

Konfirmace v toxikologii

M. Balíková

Ústav soudního lékařství a toxikologie

1. LF UK a VFN v Praze

Konfirmace - dokazování

Základní princip forenzní toxikologie-
ověřování výsledků jinou nezávislou metodou

Mezinárodní odborné směrnice, např.:

□ TIAFT

□ SOFT

□ GTFCH

□ WADA

Zaměření toxikologických analýz

- Diferenciální diagnóza – podezření na otravu
- Kontrola dodržování terapie, cílené analýzy
- Preventivní programy – okruh nox (NL)
- Výzkumné studie (nové noxy, metabolity aj.)

Nutné informace pro toxikologa při podezření na otravu neznámou noxou:

1) Anamnéza

2) Příznaky otravy

- ✓ gastrointestinální problémy
- ✓ křeče (strychnin, kyanidy, antidepresiva, amfetaminy...)
- ✓ halucinace, deliria (LSD, psilocybin, MDMA, DMT, kanabinoidy, atropin, skopolamin, předávkování léčiv...)
- ✓ mydriáza nebo mióza (amfetaminy, opiáty...)
- ✓ metabolická acidóza (methanol, glykoly...)

Cílená kvantitativní analýza

Stanovení ethanolu v krvi

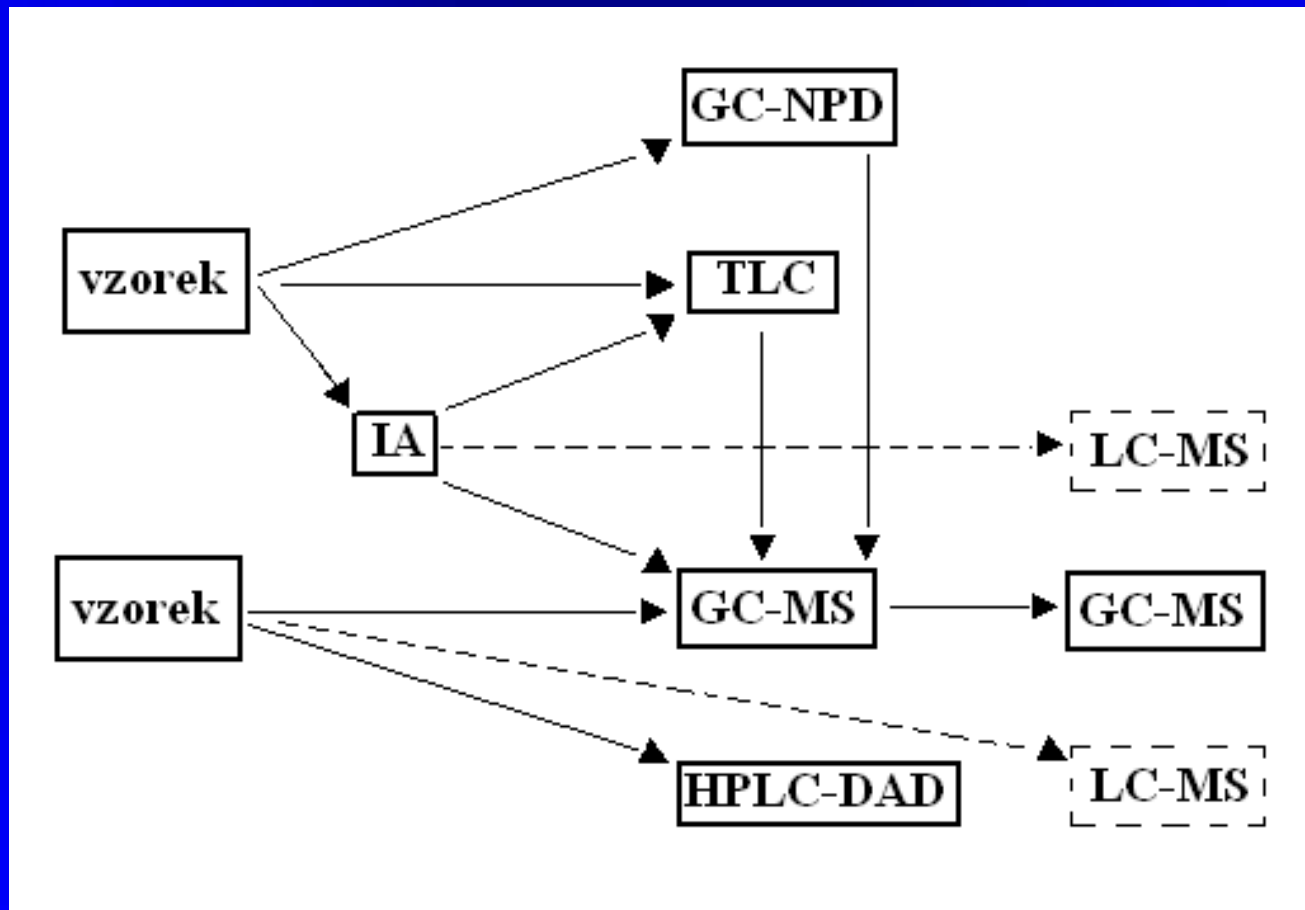
1) Orientační, nespecifické metody:

- ❑ Widmarkova metoda (suma redukující látky)
- ❑ Enzymatická metoda (možné interference)
- ❑ Osmometrická metoda (nespecifická, nevyhovující)

2a) Specifická plynová chromatografie

2b) Duální systém plynové chromatografie (2 kolony)

Kombinace toxikologických metod - dokazování neznámé noxy



Potvrzování pomocí GC-MS

Cílené analýzy

- 1) Potvrzení, upřesnění imunochemického záchytu
- 2) Potvrzení nejasného nálezu TLC (neúplná separace...)
- 3) Potvrzení nejasného HPLC nálezu (vyloučení interferencí, záměny látek...)
- 4) Potvrzení GC screeningu (FID, NPD)
- 5) Potvrzení GC-MS screeningu

GC-MS screening vs. cílená confirmace

1) Screeningové metody:

- ❑ detekce širokého spektra neznámých tox
- ❑ kompromisní řešení extrakce, separace, detekce
- ❑ méně citlivé

2) Konfirmační metody

- ❑ optimalizované pro úzkou škálu látek specifikovaných
- ❑ mohou využívat derivatizační postupy
- ❑ mají nižší mez detekce, jsou více citlivé
- ❑ výhodný speciální SIM režim MS - vyšší citlivost

Potvrzování imunochemického skupinového záchytu drog

Požadavky:

- ❑ Mez detekce potvrzovací metody musí být nižší než hodnota cut off imunochemického záchytu
- ❑ Potvrzování GC-MS předchází speciální úprava vzorku, hydrolýza, extrakce, derivatizace
- ❑ Požadavek na účinnost extrakce i čistotu extraktů
- ❑ Nastavení optimálních separačních režimů
- ❑ Volba hmotnostního módu (nastavení parametrů SIM)

GC-MS potvrzování imunochemického skupinového záchytu drog v moči

Pozitivní imunozáchyt	Úprava moče	Běžná derivatizace
Opiáty typu morfinu	1) Případná hydrolýza minerální kyselinou 2) SPE pH 9 3) Zakoncentrování	Silylace
Budivé aminy Amfetaminy	1) Extraktivní acetylace aj. 2) Zakoncentrování	Acetylace Trifluoracetylace
Kokain a metabolity	1) SPE pH 6 2) Zakoncentrování	Silylace
Kanabinoidy	1) Hydrolýza alkálií 2) SPE 3) Zakoncentrování	Silylace

Konfirmace pomocí GC-MS

Využití chemické derivatizace-1

Derivatizace je cílená chemická reakce

pro konkrétní typ sloučenin - cílené analýzy.
Není použitelná pro záchyt neznámých tox

Účel:

- ❑ Snížení polarity analytů
- ❑ Zlepšení separace, snížení meze detekce
- ❑ Získání více specifického hmotnostního spektra
- ❑ Podpořit identifikaci domnělé látky

Konfirmace pomocí GC-MS

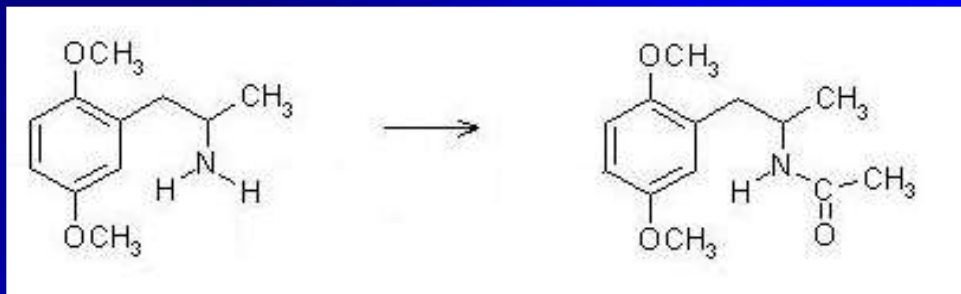
Využití chemické derivatizace-2

Původní analyt	Typ derivátu
kyselina	silyl, alkyl, halogenalkyl....
alkohol. fenol	silyl, acetyl, butyryl, halogenacetyl...
amin	acetyl, halogenacetyl, halogenbutyryl....
vicinální dioly, glykoly	cyklické boronáty, spec. estery....

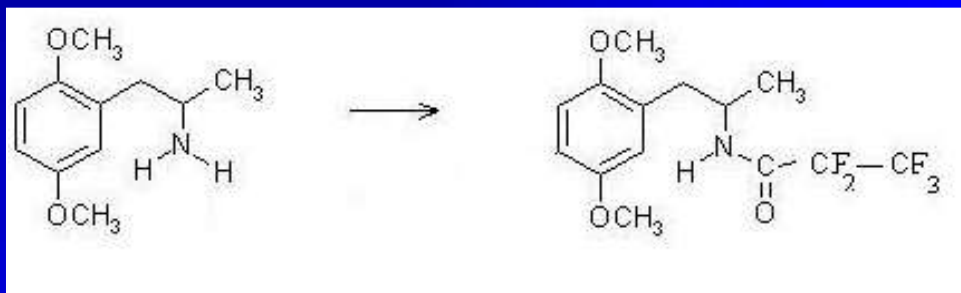
Chemická derivatizace analytů - 1

Typy reakcí:

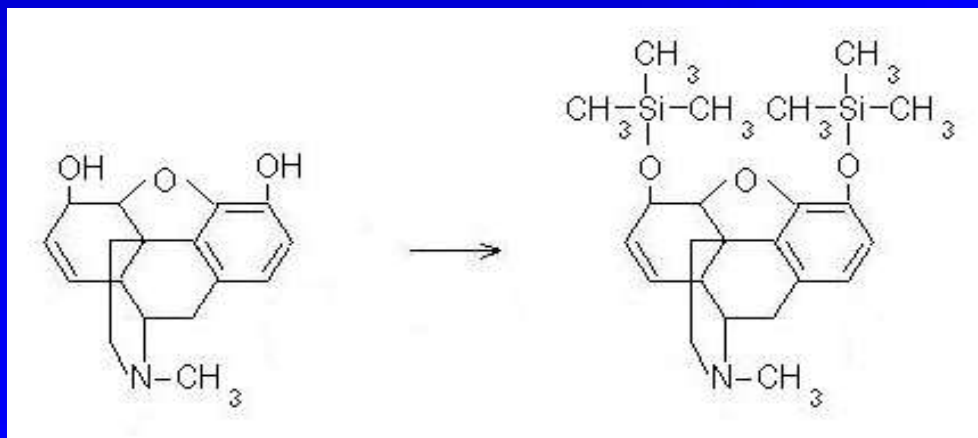
1) Acetylace aminů, fenolů



2) Tvorba perfluorderivátů

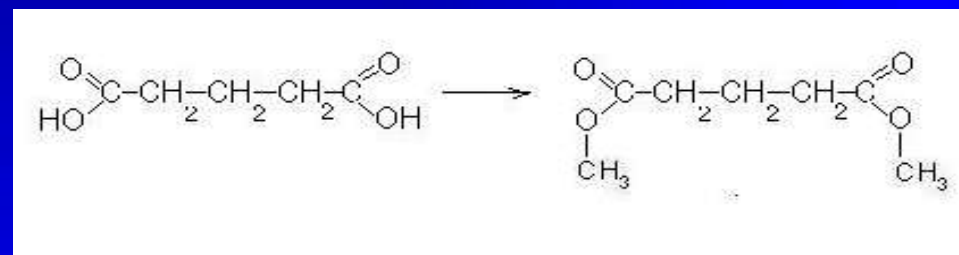
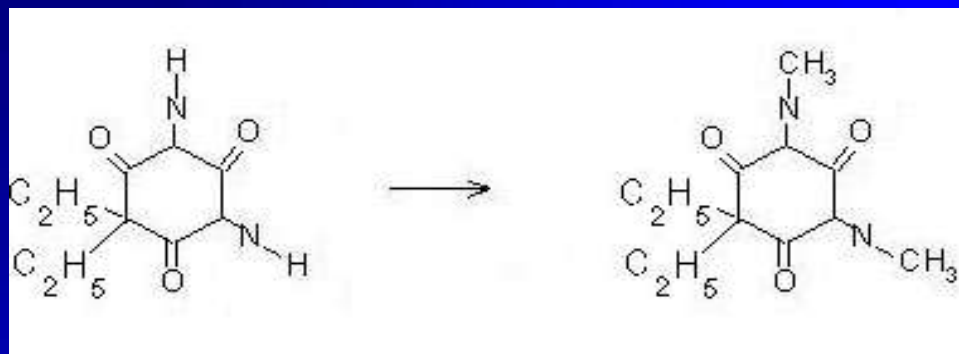


3) Silylace kyselin, fenolů

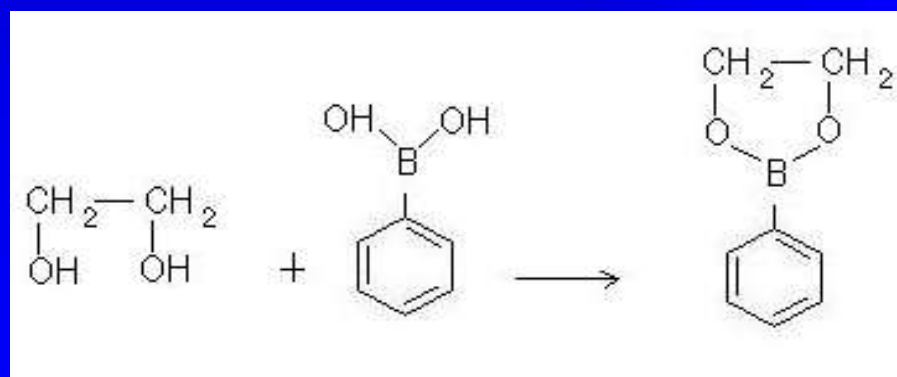


Chemická derivatizace analytů - 2

4) Alkylace kyselin



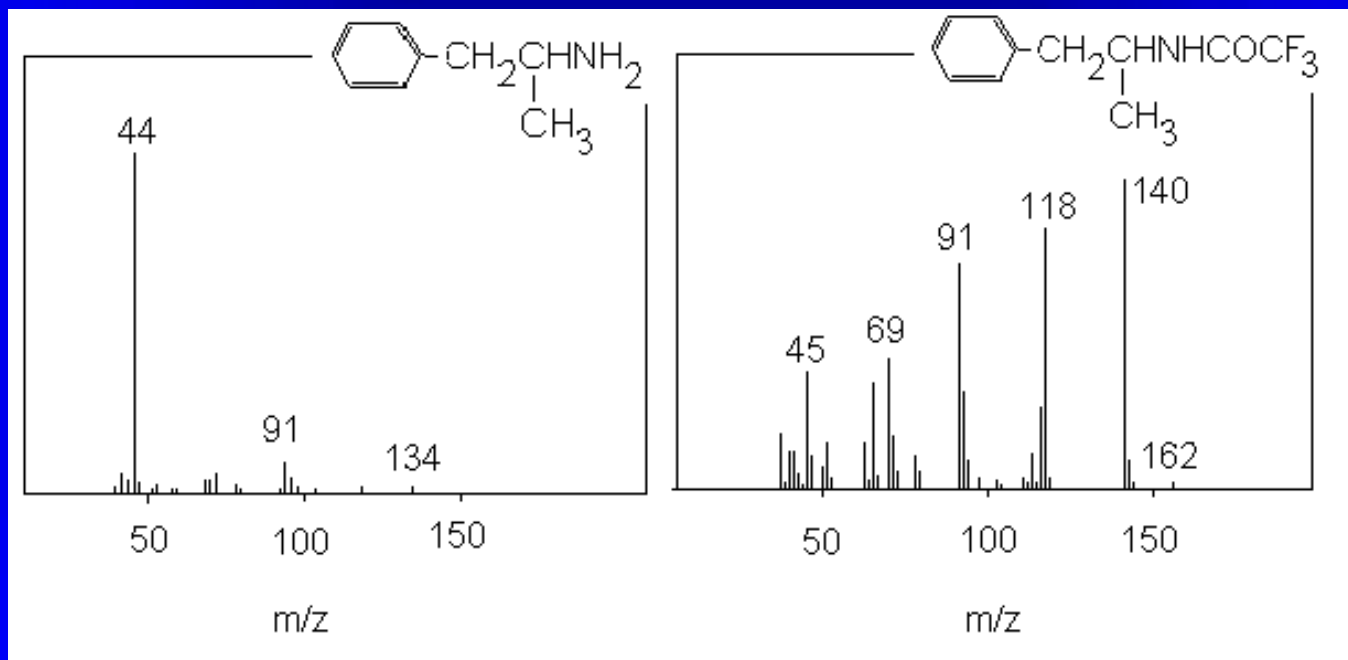
5) Speciální reakce Vicinální dioly- tvorba cyklických etherů



Specificita spekter amfetaminu

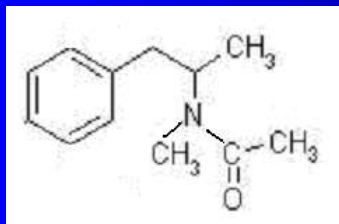
Původní forma

TFA derivát



Acetylovaný methamfetamin

EI a CI ionizace

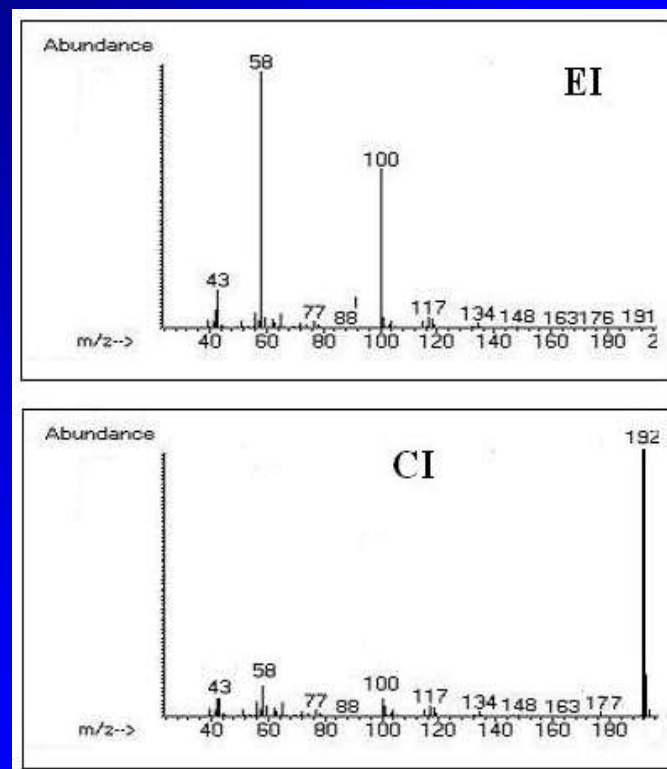


$C_{12}H_{17}NO$

191,13101

Chemická ionizace CI

Měkká ionizace Protonovaný
molekulární ion MH^+
usnadňuje identifikaci,
potvrzení předpokládané
struktury, potvrzení
molekulové hmotnosti



Hromadná otrava neznámou noxou (1)

KAZUISTIKA - využití GC-MS screeningu

Organizované cvičení uvolněného lucidního myšlení
podpořené psychoaktivními látkami - tělocvična FTVS

Účastníci seance ve věku 20-50 let, asi 35 lidí

Konzumace cca 150 ml bylinného odvaru

Cca za 1 hod zdravotní problémy:

- změny vnímání, halucinace
- agitace, neklid
- agresivita
- mydriáza, tachykardie, hypertermie, suchá ústa
- hypotenze, respirační kolaps, kóma

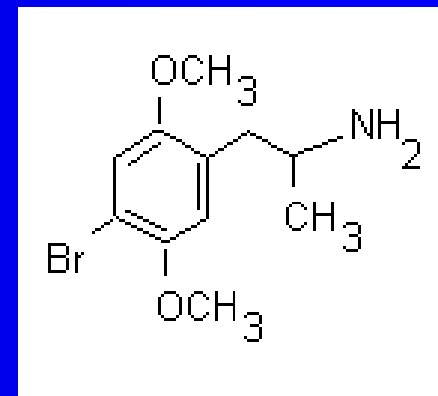
Hromadná otrava neznámou noxou (2)

- RZS, následně policie.
- 35 pacientů hospitalizováno v 5 nemocnicích
- Toxikologická laboratoř - masivní dotazy na příčinu
- Dodán vzorek bylinného odvaru
- Později biologické vzorky (ŽO, krev, moč)- záměny?
- Toxikologická analýza čaje - extrakce alkaloidů
GC-MS screening pro neznámé noxy
- Následně analýzy biologických vzorků
- Dodatečně kalibrace a kvantifikace v séru

2,5-Dimethoxy-4-brom-amfetamin

Nová droga - poprvé abuzus v ČR

- agonista serotoninových receptorů
- velmi potentní halucinogen
- efektivní dávky pro člověka 1-3 mg
- Shulgin 1998: p. o. dávka 2,8 g – bolestivé křeče s mdlobami, záblesky depersonalizace, začátek halucinací po 3 hod. Předávkování a následné spasmy artérií, kóma, možná smrt
- Dispozice v těle (Shulgin 1998): akumulace v plicích, opožděný transport do mozku, halucinace po 3 hod



Těžká otrava 2 osob neobvyklou neznámou noxou (1)

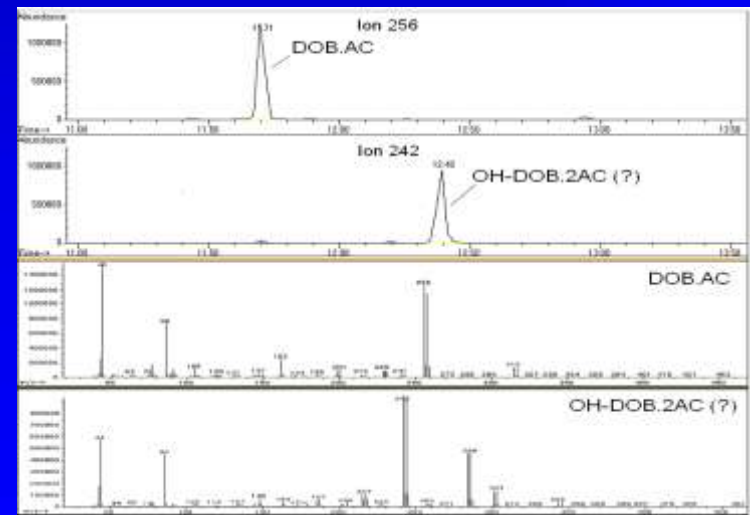
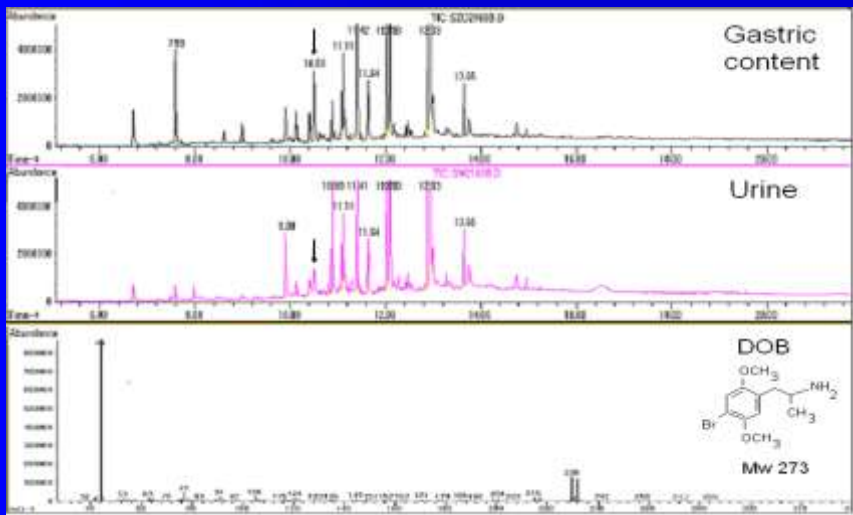
Dodatečná historie události (za řadu dní):

- Dva muži testovali nový halucinogen „LSD like“
- Rozdělili si bělavý prášek ve vialce – dávka p. o.
- Za cca 15 min začali halucinovat, zvracet
- Byli nalezeni před domem na trávníku v kómatu
- Po neznámé době byli odděleně hospitalizováni v hlubokém kómatu, se záchvaty generalizovaných křečí. Odebrány vzorky k toxikologickému vyšetření na neznámou noxu, zaslány odděleně, bez informace o souvislosti obou případů

Těžká otrava neobvyklou noxou - (2)

Toxikologické analýzy, tápání v neznámu:

- Těžká acidóza (pH 6,6) – methanol, glykoly negativní
- CEDIA screening: poz. THCOOH, poz. KOKAIN, neg. AMPH (!)
- GC-MS screening neznámé noxy : hit podle knihovny: DOB ?
- GC-MS konfirmace jako acetylderivát: DOB a metabolit

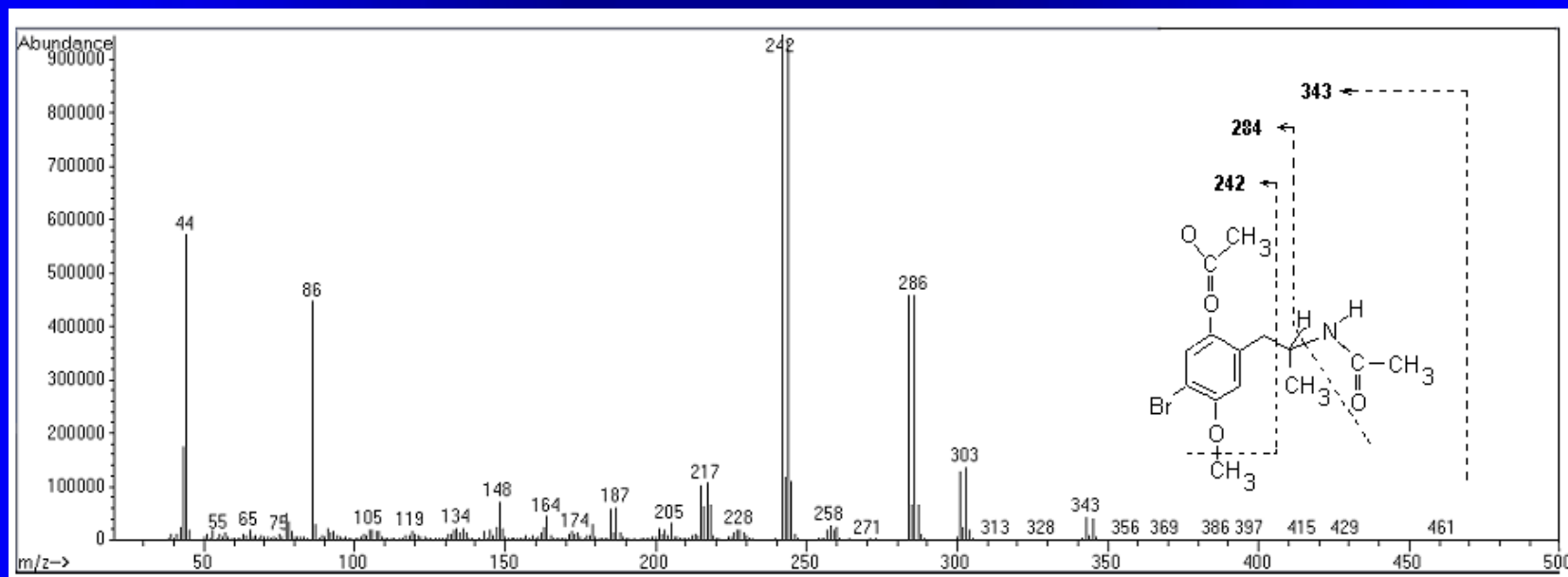


Těžká otrava neobvyklou noxou – (3)

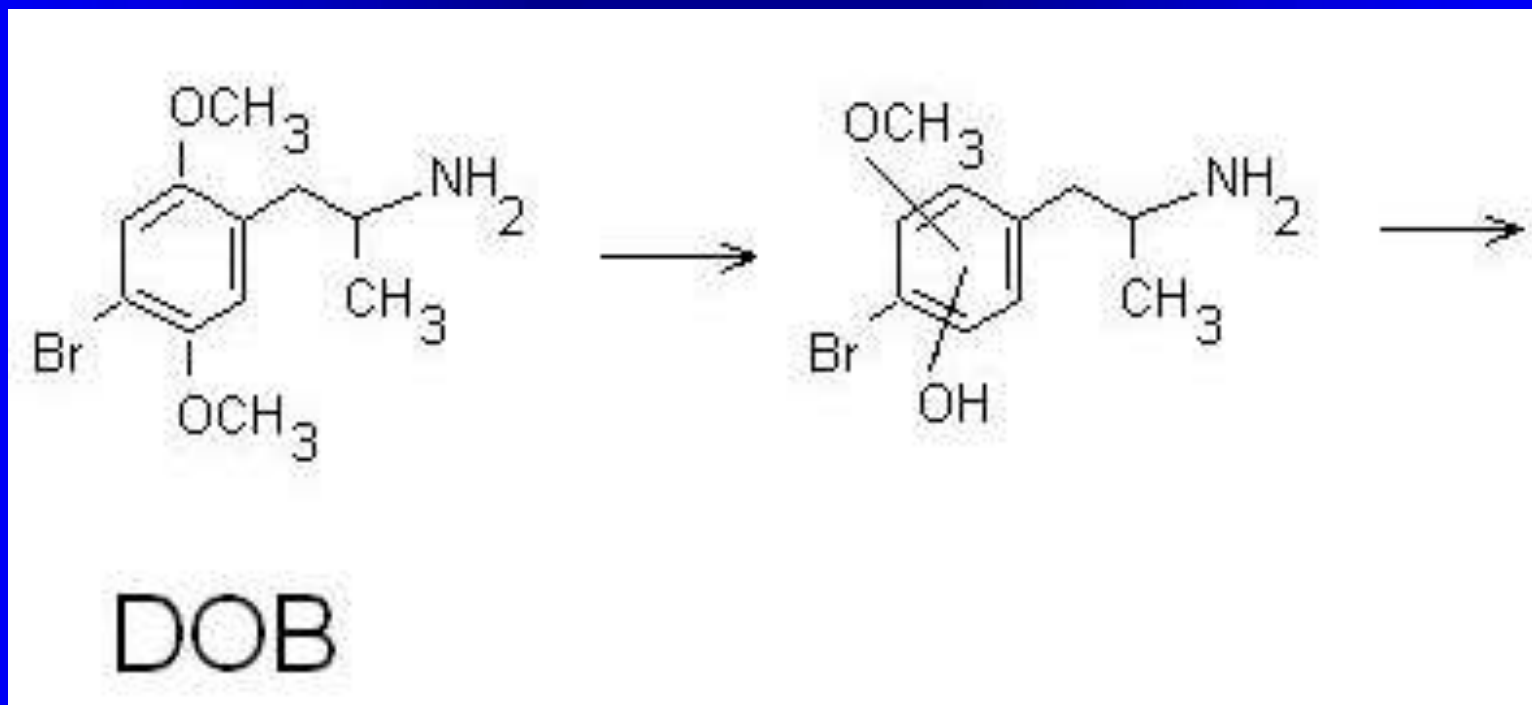
TOXIKOLOGICKÉ NÁLEZY - SOUHRN

PACIENT	Ž. O.	MOČ	SÉRUM
M-28 let 113 kg MJ Přeživší	---	DOB Kokain + met. THCOOH	DOB 13 ng/ml
M-29 let 65 kg KAR Zemřel po 6 dnech	DOB	DOB THCOOH	DOB 19 ng/ml

Struktura a fragmentace acetylderivát metabolitu DOB



Biotransformace - neznámé metabolity DOB



Hmotnostní spektra nasvědčují O-demethylaci,
neumožňují ale rozeznat oba možné izomery

Vybraná toxikologická literatura:

- R. C. Baselt: Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man, Biomedical Publ. 2002 a další vyd.
- O. H. Drummer: The Forensic Pharmacology of Drug Abuse; Arnold Publ. 2001
- R. J. Flanagan et al.: Fundamentals of Analytical Toxicology, Wiley-VCH 2007
- J. Večerková: Biotransformace léčiv a její význam pro toxikologickou praxi; Karolinum 1997
- M. Balíková: Forenzní a klinická toxikologie; Galén 2004
- J. Patočka aj.: Vojenská toxikologie; Grada 2004
- A. C. Moffat aj. ed.: Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in Pharmaceuticals, Body Fluids and Postmortem Material; Pharmaceutical Press 2004

Děkuji vám za pozornost

mbali@lf1.cuni.cz

Tel. 22496-7181