、0.5 μ g/mL、1 μ g/mL、2.5 μ g/mL、5 μ g/mL、10 μ g/mL、25 μ g/mL、50 μ g/mL), 以峰面积比值(各目标物的定量离子峰面积/内标定量离子峰面积)为纵坐标(Y)、以校准系列样品中添加的对应目标物浓度为横坐标(X), 进行线性回归, 计算得到 3 种目标物的校准曲线。检出限、定量限确定: 依据校准曲线最低浓度点的信噪比, 配制低浓度空白血添加样品, 在 1.4.1 检测条件下检测, 以信噪比(signal-noise ratio, S/N)大于 3 作为检出限(limit of detection, LOD)的检验水准, 以(S/N)大于 10, 且相对误差 $\leq \pm 20\%$, 作为最低定量限(limit of quantification, LOQ)的检验水准, 分别计算得到 3 种目标物的检出限和定量限。(2)基质效应和回收率考察。配制浓度为 1 μ g/mL、5 μ g/mL、25 μ g/mL 的 GHB、1,4-BD 和 GBL 的混标溶液; 另取 6 份 1.3.1 制备得到的空白血样残渣, 分别添加适量的 3 种目标物混合标准溶液, 配制成 3 种目标物浓度均为 1 μ g/mL、5 μ g/mL、25 μ g/mL 的空白血基质后添加样品(每个浓度 2 份平行样); 同时按 1.3.2 制备 3 种目标物浓度均为 1 μ g/mL、5 μ g/mL、25 μ g/mL 的空白血添加样品(每个浓度 2 份平行样), 在 1.4.1 检测条件下测定上述样品, 分别计算不同浓度混标溶液中各目标物定量离子峰面积平均值 Astd、不同浓度空白血基质后添加样品中各目标物定量离子峰面积平均值 Am、不同浓度空白血添加样品中各目标物定量离子峰面积平均值 As, 依据公式 $A_s/A_m \times \%100$ 计算提取回收率、依据 $(A_m/A_{std}-1) \times \%100$ 计算基质效应。

(3)精密度考察。按 1.3.2 制备 3 种目标物浓度均为 1 $\mu\text{g/mL}$ 、5 $\mu\text{g/mL}$ 、25 $\mu\text{g/mL}$ 的空白血添加样品 ($n=6$), 在 1.4.1 检测条件下进行 5 个批次的检测。前 3 个批次分别在同 1 d 内的早、中、晚进行样品检测, 后两个批次分别在接下来的 2 d 进行检测。分别记录各目标物定量离子峰面积, 计算相同目标物对应浓度定量离子峰面积的相对标准偏差(RSD), 精密度用相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)表示。不同浓度各目标物定量离子峰面积, 经线性方程计算获得各样品中 3 种目标物的测定值, 再计算准确度(偏倚值表示)。(4)稳定性考察。据文献报道^[5], 在样本储存过程中, 血液中 GHB 的浓度中会增加, 因此, 取适量空白血液, 加入不同浓度的 3 种目标物的混标应用液及氯化钠溶液, 配制质量浓度分别为 5 $\mu\text{g/mL}$ 、25 $\mu\text{g/mL}$ 、40 $\mu\text{g/mL}$ 的空白血添加样 27 份, 每个浓度 9 份(每份样品内含 1% 的氯化钠)。将样品分成 3 组: 1 组于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻 24 h 后在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴溶解, 经历 3 次冷冻循环; 2 组于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存 15 d, 第 3 组即时按 1.3.2 处理后

测定。每组每 1 浓度进样分析 3 次, 进样后室温放置 24 h 后再次进样分析, 以第 3 组样品的保留时间、离子丰度比的相对误差为定性判定参照, 以各目标物对应浓度定量离子峰面积为定量参照, 计算第 1、2 组 3 个目标物不同浓度定量离子峰面积的相对标准偏差。

1.5 统计学处理

采用 SPSS26.0 软件对数据进行处理, 计量资料用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 饮酒前后差异采用配对 t 检验。检验水准 α 取 0.05, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 分析条件优化

2.1.1 质谱条件的优化 采用 ESI 电离源, 运用 d-MRM 扫描模式, 优化碎裂电压、碰撞能量等质谱参数, 使目标物和内标的准分子离子与特征碎片离子产生的离子对响应值最大, 得到 4 种化合物的质谱参数, 见表 2。

表 2 GHB、GHB- d_6 、1,4-BD、GBL 的 d-MRM 离子、碎裂电压及碰撞能
Tab. 2 The acquisition parameters, fragmentation voltage and collision energy of d-MRM, GHB, GHB- d_6 , 1,4-BD, GBL

目标物	扫描模式	母离子(m/z)	子离子(m/z)	碎裂电压(v)	碰撞能(ev)
GHB	ESI-	103.0	103.0/85.1*	65	8
			103.0/57.1		12
GHB- d_6	ESI-	109.0	109.0/61.1*	60	8
			109.0/90.0		16
1,4-BD	ESI+	91.1	91.1/73.0*	30	4
			91.1/55.0		12
GBL	ESI+	87.0	87.0/45*	66	20
			87.0/43		24

注: *为定量离子。

2.1.2 流动相的选择 研究发现, 选用甲醇为有机相, 其分离度和色谱峰型优于乙腈。本实验还分别考察了 0.2 mL/min、0.25 mL/min、0.3 mL/min、0.35 mL/min、0.4 mL/min 的流速及流动相洗脱梯度的分析效果, 结果表明在 0.3 mL/min 流速条件下, 采用表 1 的洗脱梯度, 可实现 GHB、1,4-BD 和 GBL 的保留和有效分离, 见图 1、图 2。

2.2 方法验证

2.2.1 线性关系、方法的检出限、定量限 经 1.4.3(1)标准曲线绘制得到 3 种目标物的校准曲线,

见表 3。结果表明: GHB 在 0.1 ~ 50 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围、GBL 和 1,4-BD 在 0.15 ~ 50 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内线性关系良好 ($R^2 > 0.999$)。可得 GHB、GBL 和 1,4-BD 的检出限分别为 0.015 $\mu\text{g/mL}$ 、0.025 $\mu\text{g/mL}$ 和 0.01 $\mu\text{g/mL}$; 定量限分别为 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 、0.15 $\mu\text{g/mL}$ 和 0.15 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.2.2 基质效应和回收率 经 1.4.1(2)结果表明: 3 种目标物的提取回收率在 81.6% ~ 92.3% 之间, 基质效应均在 18.2% ~ 20.1% 以内, 其相对标准偏差(RSD)在 7.0% 以内 ($< 15\%$), 该方法的提取回

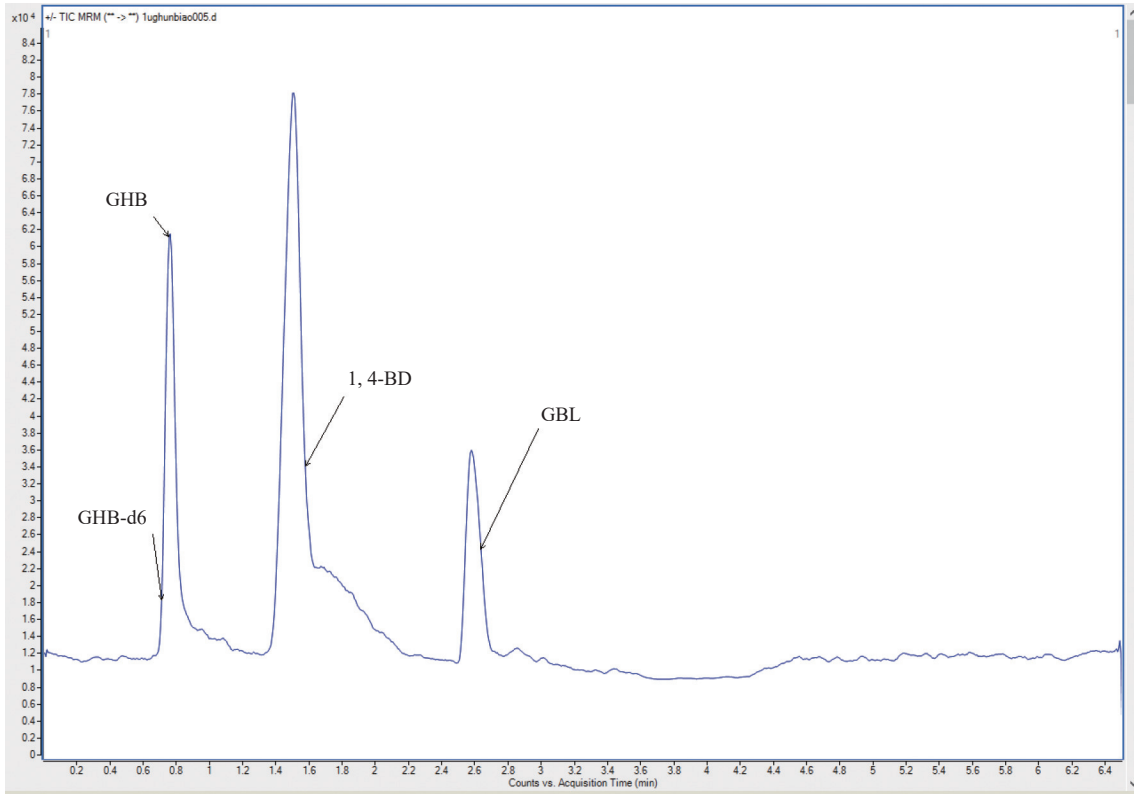


图 1 GHB、GHB-d₆、1,4-BD 和 GBL 4 种混标(1 μg/mL)的TIC 色谱峰图

Fig. 1 TIC chromatograms of GHB, GHB-d₆, 1,4-BD, and GBL mixed standards (1 μg/mL)

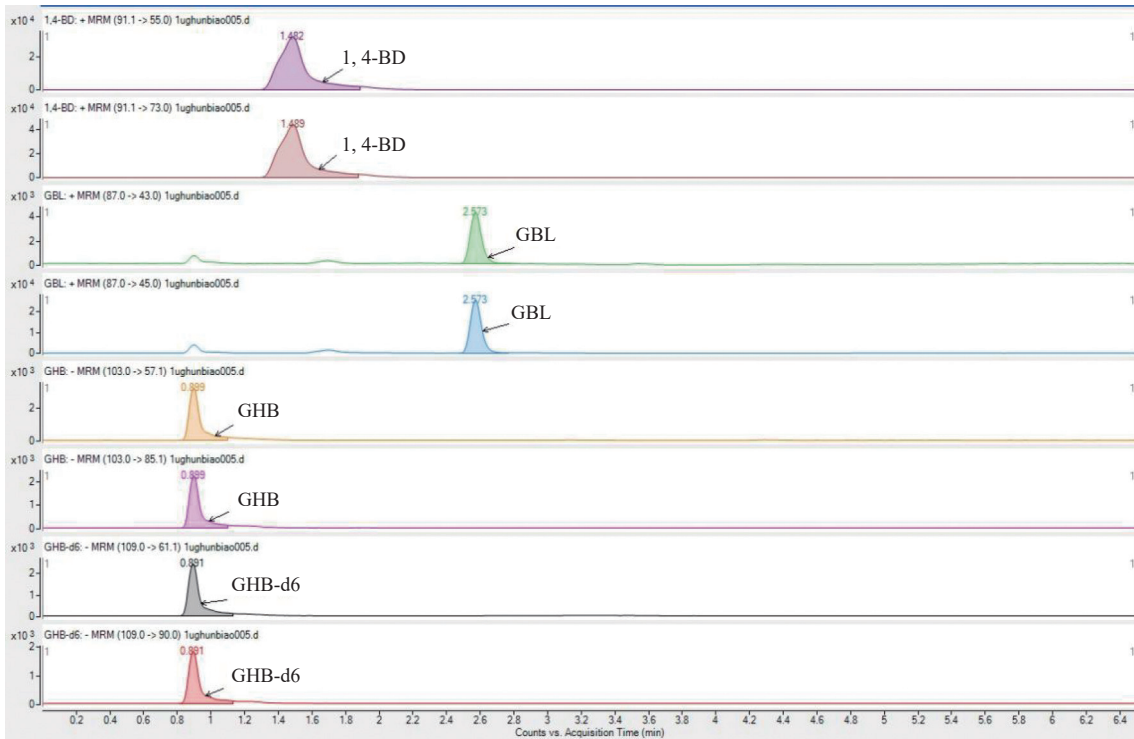


图 2 GHB、GHB-d₆、1,4-BD、GBL 4 种混标(1 μg/mL)的d-MRM 色谱图

Fig. 2 D-MRM chromatograms of GHB, GHB-d₆, 1,4-BD, and GBL mixed standards (1 μg/mL)

收率高, 基质效应影响在可接受范围内($< \pm 25\%$), 见表 4。

2.2.3 日内精密度和日间精密度的RSD在经 1.4.1(3)结果显示各目标物峰面积的日内精密度的RSD在

表3 血液中GHB、1,4-BD、GBL的校准曲线、检出限和定量限

Tab. 3 Calibration curve, detection limit and quantitation limit of GHB 1,4-BD GBL in blood

化合物	线性范围($\mu\text{g/mL}$)	线性回归方程	R^2	检出限($\mu\text{g/mL}$)	定量限($\mu\text{g/mL}$)
GHB	0.1 ~ 50	$Y=22.288925X-0.955609$	0.9993	0.015	0.1
1,4BD	0.15 ~ 50	$Y=151049.912950X+57464.367658$	0.9992	0.01	0.15
GBL	0.15 ~ 50	$Y=16316.378144X+105811.540171$	0.9995	0.025	0.15

表4 3种目标物的基质效应与提取回收率(%)

Tab. 4 Matrix effects and extraction recovery rates of three target substances(%)

化合物名称	浓度($\mu\text{g/mL}$)	基质效应	相对标准偏差RSD	提取回收率	相对标准偏差RSD
GHB	1	20.0	4.6	81.9	6.3
	5	20.1	3.8	86.2	4.2
	25	19.8	6.1	92.3	4.8
1,4-BD	1	18.2	4.6	81.6	6.4
	5	18.4	3.9	87.4	4.5
	25	19.0	2.3	89.3	6.7
GBL	1	19.2	6.2	83.7	4.4
	5	18.9	1.3	85.6	3.2
	25	18.2	5.1	84.5	4.6

1.2%~8.8%, 日间精密度的RSD在1.4%~9.8%; 日内日间RSD均在15%以内, 见表5。不同浓度各目标物定量离子峰面积, 经线性方程计算获得各样品中3种目标物的测定值, 再计算准确度(偏倚值表示), 结果表明, GHB、1,4-BD和GBL的偏倚值分别为-4%~0.8%、-5.8~-0.52%、-0.08~7%, 偏倚值均在允许范围内($< \pm 15\%$)。

2.2.4 稳定性 经1.4.3(4)得到第1、2组3个目标物不同浓度定量离子峰面积RSD $< 5.0\%$, 定量偏倚值均 $< 15.0\%$, 结果表明, 血液中的GHB冻融稳定性、长期稳定性、处理后样品的稳定性均符合生物样品测定的要求。

2.3 饮酒前后血液中GHB的含量测定及分析

2.3.1 饮酒前后血液中GHB含量测定 在1.4.1检测条件下, 分别测定1.3.4制备得到的22名健康受试者饮酒前、饮酒7h后的待测样品, 采用2.2.1的校准曲线进行各待测样品中3种目标物的定量分析, 得到的22名健康受试者饮酒前、饮酒7h后血液中GHB浓度, 见表6。

2.3.2 饮酒对血液中内源性GHB含量的影响

饮酒对血液中内源性GHB含量的影响有统计学意义, 饮酒7h后血液中内源性GHB的含量高于饮酒前血液中内源性GHB的含量($P < 0.05$), 见表7。

2.4 与该研究相关的实际案例

案例: xx年xx月x日, 一女子饮酒后不明原因落水, 48h后被发现并打捞, 尸体解剖后提取锁骨下静脉血进行毒物分析检验, 检验结果为: 锁骨下静脉血中检出酒精浓度为96.0 mg/100 mL, 未检出其他常见毒物毒品。后经案情调查了解到: 该女子落水前9h曾3次(用餐后2h第1次饮酒, 3次饮酒间隔时间均接近2h, 饮酒7h后落水)在不同场所餐后或随餐饮酒, 其间均同时饮用冰红茶/苏打水等饮料; 该女子3次共饮用酒精度为4度的啤酒4瓶(500 mL/瓶), 且涉嫌饮用添加有GHB的啤酒及饮料的可能。因此, 应用本文中建立的LC-MS/MS法对血液中GHB进行检测, 检测结果见表8。

表5 3种目标物的精密度及准确度

Tab. 5 Precision and accuracy of 3 target substances

目标物	添加浓度($\mu\text{g/mL}$)	日内精密度			日间精密度		
		平均检测浓度($\mu\text{g/mL}$)	相对标准偏差RSD (%)	偏倚值 (%)	平均检测浓度($\mu\text{g/mL}$)	相对标准偏差RSD (%)	偏倚值 (%)
GHB	1	0.96	5.4	-4.0	1.02	4.8	-2.0
	5	5.04	6.4	0.8	4.93	9.5	1.4
	25	24.83	7.7	-0.68	24.92	3.8	-0.32
1,4-BD	1	0.95	4.3	-5.0	0.98	7.4	-2.0
	5	4.71	2.2	-5.8	4.93	7.3	-1.4
	25	24.87	2.6	-0.52	24.96	7.3	-0.16
GBL	1	1.07	8.8	7.0	0.98	9.8	-2.0
	5	5.01	4.6	0.2	5.03	5.6	0.6
	25	24.98	1.2	-0.08	25.02	1.4	-0.08

表 6 饮酒前和饮酒 7 h 后血液中 GHB 和酒精含量检测结果($\mu\text{g/mL}$)Tab. 6 GHB and alcohol content in blood before and 7 hours after drinking alcohol ($\mu\text{g/mL}$)

志愿者	性别	实验分组	饮酒量(mL)	饮酒前	饮酒 7 h 后
				GHB	GHB 量
1	女	低剂量组	1000	0.63	0.84
2	女			0.66	0.81
3	女			0.84	1.22
4	男			0.34	0.71
5	男			1.69	2.02
6	男			0.86	0.99
7	男			0.71	0.77
8	女	中剂量组	2000	0.28	1.26
9	女			0.76	1.58
10	女			0.49	1.34
11	女			1.29	1.71
12	男			1.52	3.81
13	男			1.14	3.14
14	男			1.50	1.87
15	男	高剂量组	4000	0.96	2.86
16	女			0.71	0.86
17	女			1.22	1.67
18	女			0.62	0.87
19	女			1.86	2.26
20	男			1.68	1.88
21	男			1.49	2.36
22	男			1.11	2.80

3 讨论

本研究建立了人体血液中 GHB 及其 2 种前体物质 GBL 和 1,4-BD 的 LC-MS/MS 检测方法,方法验证结果表明方法的灵敏度高、准确性好,适用于实际案件人体血液中 GHB 及其 2 种前体物质的检测。采用本文建立的 LC-MS/MS 方法测定模拟实际案例饮酒方式的 22 名健康受试者饮酒前、饮酒 7 h 后血液中 GHB 的含量,饮酒前静脉血中 GHB 的浓度范围为 0.28 ~ 1.86 $\mu\text{g/mL}$,平均值为 1.02 $\mu\text{g/mL}$,饮酒 7 h 后静脉血中 GHB 的浓度范围为 0.71 ~ 3.81 $\mu\text{g/mL}$,平均值为 1.71 $\mu\text{g/mL}$,统

计学分析表明饮酒 7 h 后血液中 GHB 含量高于饮酒前 ($P < 0.05$),但浓度增幅范围为 8.0% ~ 350.0%,可能与样本量有限、乙醇体内代谢、个体差异、饮酒方式有关。

本研究结果说明,模拟实际案例饮酒 7 h 后人体血液中 GHB 的含量会升高,但浓度均低于 4 $\mu\text{g/mL}$;而实际案例尸体血液(锁骨下静脉血)中的 GHB 含量为 10.0 $\mu\text{g/mL}$,比模拟案例的研究结果 ($< 4 \mu\text{g/mL}$) 更高。分析原因可能与实际案例尸体所处环境的温湿度及生前饮酒有关。例如有研究发现,死后尸体会产生 GHB,且死后产生的 GHB 与性别、年龄和死亡方式无关,但与生前摄入毒物、尸体的储存环境、尸体的腐败程度相关^[7, 9, 12-13]。Darke S^[14] 等分析了生前口服过 GHB 的 74 例尸体血中 GHB 的浓度,发现生前有酒精、新精神活性物质和安眠药等摄入史均会引起血液中 GHB 的显著升高,平均浓度达到 210 $\mu\text{g/mL}$ (浓度范围为 13 ~ 1350 $\mu\text{g/mL}$),实际案例检测结果 (10.0 $\mu\text{g/mL}$) 在文献报道值^[7, 9, 12-16] 的范围内,结合实际案例中死者落水时的河水水温约为 20 $^{\circ}\text{C}$,尸体在水中浸泡了 48 h,结合尸体征象及解剖所见,不能排除死后产生 GHB 导致其血液中 GHB 升高的可能。因此,结合本研究结果可以初步判定实际案例血中 GHB 为内源性或死后产生,该结论与后续案情调查结果吻合,可为后续实际案例的性质判定和侦破提供证据和线索。

模拟实际案例饮酒方式的 22 名健康受试者饮酒 7 h 后静脉血液中内源性 GHB 的含量均较饮酒前高,表明乙醇可诱导内源性 GHB 的释放增加,其机制可能和酒精与 GABA 受体结合后刺激 GABA 的产生,造成血液中 GABA 转化产生的 GHB 增多^[17],具体机制有待进一步研究。因本研究主要为解决实际案例问题而设计,故未研究饮酒后不同时间血液中内源性 GHB 的变化,因此不能解释乙醇诱导内源性 GHB 增加的原因。但本研究结果可以说明,对于未摄入过 GHB 的人体,饮酒方式与本研究相似时,饮酒 7 h 后静脉血中内源性 GHB 的浓度常低于 4 $\mu\text{g/mL}$,在法医学实践中,当血液中 GHB 的浓度大于 4 $\mu\text{g/mL}$ 时应综合考虑案情、饮酒时间、饮酒方式、血液采集时间、样

表 7 饮酒前和饮酒 7 h 后血液中内源性 GHB 含量的情况 [$(\bar{x} \pm s)$, $\mu\text{g/mL}$]Tab. 7 The content of endogenous GHB levels in the blood before and 7 hours after drinking [$(\bar{x} \pm s)$, $\mu\text{g/mL}$]

组别	<i>n</i>	饮酒前	饮酒 7 h 后	饮酒前后差值	<i>t</i>	<i>P</i>
实验组	22	1.02 \pm 0.47	1.71 \pm 0.87	0.69 \pm 0.40	-4.840	0.000*

* $P < 0.05$ 。

表8 案例血液样品中GHB($\mu\text{g/mL}$)、酒精($\text{mg}/100\text{ mL}$)的含量

Tab. 8 Contents of GHB ($\mu\text{g/mL}$) and alcohol ($\text{mg}/100\text{ mL}$) in case blood samples

样品名称	目标物	检测结果
锁骨下静脉血	GHB	10
锁骨下静脉血	酒精	96

本来源、尸体保存条件等因素对血液中GHB的影响,才能客观科学的判定血液中GHB的来源。

[参考文献]

- [1] 董慧茜,沈屹东,郝伟. 新型毒品 γ -羟基丁酸中毒、戒断的研究 [J]. 中国药物依赖性杂志, 2013, 22(6): 401-407, 411.
- [2] 段炼,蓝晓嫦,杨欣湖. 使用“G水”所致精神和行为障碍一例 [J]. 中国药物滥用防治杂志, 2021, 27(3): 381-383, 387.
- [3] Mannucci C, Pichini S, Spagnolo E V, et al. Sodium oxybate therapy for alcohol withdrawal syndrome and keeping of alcohol abstinence [J]. *Current Drug Metabolism*, 2018, 19(13): 1056-1064.
- [4] Moriya F, Nishimura H, Furumiya J, et al. Effects of drinking and smoking on endogenous levels of urinary γ -hydroxybutyric acid, a preliminary study [J]. *Legal Medicine*, 2006, 8(4): 231-234.
- [5] Poldrugo, F, Barker, S, Basa, M, et al. Ethanol potentiates the toxic effects of 1,4-butanediol [J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 1985, 9(6): 493-497.
- [6] Jung, S, Kim, M, Kim, S, et al. Interaction between γ -Hydroxybutyric acid and ethanol: A review from toxicokinetic and toxicodynamic perspectives [J]. *Metabolites*, 2023, 13(2): 180.
- [7] Küting T, Madea B, Hess C, et al. Comparative study: Postmortem long-term stability of endogenous GHB in cardiac blood, femoral blood, vitreous humor, cerebrospinal fluid and urine with and without sodium fluoride stabilization [J]. *Journal of Analytical Toxicology*, 2022, 46(5): 519-527.
- [8] Korb A S, Cooper G. Endogenous concentrations of GHB in postmortem blood from deaths unrelated to GHB use [J]. *Journal of Analytical Toxicology*, 2014, 38(8): 582-588.
- [9] 李润康,何洪源,李佳宜,等. 生物样品中 γ -羟基丁酸的检验方法与阈值研究 [J]. *分析测试学报*, 2021, 40(4): 488-494.
- [10] Elian A A. Determination of endogenous gamma-hydroxybutyric acid (GHB) levels in antemortem urine and blood [J]. *Forensic Science International*, 2002, 128(3): 120-122.
- [11] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 静脉血液标本采集指南 [J]. *中国实用乡村医生杂志*, 2020, 27(5): 7-11.
- [12] Kietzerow J, Otto B, Wilke N, et al. The challenge of post-mortem GHB analysis: storage conditions and specimen types are both important [J]. *International Journal of Legal Medicine*, 2020, 134(1): 205-215.
- [13] Ha H H, Mata D C, Vargas J R. Endogenous gamma-hydroxybutyrate in postmortem samples [J]. *J Anal Toxicol*, 2020, 44(3): 263-267.
- [14] Darke S, Peacock A, Duffou J, et al. Characteristics and circumstances of death related to gamma hydroxybutyrate (GHB) [J]. *Clinical Toxicology*, 2020, 58(11): 1028-1033.
- [15] Paolo F B, Wayne A J. Interpreting γ -hydroxybutyrate concentrations for clinical and forensic purposes. [J]. *Clinical Toxicology (Philadelphia, Pa.)*, 2019, 57(3): 149-163.
- [16] Kugelberg F C, Holmgren A, Eklund A, et al. Forensic toxicology findings in deaths involving gamma-hydroxybutyrate [J]. *International Journal of Legal Medicine*, 2010, 122(1): 1-6.
- [17] Caputo F, Vignoli T, Tarli C, et al. A brief up-date of the use of sodium oxybate for the treatment of alcohol use disorder [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2016, 13(3): 290-290.