

Principy řízených extrakcí nox z biologického materiálu pro různé typy toxikologických analýz

Význam správné přípravy vzorku pro konečný
výsledek

Ing. Věra Marešová, CSc

Ústav soudního lékařství a toxikologie 1 LF UK a VFN

vmare@lf1.cuni.cz

Správná příprava vzorku

- ✓ léčiva a drogy – velmi široké spektrum strukturně odlišných organických extraktivních látek o různých fyzikálně – chemických vlastnostech
- ✓ **zásadní význam pro konečný výsledek analýzy**
 - vhodná volba biologického materiálu
 - vhodná volba a provedení izolačního postupu
 - znalosti o osudu látek v organismu
 - praktické zkušenosti v toxikologické laboratoři
- ✓ **účely izolací léčiv a drog**
 - oddělení analytů od nežádoucích interferujících látek z matrice (proteinů a lipidů, endogenních či exogenních součástí vzorku)
 - zakoncentrování analytů v extraktu pro snížení mezí detekce
 - redukce nečistot v extraktu pro zvýšení citlivosti důkazu analytu
 - kompatibilita s chromatografickým systémem – změna matrice analyt v séru → analyt v organické fázi

Správná příprava vzorku

Volba biologického materiálu

- Cíl vyšetření (neznámá noxa, cílená analýza)
- Anamnéza případu (akutní otrava, chronická otrava)
- Dostupné analytické možnosti (přístrojové vybavení)

Detekční okno

Čas	Biologický materiál
hodiny	krev
	sliny
	pot
dny	moč
	tkáň
týdny, měsíce	vlasý
	smolka

Správná příprava vzorku

Volba biologického materiálu

➤ *krv*

- ✓ drogy a léčiva rozdělovány mezi plazmu a erythrocyty
- ✓ tabelovaná terapeutická rozmezí se vztahují k plazmě nebo séru
- ✓ hemolýza erythrocytů narušuje správnost stanovení a interpretace
- ✓ hodnoty koncentrací léčiv a drog jsou důležité
 - posuzování stavu vědomí
 - určování terapeutických, toxických či letálních koncentrací

➤ *moč*

- ✓ koncentrace léčiv a drog bývají vyšší než v krvi
- ✓ vztahují se k pozdější fázi otravy, vedle původních forem jsou ve vzorku obsaženy metabolity
- ✓ neinvazivní odběr, velký objem vzorku
- ✓ hydrolýza pro uvolnění metabolitů i původních forem z konjugátů s endogenními substráty

Správná příprava vzorku

Volba biologického materiálu

➤ *žaludeční obsah*

- ✓ koncentrace léčiv a drog bývají vyšší než v krvi
- ✓ vztahují se k počáteční fázi otravy, ve vzorku jsou obsaženy původní formy látek, někdy i metabolity
- ✓ neinvazivní odběr, velký objem vzorku

➤ *tkáňové matrice (játra, ledviny, slezina, plíce...)*

- ✓ obtížné zpracování
- ✓ nízká extrakční výtěžnost

➤ *vlasý*

- ✓ zkoumání historie abuzu
- ✓ testy chronického abuzu
- ✓ kriminální vyšetřování, pracovní nebo občansko – právní spory
- ✓ spolehlivost při výkonu povolání

Správná příprava vzorku

Koncentrační rozpětí léčiv a drog

- ✓ od terapeutických koncentrací k letálním od 10^{-12} až do 10^{-4} g/g nebo g/ml
- ✓ směsné podání ztěžuje interpretaci účinků
- ✓ společný výskyt mnoha nox způsobuje analytické komplikace a ztěžuje odhalení přítomnosti všech nox

Způsob provedení izolace

- ✓ předem neznámé noxy „general unknown“ – izolace co neširšího spektra toxikologicky významných látek za cenu nižší extrakční výtěžnosti
- ✓ cílené izolace léčiv a drog po identifikaci neznámých látek – optimalizace izolačních postupů pro vysokou extrakční výtěžnost

Správná příprava vzorku

Brönstedova teorie kyselin a zásad

AH – kyseliny: uvolňují proton **B** – báze: přijímají proton

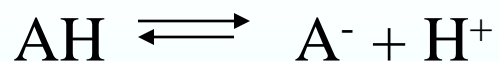
pK_a – disociační konstanta: síla kyselin a zásad

slabé kyseliny: protonovaná forma neionizovaná [AH]

slabé báze: protonovaná forma ionizovaná [BH⁺]

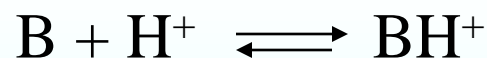
HENDERSON – HASSELBACH

vztah mezi pH, disociační konstantou pK_a a poměrem ionizované a neionizované frakce



$$K_a = \frac{[A^-] [H^+]}{[AH]}$$

$$pK_a = pH + \log \left(\frac{[AH]}{[A^-]} \right)$$



$$K_a = \frac{[B] [H^+]}{[BH^+]}$$

$$pK_a = pH + \log \left(\frac{[BH^+]}{[B]} \right)$$

Správná příprava vzorku

$pK_a - pH$ při kterém je 50 % analytu disociováno (rovnováha)

většina léčiv a drog – slabé báze nebo slabé kyseliny

kyseliny **$pH < pK_a$ potlačení ionizace**

$pH > pK_a$ podpoření ionizace

báze **$pH > pK_a$ potlačení ionizace**

$pH < pK_a$ podpoření ionizace

Nedisociované formy analytu v %

Analyt	Ion	$pK_a + 2$	$pK_a + 1$	pK_a	$pK_a - 1$	$pK_a - 2$
kyseliny	anion (-)	1	9	50	91	99
báze	kation(+)	99	91	50	9	1

Izolace léčiv a drog z biologického materiálu

Extrakce – separační proces

rozdělení látek mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze podle jejich rozdělovacích koeficientů

Kvantitativní vyjádření rozdělovací rovnováhy:

Distribuční konstanta K_C $K_C = C_0 / C_A$

C_0 – koncentrace látky v organické fázi

C_A – koncentrace látky ve vodné fázi

Účinnost extrakce E $E = K_C V / (1 + K_C V)$

V – poměr objemů organické a vodné fáze

Izolace léčiv a drog z biologického materiálu

Extrakce kapalina – kapalina

LLE, liquid – liquid extraction

Výhody:

- ✓ extrahuje široké spektrum organických látek
- ✓ jednoduchá na provedení

Nevýhody:

- ✓ špinavé extrakty
- ✓ tvorba emulzí
- ✓ časově náročná
- ✓ velký objem rozpouštědel
- ✓ variabilní výtěžnost

Extrakce na tuhých fázích

SPE, solid phase extraction

Výhody:

- ✓ selektivní
- ✓ možnost zpracování více vzorků
- ✓ reprodukovatelné výsledky
- ✓ jednoduchá na provedení
- ✓ časově nenáročná
- ✓ malá spotřeba rozpouštědel

Nevýhody:

- ✓ proměnlivost kvality sorbentu při výrobě

Izolace léčiv a drog z biologického materiálu

Eluotropní řada rozpouštědel

Rozpouštědlo	Teplota varu (°C)	Rel. permitivita	Rozpustnost ve vodě (g/l)	Dipólmoment (10^{-30} Cm)
pentan	36.07	1.84	0.04	0
cyklohexan	80.74	2.00	0.10	0
tetrachlormethan	76.50	2.20	0.80	0
benzen	80.10	2.30	1.80	0
sirouhlík	46.30	2.60	2.20	0
diethylether	34.50	4.30	74.20	3.84
chloroform	61.26	4.80	10.00	3.94
ethylacetát	77.51	6.00	86.00	6.07
pyridin	115.26	12.40	Mísitelný	7.91
2 - propanol	82.26	19.92	Mísitelný	5.54
aceton	56.50	20.27	Mísitelný	9.44
methanol	64.70	32.60	Mísitelný	5.63
acetonitril	81.60	37.50	Mísitelný	11.47
ethylenglykol	197.30	37.70	Mísitelný	7.61
voda	100.00	80.36	Mísitelná	-

Izolace léčiv a drog z biologického materiálu

Extrakce kapalina-kapalina

Standardní frakční extrakce léčiv a drog STA

50 ml moč, žaludeční obsah
pH=3.0, 100 ml diethyléter

kyselé a neutrální analyty E_K

zbytek vodné fáze
pH=10.0, 100 ml diethyléter

bazické a neutrální analyty E_A

zbytek vzorku moče (20 ml)
hydrolytické štěpení konjugátů

hydrolyzát, pH=7.0
100 ml diethyléter

konjugované metabolity E_H

Izolace léčiv a drog z biologického materiálu

Extrakce SPE

Typy materiálů pro SPE

silikagel – kyselina křemičitá

křemelina – oxid křemičitý

alumina – oxid hlinitý

uhlík

polystyren

polystyrenstyren – divinylbenzen

polystyren –N – vinylpyrrolidon

celuloza

Charakteristiky silikagelu

velmi čistý

stabilní – nebobtná, nesmršťuje se
porézní a amorfní (ne krystalický)

regenerace po změně pH

regenerace po zpětné extrakci

velká plocha povrchu, porozita

velká reaktivita – hydroxylové skupiny

Izolace léčiv a drog z biologického materiálu

Extrakce SPE

Silikagel

- Nejčastěji používaným nosičem jsou porézní, sférické částice silikagelu.
- Amorfnní síť polymerního oxidu křemičitého.
- Výhody: mechanicky stabilní, reaktivní, velká plocha povrchu.
- Nevýhody: reaktivní zbytkové silanolové skupiny, rozpustný při vysokém pH.
- Při nízkém pH hrozí hydrolyza vazby u chemicky vázané fáze.

Skupiny na povrchu částic:

- $\equiv\text{Si-O-Si}\equiv$ siloxanové
- $\equiv\text{Si-OH}$ siloxy nebo silanolové
- $=\text{Si}(\text{OH})_2$ silandiolové nebo geminalní silanoly
- $-\text{Si}(\text{OH})_3$ silantrioly



5 micron

Izolace léčiv a drog z biologického materiálu

Extrakce SPE

Výběr vhodné SPE kolonky závisí na konkrétní úloze

SPE extrakce se řídí principy kapalinové chromatografie:

- ✓ separační mechanismy zahrnují vzájemné interakce mezi molekulami analytů a funkčními skupinami pevné fáze
- ✓ *system normální fáze* – pevná fáze je polárnější než kapalná fáze
- ✓ *system reverzní fáze* – kapalná fáze je polárnější než pevná fáze
- ✓ izolace v systému normální fáze s polárními adsorbenty
- ✓ izolace v systému normální fáze s vázanými polárními funkčními skupinami
- ✓ izolace v systému reverzní fáze s nepolárními vázanými funkčními skupinami
- ✓ izolace v systému iontovýmenné separace na fázích s nabitými funkčními skupinami

Izolace léčiv a drog z biologického materiálu

extrakce SPE

interakce analyt – pevná fáze

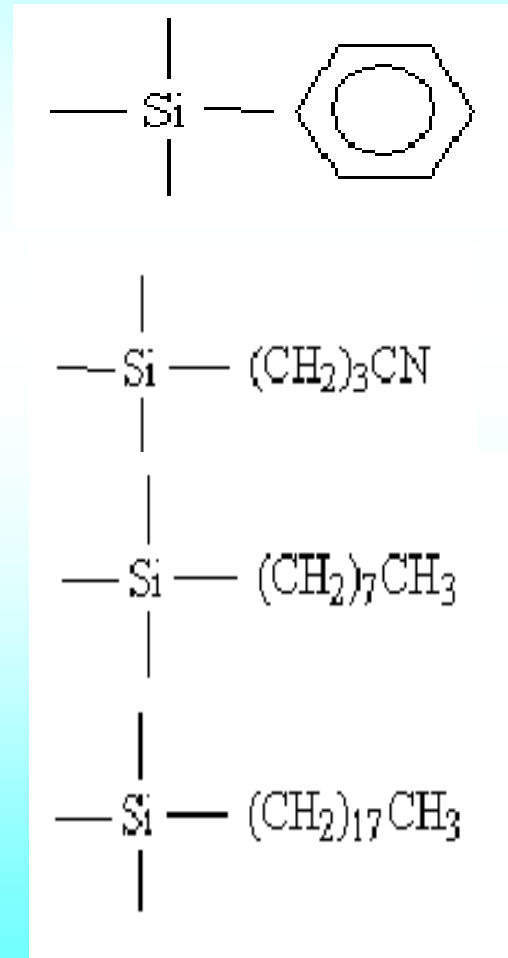
- ✓ *nepolární extrakce* – van der Waalsovy síly, disperzní síly
- interakce na nepolárních fázích mezi C –H vazbami sorbentu a C –H vazbami analytu (reverzní fáze)
- na pevnou fázi navázány uhlovodíkové řetězce C2-C8, C10, C12, C18 , C20, C30, fenyl, cyklohexyl, kyanopropyl
- izolace pro léčiva a drogy, TDM, pesticidy
- analyty: protonované nebo neutrální molekuly, aromáty, alifatické řetězce
- matrice – vodná fáze, pufry
- eluce rozpouštědly od typicky nepolárních ke středně polárním

Izolace léčiv a drog z biologického materiálu

extrakce SPE

reverzní fáze:

- vázaný fenyl
- vázaný kyanopropyl
- vázaný oktyl
- vázaný oktadecyl



Izolace léčiv a drog z biologického materiálu

Extrakce SPE

interakce analyt – pevná fáze

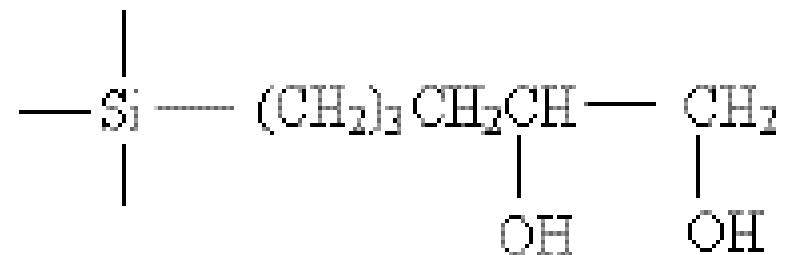
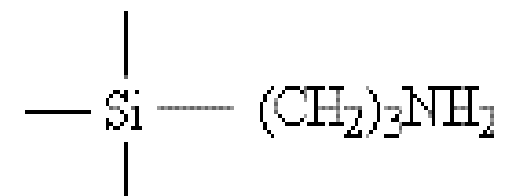
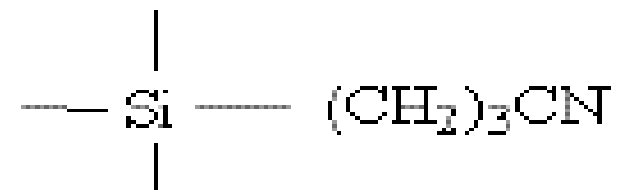
- ✓ *polární extrakce* – vodíkové vazby, $\pi - \pi$ a dipól - dipól interakce
- interakce na polárních fázích, vodíkové vazby mezi aktivním vodíkem funkční skupiny analytu a silanolovými skupinami pevné fáze, interakce molekul s permanentním nebo indukovaným dipólem
- na pevnou fázi (silikagel) navázány skupiny kyanopropylová nebo diethylaminová
- izolace pro tuky, olejová aditiva, uhlovodíky, fenoly
- analyty: aminy, alkoholy, fenoly, karboxylové kyseliny, aromatické uhlovodíky, heterosloučeniny (O, S, N, P)
- matrice – nepolární, organická fáze
- eluce rozpouštědly od středně polárních k vysoce polárním

Izolace léčiv a drog z biologického materiálu

extrakce SPE

normální fáze:

- kyselý prahý silikagel
- vázaný kyanopropyl
- vázaný aminopropyl
- vázaný dihydroxypropylpropyl



Izolace léčiv a drog z biologického materiálu

extrakce SPE

interakce analyt – pevná fáze

✓ *iontová výměnná extrakce*

- interakce mezi nabitými skupinami kovalentně vázanými na pevné fázi a ionty v roztoku s opačným znaménkem
- změna pH – pro ionizaci funkční skupiny analytu
- iontové vazby jsou silné, zadržují analyt
- nepolární interference vymyty organickými rozpouštědly
- polární interference odstraněny promytím vodou
- pro ionizované/nepolární analyty
- eluce rozpouštědly obsahující silnější opačně nabitý ion nebo se využije změna pH
- pro iontové/nepolární analyty eluce se současným přerušением interakcí analyt – pevná fáze

Izolace léčiv a drog z biologického materiálu

extrakce SPE

interakce analyt – pevná fáze

✓ *kationtově výměnná extrakce*

- záporně nabitě funkční skupiny kovalentně vázané na pevné fázi
- bazické (acidické) analyty nesou opačný náboj – změna pH
- pevná fáze – benzensulfonová kyselina (silný katex)
 - propylsulfonová kyselina (silný katex)
 - karboxylová kyselina (slabý katex)
- izolace pro bazické drogy, léčiva, katecholaminy, herbicidy
- analyty: aminy, bazická léčiva
- matrice vodná, tělní tekutiny
- eluce bazickými rozpouštědly – neutralizace analytu

Izolace léčiv a drog z biologického materiálu

extrakce SPE

interakce analyt – pevná fáze

✓ *aniontově výměnná extrakce*

- kladně nabitě funkční skupiny kovalentně vázané na pevné fázi
- kyselé analyty nesou opačný (záporný) náboj – změna pH
- pevná fáze – kvarterní amoniová sůl (silný anex)
 - amino propyl (slabý anex)
 - diethylamino (slabý anex)
- izolace pro kyselé drogy, organické kyseliny, mastné kyseliny
- analyty: fosfáty, karboxylové kyseliny, sulfonové kyseliny
- matrice vodná, tělní tekutiny
- eluce kyselými rozpouštědly – neutralizace analytu

Izolace léčiv a drog z biologického materiálu

Extrakce SPE

interakce analyt – pevná fáze

✓ *interakce na směsných pevných fázích*

- záporně nebo kladně nabitě funkční skupiny kovalentně vázané na pevné fázi (reverzní pevná fáze RP)
- polární, nepolární a iontové retenční mechanismy
- analyty nesou opačný náboj
- pevná fáze – katex
 - anex
- izolace pro bazické nebo kyselé a neutrální analyty
- bazické analyty, kyselé analyty, neutrální analyty
- matrice vodná, tělní tekutiny
- selektivní vymývání organickými rozpouštědly
- eluce směsí organických rozpouštědel s bází nebo kyselinou

Izolace léčiv a drog z biologického materiálu

extrakce SPE

Výběr SPE kolonky – typ fáze a velikost kolonky

- ✓ *biologický materiál vzorku*, objem vzorku
- ✓ *vlastnosti matrice* – je polární či nepolární (sérum, plasma, moč = polární = obrácené fáze, fáze iontově výměnné nebo kombinace)
- ✓ *vlastnosti analytu* – obsahuje hydrofilní, hydrofobní nebo neutrální skupiny

hydrofilní skupiny

hydroxyl – OH

amino – NH₂

karboxyl – COOH

amido – R_NH₂

kvarterní amín – NR₃

sulfonová kyselina –SO₃⁻

hydrofobní skupiny

uhlík – uhlík –C-C

uhlík – vodík –C-H

uhlík – halogen –C-Cl

olefin – C=C

aromát – 

neutrální skupiny

karbonyl – C=O

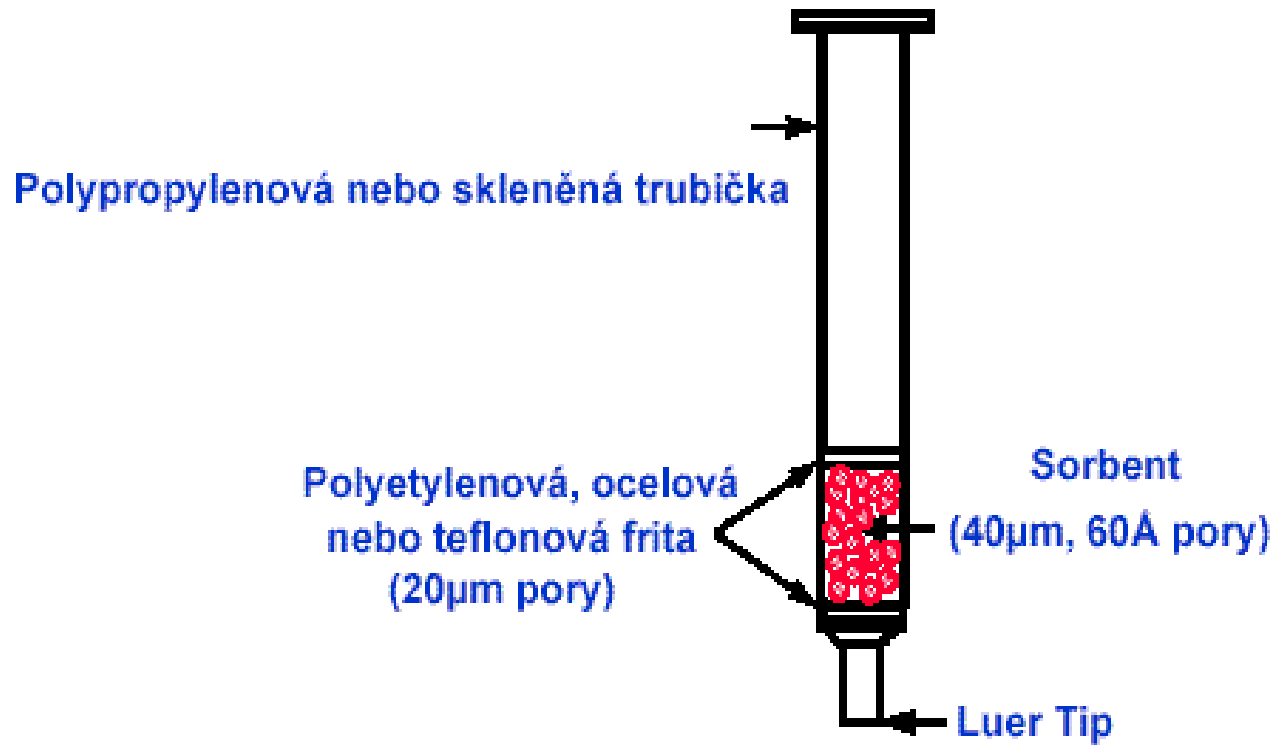
ether – O-R

nitril – CN

Izolace léčiv a drog z biologického materiálu

extrakce SPE

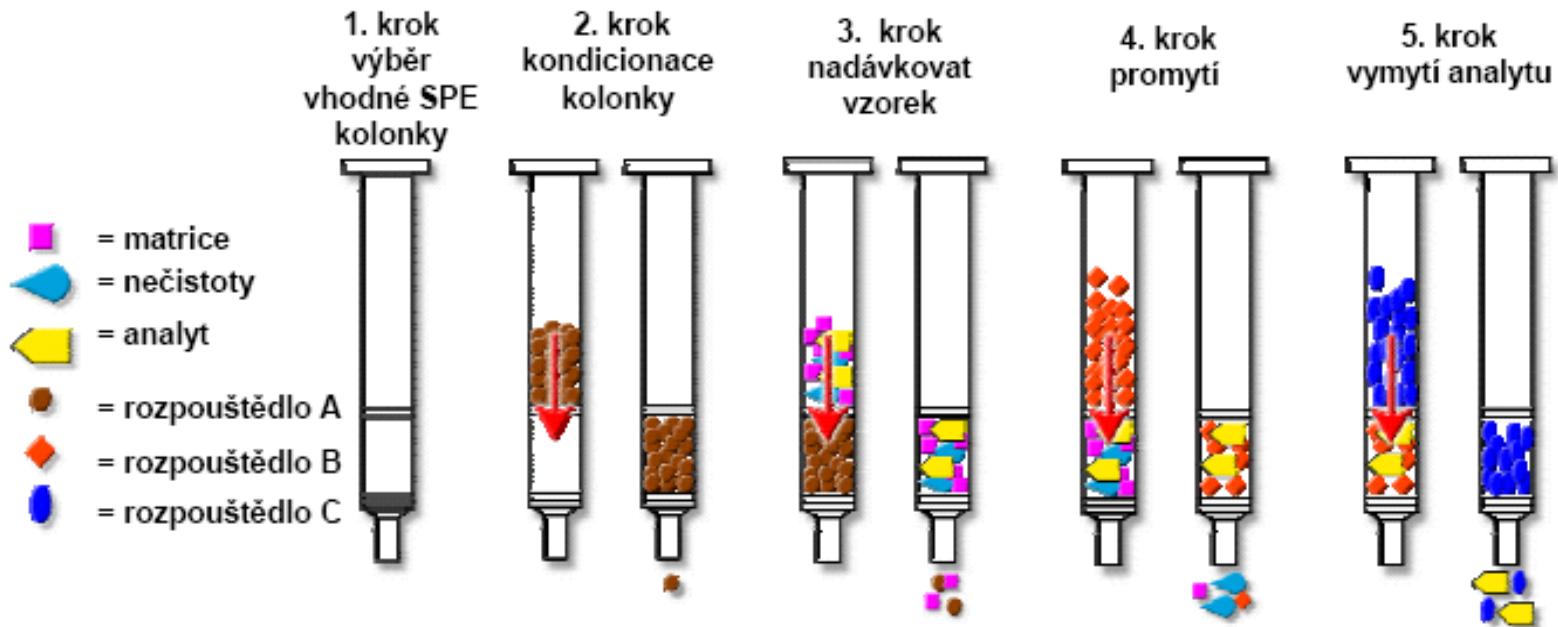
Výběr SPE kolonky



Izolace léčiv a drog z biologického materiálu

extrakce SPE

kroky SPE:



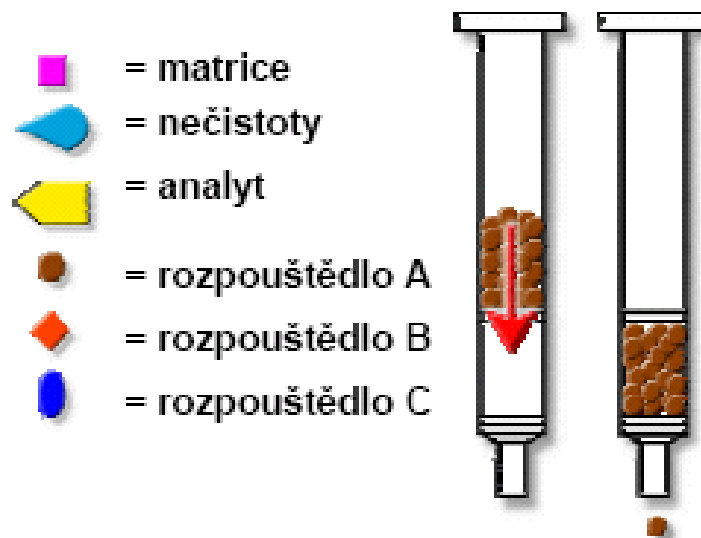
Izolace léčiv a drog z biologického materiálu

extrakce SPE

Kondicionace kolonky

SPE kolonky jsou aktivovány

- ✓ příprava sorbentu pro reprodukovatelnou interakci se vzorkem
- solvatací – promytí jedním objemem kolonky methanolem
- ✓ promytím jedním objemem kolonky pufrům o vhodném pH
- ✓ sorbent zůstává smočený

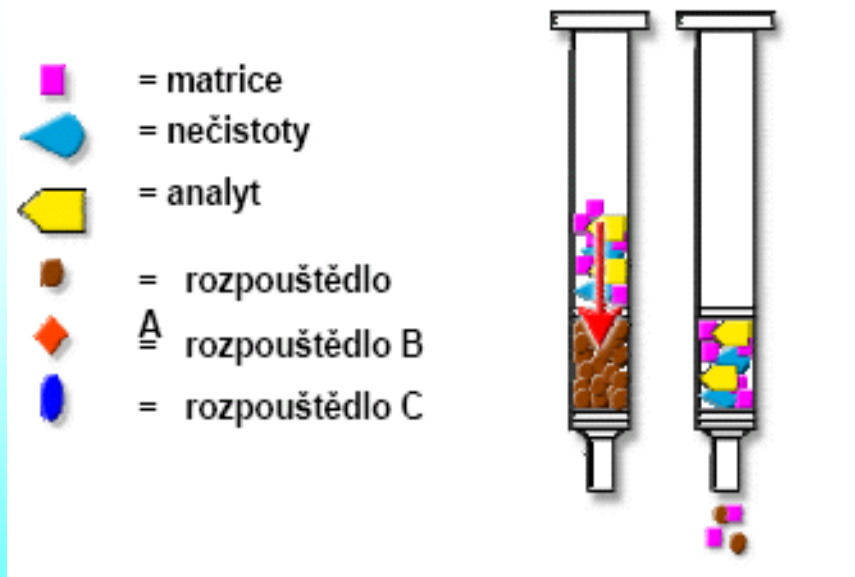


Izolace léčiv a drog z biologického materiálu

Extrakce SPE

Aplikace vzorku – retence analytů

- ✓ úprava vzorku: precipitace proteinů, úprava pH apod
- ✓ pomalá aplikace vzorku, dostatečný čas pro záchyt analytů na povrchu sorbentu (van der Waals, nepolární interakce)

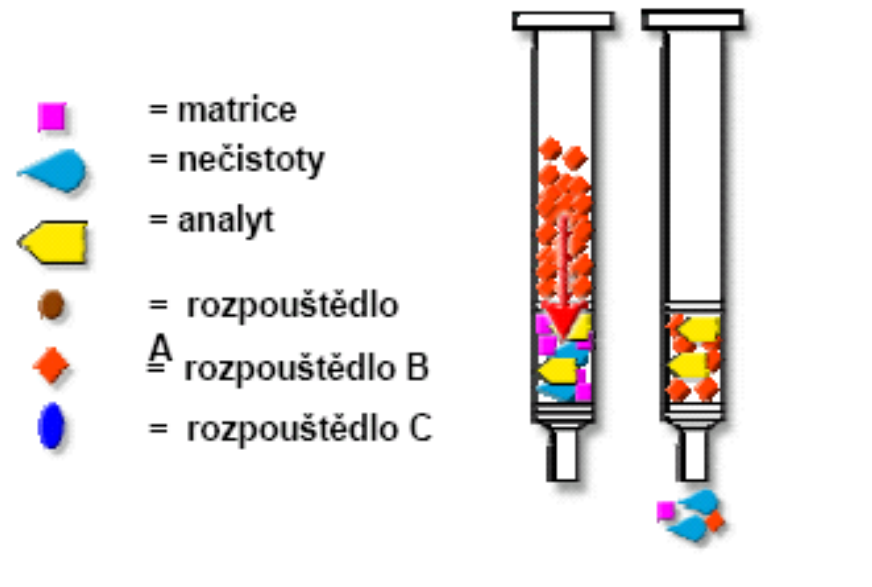


Izolace léčiv a drog z biologického materiálu

extrakce SPE

Vymytí interferencí

- ✓ promytí jedním objemem kolonky deionizovanou vodou obvykle používanou pro nepolární extrakce
- ✓ odstraňování nečistot, aby nedošlo ke ztrátám analytu

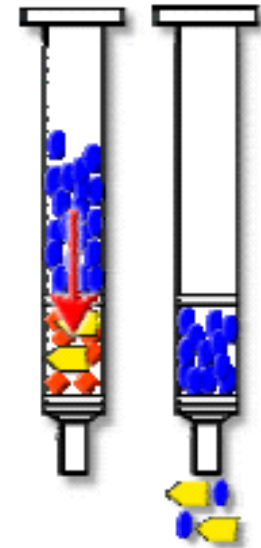


Izolace léčiv a drog z biologického materiálu

extrakce SPE

Eluce analytu

- ✓ eluce analytů vybranou směsí organických rozpouštědel vhodnou pro přerušování interakcí analyt – sorbent (při nepolární extrakci methanolem)
- ✓ zakoncentrování analytů
- ✓ derivatizace



Izolace léčiv a drog z biologického materiálu

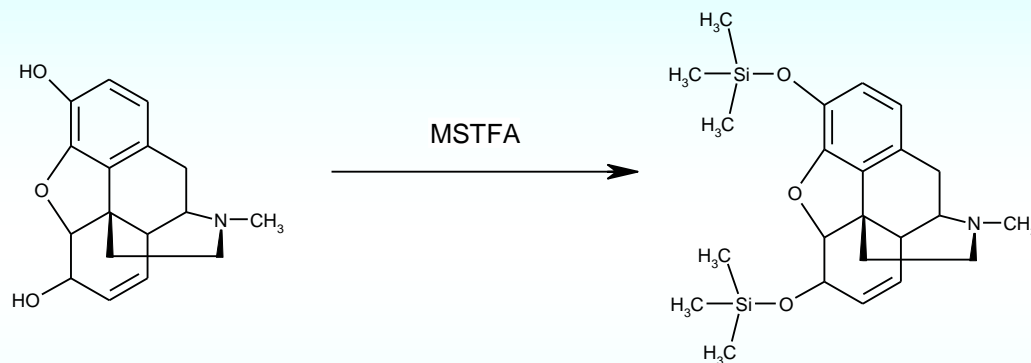
Derivatizace analytů

- ✓ změna fyzikálních a chemických vlastností analytů
- ✓ zvýšení těkavosti
- ✓ zvýšení stability
- ✓ zlepšení chromatografických vlastností (polarita)
- ✓ zvýšení citlivosti (detekovatelnosti)
- ✓ změna matrice

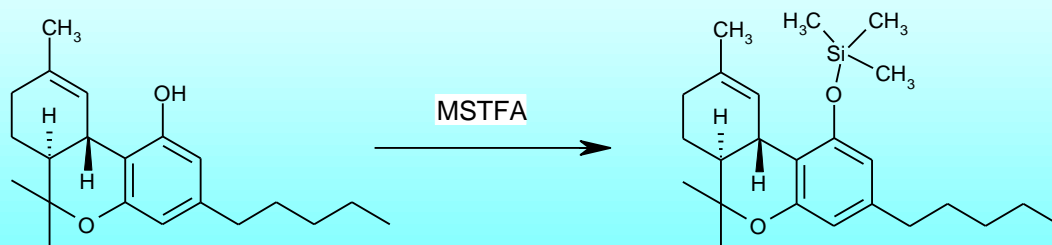
Izolace léčiv a drog z biologického materiálu

Příklady derivatizačních reakcí

Silylace morfinu

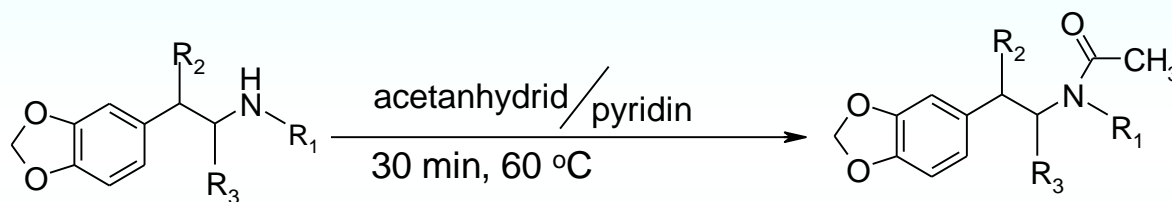


Silylace tetrahydrokanabinolu



Izolace léčiv a drog z biologického materiálu

Příklady derivatizačních reakcí Acetylace amfetaminů



R₁=H, R₂=H.....amfetamin.....R₁=H, R₂=H.....amfetamin AC

R₁=CH₃, R₂=H.....metamfetamin.....R₁=CH₃, R₂=H.....metamfetamin AC

R₁=CH₃, R₂=OH...efedrin.....R₁=CH₃, R₂=O-CO-CH₃.....efedrin 2AC

Izolace léčiv a drog z biologického materiálu

Extrakce SPE Bond Elut Certify RP/katex

Cílená izolace skupin drog

Extrakce opiátů



KONDISIONACE

2 ml CH₃OH

2 ml deionizovaná voda

APLIKACE VZORKU

4 ml moč

1 ml 2.0 M TRIS pufr pH=8.0 – 9.0

PROMYTÍ, NASTAVENÍ pH

4 ml deionizovaná voda

1 ml 0.1 M CH₃COONa pH=4.0

2 ml methanol

SUŠENÍ

vakuum

ELUCE

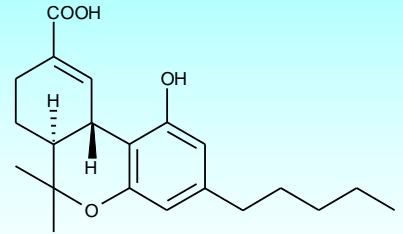
3 ml CH₂Cl₂:isopropanol:NH₄OH
(78:20:2)

Izolace léčiv a drog z biologického materiálu

Extrakce Bond Elut Certify RP/katex

Cílená izolace skupin drog

Extrakce kanabinoidů



kyselina tetrahydrokanabinolová

KONDITIONACE

2 ml CH₃OH

2 ml 0.05 M H₃PO₄

APLIKACE VZORKU

3 ml moč

400 μl 10 M KOH

PROMYTÍ, NASTAVENÍ pH

9 ml 0.05 M H₃PO₄

3 ml 0.05 M H₃PO₄ : CH₃OH(80:20)

SUŠENÍ, HEXAN

vakuum, 1 ml hexan

ELUCE

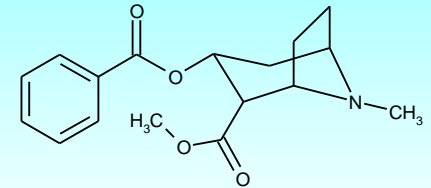
4.5 ml hexan:ethylacetát (80:20)

Izolace léčiv a drog z biologického materiálu

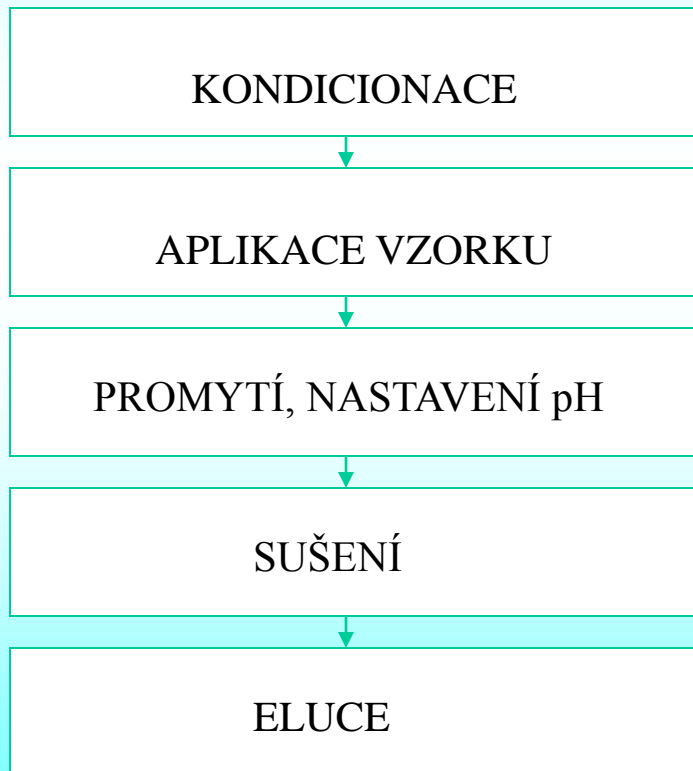
Extrakce Bond Elut Certify RP/katex

Cílená izolace skupin drog

Extrakce kokainu



kokain



2 ml CH₃OH

2 ml 0.1 M fosfát pH=6.0

4 ml moč

2 ml 0.1 M fosfát pH=6.0

6 ml deionizovaná voda

3 ml 0.1 M HCl

5 ml CH₃OH

vakuum

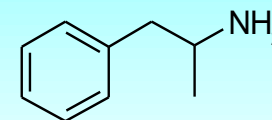
2 ml CH₂Cl₂:isopropanol:NH₄OH
(78:20:2)

Izolace léčiv a drog z biologického materiálu

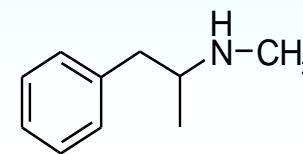
Extrakce SPE Bond Elut Certify RP/katex

Cílená izolace skupin drog

Extrakce amfetaminů



amfetamin



metamfetamin

KONDICIONACE

2 ml CH₃OH

2 ml 0,1 M fosfát pH=6.0

APLIKACE VZORKU

5 ml krev, moč

2 ml 0.1 M fosfát pH=6.0

PROMYTTÍ, NASTAVENÍ pH

1 ml 1.0 M CH₃
COOH

SUŠENÍ, CH₃OH

vakuum, 6 ml CH₃OH

ELUCE

2 ml CH₂Cl₂:isopropanol:NH₄OH
(78:20:2)

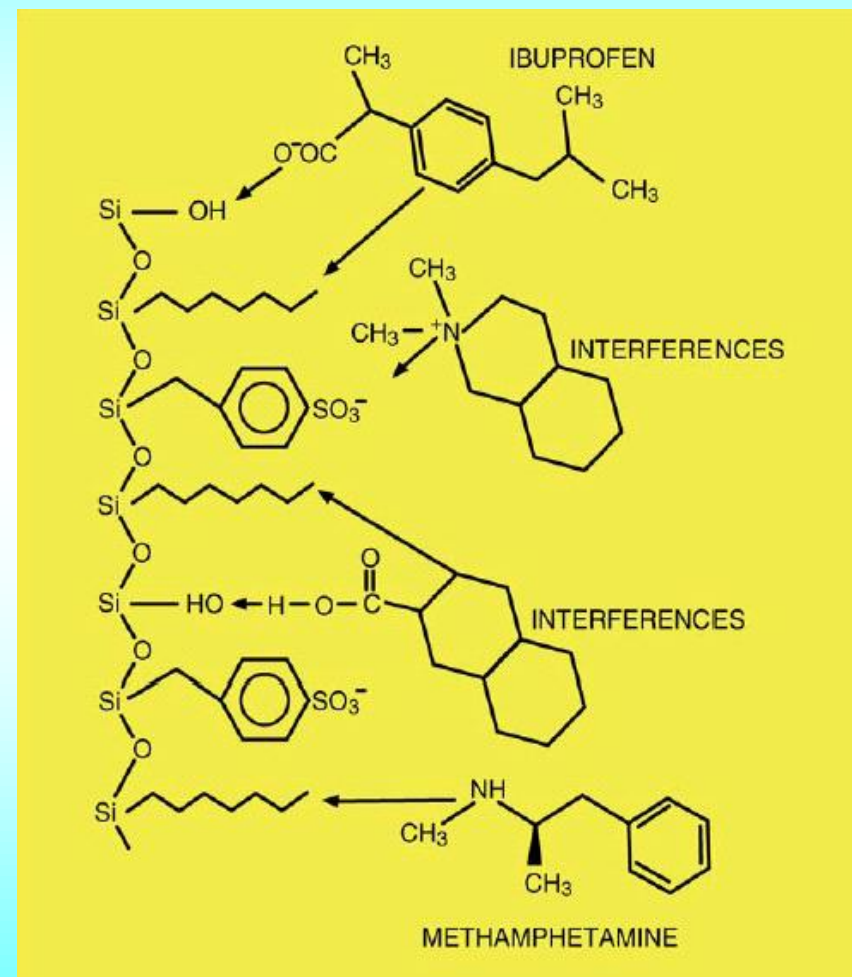
Izolace léčiv a drog z biologického materiálu

SPE Bond Elut Certify RP/katex

Cílená izolace amfetaminů

Aplikace vzorku pH=6.0

- ✓ retence bází na hydrofobním povrchu nepolární interakcí
- báze nejsou ionizovány
- ✓ retence kyselin vodíkovými můstky, ionizace kyselin

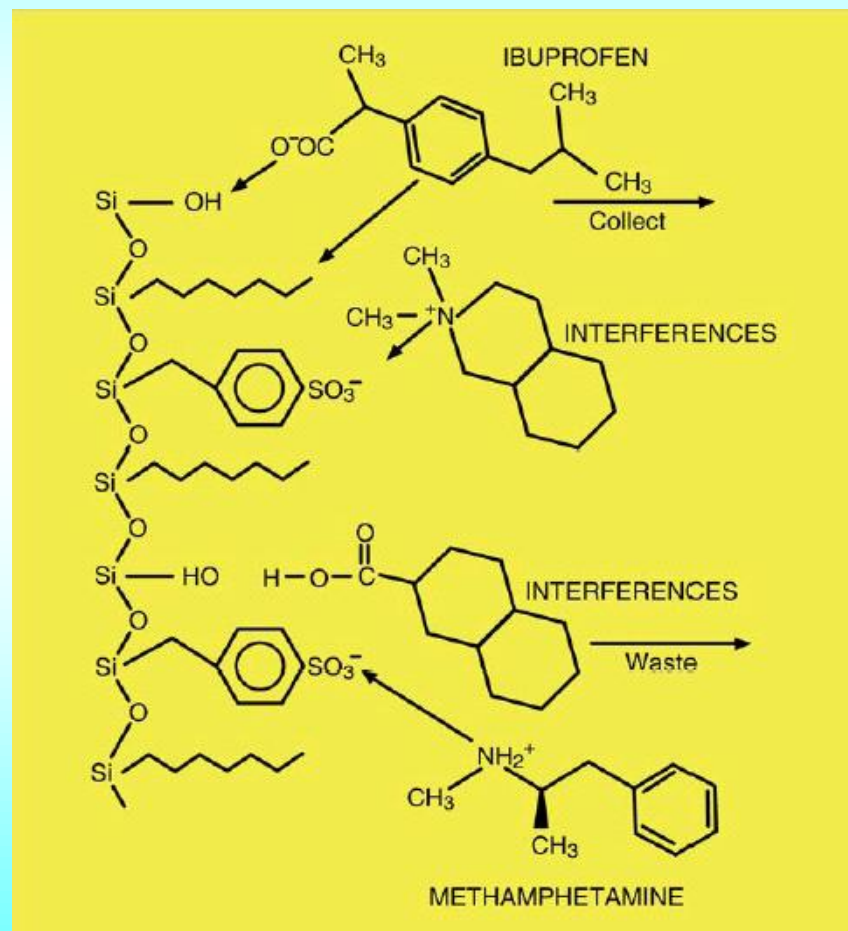


Izolace léčiv a drog z biologického materiálu

SPE Bond Elut Certify

Promytí kolonky puřrem,
snížení pH

- ✓ odstranění polárních interferencí
- ✓ snížení pH
- protonizace bázických analytů
ionizované báze zachyceny na katexu



Izolace léčiv a drog z biologického materiálu

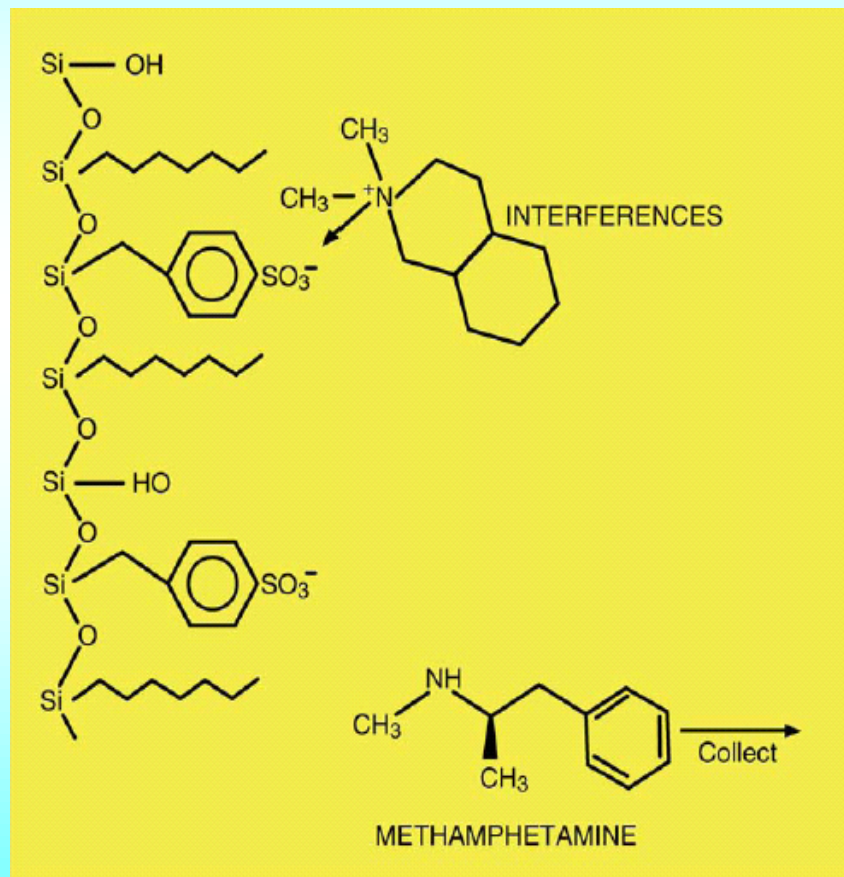
SPE Bond Elut Certify

Eluce bází

Eluce neionizovaných bází
bázickou směsí organických
rozpouštědel

2 ml CH_2Cl_2 :isopropanol:

: NH_4OH (780:20:2)



Izolace léčiv a drog z biologického materiálu

Extrakce SPE Bond Elut Certify RP/katex

Extrakce léčiv a drog STA 2 ml krev, moč

KONDICIONACE

2 ml CH₃OH

2 ml 0.1 M fosfát pH=6.0

APLIKACE VZORKU

2 ml krev, moč

6 ml 0.1 M fosfát pH=6.0

PROMYTÍ, NASTAVENÍ pH

1 ml deionizované H₂O

0.5 ml 0.01 M CH₃COOH

SUŠENÍ, CH₃OH

vakuum, 1 ml CH₃OH

4.5 ml aceton:CH₂Cl₂ (1:1)

4.5 ml CH₂Cl₂:isopropanol:
:NH₄OH (78:20:2)

ELUCE KYSELIN
A NEUTRÁLNÍCH LÁTEK

ELUCE BÁZÍ
A NEUTRÁLNÍCH LÁTEK

KYSELÉ A NEUTRÁLNÍ
ANALYTY E_K

BÁZICKÉ A NEUTRÁLNÍ
ANALYTY E_A

