

Toxikologické analýzy pro neznámé noxy  
Cílené analýzy různého typu  
Různé screeningové metody

Ing. Věra Marešová, CSc

Ústav soudního lékařství a toxikologie 1. LF UK a VFN  
vmare@lf1.cuni.cz

# Toxikologické laboratorní vyšetření

- ✓ poskytuje důkaz či vyloučení přítomnosti jedů
- ✓ vyžaduje znalosti o osudu látky v organismu
- ✓ vyžaduje vhodnou volbu biologického materiálu a izolačního postupu

## Možnosti izolace jedů:

- ✓ těkavé látky – destilace
- ✓ léčiva, drogy – extrakce
- ✓ anorganické látky – kovy – mineralizace, ionty – iontoměniče
- ✓ rostliny, houby – mikroskopické vyšetření

## Koncentrační zastoupení jedů:

- ✓ terapeutické
- ✓ toxické
- ✓ letální

# Toxikologické laboratorní vyšetření

## Materiál

- ✓ Krev
- ✓ Moč
- ✓ Žal. obsah
- ✓ Tkáň
- ✓ Vlasy
- ✓ Sliny
- ✓ Pot
- ✓ Smolka

## Možnosti toxikologických analýz

- ✓ *Diferenciální diagnostika akutních otrav*
- ✓ *Odhalování abuzu drog*
- ✓ *Kontrola terapie otrav*
- ✓ *Objasňování trestné činnosti: dopravní nehody pod vlivem návykových látek*  
*ilegální výroba drog*  
*oběti oloupení a znásilnění*
- ✓ *Šetření příčin úmrtí: vraždy, sebevraždy*

## Klinický výstup

- ✓ ARO
- ✓ Interna
- ✓ Psychiatrie...

## Forenzní výstup

- ✓ Policie
- ✓ Soudy

# Toxikologické laboratorní vyšetření

## Žádanka na vyšetření

- ✓ osobní údaje pacienta
- ✓ klinický stav a okolnosti případu
- ✓ datum a čas odběru vzorků
- ✓ druh a objem vzorků
- ✓ doba od aplikace noxy
- ✓ předpokládaná škodlivina
- ✓ léková terapie před odběrem včetně léčby
- ✓ použitá dezinfekce
- ✓ adresa žadatele, telefon

## Vyšetřovaný materiál

- ✓ léčiva, drogy: 50 - 100 ml moč  
50 – 100 ml žaludeční výplach  
1 zkumavka krve  
stříkačky, tablety, prášky
- ✓ tekavé látky: 1 zkumavka krve  
moč
- ✓ alkohol: 1 zkumavka krve
- ✓ oxid uhelnatý: nesrážlivá krev
- ✓ glykoly: 1 zkumavka krve, moč
- ✓ houby: houba, pokrm, střevní a žaludeční obsah

**Chemická čistota a inertnost odběrových nádob.**

# Toxikologické laboratorní vyšetření

## Testování léčiv a drog v biologickém materiálu

	krev, sérum	sliny	moč	vlasý
odběr vzorku	invazivní	neinvazivní	neinvazivní	neinvazivní
získané množství	krev 10 ml sérum 1-2 ml	1-5 ml	> 50 ml	50-300 mg
koncentrace látek	nízká převážně parentní látky	nízká převážně parentní látky	vyšší hlavně metabolity	nízká převážně parentní látky
detekční okno	minuty až hodiny	minuty až hodiny	hodiny, dny	měsíce
poznámky		kontaminace potravou kouřením	manipulace se vzorkem falšování	barvení

# Systematická toxikologická analýza STA

*System logicky na sebe navazujících analytických postupů*

3 fáze toxikologické analýzy neznámých nox

1. screening = záchyt = detekce

2. identifikace chemického individua

3. stanovení = kvantifikace známé látky

> průkaz

screening znamená vždy suspektní záchyt, není nikdy průkazem  
či stanovením

# Systematická toxikologická analýza STA

*screeningové (vyhledávací) metody* – imunochemické  
– chromatografické  
*potvrzovací identifikační metody* – chromatografické

Průkaz jedu – založen na kombinaci metod imunochemických, chromatografických a spektrálních – *základní princip toxikologie: potvrzování výsledků navzájem nezávislými metodami*

*Klinický a forenzně toxikologický standard současnosti:*  
metody hmotnostní spektrometrie v tandemu s plynovou nebo kapalinovou chromatografií GC-MS, LC-MS

# Systematická toxikologická analýza STA

## Toxikologické analýzy se záměrem

- ✓ STA – systematické vyhledávání neznámé noxy
- ✓ Cílené – potvrzení specifikované noxy

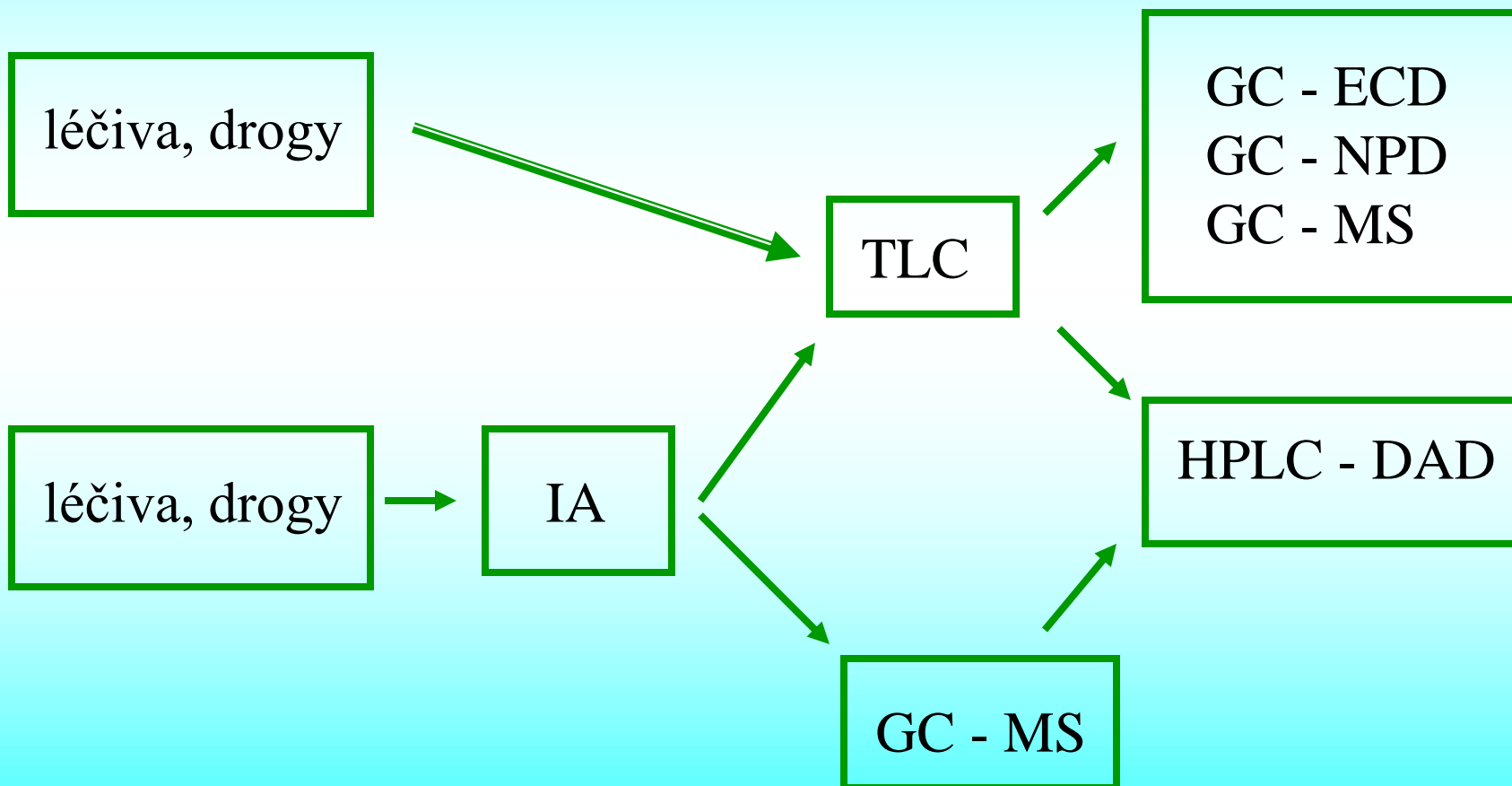
## Volba analytické metody

Metoda	Specifikace
IA	EMIT, CEDIA, FPIA
TLC	UV, chemická detekce
HPLC	UV, DAD, MSD
LC - MS	ESI, APCI
LC – MS/MS	ESI, APCI
GC	FID, NPD, ECD, MSD
GC - MS	EI, PICI, NICI
GC- MS/MS	EI, PICI, NICI



# Systematická toxikologická analýza STA

Testování léčiv a drog ÚSLT Praha



# Imunochemické metody

## Princip

Kompetice (soutěž) měřeného analytu ( léčivo, droga) = *antigen Ag* (hapten) se značenou formou téhož léčiva či drogy = *antigen Ag<sup>#</sup>* o vazebná místa na limitovaném množství specifické protilátky = *antibody Ab* za vzniku biospecifické vazby ve vzniklých imunokomplexech *AgAb* a *Ag<sup>#</sup>Ab*.



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

# Imunochemické metody

Značení antigenu (případně protilátky)

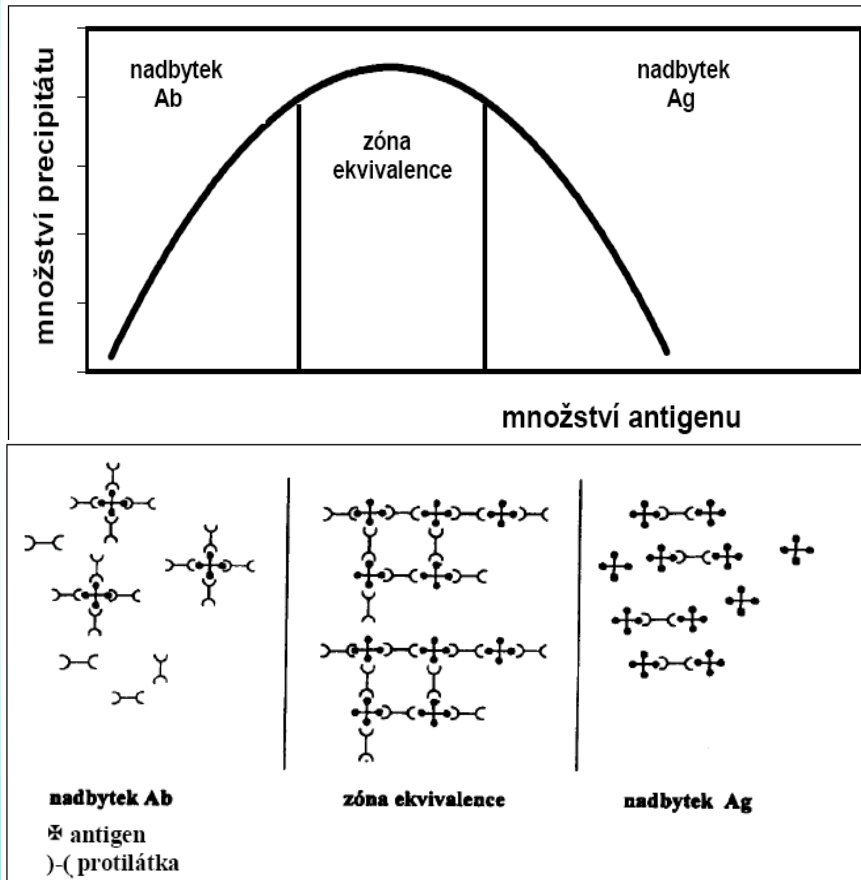
- ✓ enzymem EMIT
- ✓ geneticky upraveným enzymem CEDIA
- ✓ radioizotopem RIA
- ✓ fluorescenční látkou FIA
- ✓ chemiluminiscenční látkou LIA

***Heterogenní imunometody*** – separace molekul značeného reagens vázaného v imunokomplexu od volných molekul značeného reagens v roztoku (radioimunometody) – vysoká citlivost

***Homogenní imunometody*** – bez separace frakcí, jsou jednodušší, rychlejší, lze je automatizovat (enzymová, fluorescenční a chemiluminiscenční immunoanalýza)

# Imunochemické metody

Imunoprecipitační křivka (Ag – antigen, Ab – protilátka)



## Oblast ekvivalence

*Precipitační metody*

VISUAL LINE, FRONTIER

## Oblast nadbytku protilátky

*Nekompetitivní metody*

- zákalové nefelometrie
- turbidimetrie

- s markerem EIA, IRMA..

## Oblast nadbytku antigenu

*Kompetitivní metody*

- heterogenní RIA, ELISA..
- homogenní FPIA, EMIT...

# Imunochemické metody

## Enzymové imunometody

EMIT enzyme multiplied immunoassay technique

✓ značení enzymem bakteriální glukozo - 6 – fosfát dehydrogenáza  
G6PD

✓ nízká koncentrace stanovované látky  $Ag$ : zůstává větší množství volné protilátky  $Ab$  – nevyvázaná protilátka inhibuje enzym ve značeném antigenu  $Ag^{\#}$  - snižuje jeho aktivitu

✓ *menšímu množství analytu odpovídá větší množství volné protilátky a menší aktivita enzymu*

✓ *většímu množství analytu odpovídá menší množství volné protilátky a větší aktivita enzymu*

✓ fotometrické měření enzymové aktivity



substrát

# Imunochemické metody

**Antigeny Ag** – makromolekuly (polymery: proteiny, polypeptidy...)

- ✓ navozují specifickou imunitní odpověď
- ✓ specificky reagují s protilátkami
- ✓ haptén – nízkomolekulární látka (léčiva, drogy) navázána na vysokomolekulární nosič

**Protilátky Ab** – bílkoviny (glykoproteiny) tělních tekutin

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

*Typy protilátek Ab:*

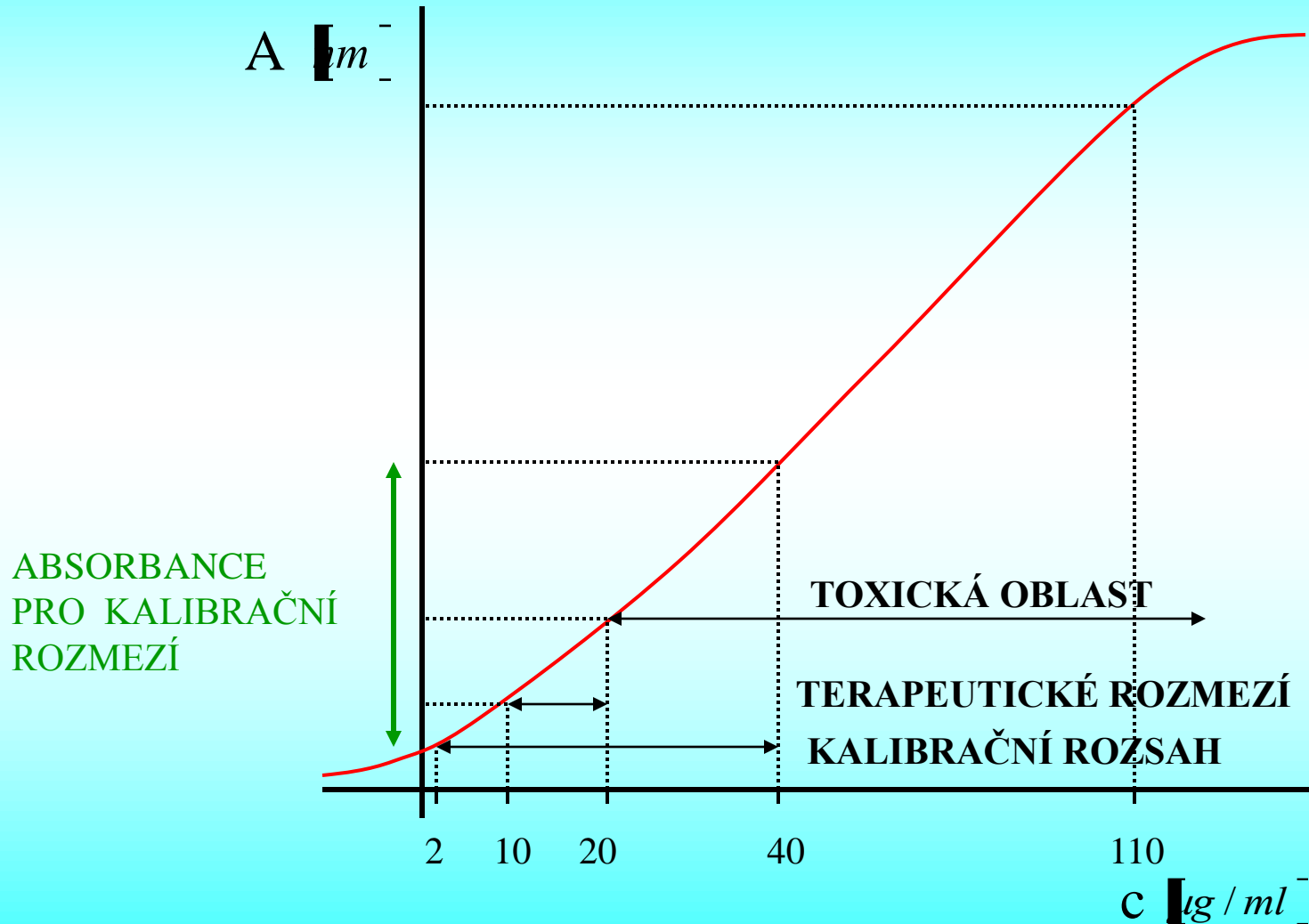
- ✓ cíleně připraveny proti determinantní skupině, která je specifická jen pro jedno chemické individuum např.

**fenobarbital**

- ✓ cíleně připraveny proti chemické struktuře, která je společná pro více strukturně chemicky příbuzných látek např. **barbituráty**

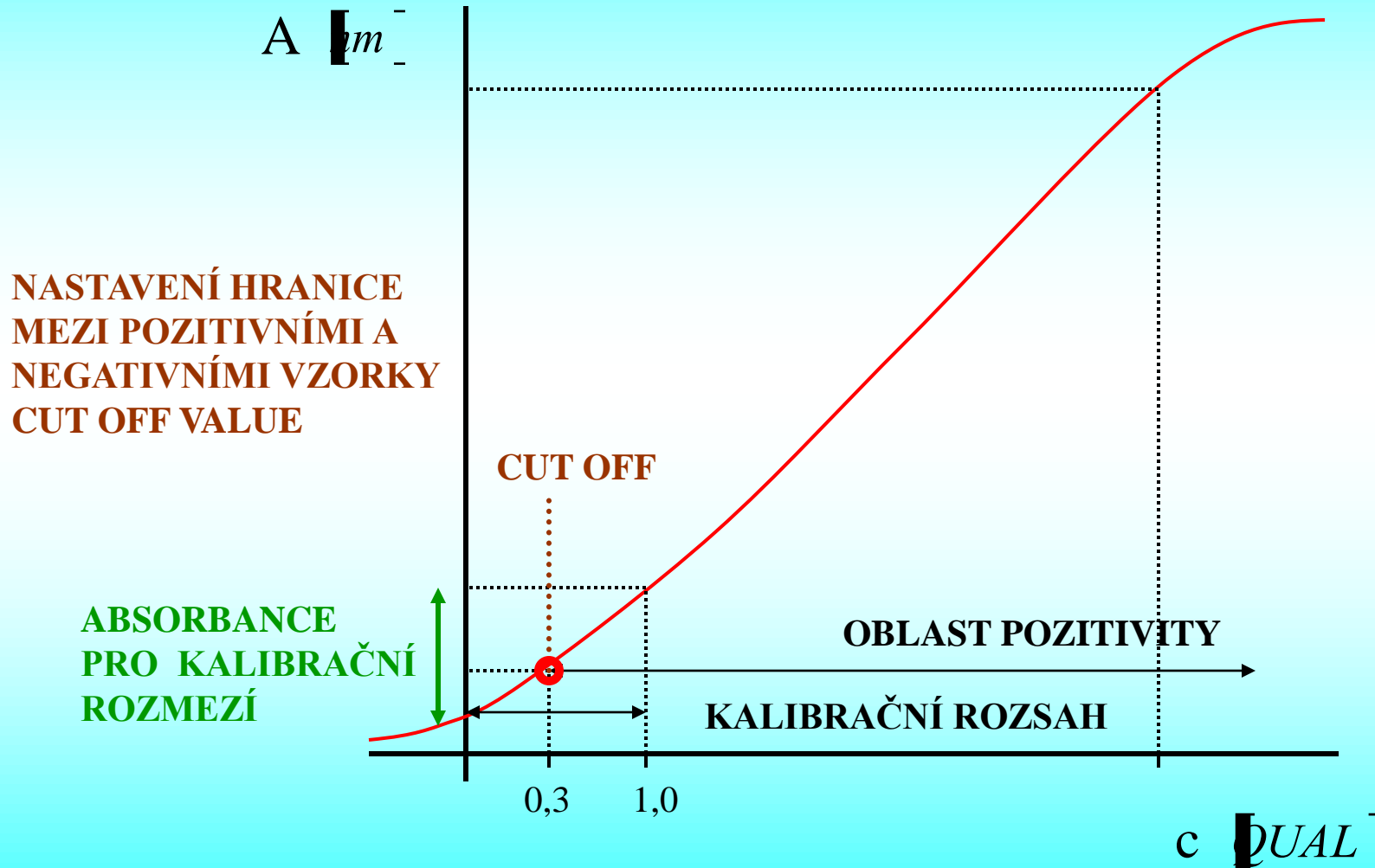
# Imunochemické metody

## STANOVENÍ THEOPHYLLINU EMIT



# Imunochemické metody

## SCREENINGOVÉ MĚŘENÍ OPIÁT





# Imunochemické metody

Interpretace nálezů u screeningové metody EMIT pro opiáty

- ✓ kalibrace metody na jednu ze skupiny strukturně podobných látek – *morfin* pro opiáty
- ✓ nastavení hraniční meze selekce – *cut off* – tj. hranice positivity testu doporučené výrobcem na 0.3 µg/ml morfinu
- ✓ pro směs strukturně příbuzných látek v moči výsledek záchytu neodpovídá kvantitě morfinu (např. heroin a metabolity)
- ✓ záchyt opiátů v moči odpovídá nálezům pro morfin > 0.3 µg/ml, kodein 1.0 µg/ml, hydrokodon 1.0 µg/ml, hydromorfon 1.0 µg/ml, levorfanol 3.0 µg/ml, oxykodon 50 µg/ml atd.

# Imunochemické metody

## **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

# Imunochemické metody

## Interpretace výsledků imunochemických metod

### *Kvantitativní metody*

- ✓ správnost a přesnost kalibrace
- ✓ oblast linearit závisí na poměru Ag/Ab

### *Screeningové metody – přístrojové (EMIT)*

- ✓ variabilita v selektivitě metod
- ✓ záchyt drog a jejich metabolitů v závislosti na křížové reaktivitě ve specifikované skupině
- ✓ interferující absorbující látky – kyselina mléčná, biogenní aminy (FP)
- ✓ rušivé látky – glutaraldehyd, bělidla (FN)
- ✓ nastavení cut off hodnoty
- ✓ čím výše je hodnota cut off, tím méně FP ale více FN
- ✓ čím níže je hodnota cut off, tím více FP ale méně FN

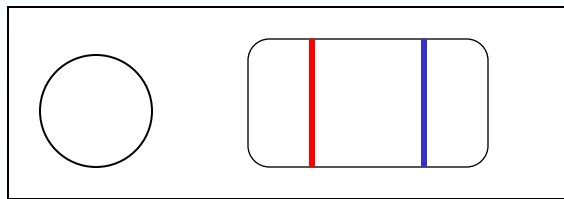
# Imunochemické metody

## **Interpretace výsledků screenigových imunochemických metod**

- ✓ cílený imunochemický screening nemusí zjistit všechny významné noxy ve vyšetřovaném případě (FN)
- ✓ velké množství často zneužívaných nox leží mimo oblast běžných imunochemických screenigových vyšetření (FN)
- ✓ strukturně chemicky odlišné noxy a jejich metabolity ve vysokých koncentracích mohou při screenigových vyšetřeních reagovat (FP)
- ✓ screenigové metody mohou sloužit pro zaměření na další analytické postupy – vstupní náhled na soubor nox
- ✓ uvážení možností imunochemických metod a správná interpretace výsledků slouží k rychlému řešení akutních intoxikací

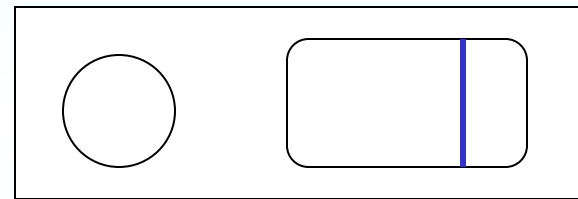
# Imunochemické metody

*Screeningové metody* – jednoduché precipitační testy  
terénní kazetové testy pracující v oblasti ekvivalence



S T C

Negativní výsledek



S T C

Pozitivní výsledek

Za nepřítomnosti nebo nedostatku drogy ve vzorku moče vytvoří protilátka imunokomplex (precipitát) se značenou drogou vázanou v místě testu T. (S – vzorek, C – kontrola)

# Imunochemické metody

## **Imunochemické metody analýzy léčiv a drog v biologických tekutinách**

- ✓ nevyžadují izolaci a zakoncentrování noxy
- ✓ vysoká citlivost
- ✓ vysoká rychlost
- ✓ jednoduchost, nenáročnost na kvalifikaci
- ✓ vhodné pro automatizaci
- ✓ vhodné pro sériová vyšetření

**Imunochemické screeningové metody jsou pouze orientační, vyžadují potvrzení a upřesnění více specifickou nezávislou metodou.**

# GC –MS metody

- ✓ plynová chromatografie – separační metoda, hmotnostní spektrometrie – identifikační metoda
- ✓ reprodukovatelné retenční parametry, mezilaboratorní přenos retenčních dat, databáze retenčních indexů
- ✓ velká separační účinnost GC kapilár
- ✓ polární a termolabilní látky – derivatizace
- ✓ diskriminace transportu velkých molekul z injektoru do místa detekce
- ✓ velká specifita hmotnostních spekter
- ✓ **hmotnostní spektra látek jsou standardem pro identifikaci neznámých látek v toxikologii**

# GC –MS metody

Záměry:

- chemická identifikace širokého spektra neznámých látek
- potvrzovací analýzy užší skupiny látek
- kvantifikace – stanovení známé látky

## **GC – MS vyšetření biologického materiálu**

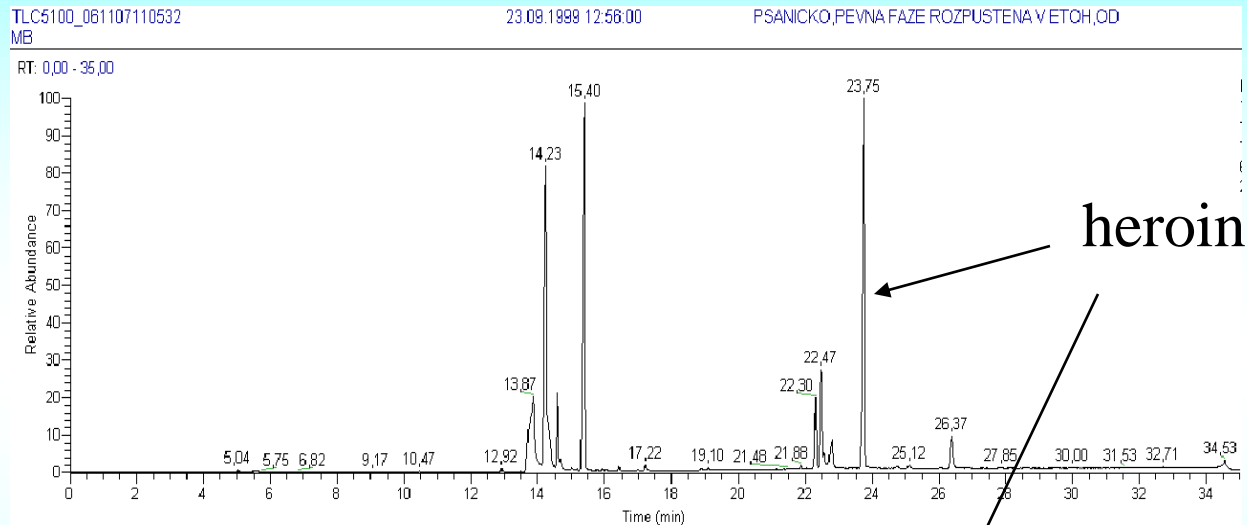
- |  |                  |
|--|------------------|
| • neznámá léčiva, drogy                    | 2 ml moč         |
| příprava dvou extraktů: kyseliny, báze     | 2 ml krev/serum  |
| • cíleně morfin, kokain – báze             | 4 ml moč         |
| příprava silylovaného extraktu             | 1 ml krev/ serum |
| • cíleně kanabinoidy                       | 3 ml moč         |
| příprava silylovaného extraktu hydrolyzátu | 1 ml krev/serum  |
| • cíleně budivé aminy                      | 2 ml moč         |
| extraktivní acetylace                      | 1 ml krev/serum  |



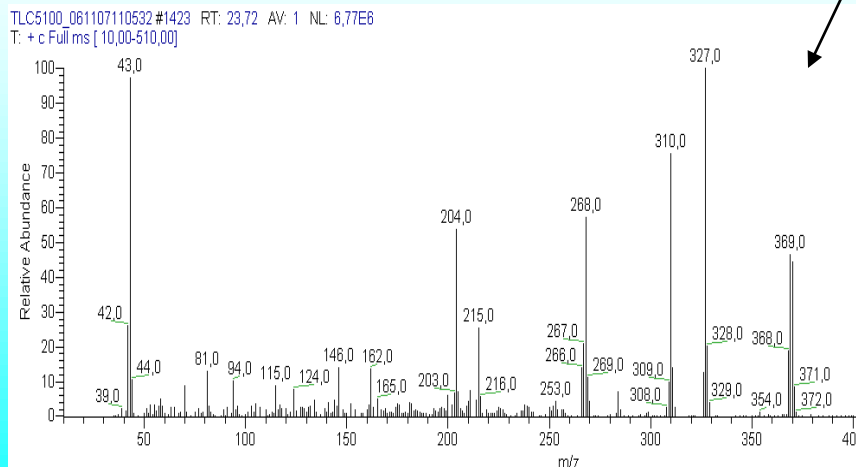
# Screeningové metody GC -MS

## „psaníčko“ s heroinem

GC-MS Total Ion Chromatogram – analýza substance



MS spektrum heroinu



# Cílené analýzy GC – MS potvrzení pervitinu

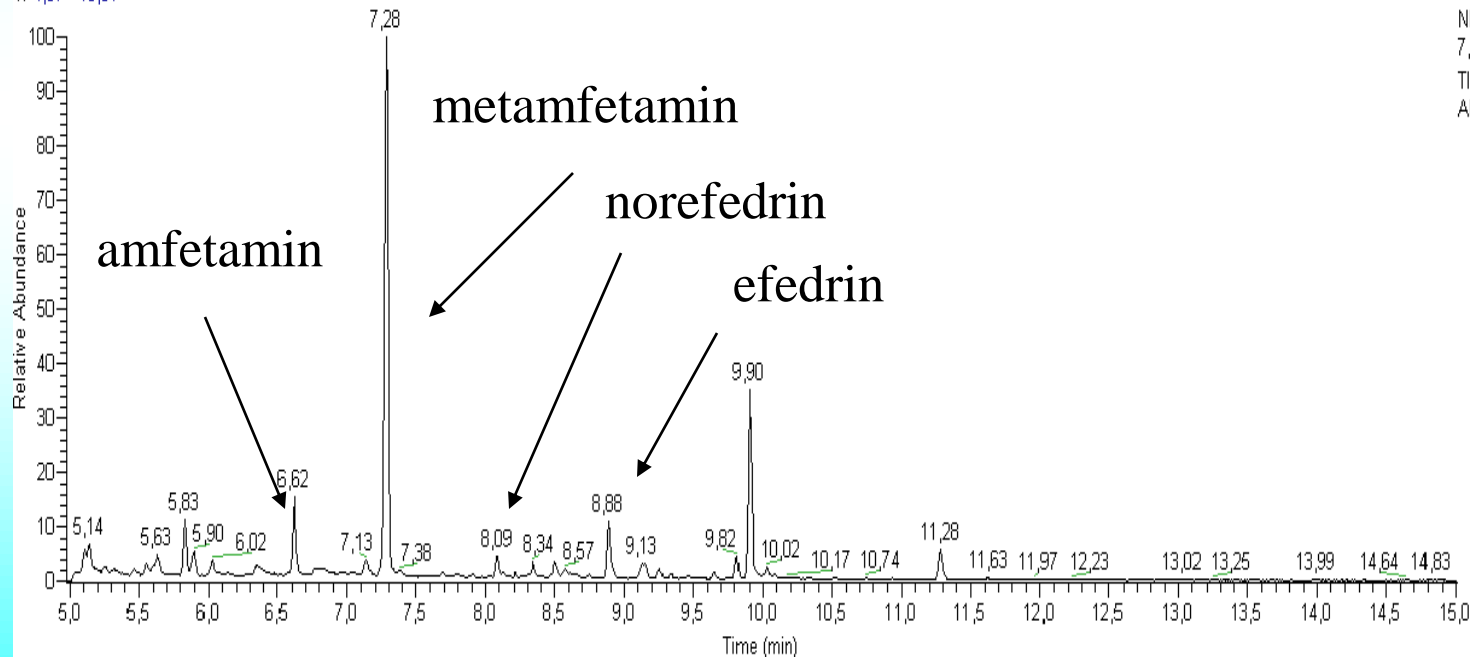
GC-MS Total Ion Chromatogram – analýza 2 ml moč acetylce

\\Documents and Settings\\...\\AMD60558

09.02.2006 20:08:40

2 ML UR, I.S.BROMFENI 500 NG/ML ACETYLAC

T: 4,97 - 15,01



# Cílené analýzy GC – MS potvrzení heroínu a Brownu

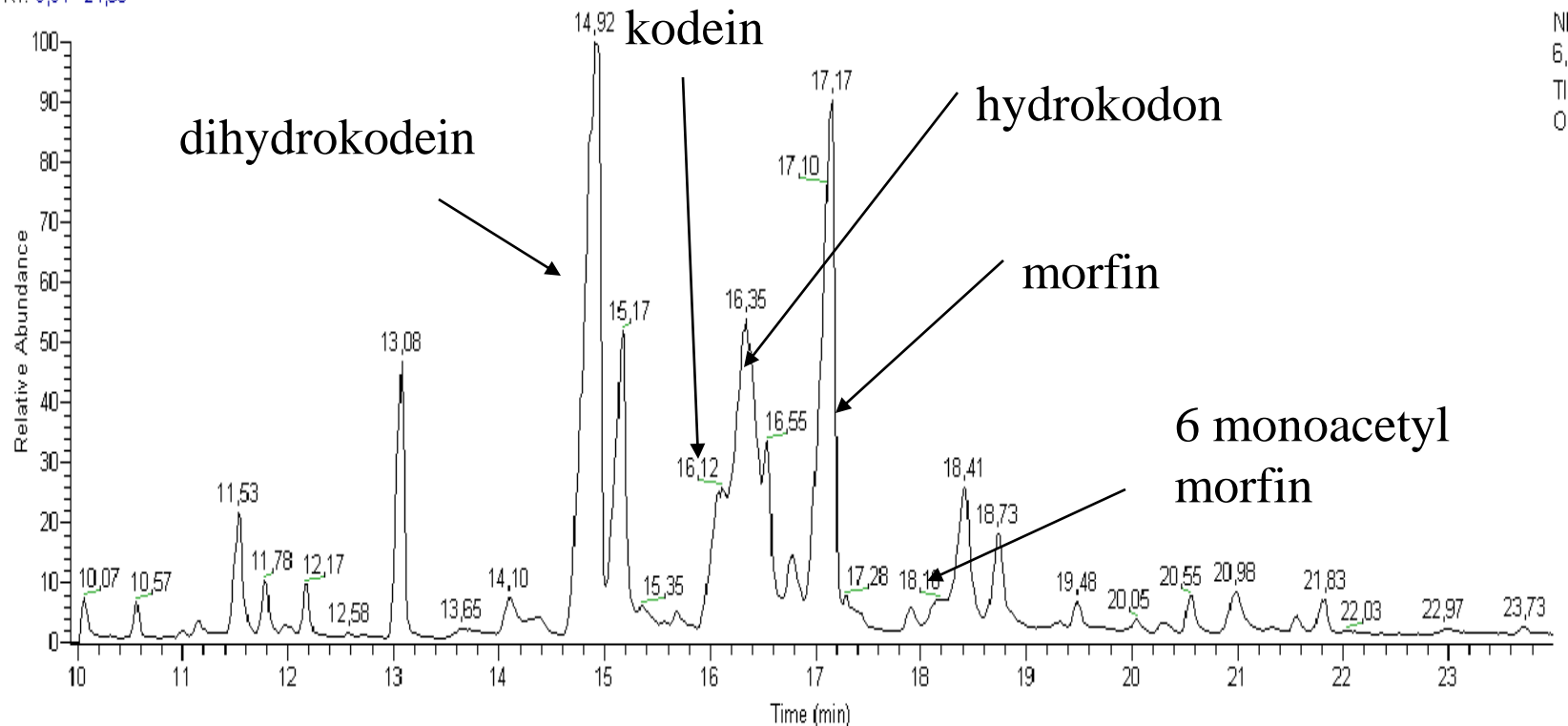
GC-MS Total Ion Chromatogram – analýza 4 ml moč silylace

C:\Documents and Settings\... \OM054863  
VM

08.10.2005 22:08:30

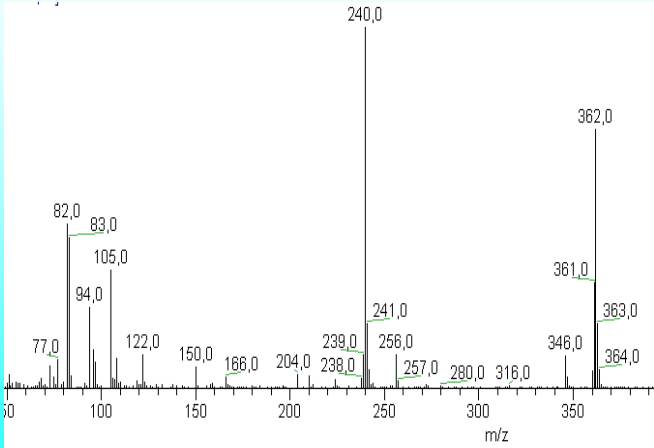
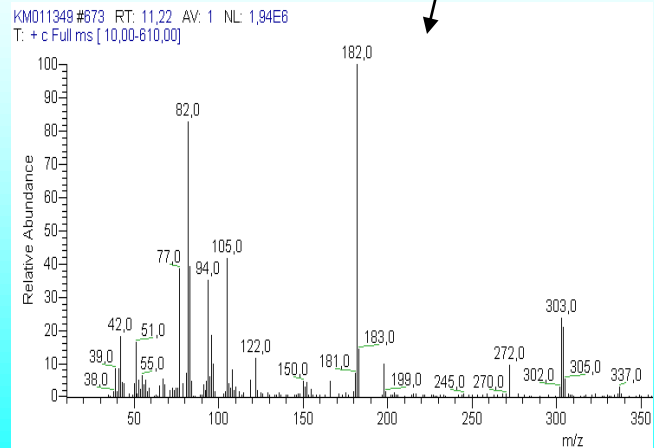
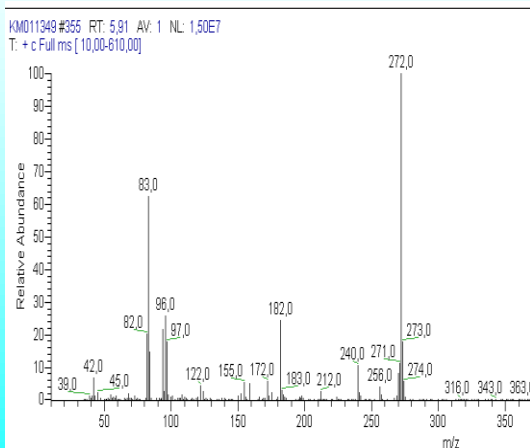
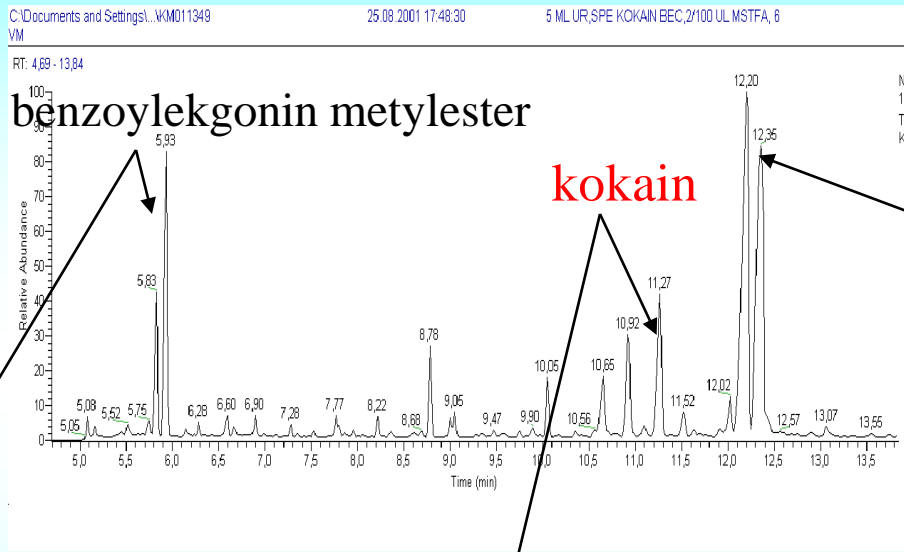
4 ML UR, NH, SPE, BEC, SPE BEC, 100 UL MST

RT: 9,94 - 24,00



# Cílené analýzy GC – MS potvrzení kokainu

GC-MS Total Ion Chromatogram – analýza 5 ml moč silylace



# Cílené analýzy GC – MS potvrzení heroínu

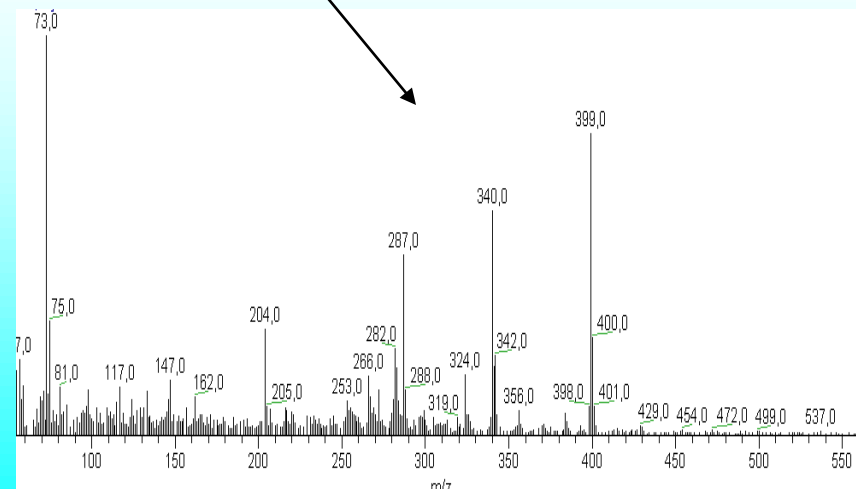
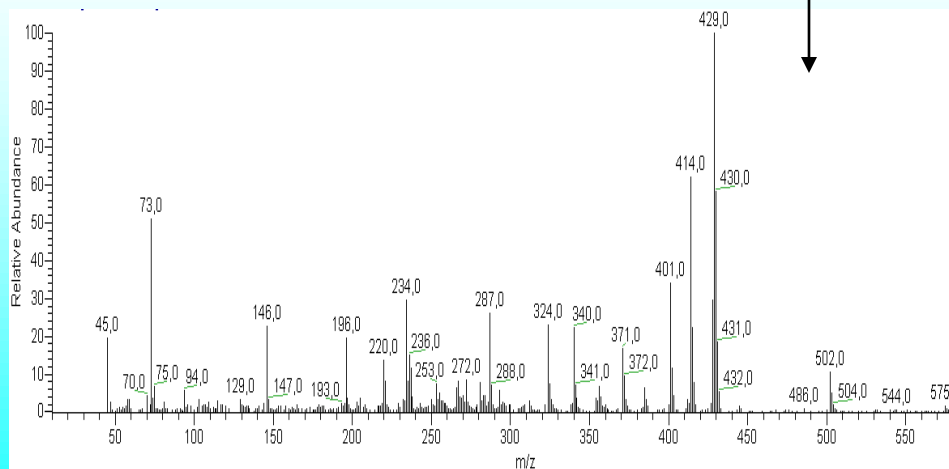
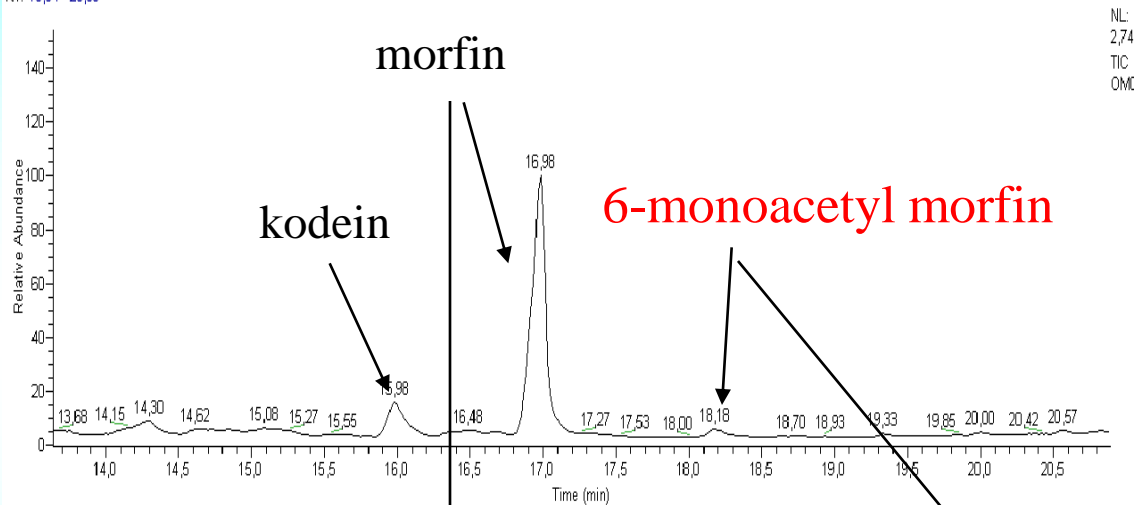
GC-MS Total Ion Chromatogram – analýza 4 ml moč silylace

C:\Documents and Settings\... \NOM054903  
vM

20.10.2006 18:25:10

4 ML UR, NH, SPE BEC, 100 UL MSTFA, NH4J

RT: 13,64 - 20,89



# Cílené analýzy GC – MS potvrzení kanabinoidů

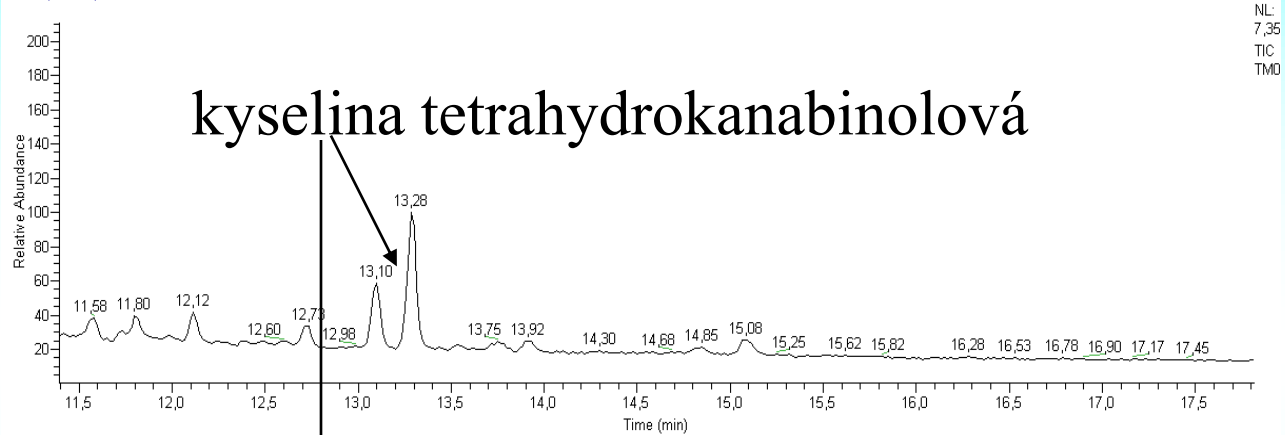
GC-MS Total Ion Chromatogram – analýza 3 ml moč silylace

C:\Documents and Settings\...TMO61136  
vM

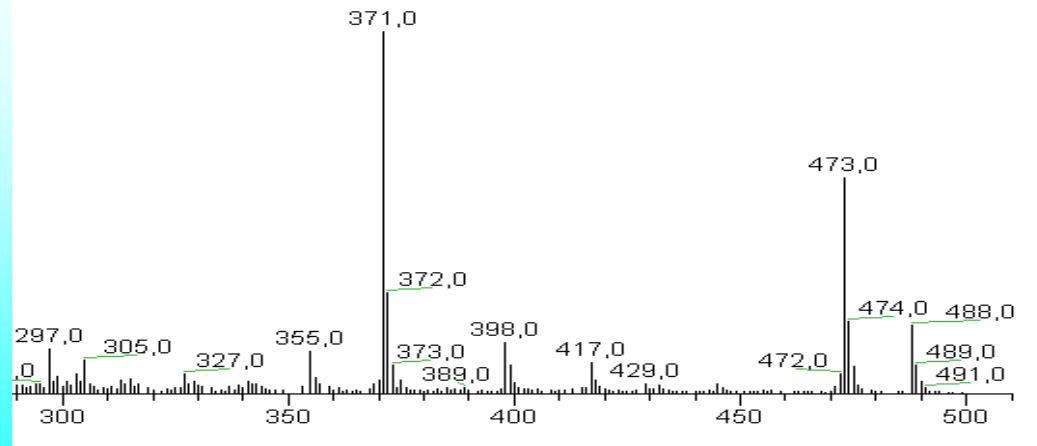
09.05.2006 19:17:20

3 ML UR, AH, SPE, BEC, 2/100 UL MSTFA

RT: 11,39 - 17,82



NL:  
7,35  
TIC  
TMO



# Screeningové metody TLC

## Chromatografie na tenké vrstvě TLC

### Princip

- ✓ využívá princip pohyblivosti v reakčním systému:  
dělení směsi nox mezi stacionární a mobilní fázi  
využívá adsorpční a rozdělovací chromatografii
- ✓ využívá princip extrakčního chování nox – dělení na  
látky bázické, kyselé a neutrální
- ✓ využívá UV a barevné detekce činidel
- ✓ jednoduchá na provedení, rychlá
- ✓ vhodná pro intoxikace, záchyt vyšších koncentrací nox
- ✓ finančně nenáročná

# Screeningové metody TLC

Způsob provedení:

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

*Mobilní fáze* – směs organických rozpouštědel

$R_F$  faktor – podíl vzdálenosti skvrny látky od startu a vzdálenosti čela rozpouštědla

$R_F$  faktor ovlivňuje:

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



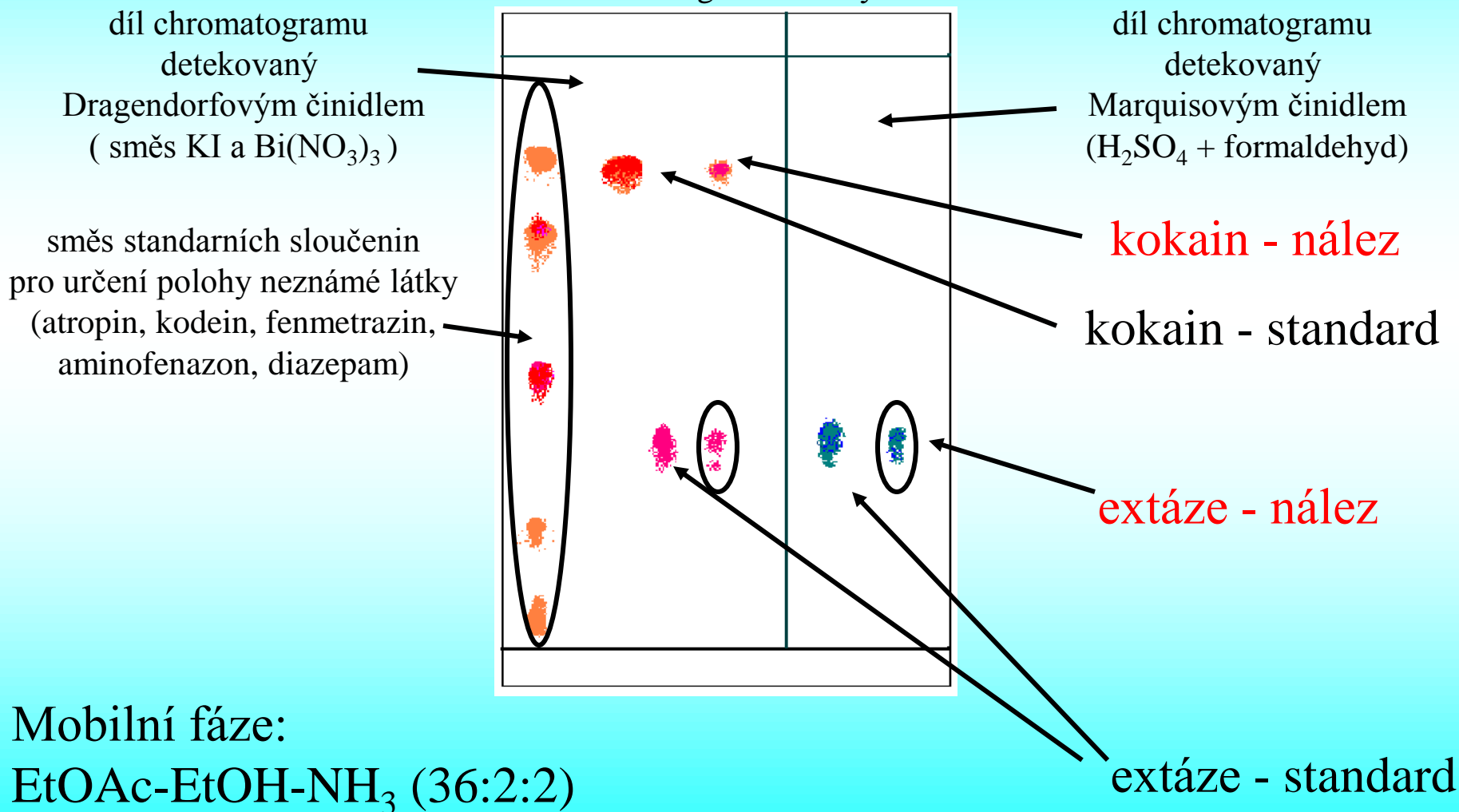
# Screeningové metody TLC

## **Standardní frakční extrakce léčiv metodou kapalina – kapalina**

- 50 ml moč, žaludeční obsah, pH = 3.0, vytřepat se 100 ml diethyléteru, organickou fází odpařit – získá se extrakt obsahující neutrální a kyselé analyty – EK
- vodná fáze, pH = 10.0, vytřepat se 100 ml diethyléteru, organickou
- fází před odpařením zakápnout ředěnou HCl – získá se extrakt obsahující bázi (alkalické) analyty – EA
- 20 ml vytřepané moče – hydrolytické štěpení konjugátů varem s minerální kyselinou (HCl, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)  
varem s alkálií  
enzymy (šetrné, ale drahé)
- hydrolyzát se neutralizuje pH = 7.0, vytřepat se 100 ml diethyléteru, organickou fází odpařit – získá se extrakt obsahující konjugované metabolity - EH

# Screeningové metody TLC intoxikace kokainem a extází

TLC chromatogram – analýza 50 ml moč



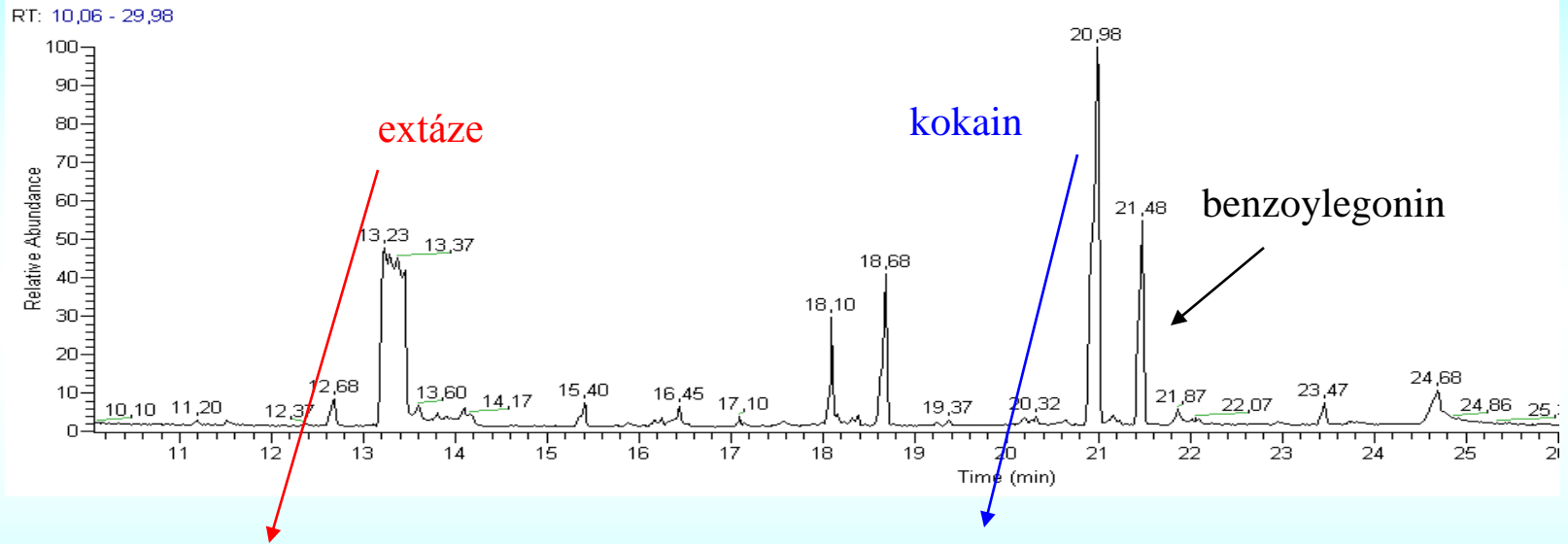
# Screeningové metody GC-MS intoxikace kokainem a extází

Total Ion Chromatogram – analýza 2 ml moč silylace

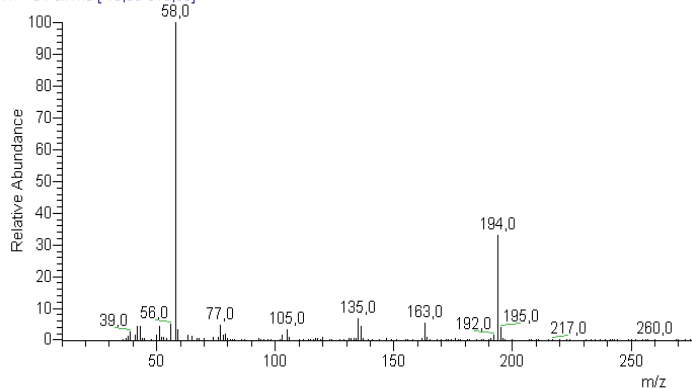
C:\Documents and Settings\...\SM64997B

08.11.2006 20:31:20

2 ML UR,SPE BEC SCREENING FRA



SS64997B #802 RT: 13.37 AV: 1 NL: 1,15E7  
T: + c Full ms [ 10,00-510,00]



SS64997B #1258 RT: 20.97 AV: 1 NL: 1,48E6  
T: + c Full ms [ 10,00-510,00]

