

TOXIKOLOGICKÁ VYŠETŘENÍ

Toxikologie je vědní obor zabývající se jedovatými látkami. Jed je taková látka, která po vniknutí do organismu působí chorobné změny, které mohou vést až ke smrti. Soubor změn, které nastanou v organismu působením jedu, se nazývá otrava (intoxikace). V praxi se setkáváme s lékovými a nelékovými otravami. Do organismu se jed může dostat vdechováním, vstřebáváním přes sliznice a kůži a injekčně. Vnik jedu do organismu může být náhodný, úmyslný, profesionální, medicínský. Další příčinou otravy může být toxikománie. **Klinická toxikologie** zkoumá účinky jedů na organismus. Chemicko-analytická toxikologie studuje chemickou stránku jedů, jejich výrobu, zabývá se možnostmi izolace jedů, jejich výrobou, jejich reakcemi a identifikací. Izolace jedů z biologických materiálů a jejich identifikace je velmi náročná analytická práce. Náročnost se zvyšuje tím, že téměř nikdy nevíme, který jed bude předmětem rozboru, zda bude v původní formě nebo metabolizován. Obtížnost izolace a důkazu jedu v biologických materiálech je dána přítomností celé řady látek, které ruší při detekci nebo vyvolávají spolu s jedy různé vedlejší interakce. Vzájemné interakce jsou podmíněny typem jedu, jeho stabilitou, množstvím a dobou působení v organismu. Proto je nutné provést odběr biologického materiálu v co nejkratší možné době.

V toxikologii se nejčastěji vyšetřují tyto biologické materiály:

1. žaludeční obsah nebo zvratky (v tomto materiálu můžeme najít látku v původní formě)
2. krev
3. moč (zachycujeme látky v podobě metabolitů)
4. vydechovaný vzduch
- 5 jiné (vlasy, nehty, části orgánů apod.)

ALGORITMUS TOXIKOLOGICKÉHO VYŠETŘENÍ

1. Dokumenty anamnestických údajů (pro analytika zdroj velmi důležitých informací)

- popis příznaků otravy
- používané léky
- přibližná doba požití jedu
- podezření na konkrétní jed

2. Popis a dokumentace materiálu:

- hodina odběru a druh materiálu

- skladování
- množství
- vzhled

Biologický materiál nikdy nekonzervujeme chemicky, pokud je to nutné, uchováváme jej v chladničce nebo mrazničce.

3. Analytická práce:

- úprava biologického materiálu
- izolace jedu
- provedení reakce
- identifikace

1. Dokumentace:

- popis použitých metod
- standardní roztoky
- výsledky

V toxikologické analytice se nejčastěji pracuje s těmito metodami:

- fotometrie
- atomová absorpční spektrofotometrie (AAS)
- polarografie
- chromatografie (TLC – tenká vrstva nejčastěji).

PRAKTICKÁ ČÁST

1. Chromatografie na tenkých vrstvách

Přístroje: UV – lampa (s vlnovou délkou 254 a 366 nm), fén, vodní lázeň.

Materiál a chemikálie: chromatografické desky – plastické folie silikagel 60 F254 (firma Merck), třecí misky, zásobní lékovky, nádobka na moč, dělicí nálevka, odpařovací misky, kádinky, sada automatických pipet, hamiltonky, tužka, pravítko, chromatografická vana, rozprašovač, ependorfky se šroubovým uzávěrem, pH–papírky, Ramsay tuk, 96 % ethanol, chloroform, ether, kyselina chlorovodíková (1:1), 50 % hydroxid sodný, síran sodný bezvodý,

vyvíjecí soustava: ethylacetát : methanol : amoniak (34 : 4 : 2),

detekční činidla:

1. konc. H_2SO_4 : ethanol (1:1) (činidlo připravovat v ledové lázni, po kapkách přidávat kyselinu do vychlazeného ethanolu).

2. Dragendorffovo činidlo:

Roztok I : Dusičnan bismutitý (850 mg) se rozpustí v 10 ml kyseliny octové a 40 ml vody.

Roztok II: Jodid draselný (8 g) se rozpustí ve 20 ml vody.

Oba roztoky se smísí a uchovávají se v hnědé láhvi i několik měsíců. Před použitím se 10 ml tohoto zásobního roztoku zředí 20 ml kyseliny octové a 100 ml vody.

3. 1 % roztok jódu v chloroformu,

Léky: diazepam, stilnox, codein, paracetanol extra, preparáty kofeinu, chininu.

Pracovní postup

Příprava standardů: Léky v tabletové formě rozetřeme v třecí misce na prášek. Preparáty kofeinu a chininu navážíme na analytických vahách přímo do připravených ependorfe a rozpustíme v ethanolu. Pokud je povrch tablety pokryt obalem nebo glazurou, musíme obal odstranit nebo smýt. Odvážíme požadované množství substancí (množství závisí na jednotlivých důkazech a metodách – nejčastěji 10–200 mg). Naváženou substanci rozpustíme v odpovídajícím objemu rozpouštědla (u léků se nejčastěji používá alkohol–ethanol). Standardní roztok přeneseme do lahvičky a označíme jej datem přípravy. Skladujeme ve tmě a chladu (0–4°C).

Pro potřeby cvičení budou standardy připraveny pro nanášení.

Příprava biologického materiálu: 50 ml biologického materiálu - moči okyselíme 5 kapkami zředěné kyseliny chlorovodíkové na pH asi 3–4. Upravenou moč přelijeme do dělicí nálevky, přidáme 50 ml etheru a třepeme 3–5 minut. Probíhá extrakce těch léčiv, které mají slabě kyselý nebo neutrální charakter. Oddělený etherový extrakt přeneseme do odpařovací misky. K vodní vrstvě opět přidáme 50 ml etheru a extrakci opakujeme. Během vytřepávání občas uvolníme zátku, abychom zabránili nahromadění etherových par. Oddělený etherový extrakt přidáme k prvnímu podílu a extrakty vysušíme pomocí bezvodého Na_2SO_4 a odpaříme do sucha na vodní lázni. Sušinu rozpustíme v 0,5 ml absolutního ethanolu. Tím získáme **kyselý extrakt (M_K)**. Oddělené vodní vrstvy z dělicí nálevky dáme do kádinky a upravíme pH na 9–10 pomocí 50 % NaOH. Provedeme opakovanou extrakci, extrakt vysušíme, odpaříme, odparek rozpustíme v ethanolu a tím získáme **alkalický extrakt moči (M_B)**, který obsahuje bázičká léčiva, popřípadě druhý podíl neutrálních látek, např. alkaloidů.

Chromatografie: Na chromatografické desce vyznačíme měkkou tužkou místa startů. Pomocí hamiltonky nanese potřebná množství vzorků (1–4 kapky) a příslušné standardní roztoky nebo směsi standardních roztoků. Vzdálenosti mezi nanášenými vzorky nesmí být menší než 15 mm a průměr nanášených skvrn nesmí být větší jak 5 mm. V průběhu nanášení skvrny vysušujeme teplým vzduchem z fenu. Nejméně 10 minut předem před vyvíjením nalijeme do chromatografické komory takový objem vyvíjecí směsi, aby její hladina byla níže, než místa startu vzorku na chromatografické desce. Směs používáme pouze pro jedno vyvíjení. Komoru uzavřeme sklem, obsah důkladně promícháme (prostor komory se nasatí parami směsi, což napomáhá dokonalejšímu a rychlejšímu dělení). Po nasycení komory parami rozpouštědel do ní vložíme připravené chromatografické desky a provedeme vzestupné vyvíjení. Když čelo mobilní fáze (vyvíjecí směsi) dosáhne vzdálenosti asi 20 mm od horního okraje desky, desku z komory vyjmeme a čelo fáze vyznačíme měkkou tužkou. Zbytky mobilní fáze z desky odstraníme vysušením volně na vzduchu nebo proudem teplého vzduchu.

Detekce: Chromatografickou desku pomocí rozprašovače postříkáme jednotlivými detekčními činidly. Zakreslíme polohy skvrn.

Vyhodnocení:

Látku identifikujeme tak, že polohu skvrny vztahujeme k poloze skvrny standardu, který se s ní ztotožňuje nebo se nachází v těsné blízkosti. Chinin detekujeme pomocí UV-lampy při 366 nm. Kofein je detekovatelný hlavně z kyselého podílu moči a je viditelný při UV 254 nm nebo pomocí Dragendorffova činidla (hnědá skvrna) nebo 1 % roztoku jódu v chloroformu (šedo-fialová skvrna). Diazepam je viditelný po postříkání skvrny činidlem konc. H₂SO₄ : ethanol (1:1).

Doporučení:

Pokud chcete vidět nějaké zajímavé látky ve vaší moči, vypijte silný černý čaj, kávu s kofeinem nebo si dejte tonik s chininem (pozor ne každý tonik obsahuje chinin). Léky raději nezkoušejte.

2. Detekce drog pomocí Instant-View Multi-Drug Screen Urine test

Princip

Každý testovací proužek, který je součástí multipanelu, je jednokrokový imunochromatografický test, který zahrnuje 1) podušku s fialovým konjugátem koloidní

zlato- antidrogová protilátka 2) nitrocelulóзовou membránu obsahující testovací linii (T-linie) kontrolní linii (C –linie). T linie je potažena drogovým antigenem, zatímco C linie je potažena kozími anti-myšími IgG protilátkami.

Tento test je kompetitivní imunometoda. Droga nebo drogový metabolit ve vzorku kompetuje s antigenem, kterým je potažena nitrocelulóзовá membrána na omezeném množství vazebných míst konjugovaných protilátek. Jakmile je na podušku aplikováno adekvátní množství vzorku moče, moč putuje kapilárními silami testovacím proužkem. Pokud je hladina drogy ve vzorku pod detekčním limitem testovacího proužku, fialově zbarvený konjugát z podušky se naváže na antigeny, kterými je potažena nitrocelulóзовá membrána v oblasti testovací linie (T linie) a objeví se temně fialová zbarvená T linie indukující negativní výsledek testu.

Pokud je droga ve vzorku moče přítomna v koncentraci rovnající se nebo vyšší než je detekční limit testovacího proužku, naváže se tato droga na protilátky z podušky, takže se neobjeví fialově zbarvená linie T v testovací oblasti proužku, což indikuje pozitivní výsledek.

Barevný konjugát zlato-protilátka by se měl vždy navázat na linii C a měla by se objevit fialově zbarvená linie C bez ohledu na to, zda je nebo ne v moči přítomna droga. Podrobnější informace k imunometodám hledejte v kapitole „Imunochemické metody“.

Materiál a chemikálie

Instant-View Multi-Drug Screen Urine Test (M3), výrobce Alfa Scientific Designs Inc, Poway, CA 92064 USA, dovozce. ELISABETH PHARMACON, spol. s r. o., Náměstí Svobody 18, Brno

testovací panel je zatavený zvlášť ve folii s desikantem a pipetkou

Odběr vzorku: Každý vzorek musí být odebrán do čisté nádoby. Vzorky mohou být drženy při teplotě 15-30°C po dobu 8 hodin, při teplotě 2-8°C tři dny a při -20°C delší dobu.

Pracovní postup:

Ochlazené vzorky a další materiál včetně testů, musejí být před zahájením testování vytemperovány na pokojovou teplotu

Testovací panel je pak vyjmut z folie.

A. Ponořovací metoda: Sejme se vršek a ponoří se panel do vzorku nejméně na 10 sekund. Hladina vzorku musí být při ponořování nad okénkem pro nanášení vzorku a zároveň pod hroty šipek naznačujících maximální hladinu, kam lze panel ponořit.

B. Alternativní metoda: (když je objem vzorku malý). Sejme se vršek a vyjme se pipetka z folie. Stiskne se balonek na konci pipetky a naplní se pipetka vzorkem až po risku nad středovým balonkem. Přidá se veškerý vzorek z pipetky do okénka určeného pro nanášení vzorku. Vršek se nasadí zpátky na panel a panel se položí na suchý vodorovný povrch. Výsledky se odečítají mezi čtvrtou a sedmou minutou od přidání vzorku. Po sedmi minutách už se výsledky neodečítají.

Interpretace výsledků

pozitivní: pokud se objeví linie C a neobjeví se linie T

negativní: pokud se objeví linie C a linie T společně, výsledek testu znamená, že hladina drogy nebo jejího metabolitu v moči je pod detekčním limitem pro danou drogu.

neplatný test: pokud se neobjeví linie C do pěti minut na žádném proužku, testování je třeba zopakovat s novým testovacím proužkem.

3. Detekce alkoholu v dechu pomocí digitálního alkoholové testeru CA 2000

Princip detekce

Jedná se o mikroelektronický analyzátor alkoholu v dechu. Obsahuje plynový sensor citlivý na molekuly alkoholu.

Pracovní postup

1. Zapnout spínač PWR ON/OFF, detektor začne odpočítávat od 200 do 000. je to zahřívací interval k přípravě snímače a obvodů pro testování.
2. Jakmile přístroj pípne, a rozsvítí se zelená kontrolka je připraven k měření, začíná se pravidelně foukat do trubice, než opět přístroj pípne. Ihned je třeba přestat foukat.
3. Začnou blikat červená a zelená kontrolka během 4 sekund, bude zobrazen výsledek testu po dobu 15 sekund pomocí tří číslic. Pokud přesáhne údaj 0,5 promile (tovární nastavení), začne blikat červená výstražná kontrolka a současně zazní výstražný zvukový signál.
4. Zobrazí se OFF pro vypnutí.
5. pro následující měření je třeba přístroj vypnout, počkat aspoň dvě minuty a pak postupovat podle bodů 1-3.

Důležité upozornění:

1. provedení testu se doporučuje počkat po pití aspoň 20 minut a 1 minutu po kouření
2. Do přístroje nefoukat cigaretový dým, ani tekutiny (zničí se snímač)

3. Test neprovádět na silném větru nebo v uzavřené místnosti s kontaminovaným vzduchem.
4. Po rozsvícení kontrolky stavu baterie je doporučeno vyměnit 9 V pouze alkalickou baterii.
5. Přístroj udržovat při teplotách od 0-40°C a mimo dosah dětí.
6. Při obvyklém použití vyžaduje CA 2000 kalibraci každých 6 měsíců pro udržení přesných výsledků. Kalibraci provádí dodavatel.