

Vyšetřovací metody v toxikologii

B. Sokolová

Diagnostika otravy

Otrava je chorobný stav, který je vyvolán vstupem jedu do organismu, jeho vstřebáním a zásahem do metabolických dějů, což se projeví změnami funkčními nebo morfologickými, a který jakožto celkové onemocnění může končit i smrtí organismu. Jde tedy o interakci jedu a organismu. Na straně jedu je nejdůležitějším faktorem dávka

- nutnost úzké spolupráce lékaře a toxikologa
 - věk, pohlaví
 - anamnéza – onemocnění, užívané léky, místo nálezu (zbytky jídel, nápojů, obaly), susp. doba požití, susp. noxa, koníčky, zaměstnání
 - klinické příznaky, pozorování laiků
 - výsledky biochemických vyšetření, zdravotnická dokumentace (u zemřelých pitevní nález), léky podané před odběrem

- *klasifikace otrav z klinického hlediska*

- podle časového průběhu otravy: perakutní, akutní, subakutní, subchronické a chronické

- podle příznaků

- bolesti břicha, zvracení, průjem: sloučeniny arzenu, rtuti, houby
- křeče: strychnin, CN-, CO, imipramin
- kóma: alkoholy, alkaloidy, barbituráty, imipramin
- delirium: marihuana, kokain
- mydriáza: alkaloidy (atropin), imipramin
- mióza: morfin, barbituráty, chlorpromazin, organofosfáty

- *klasifikace otrav z hlediska soudnělékařského*

- otravy úmyslné

- vlastní rukou – sebevraždy
- cizí rukou – vraždy

- otravy náhodné a z nedbalosti

- průmyslové – průmysl, zemědělství
- ekonomické (nepozornost, nedbalost, záměna) – „jedy z domácnosti“ (čističe skvrn, prací prostředky, dezinfekční prostředky); „hobby“ (1,2-etyandiol, pesticidy)
- medikamentózní: pochybení zdravotních pracovníků, předávkování, toxikomanie, záměny

- otravy zvláštní

- potravinami (houby)
- abortivy (odvar z tisů, chinin)
- afrodiziaka

Odběr biologického materiálu (BM) pro účely toxikolog. analýzy

1) Odběr BM u zemřelých osob

- moč (veškerá, která je v močovém měchýři, optimum 50-100 ml)
- krev (z dolních končetin, v poslední době i ze srdce, popř. z jater – 8 ml, možné rozdíly v koncentraci některých medikamentů)
- žaludeční obsah (veškerý obsah – optimum 50 – 100 ml)
- střevní obsah (z tenkého střeva s obsahem 1 m a tlustého střeva s obsahem 0,5 m)
- orgány (polovina jater, jedna celá ledvina, část mozku a plic)

2) Odběr BM u živých osob

- moč (50 ml)
- žaludeční obsah (min. 50 ml)
- krev (min. 8 ml)
- sliny

3) Obecná pravidla při odběru BM

Pitevní materiál (orgány, ŽO, SO) do širokohrdlých nádob – samostatně, nepoužívat žádné konzervační látky, dbát na správné označení odebraného BM, důsledné vyplnění žádanky k toxikologickému vyšetření – anamnestické údaje, uvést dobu a způsob odběru vzorku, zabezpečit přepravovaný materiál proti rozbití, resp. proti jinému znehodnocení, materiál po odběru bezprostředně zaslat k toxikologickému vyšetření.

Uchování biologického materiálu (BM) pro účely toxikolog. analýzy

- lednice 4°C (pro některé TVL nutnost –20°C)
- tma

Zvláštní význam při intoxikaci návykovými látkami

- pravost vzorku (měření pH, teplota)
- vyloučení možné kontaminace (saponáty, dezinfekční prostředky)
- možnost ředění vzorku
- donesení si připraveného vzorku

Důsledkem je znehodnocení analýzy!!!

Vlastní toxikologická analýza BM

- každý případ vyžaduje individuální přístup
- komplikující skutečnosti: nízká koncentrace noxy, nepřítomnost původní formy látky (nutná znalost metabolismu), balastní látky, autolýza (hnilobný rozklad)
 - živý, mrtvý
 - zdravotnictví, policie
 - neznámá látka, cílené vyšetření
 - kvalita, kvantita

Základní schéma toxikologického vyšetření

- příprava vzorku (deproteinace, izolace – LLE, SPE, speciální postupy)
- průkaz (TLC, GC, LC-MS, Imunochemické metody)
- identifikace (TLC, GC-MS, FID, ECD, NPD, LC-MS, PDA, UV-VIS spektrofotometr)
- stanovení (GC, HPLC, UV-VIS spektrofotometr)
- interpretace výsledků

Průkaz neznámé látky – screening NL

Imunochemické vyšetření moče na přítomnost NL – v současné době je na trhu celá řada imunochemických testů, které jsou pro screeningové vyšetření moče na OPL velice výhodné z hlediska

- Rychlosti
 - Snadné technické obsluhy
 - Materiálová nenáročnost
 - Záchyt i velmi nízkých koncentrací – citlivost
 - Skupinový záchyt určité skupiny NL
-
- výsledky imunochemických metod pro diskutované látky jsou pouze orientační
 - každý pozitivní výsledek je nutné potvrdit jinou nezávislou metodou
 - vhodné je screeningové vyšetření analyzovaného materiálu na přítomnost dalších TVL

Imunochemické metody

Princip

Kompetice (soutěž) měřeného analytu (léčivo, droga) = ***antigen Ag (hapten) se značenou formou téhož léčiva či drogy = antigen Ag****

o vazebná místa na limitovaném množství specifické protilátky = ***antibody Ab za vzniku biospecifické vazby ve vzniklých imunokomplexech AgAb a Ag*Ab.***



Podíl vázaného značeného léčiva či drogy je nepřímo úměrný koncentraci měřeného léčiva či drogy ve vzorku.

Značení antigenu (případně protilátky)

- ✓ enzymem EMIT
- ✓ geneticky upraveným enzymem CEDIA
- ✓ radioizotopem RIA
- ✓ fluorescenční látkou FIA
- ✓ chemiluminiscenční látkou LIA

Enzymové imunometody EMIT: enzyme multiplied immunoassay technique

- značení enzymem bakteriální glukozo - 6 – fosfát dehydrogenáza G6PD
- fotometrické měření enzymové aktivity G6P + NAD⁺ → NADH + 6PGL + NADH (340 nm) substrát G6PD



Kinetická interakce mikročastic v roztoku (KIMS) měřená změnou intenzity procházejícího světla.

V případě absence drogy ve vzorku se volný konjugát drogy váže na protilátku, vázanou na mikročastice, a vytváří agregáty. S probíhající agregací v případě absence léčiva ve vzorku absorbance roste. Jestliže vzorek moči obsahuje příslušnou drogu, probíhá kompetice drogy s konjugátem derivátu drogy o protilátku vázanou na mikročastice. Protilátka vázaná na léčivo ve vzorku není již dostupná pro podporu agregace částic a následný vznik struktury částic je inhibován. Přítomnost léčiva ve vzorku úměrně snižuje nárůst absorbance vůči koncentraci léčiva ve vzorku. Obsah léčiva ve vzorku se měří poměrem ke známé hodnotě cut-off koncentrace léčiva.



Typy protilátek Ab:

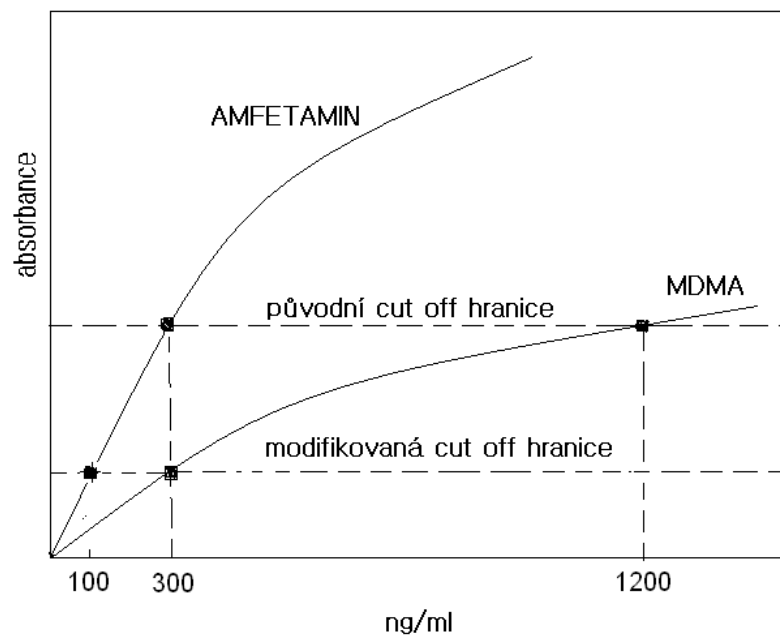
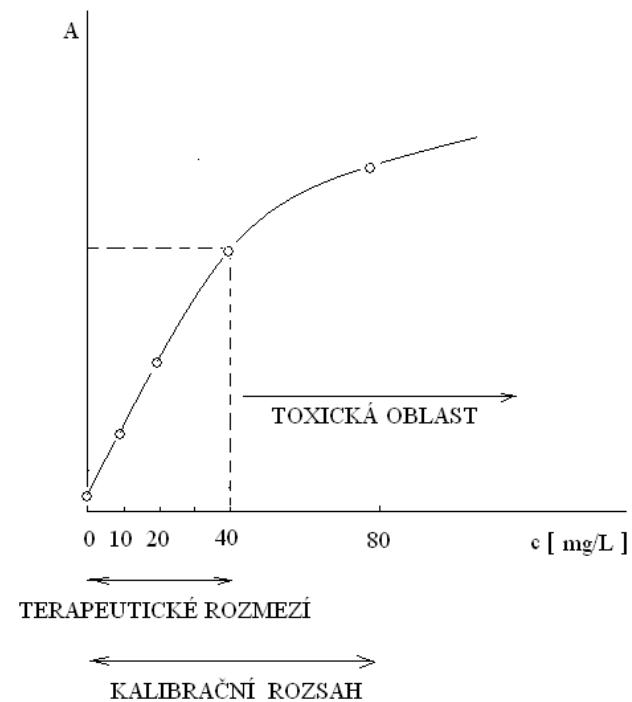
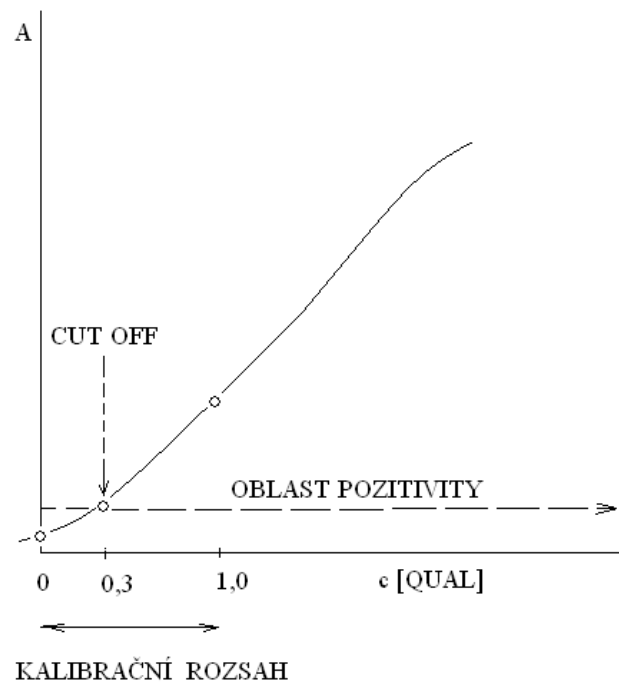
- cíleně připraveny proti determinantní skupině, která je specifická jen pro jedno chemické individuum např. **6-monoacetylmorfin**
- cíleně připraveny proti chemické struktuře, která je společná pro více strukturně chemicky příbuzných látek např. **opiáty**

TEST	Citlivost ng/ml	Cut off ng/ml	GC-MS Cut off	NIDA Cut off	Testovaná látka	Detekova- telnost
Amfetaminy	100	300	100	1000	D-Amfetamin	3-5 dní
BZD	40	200	150	100	Nordiazepam	1-7 dní
Cannabionidy	13	25	15	50	THC-COOH	14-30 dní
Cocain	30	300	150	300	Benzoylcgonin	2-3 dny
Opiáty	25	200	300	300/200 0	Morfin	3 dny

TEST	Falešná negativita	Falešná pozitivita
Amfetaminy	Efedrin	Diclofenac, Ibuprofen
Benzodiazepiny	Flunitrazepam Bromazepam	Codein, MDMA, Karbamazepin
Cannabinoidy	Cannabidiol Cannabinol	Midazolam, Procain, PenicilinG, Lorazepam
Cocain	Cocain, Ecgonin, Ecgonin-methylester	Diclofenac, Diazepam, Clonazepam
Opiáty	Norcodein, Normorfin, Oxycodon, Oxymorfon	Diclofenac, Histamin, Lorazepam, Midazoloam

Aplikace imunochemických metod:

- terapeutické monitorování hladin léčiv – TDM : dovolují rychlý klinický zásah
- diferenciální diagnostika akutních intoxikací
 - ✓ paracetamol – hepatotoxicita s dlouhou latencí, poškození lze odhadnout v prvních 12 hod po dávce
 - ✓ digoxin – kardiotoxicita
 - ✓ theofylin – astmatické onemocnění
 - ✓ carbamazepin, fenobarbital aj.– náhodné či úmyslné požití
- *diferenciální diagnostika pro skupinový záchyt léčiv a drog při akutních intoxikacích a toxikománii*
 - ❖ tricyklická antidepresiva
 - ❖ barbituráty
 - ❖ benzodiazepiny
 - ❖ kanabinoidy
 - ❖ budivé aminy
 - ❖ opiáty
 - ❖ kokain



Pozn: cut off – hodnota, doporučena výrobcem, od které se bere pozitivita testu. Pro určité látky, se cut off hodnota snižuje oproti doporučení výrobcem.

LLE



Screeningové metody TLC

Způsob provedení:

Stacionární fáze – silikagel (kyselina křemičitá), oxid hlinitý, komerční přípravky: silufol, kieselgel G

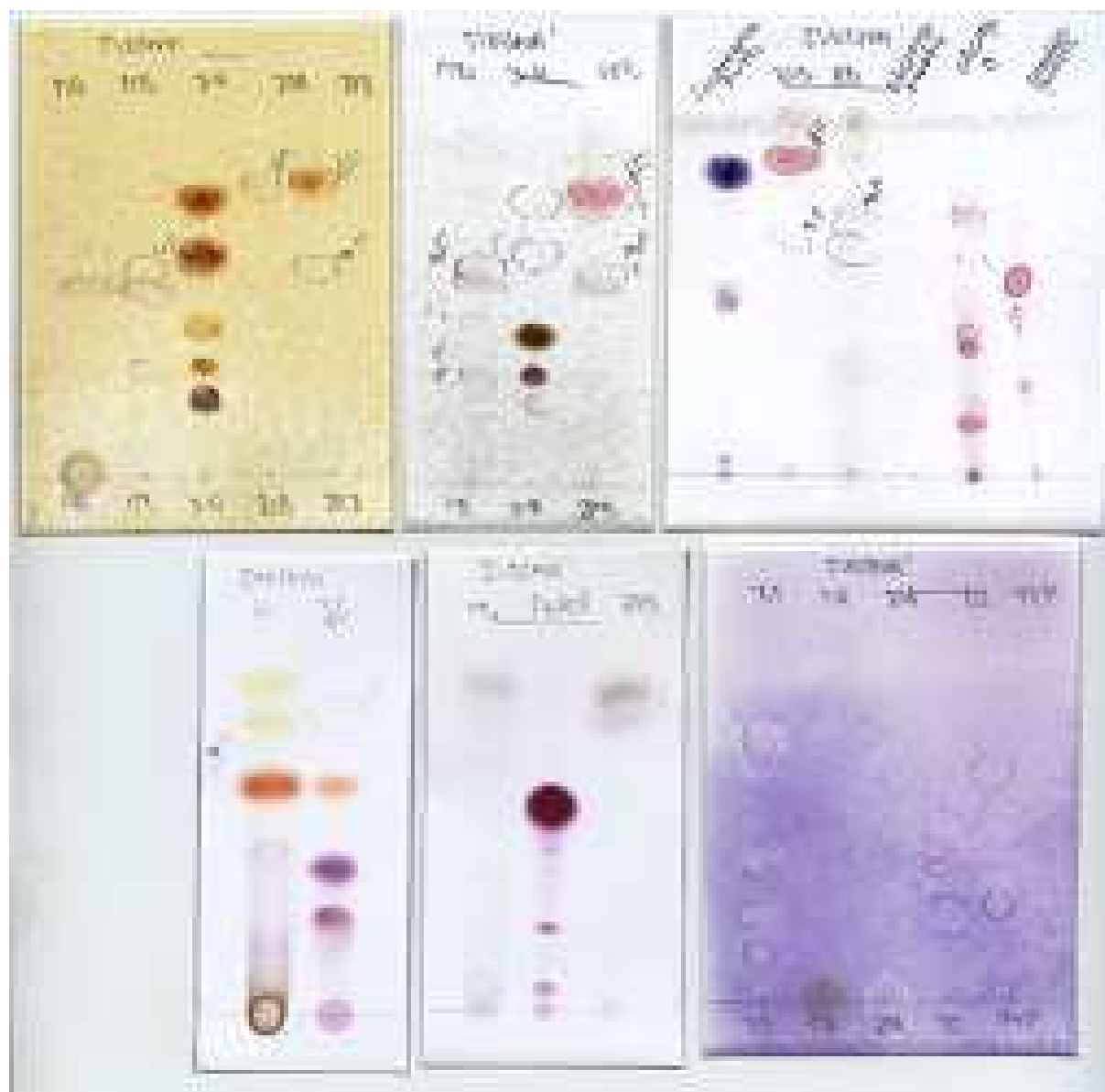
Mobilní fáze – směs organických rozpouštědel

RF faktor – podíl vzdálenosti skvrny látky od startu a vzdálenosti čela rozpouštědla RF faktor ovlivňuje:

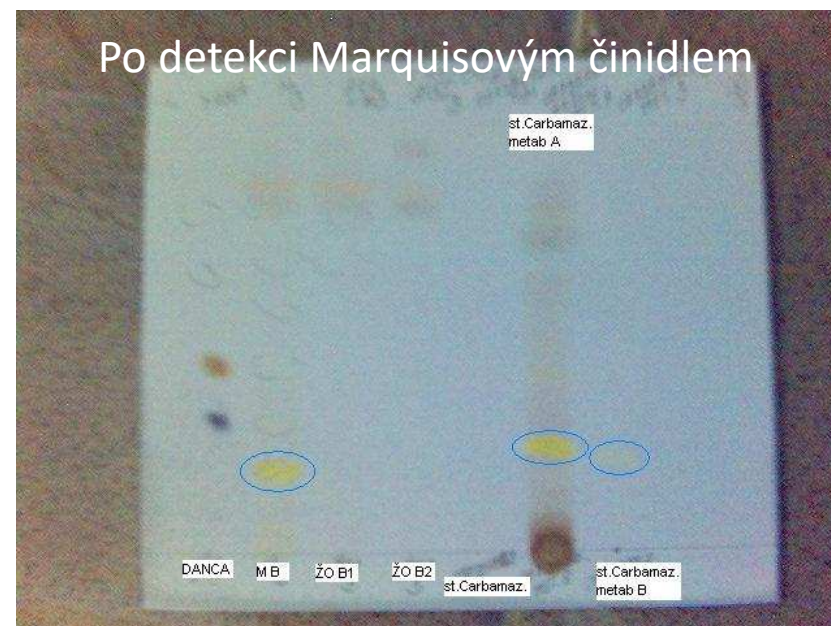
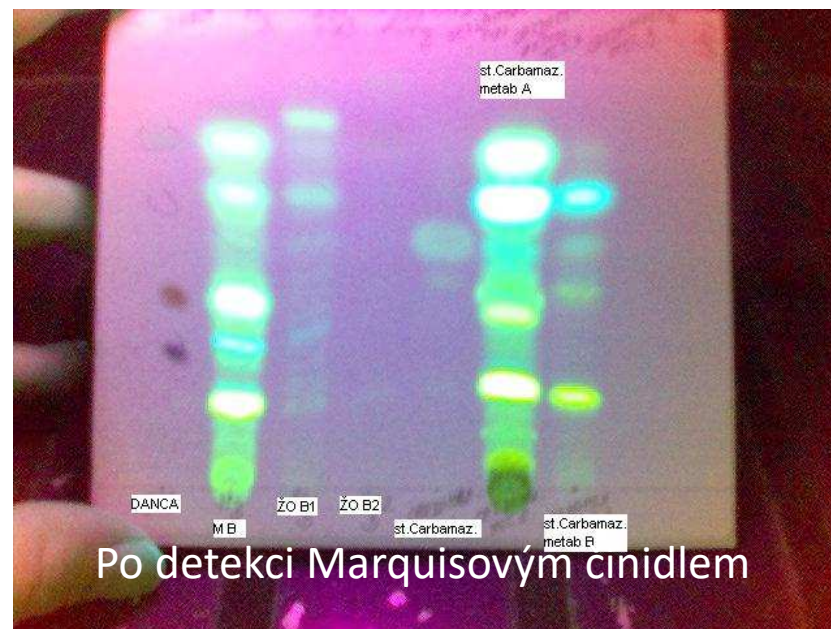
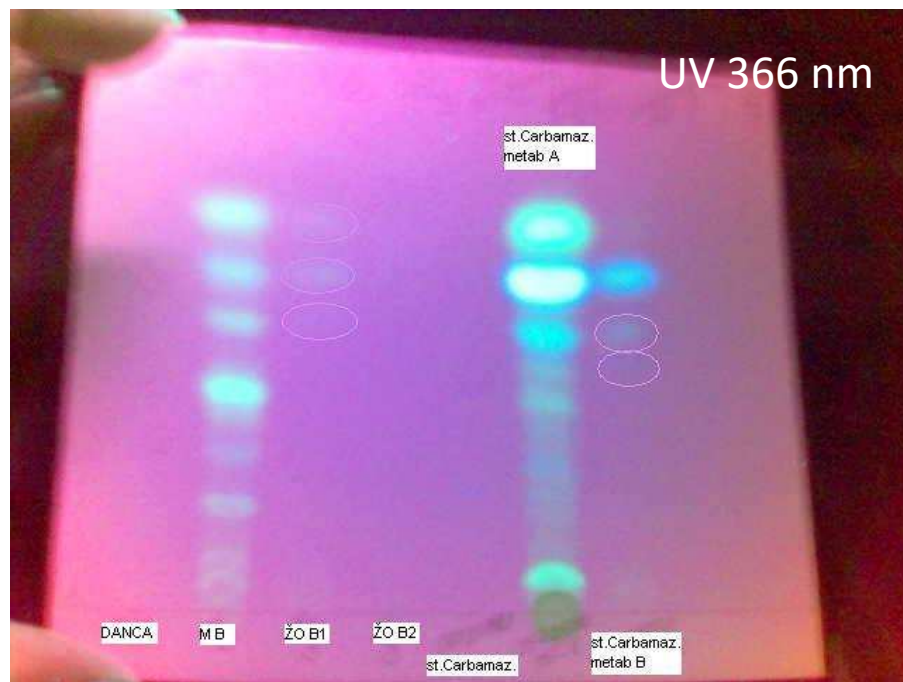
- chemická struktura látky
- složení mobilní fáze
- pH
- teplota, vlhkost
- materiál nosiče

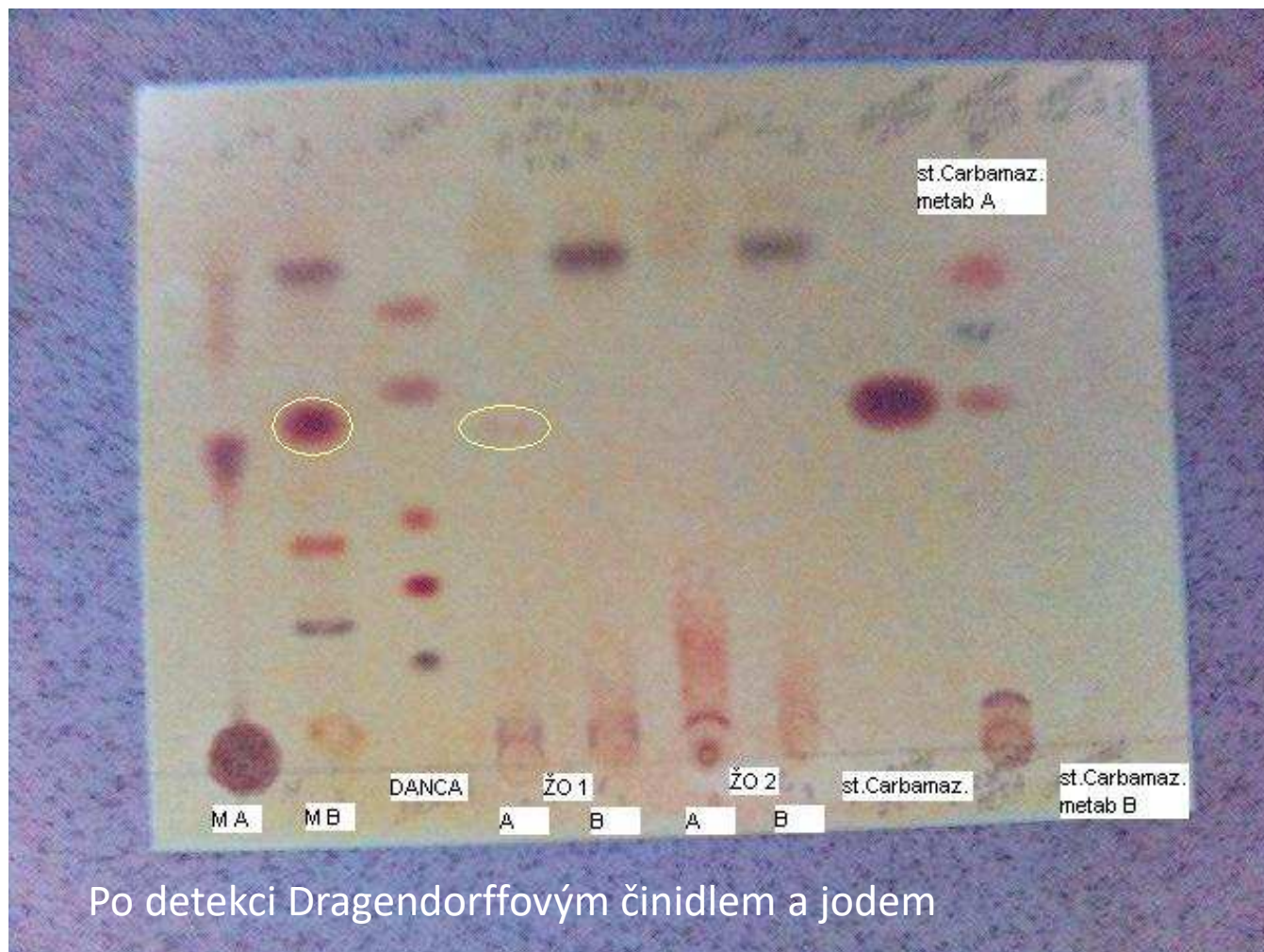
TLC

Případ č.1



Případ č.2

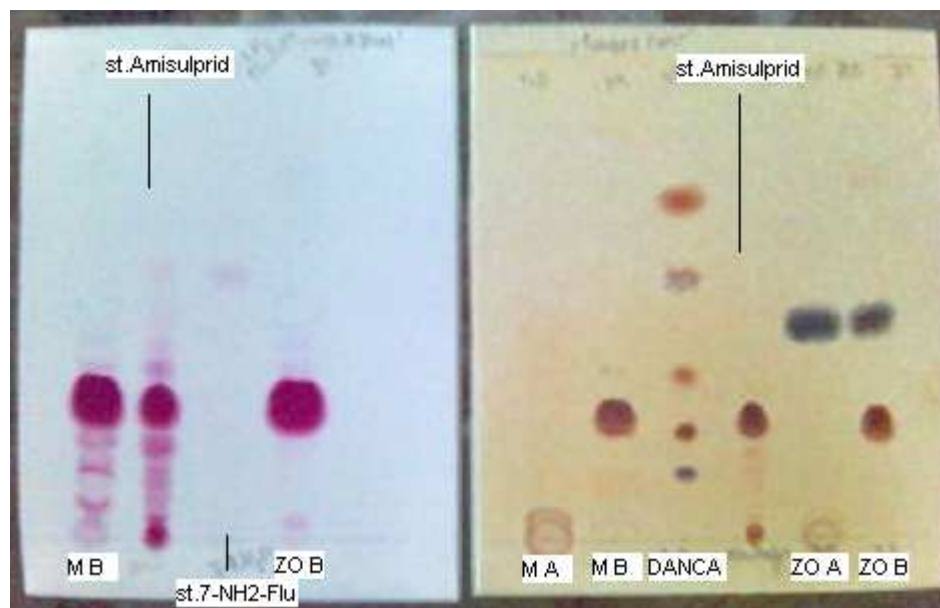




Po detekci Dragendorffovým činidlem a jodem

Carbamazepin – odparek A i B
 detekce: 366 nm: modrozelená fluorescence
 254 nm: fluorescence
 Marquis: zelená fluorescence
 Žluté skvrny metabolitů
 Drag.: or
 Hg/ DFK: mf
 antiepileptikum

Případ č.3



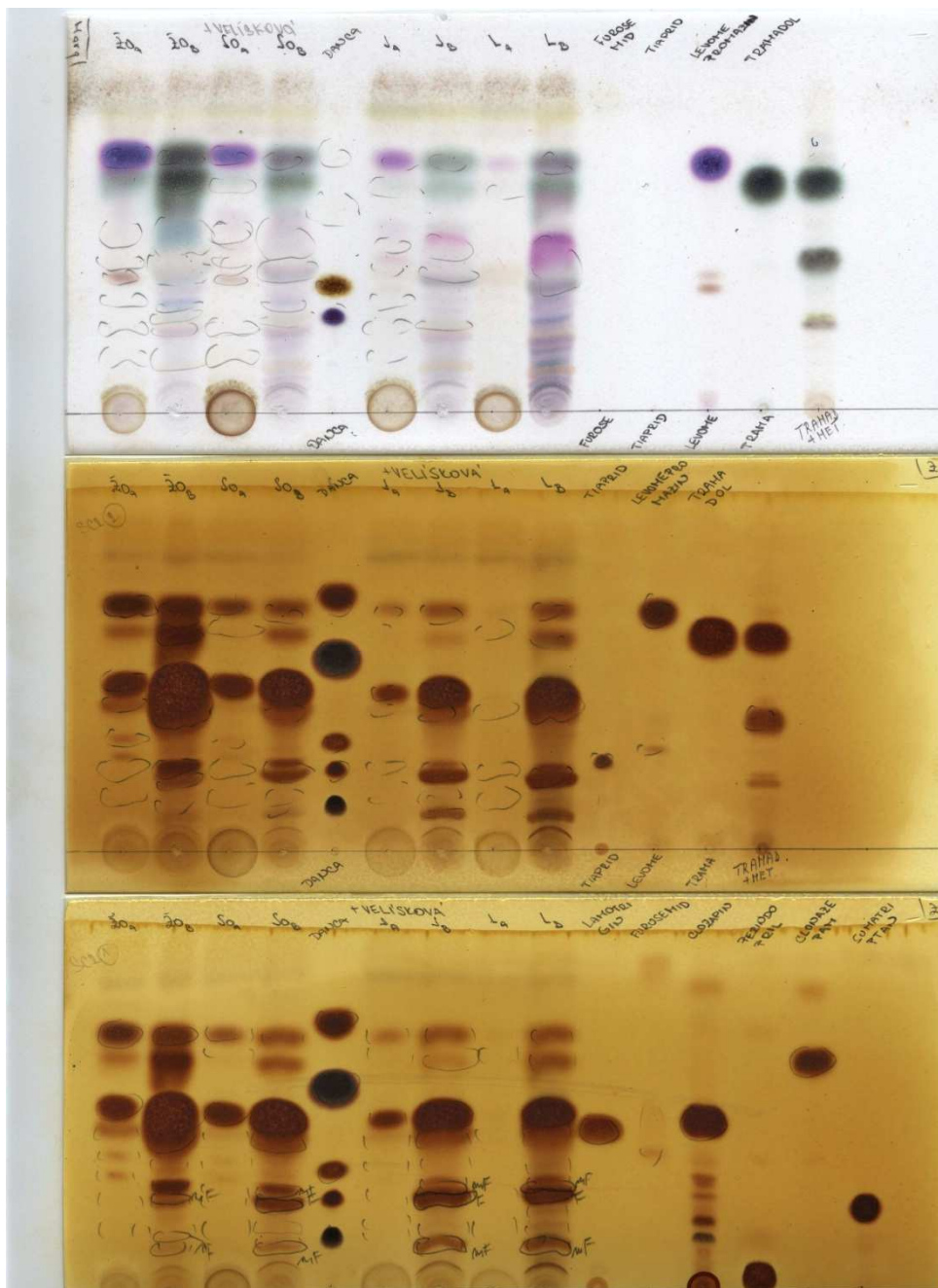
detekce: BM

detekce: H_2SO_4 , FeCl_3 , Dragg., jod



detekce: Maquis

Případ č.4



SPE

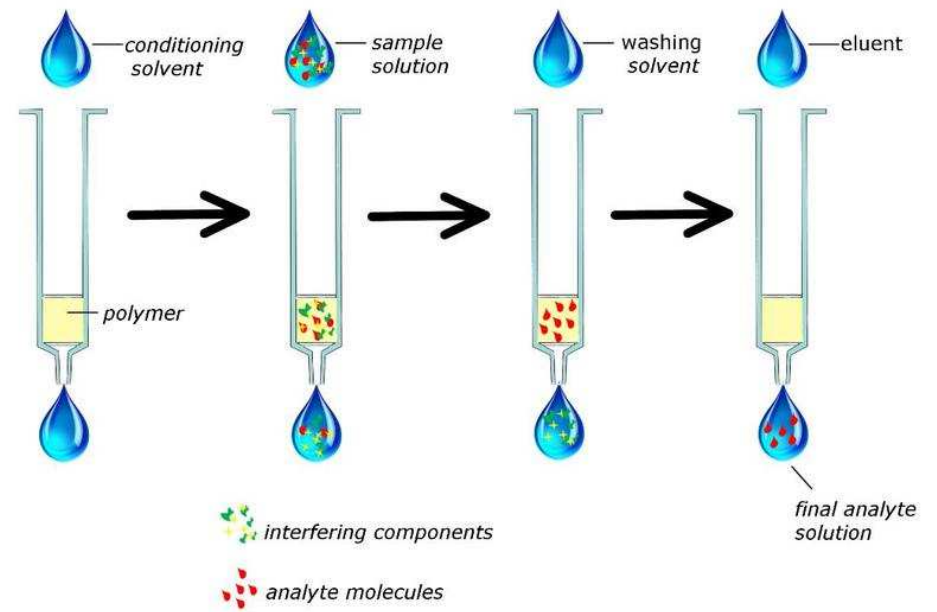


1. conditioning

2. loading

3. washing

4. elution



UV-VIS spektrometr



Plynová, kapalinová chromatografie

- separační metoda, při které se oddělují (separují) složky obsažené ve vzorku
- vzorek se vnáší mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze
 - stacionární fáze je nepohyblivá (ukotvená na stěnách kolony)
 - mobilní fáze je pohyblivá (plyn, kapalina)
- pohybem mobilní fáze přes stacionární fázi je vzorek unášen. Složky vzorku jsou na základě svých chemických vlastností zachytávány na stacionární fázi, a proto se při pohybu zdržují. Čím silněji jsou složky vzorku ke stacionární fázi poutány, tím později se eluují z kolony.
- možnost derivatizace vzorku

➤ Plynová chromatografie

- vzorek, který se ihned po nástřiku mění na plyn, se dávkuje do proudu plynu (mobilní fáze) který jej unáší na kolonu, kde se separují jednotlivé složky vzorku. Složky opouštějící kolonu indikuje detektor
- pro separaci látek, které mají dostatečný tlak syté páry (jsou těkavé), ale tepelně stálé, $M_R < 1000$ (plyny, nedisociované kapaliny, pevné organické molekuly, organokovové látky)
- dělení probíhá na základě rozdílů v těkavosti a struktuře

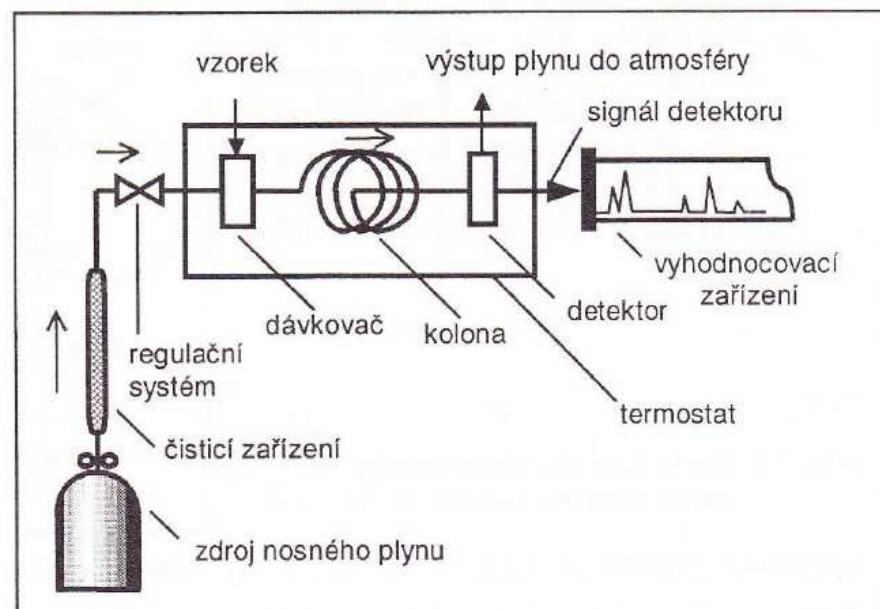


Schéma plynového chromatografu

Fáze GC analýzy

Nástřik

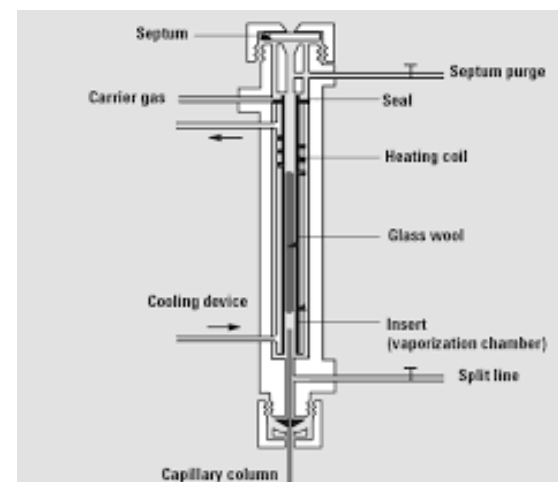
- Zavedení zplyněného vzorku do systému
- Split / splitless, on column, ...
- Koncentrační rozmezí cílových analytů, fyz.-chem. vlastnosti, matrice vzorku

Split nástřik

- Nástřik s dělením toku
- Menší část vzorku je přenesena na kolonu, větší část vzorku je odfouknuta
- Split poměr nerovná se poměr rozdělení vzorku
- Vhodné pro: špinavé vzorky, vysoké koncentrace, kolony s malým i.d.

Splitless nástřik

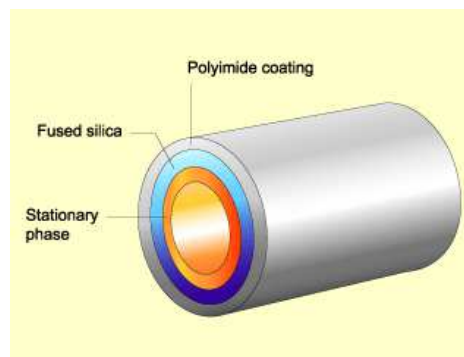
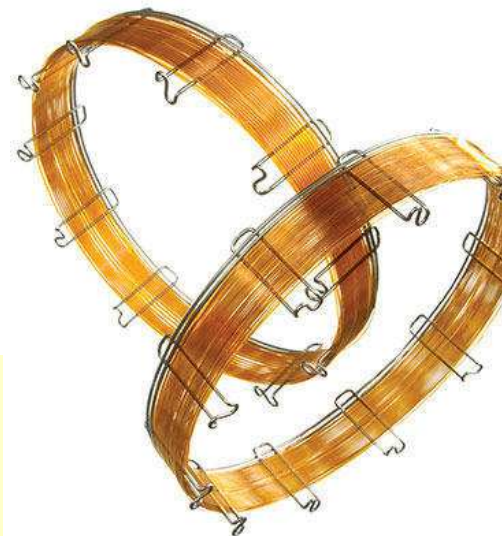
- Veškerý nastříknutý vzorek je přenesen na kolonu
- Vhodné pro: stopové hladiny analytů, čisté vzorky



Separace

Kapilární kolony

- délka: 5-150 m
- vnitřní průměr: 0,1 – 0,75 mm
- materiál: křemenná kapilára potažená polyimidem
- tloušťka stac. fáze: 0,1 – 7 μm



Náplňové kolony

- délka: 0,6 - 10 m
- vnitřní průměr: 2 – 5 mm
- materiál: sklo, ocel, měď, nikl
- stac. fáze: Chromosorb, Carbopack, Tenax,...



- Léky, NL: 5ms, (5%-fenyl)methylpolysiloxan
- Těkavé látky: WAX, polyethylen glykol

Detektory

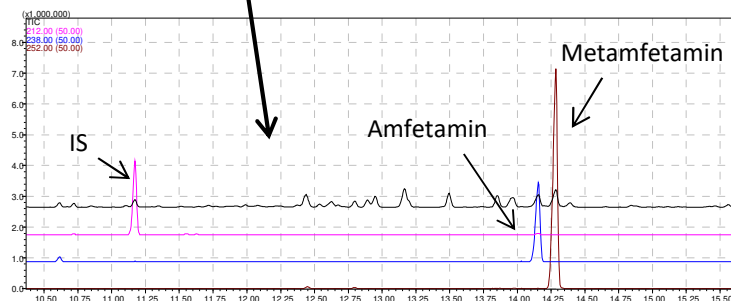
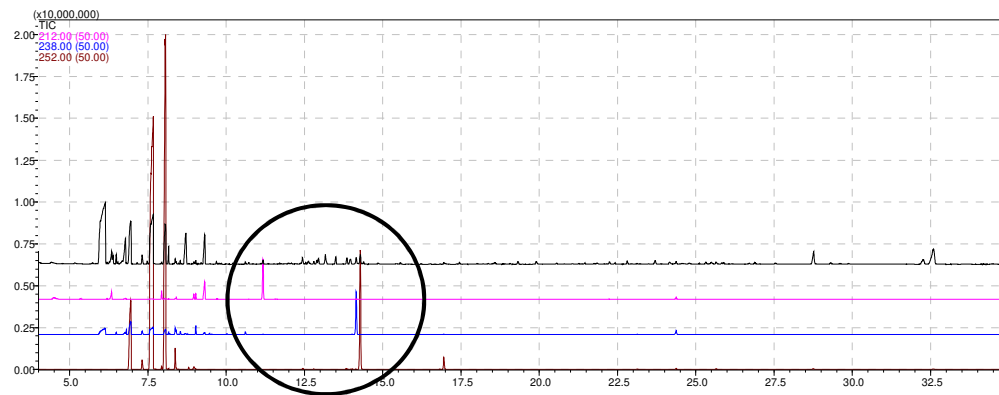
Konvenční detektory

- Plamenově-ionizační detektor (FID) – sloučeniny, které je možné spálit nebo zionizovat
- Tepelně-vodivostní detektor (TCD) – sloučeniny, které jsou tepelně vodivé, jiná vodivost než nosný plyn
- Plamenově-fotometrický detektor (FPD) – sloučeniny obsahující síru nebo fosfor
- Detektor elektronového záchytu (ECD) – elektronegativní sloučeniny
- Dusíko-fosforový detektor (NPD) – sloučeniny obsahující dusík a fosfor
- Další (XSD, PID, PFPD, AED, ELCD)

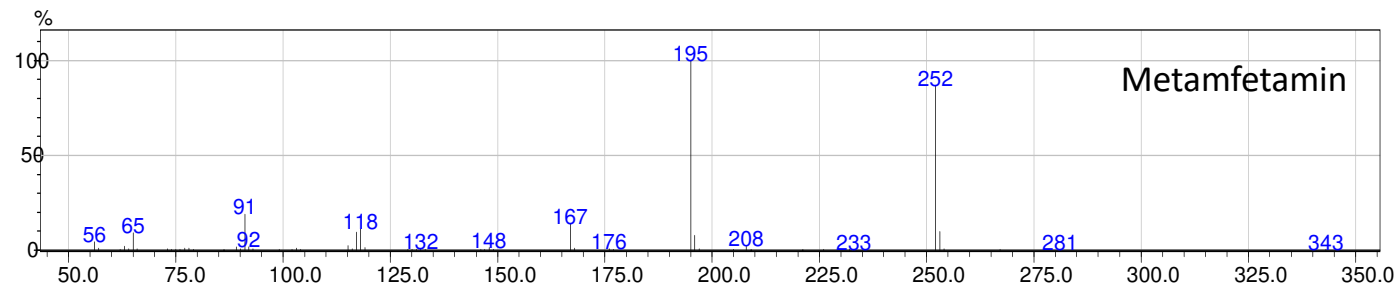
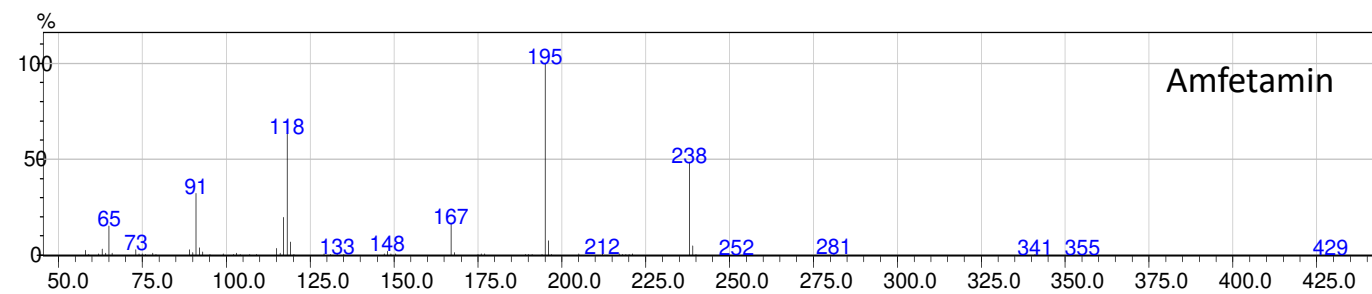
Hmotnostní spektrometry

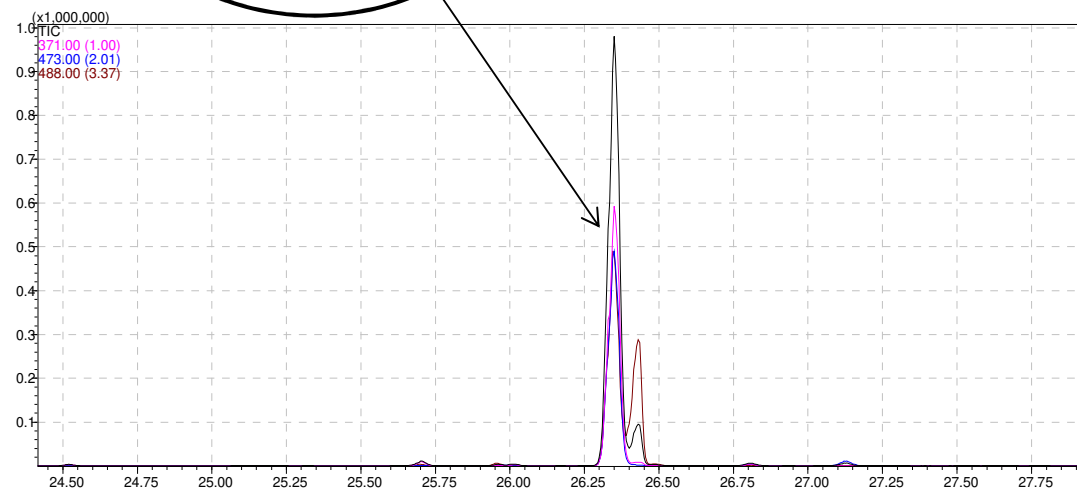
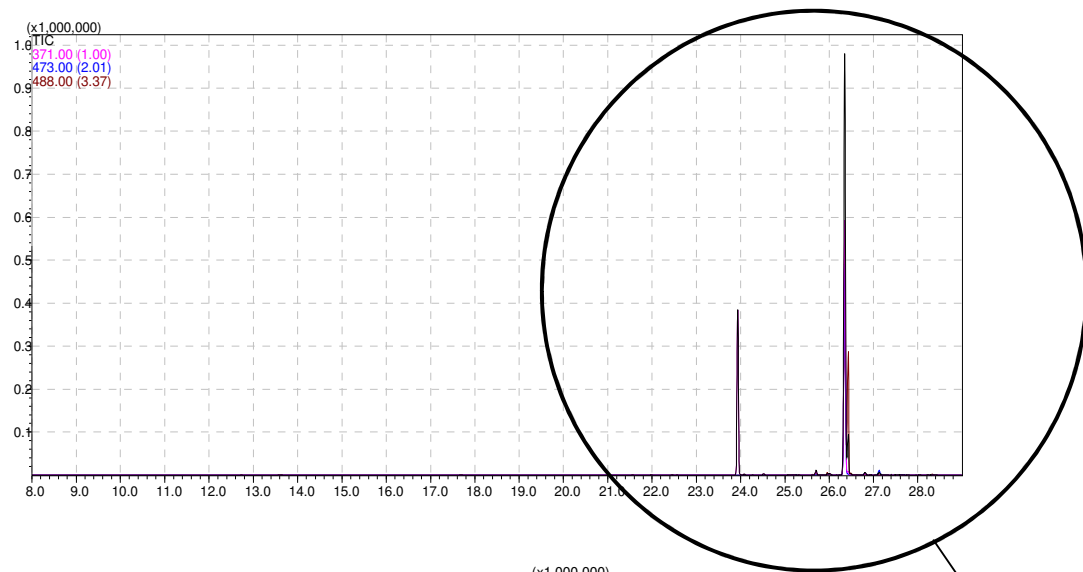
- Kvadрупól (Q / QQQ)
- Iontová past (IT)
- Průletový (TOF)
- Sektor (S)





GC-MS, chromatografický záznam pacienta (nález amfetaminů)





GC-MS, chromatografický záznam pacienta (nález THCCOOH)

➤ **Kapalinová chromatografie**

- mobilní fáze je kapalina
- je možno pracovat za laboratorní teploty bez nutnosti převádět vzorek na plyn, proto je tato metoda vhodná i pro separaci tepelně nestálých a netěkavých sloučenin

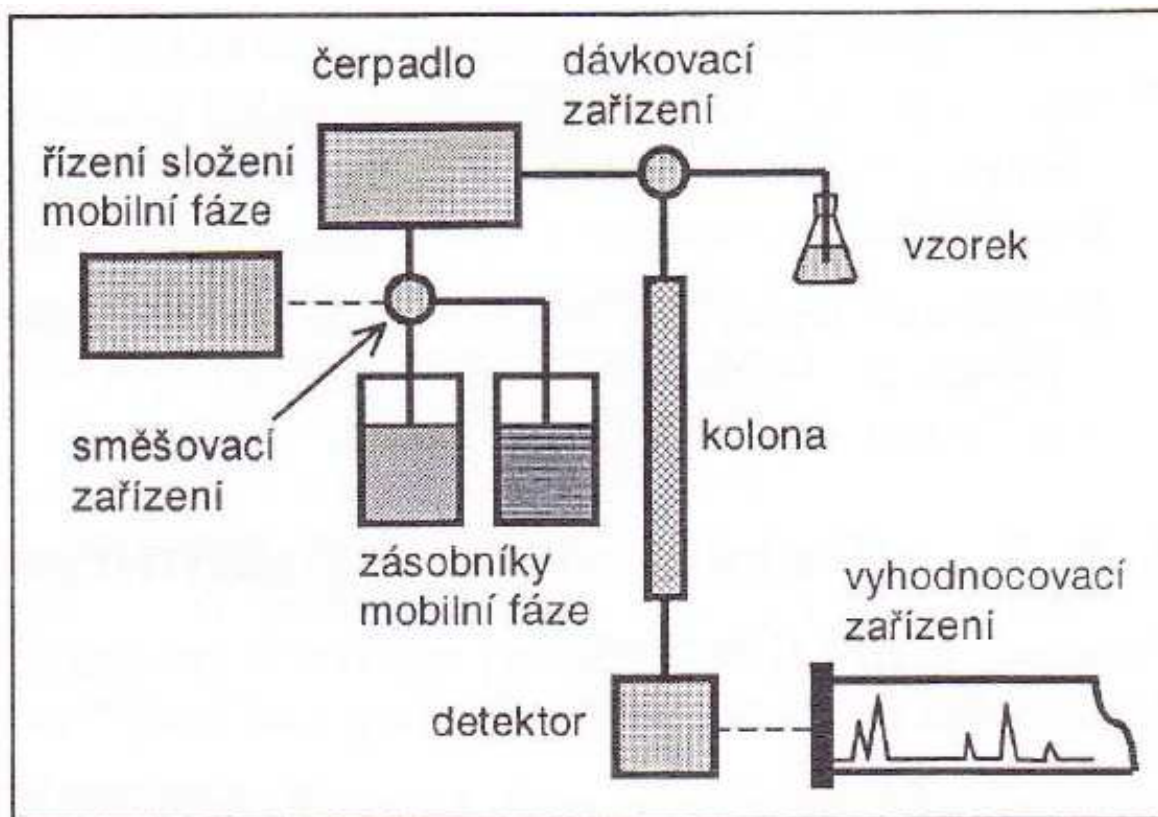


Schéma kapalinového chromatografu

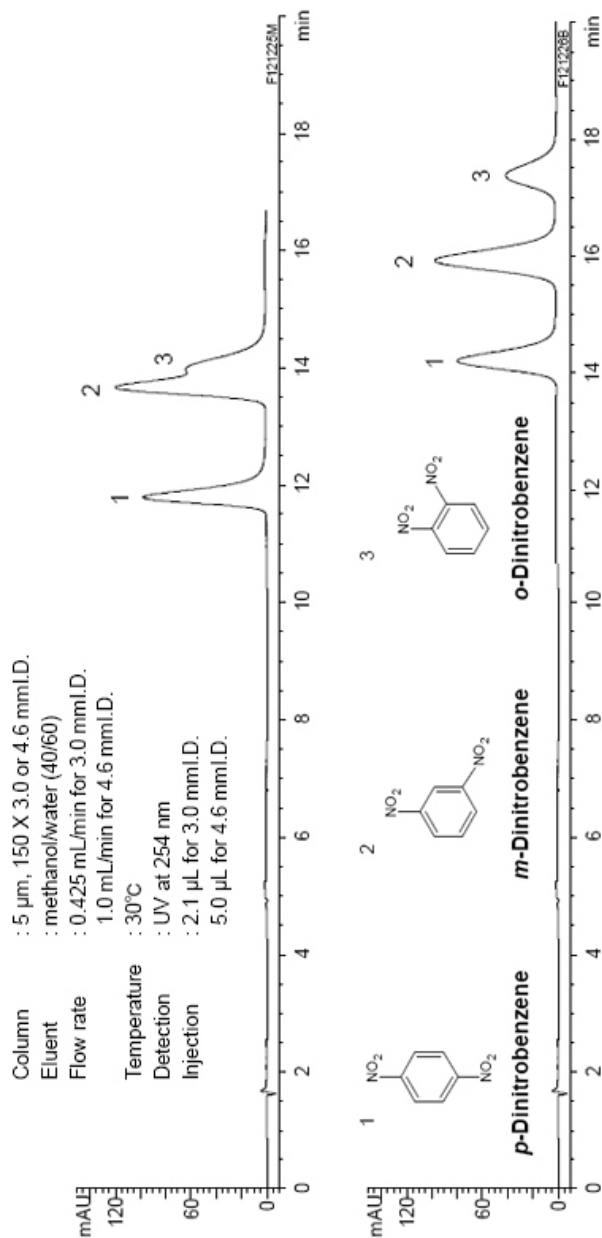
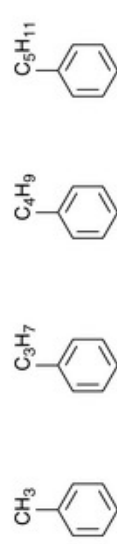
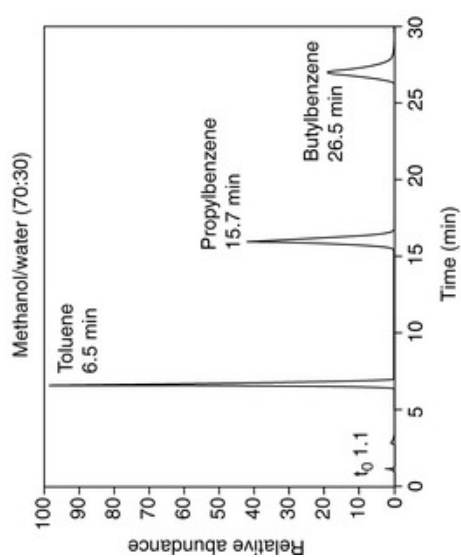
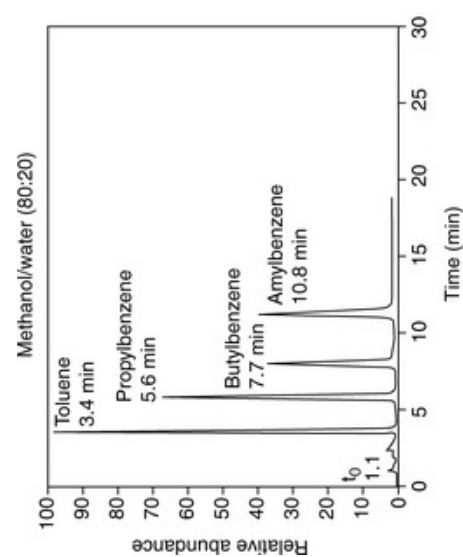
Mobilní fáze

- Čistota rozpouštědel
 - Čistota použitých aditiv
 - Použití deionizované vody
 - MF uchovávat ve skleněných nádobách
 - Filtrace, odvzdušnění
- ✓ MS detekce (HCOOH , CH_3COOH , HCOONH_4 , $\text{CH}_3\text{COONH}_4$)
 - ✓ PDA, RF (fosfátové pufrы)

Kolony

- Nenechat vyschnout
- Uchovávat pouze v doporučeném rozpouštědle uzavřené zásepky
- Promytí kolony silným elučním rozpouštědlem
- Použití předkolonek
- Dbát omezení výrobce (tlak, teplota, pH, rozpouštědla)



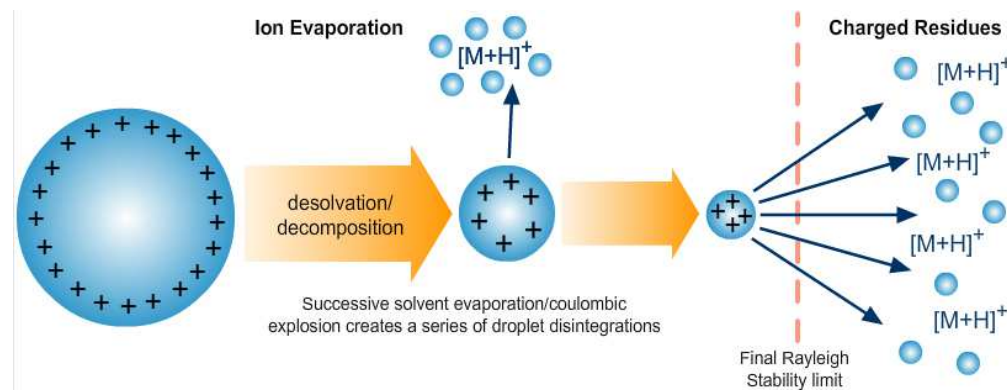
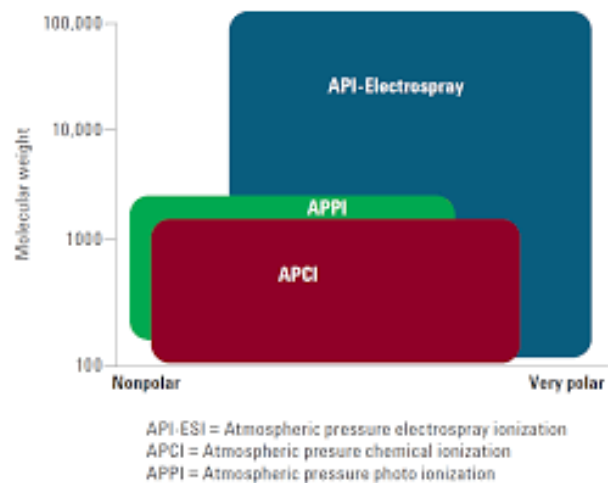


Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

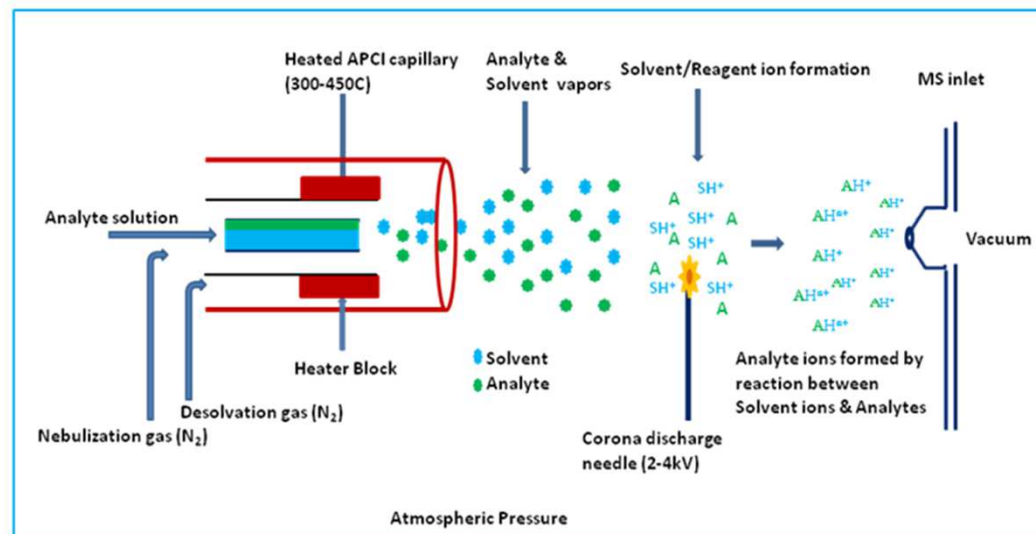
- s detektorem diodového pole
- s fluorescenční detektorem
- s elektrochemickým detektorem



➤ s hmotnostním detektorem



Ionizace elektrosprejem



Ionizace za atmosférického tlaku



AbSciex QTRAP 4500

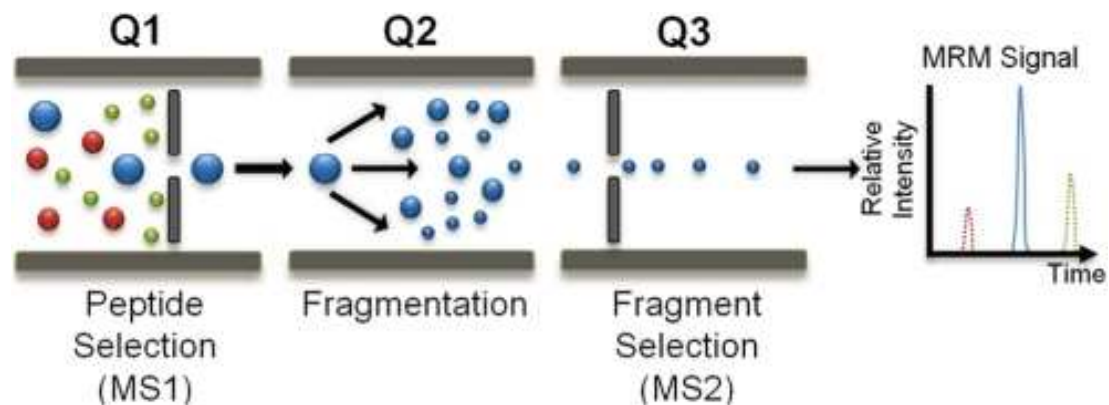


Schéma trojitého kvadrupolu

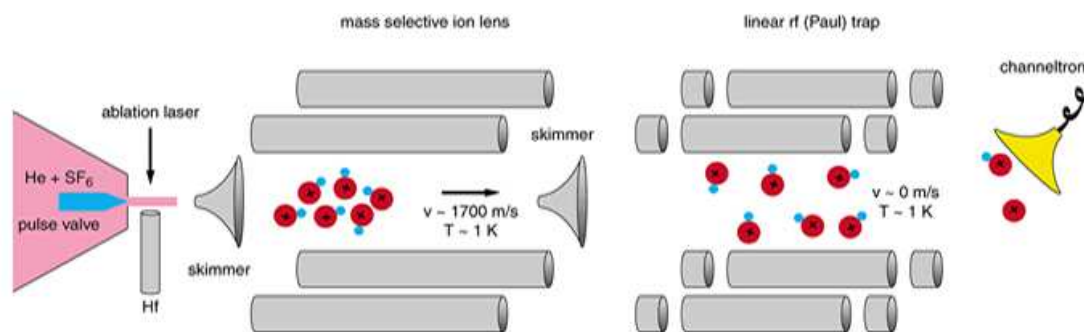


Schéma iontové pasti

QTOF

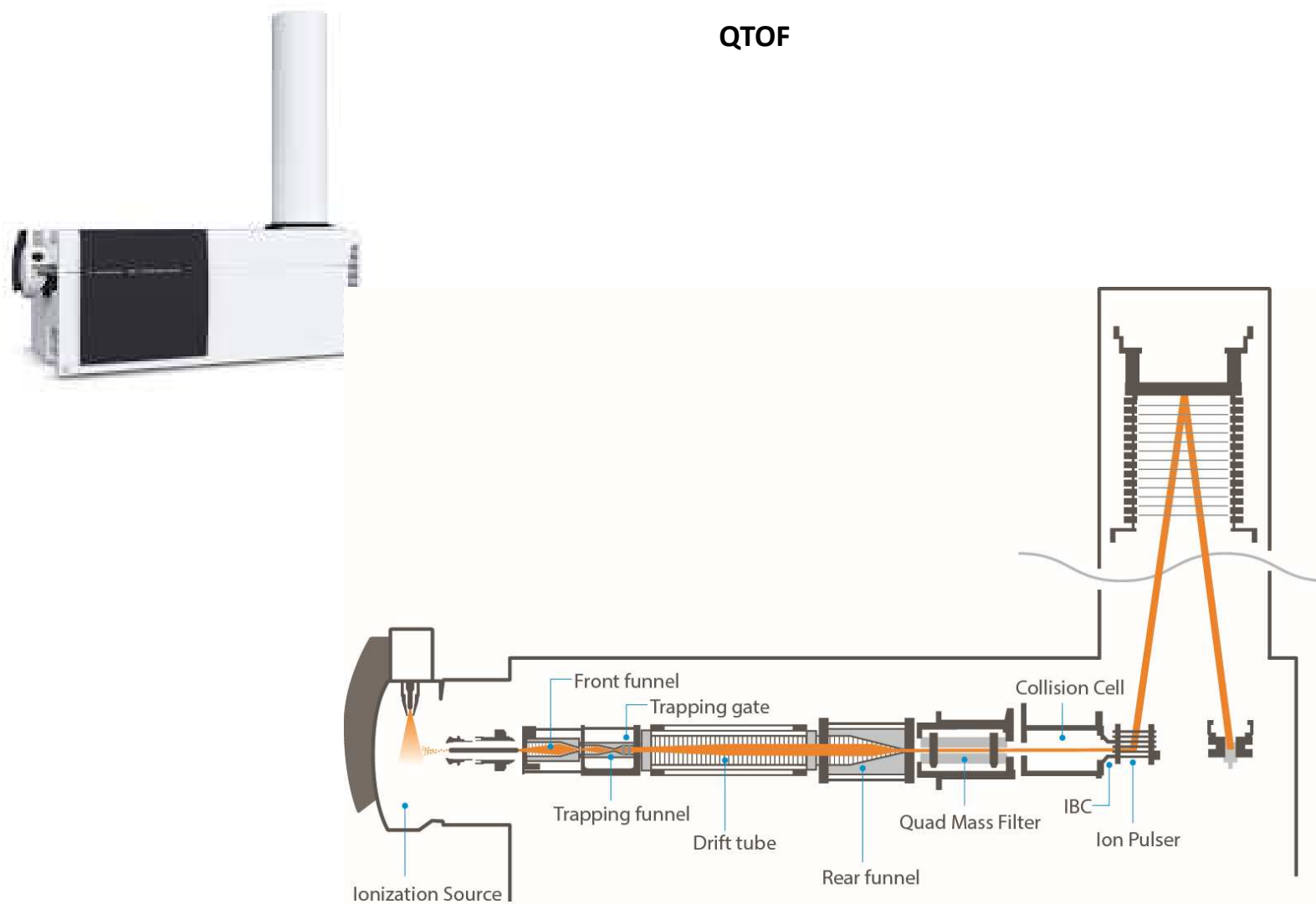


Schéma kvadrupól - analyzátoru doby letu

Testing Unconventional Matrices to Monitor for Prenatal Exposure to Heroin, Cocaine,
Amphetamines, Synthetic Cathinones, and Synthetic Opioids

Jeremy Carlier, PhD^a, Nunzia La Maida, MSc^b, Anna Giulia Di Trana, MSc^b, Marilyn A.
Huestis, PhD^c, Simona Pichini, PhD^{b,*}, Francesco P. Busardò, PhD, MD^d.

^aUnit of Forensic Toxicology, Department of Anatomical, Histological, Forensic, and
Orthopedic Sciences, Università la Sapienza, Rome, Italy

^bNational Centre on Addiction and Doping, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy

^cLambert Center for the Study of Medicinal Cannabis and Hemp, Institute of Emerging Health
Professions, Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA, USA

^dSection of Legal Medicine, Università Politecnica delle Marche, Ancona, Italy