



Screeningové metody v toxikologii

M. Balíková

Toxikologická laboratorní diagnostika

- ❑ Komplexní úkol
- ❑ Mezioborová spolupráce, konzultace, komunikace
- ❑ Anamnestická data, klinické příznaky
- ❑ Aspekty farmakokinetické, biotransformace
- ❑ Správné zajištění vzorků
- ❑ Adekvátní chemicko-toxikologické řešení
- ❑ Adekvátní ineterpretace toxikologických nálezů

Nutné informace pro toxikologa při podezření na otravu neznámou noxou:

1) Anamnéza a její spolehlivost

2) Příznaky otravy - nespecifičnost:

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

Anamnéza vs. toxikologické nálezy

Pacient	Anamnestické údaje	Laboratorní toxikologické nálezy
M-26 let	Hluboké kóma, těžká hypotenze, srdeční dysrytmie, anurie, suspektně toxikoman nebo epileptik	ŽO: prothiaden Sérum: prothiaden 10590 ng/ml northiaden 455 ng/ml (ter. rozmezí 50 – 150 ng/ml)
Ž-20 let	Somnolentní Suspektně alkohol, brufen	Krev: ethanol 2,69 g/kg Sérum: alprazolam 59 mg/ml (ter. rozmezí 5-50 ng/ml) ŽO: ibuprofen, kodein, fluoxetin Moč: ibuprofen + metab., kodein, fluoxetin, salicyláty, kofein
M-21 let	Bezvědomí, křeče	Moč: methamfetamin, amfetamin, efedrin, metabolity bromazepamu
Ž-21 let	Bezvědomí, oběhové selhání, Sectral 20 tbl. x 400 mg, úmrtí - sebevražda	ŽO: acebutolol Moč: acebutolol + metab.
M-53 let	Bez potíží, omylem 2 loky FRIDEXU před 45 min	Sérum: EG 337 ng/ml Moč: EG 9640 ng/ml

Noxy v toxikologické laboratoři dle požadavků na vyšetření:

- ❑ (Anorganické látky, kovy)
- ❑ Kouřové plyny, CO
- ❑ Plynné a těkavé organické látky, alkoholy
- ❑ Méně těkavé organické látky, glykoly a deriváty
- ❑ Organické extraktivní noxy, léčiva, návykové látky

Toxikologická laboratorní diagnostika – komplexní úkol

- 1) anamnéza, účinky nox
- 2) farmakokinetika, biotransformace
- 3) analyticko-chemické adekvátní řešení

Organické extraktivní noxy (Léčiva, ilegální drogy)

Systematická toxikologická analýza (STA):

- 1) Vyhledávání neznámé noxy, screening, detekce
- 2) Potvrzení předpokládané noxy, identifikace individua
- 3) Případná kvantifikace známé látky, stanovení

$$1 + 2 = \text{průkaz}$$

Základní princip v toxikologii:

potvrzování výsledků nezávislými
metodami

Toxikologické analýzy - 1

- ❑ STA - systematické vyhledávání neznámé noxy
- ❑ Cílené analýzy: rozlišení nox určité skupiny
potvrzení předpokládané noxy
kvantitativní analýzy

Kombinace metod v současnosti:

- ✓ imunochemických
- ✓ chromatografických
- ✓ spektrálních

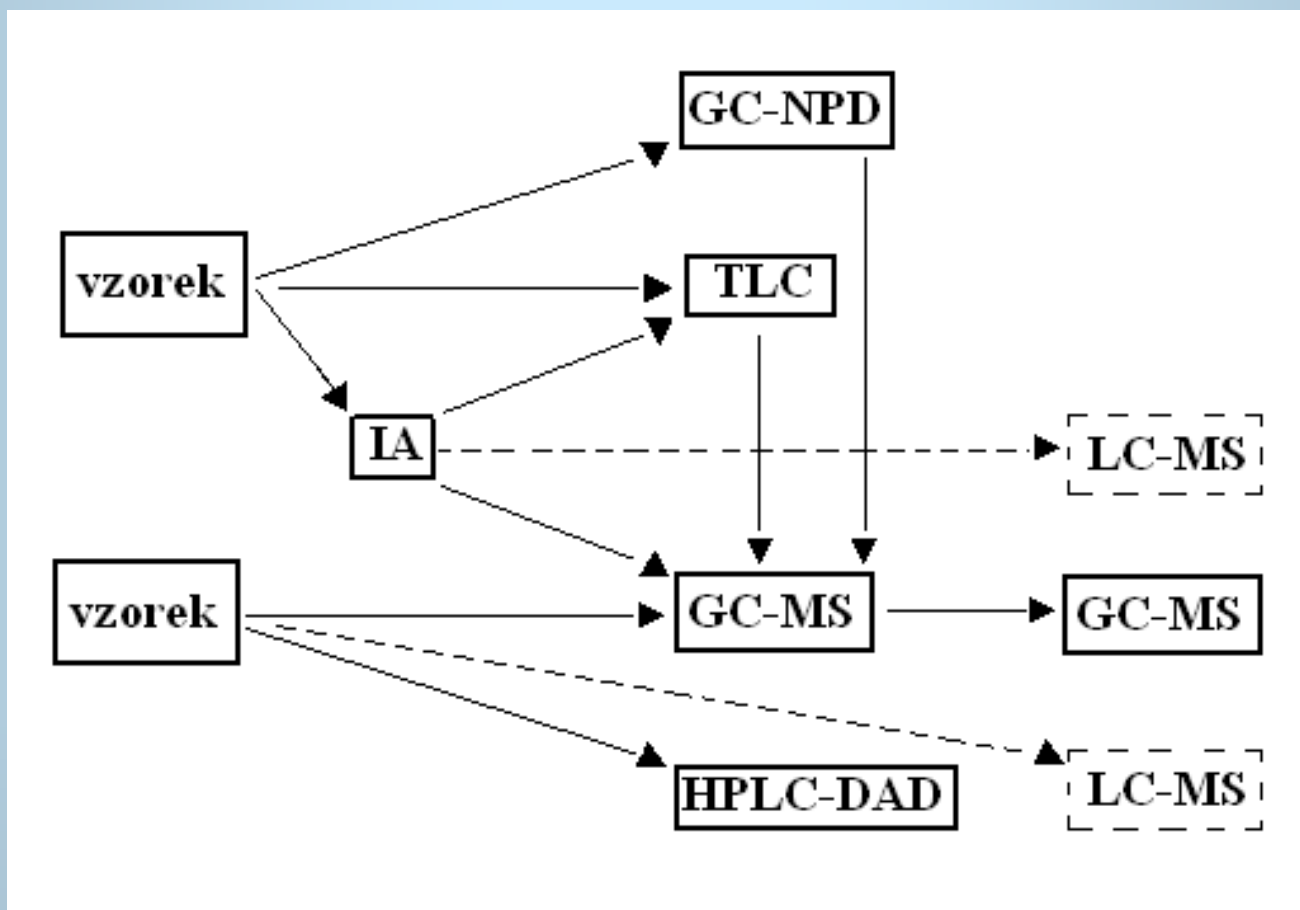
Toxikologické analýzy - 2

Dnešní analytické metody:

Typ metody	Některé varianty
IA	EMIT, FPLA, CEDIA, KIMS.....
TLC	UV, detekce chemická
HPLC	Refraktometrie, EC, UV, DAD
LC-MS, LC-MS/MS	ESI, APCI
GC	TCD, FID, NPD, ECD
GC-MS, GC-MS/MS	EI, PICI, NCI

Forenzně toxikologický standard pro organické látky:
chromatografie v tandemu s hmotnostní spektrometrií
(WADA, SOFT, TIAFT)

STA – organické extraktivní noxy



Imunochemické metody v toxikologii-1

Princip:

Interakce cílové molekuly (antigen) s protilátkou

Kompetice měřeného analytu (léčivo, droga) ve vzorku
= antigen Ag (hapten) se značenou formou téhož
analytu = *antigen Ag** o vazebná místa na fixním
množství protilátky = *antibody Ab* za vzniku
biospecifické vazby za tvorby imunokomplexů:



Podíl vázaného značeného analytu je nepřímě úměrný
koncentraci měřeného analytu ve vzorku

Imunochemické metody v toxikologii-2

Měřitelný signál - značená droga nebo značená protilátka

Značení: *radioizotopem (RIA)

*enzymem (EMIT, CEDIA, ELISA)

*fluorescenční látkou (FIA, FPIA)

*chemiluminiscenční látkou (LIA)

Metody heterogenní: separace značené drogy vázané v imunokomplexu od volných značených molekul v roztoku

- všechny metody RIA vyšší citlivost po separaci

Metoda ELISA - měřena značená protilátka vázaná

Metody homogenní: bez separace frakcí, jednodušší, rychlejší - optické metody enzymové, fluorescenční.....

Imunochemické metody v toxikologii-3

Antigeny Ag : makromolekuly (polymery, peptidy, proteiny)

- navozují specifickou imunitní reakci
- specificky reagují s protilátkami

Hapten: nízkomolekulární látka (léčivo) navázaná na vysokomolekulární nosič

Protilátky Ab: bílkoviny (glykoproteiny)

- vykazují specifickou vazebnou schopnost vůči antigenu na jehož podnět se vytvořily

Enzymové imunometody v toxikologii

EMIT : Enzyme Multiplied Immunoassay Technique

- ❑ značení enzymem *bakteriální glukóza-6-fosfát dehydrogenáza (G6PDH)*
- ❑ nízká koncentrace analytu Ag - zůstává větší množství volné protilátky Ab
- ❑ nevázaná protilátka inhibuje enzym ve značeném Ag* tedy snižuje jeho aktivitu
- ❑ vysoká koncentrace analytu Ag - méně volné protilátky - větší aktivita enzymu
- ❑ fotometrické měření enzymové aktivity, 340 nm

Typy imunometod - typy protilátek

1) Screeningové - záchytové metody pro skupiny látek

Protilátky záměrně připraveny pro záchyt skupiny strukturně blízkých látek - např. barbituráty

2) Kvantitativní metody pro stanovení specifikované látky

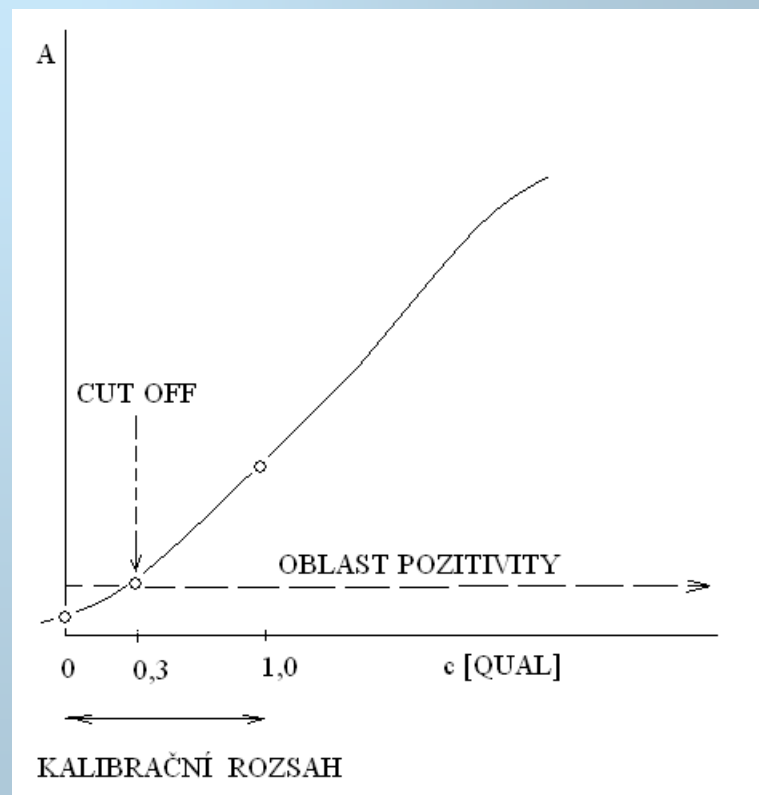
Protilátky cíleně připraveny proti determinantní struktuře, která je specifická jen pro jedno chemické individuum - např. fenobarbital

Imunochemický screening

Cut off value

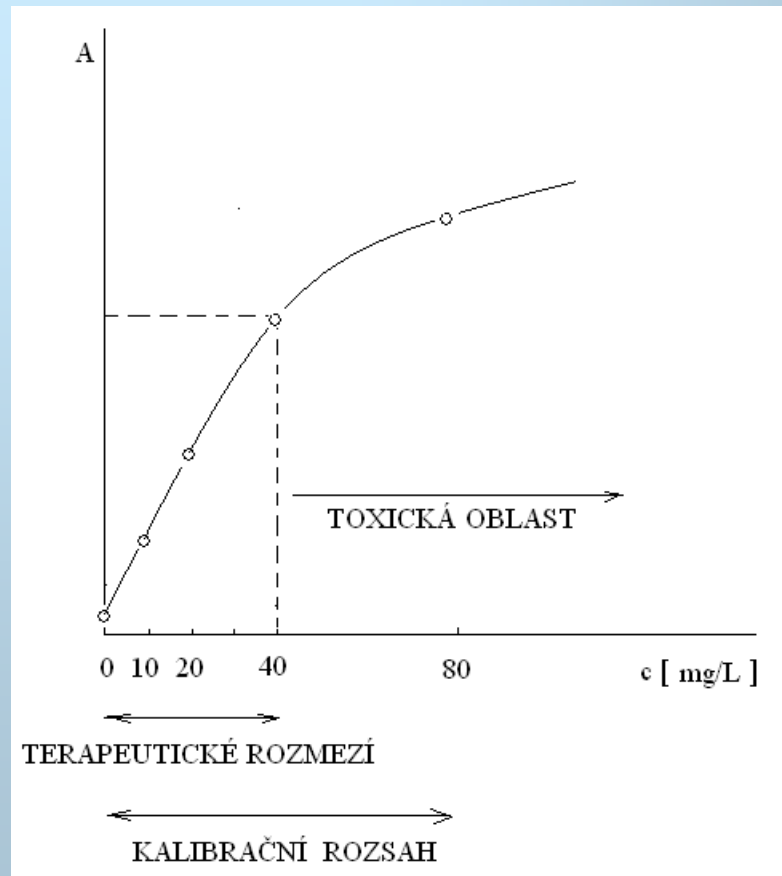
Pomocí kalibrátoru na jednu látek ze skupiny nastavení hranice mezi pozitivními a negativními vzorky

Např. záchyt barbiturátů v moči bez jejich rozlišení



Imunochemické stanovení

EMIT stanovení fenobarbitalu v séru



Imunochemický screening

Interpretace

Př. detekce, záchyt opiátů v moči - metoda EMIT

- ❑ cut off hodnota nastavena podle kalibrace na morfin
- ❑ pozitivní detekce opiátů ve směsi bez znalosti jejich zastoupení neodpovídá kvantitě
- ❑ křížové reakce - různá reaktivita příbuzných látek: morfin-glukuronidy, 6-acetylmorfin, kodein, dihydrokodein, hydrokodon, hydromorfon, oxykodon, levorfanol
- ❑ křížová reaktivita závisí na typu protilátky použité metody, variabilita v selektivitě metod (př. aminy)

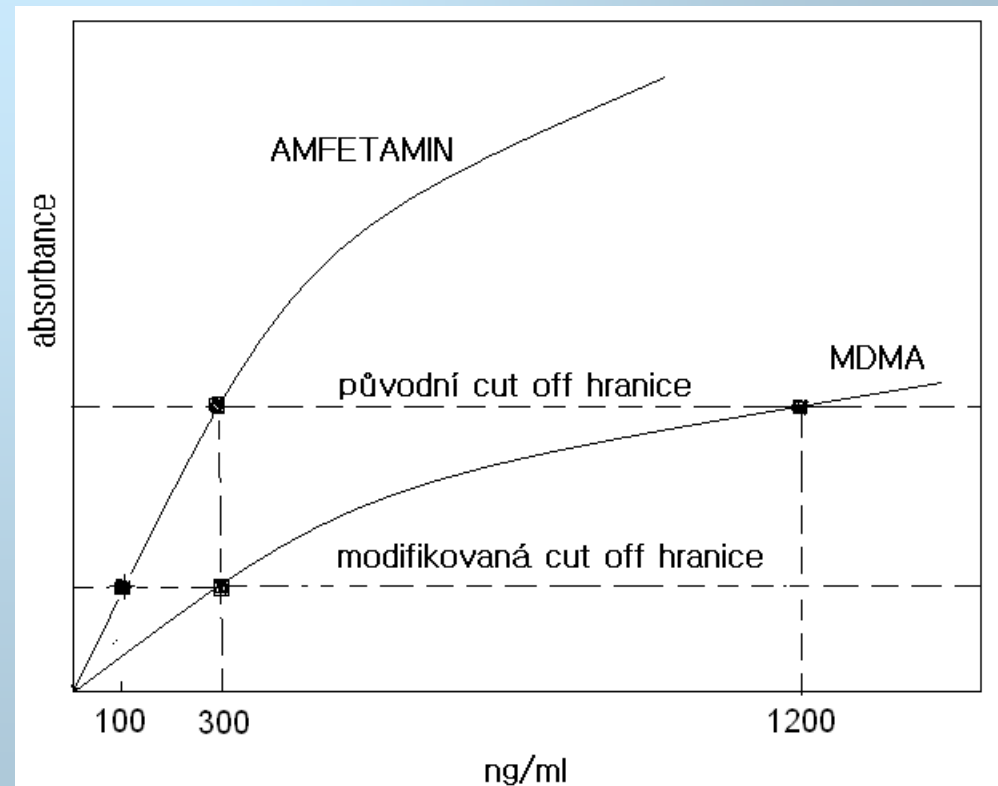
Imunochemický screening

Nastavení cut-off hodnoty

Léčiva - nastavení
podle toxických hodnot
- problém variability
toxicity uvnitř skupiny
(benzodiazepiny)

Návykové látky - často
kopírují USA legislativu
pro vybrané látky

Možnost flexibilního
nastavení podle účelu
vyšetření, rozšíření
škály zachycených nox



Imunochemický screening Předávkování benzodiazepiny

Př. EMIT

INTOXIKACE

BENZODIAZEPINY ?

Farmakologická
potence - variabilní

Variabilita dávkování

Krevní hladiny

NOXA	EMIT reaktivita (ng/ml)	Terapeutické rozmezí (ng/ml)
DIAZEPAM	> 300	20 – 2000
OXAZEPAM	> 2000	100 – 1500
LORAZEPAM	> 2000	80 – 250
CLONAZEPAM	> 2000	5 – 150
NITRAZEPAM	> 2000	30 – 90
FLUNITRAZEPAM	> 2000	5 – 15
BROMAZEPAM	> 2000	80 – 200
aj.	> 2000	

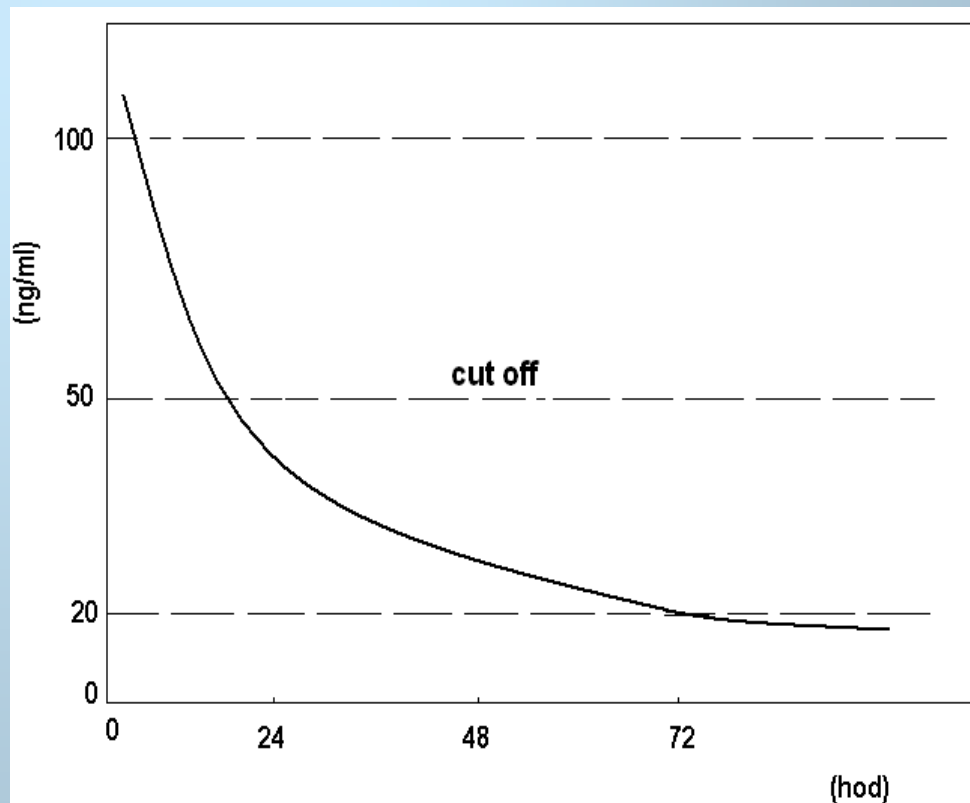
Řešení: snížení cut off hodnoty (10 ng/ml)

Mez záchyty a časové detekční okno

Např.

Doba záchyty
kanabinoidů v moči

Vylučování THCOOH
močí po vykouření 1
standardní
marihuanové cigarety
(27 mg 9-THC)



Snížení meze záchyty - optimalizace výsledků FN/FP
Nutnost potvrzování orientačních výsledků např. GC-MS

Imunochemický screening - Selektivita

Falešná pozitivita (FP) : záchyt látek mimo skupinu

- ❑ interferují absorbující látky, kyselina mléčná
- ❑ interferují nesledované příbuzné látky (z potravy)
- ❑ inteferují strukturně odlišné noxy a jejich metabolity ve vzorku ve vysokých koncentracích

Falešná negativita (FN) :

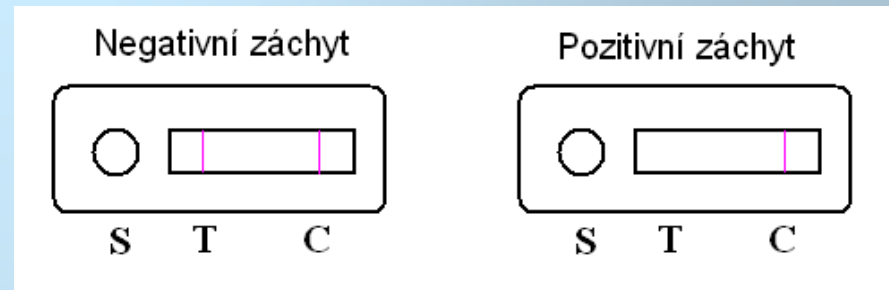
- ❑ v zaměřené skupině nemusí reagovat všechny strukturní deriváty (deriváty amfetaminu)
- ❑ nastavení cut off hodnoty neodpovídá účelu vyšetření (benzodiazepiny při předávkování)
- ❑ záměrná manipulace se vzorkem, ředění moče, přidavek adulterantů (glutaraldehyd, bělidla)

Terénní imunochemické testy

S - značená protilátka

T - vázaná droga

C - kontrola validity testu



Vývoj terénních kazetových testů „point of care“
původně pro moč, později také sérum, sliny

Modifikace ELISA - „lateral flow immunoassay“

Protilátka - často značena koloidálním zlatem
nebo barevnými částicemi latexu

Intenzita barevné linie (**T**) je nepřímo úměrná množství

Vizuální nebo digitální odečet zbarvení

Pevné hodnoty „cut off“

Imunochemický screening - souhrn

Přednosti v toxikologických aplikacích:

- ☐ Úprava vzorku žádná nebo minimální
- ☐ Vysoká citlivost
- ☐ Rychlé získání výsledku
- ☐ Vstupní náhled - zaměření na cílená potvrzení
- ☐ Snadné technické provedení
- ☐ Nároky na kvalifikaci, zacvičení malé
- ☐ Možnost automatizace v sériových kontrolách

Nevýhody:

- ☐ Nepokrývá řadu významných nox ve vzorku
- ☐ Orientační skupinový výsledek, možné interference
- ☐ Nerozlišuje jednotlivé noxy (kodein - morfin)

Finance:

Stálý přísun
spotřebních
reagencií

Chromatografický záchyt nox

Přednosti

- ❑ Široká škála záchytu předem neznámých organických extraktivních nox
- ❑ Flexibilní otevřené systémy - aktualizace a rozšiřování
- ❑ Záchyt individuálních substancí - nikoliv skupin
- ❑ Větší selektivita záchytu

Nevýhody

- ❑ Nutná úprava vzorku - extrakce
- ❑ Časově náročnější získání výsledku
- ❑ Odborně personálně náročnější

Finance:

Pořizovací cena
přístroje (vyjma
TLC systémy)

Provozní náklady
nízké

Tenkovrstevná chromatografie TLC

Schéma záchytu kodeinu a volných met.
v extraktu moče (U_A) pH~10
v základním TLC systému (*Kieselgel*):

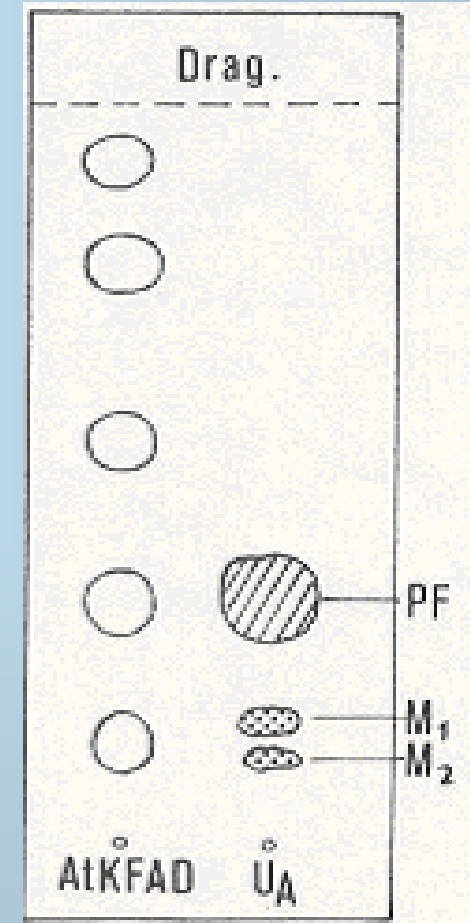
Záchytový systém TLC- 3 indikátory:

- 1) Extrahovatelnost - acidobazicitá noxy
- 2) Pohyblivost vůči referenci AtKFAD
- 3) Barevné reakce se sadou činidel

Sekvence chromatograf. postupů:

- ☐ Výběr možných kandidátů nox a ověřování
- ☐ Konfirmace noxy ve specifických chromatogr. podmínkách se standardem

Nutná referenční substance !!!



(J. Večerková, Karolinum
Praha 1997 a další vydání)

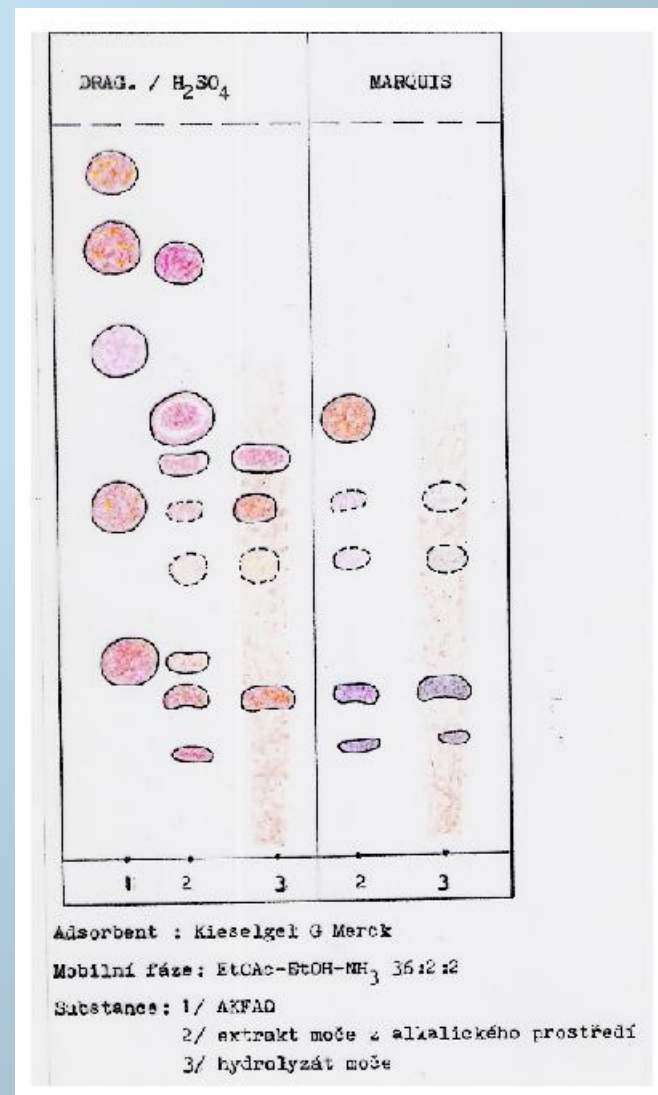
TLC reálný chromatogram

Extrakt moče

System J. Večerková

Podezření na intoxikaci
opiáty a
methamfetaminem,
(vedlejší detekce nikotin)

Následné upřesnění GC-
MS



TLC screening neznámých nox

Výhody:

- 1) Nulové investice, provozní náklady nízké
- 2) Otevřený a velmi flexibilní systém
- 3) Záchyt chemických individuí

Nevýhody:

- 1) Nepostačuje v nízkých koncentracích (krev)
- 2) Nároky na větší objem vzorku
- 3) Separační účinnost nižší (srov. GC...)
- 4) Nutné referenční substance (metabolity a jejich dostupnost)
- 5) Specializovaný personál

Plynová chromatografie se specifickou detekcí GC-NPD

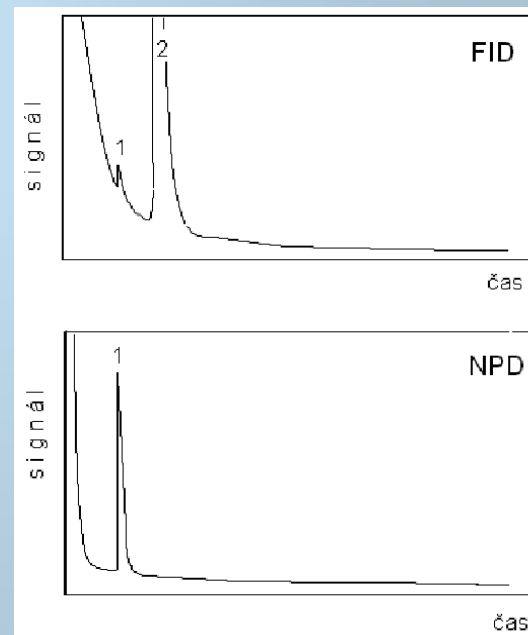
Plynová chromatografie - značná separační účinnost

- ❑ Menší objemy vzorků ve srov. s TLC
- ❑ Větší nároky na čistotu extraktů

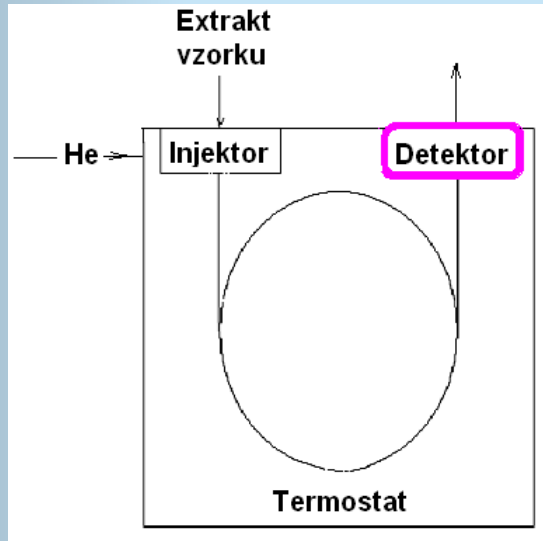
Specifická detekce NPD:

*pro látky s dusíkem či fosforem,
většina léčiv a drog, alkaloidy aj.*

- ❑ Potlačen signál rozpouštědla
- ❑ Retenční charakteristika noxy
- ❑ Nepostačuje k identifikaci neznámé noxy
- ❑ Nutné potvrzovací kroky

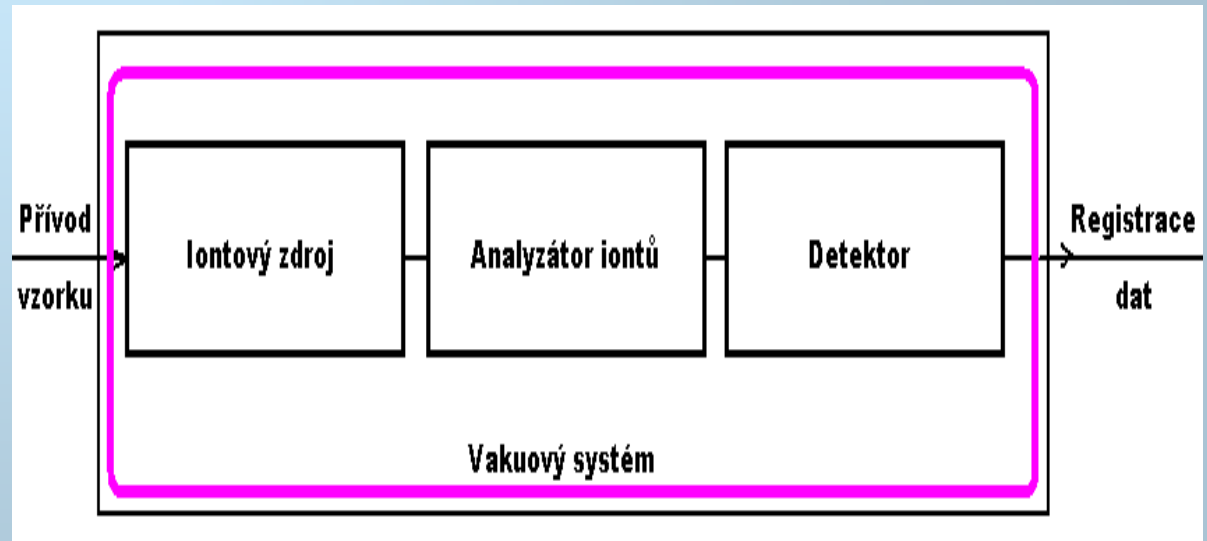


Plynový chromatograf s hmotnostní detekcí GC-MSD



GC

SEPARACE



MSD

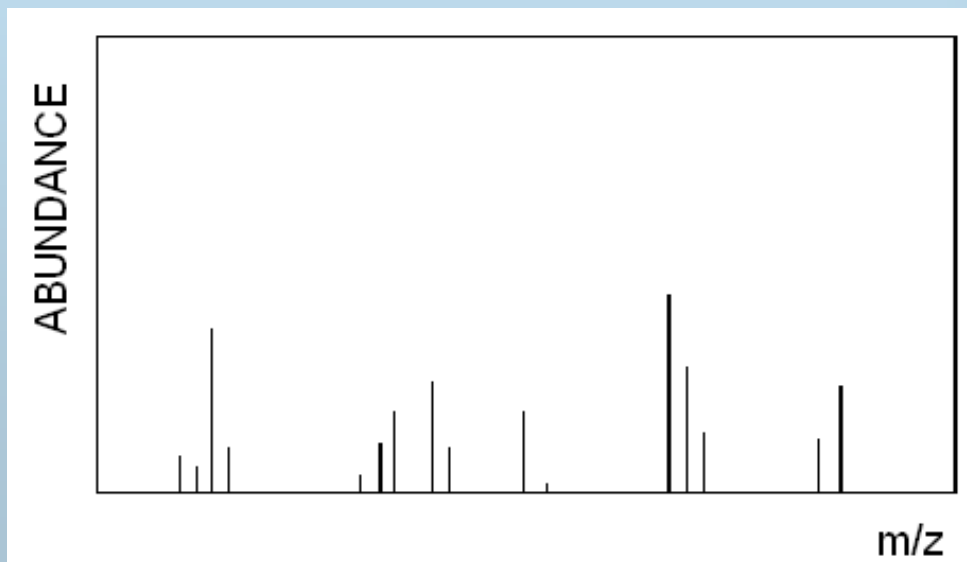
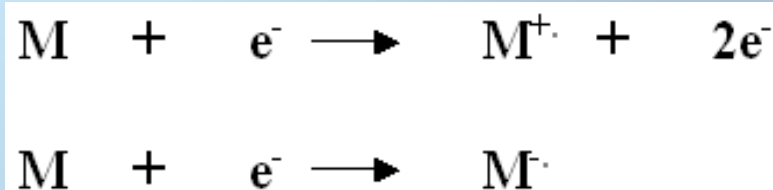
DESTRUKČNÍ DETEKCE

Hmotnostní spektra

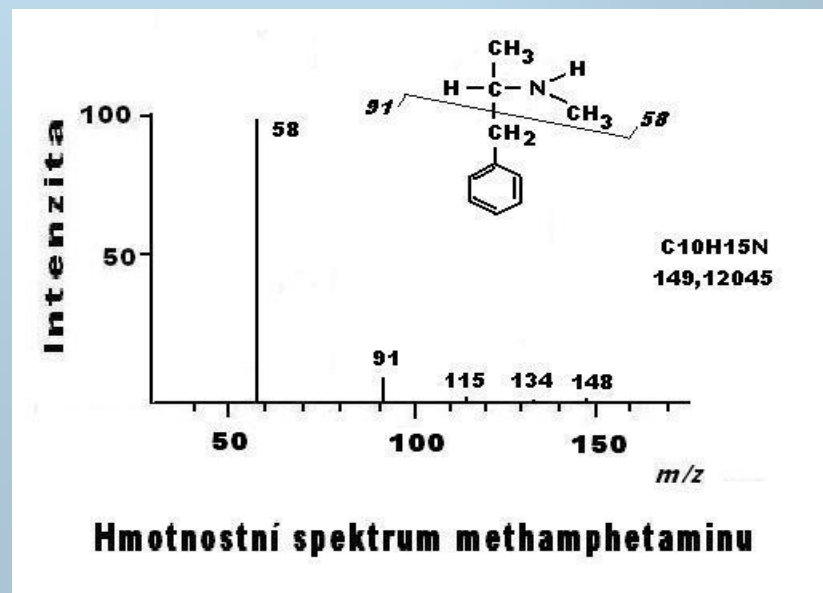
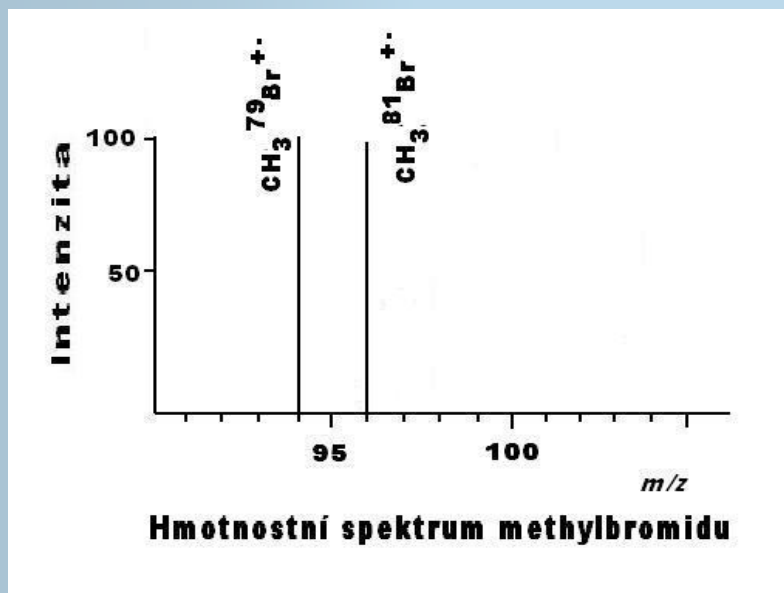
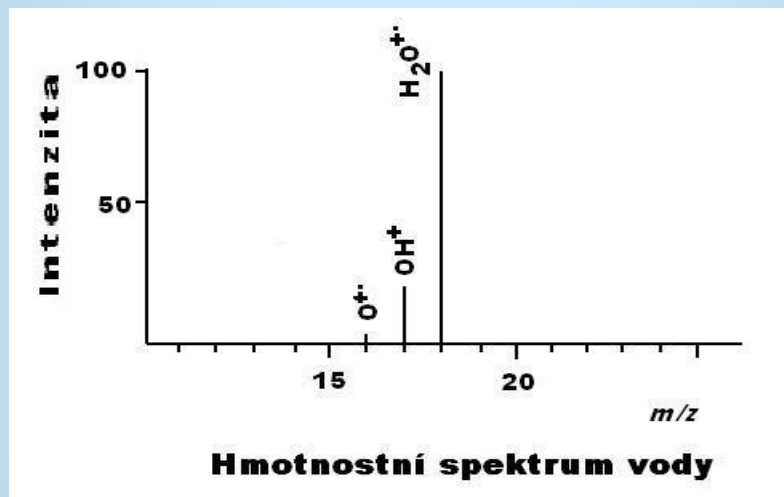
Reprodukovatelná fragmentace vstupujících molekul do iontového zdroje dle energie strukturálních vazeb

Databáze spekter - spektrální knihovny

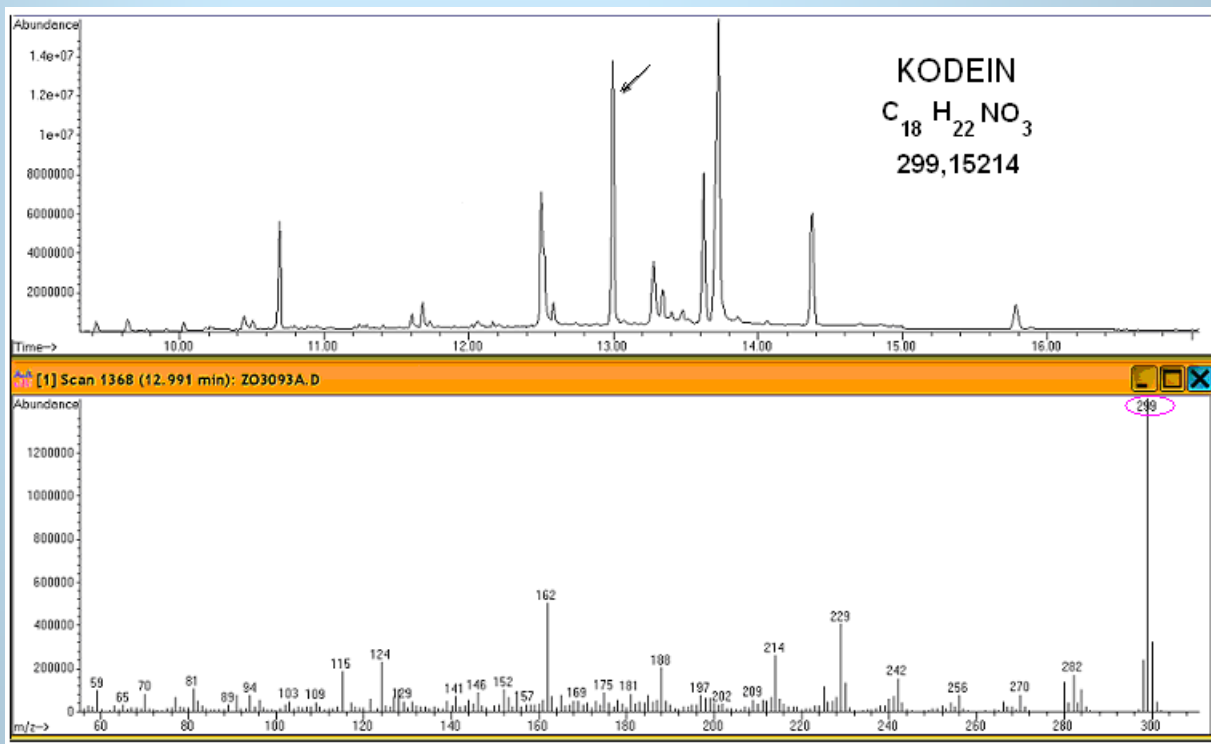
Ionizace nárazem elektronů :



Příklady hmotnostních spekter



Tandemová plynová chromatografie s hmotnostní detekcí GC-MS



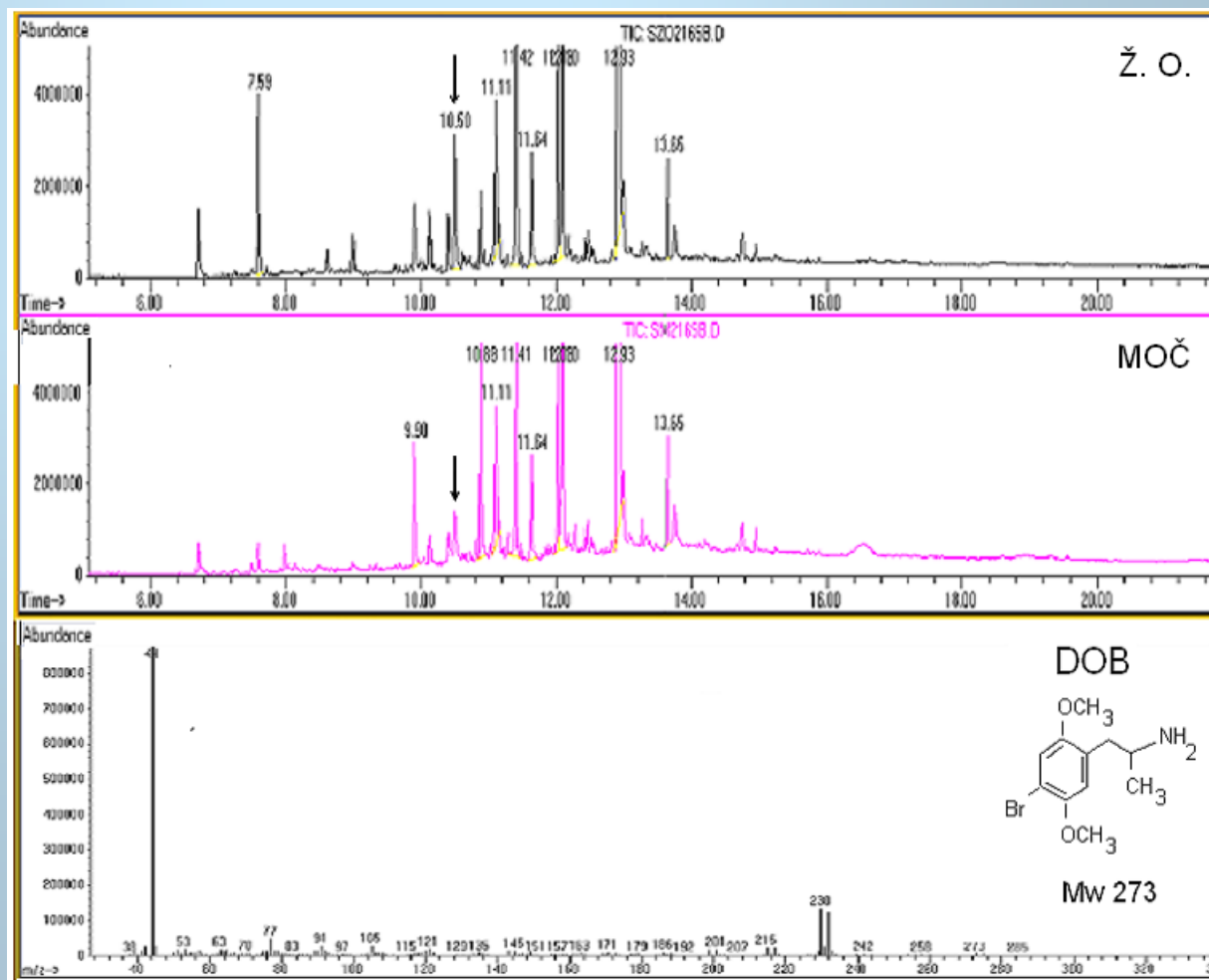
Kodein: M^+ (299) kvazimolekulární ion

GC-MS screening neznámé noxy

Extrakty
ethylacetátem
při pH 10



Porovnání s
knihovnou
spekter

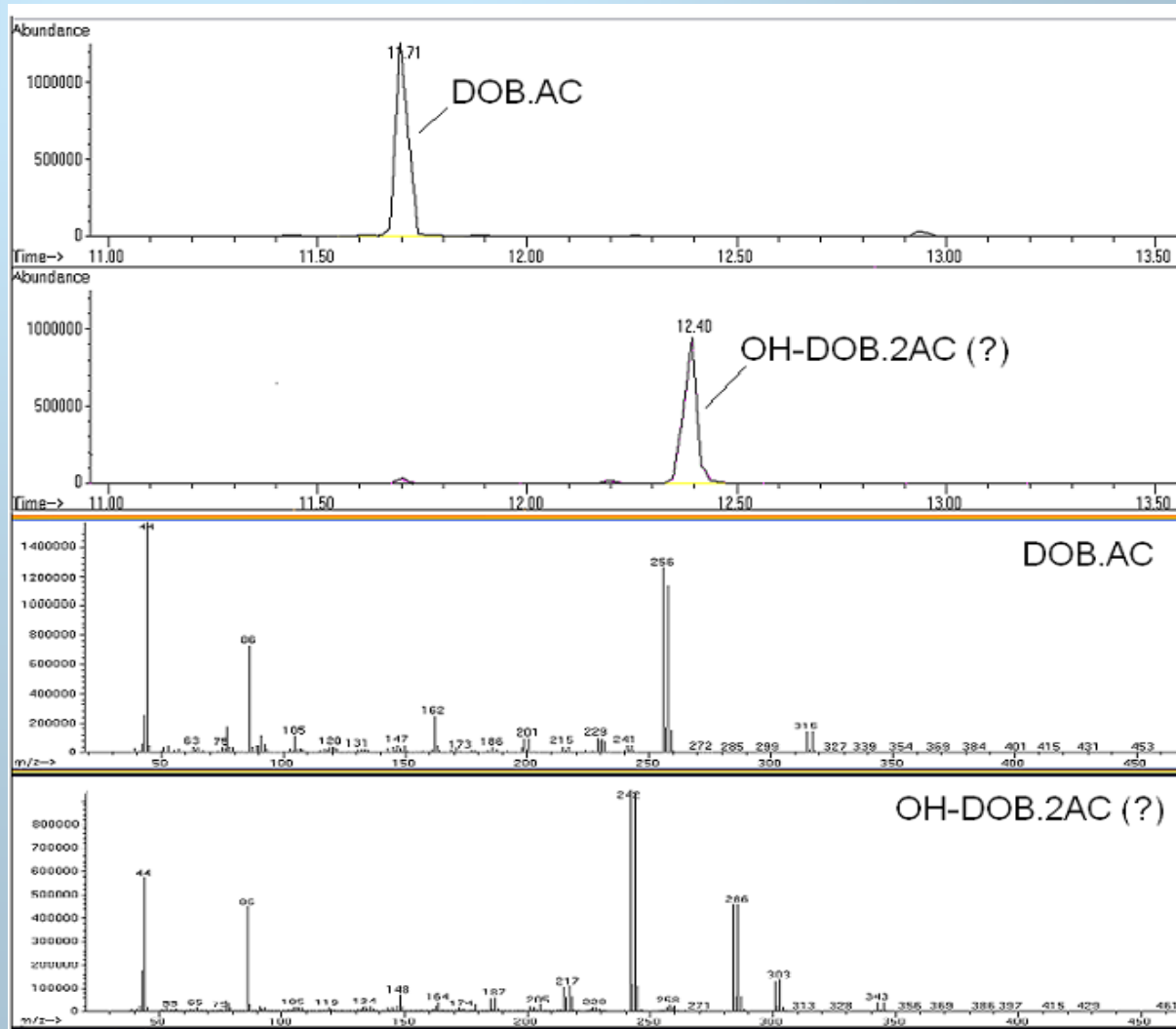


GC-MS potvrzení po acetylaci

Extraktivní
acetylace
hydrolyzátu
moče

Porovnání pův.
formy po
acetylaci s
referenčním
standardem

Určení
metabolitu -
výzkum



Struktura a fragmentace

Př. acetylderivát metabolitu DOB

