



Konfirmace v toxikologii

M. Balíková

Konfirmace - dokazování

Základní princip forenzní toxikologie-
ověřování výsledků jinou nezávislou metodou

- Mezinárodní odborné směrnice, např.:
 - TIAFT
 - SOFT
 - GTFCH
 - WADA

Př.: Stanovení ethanolu v krvi

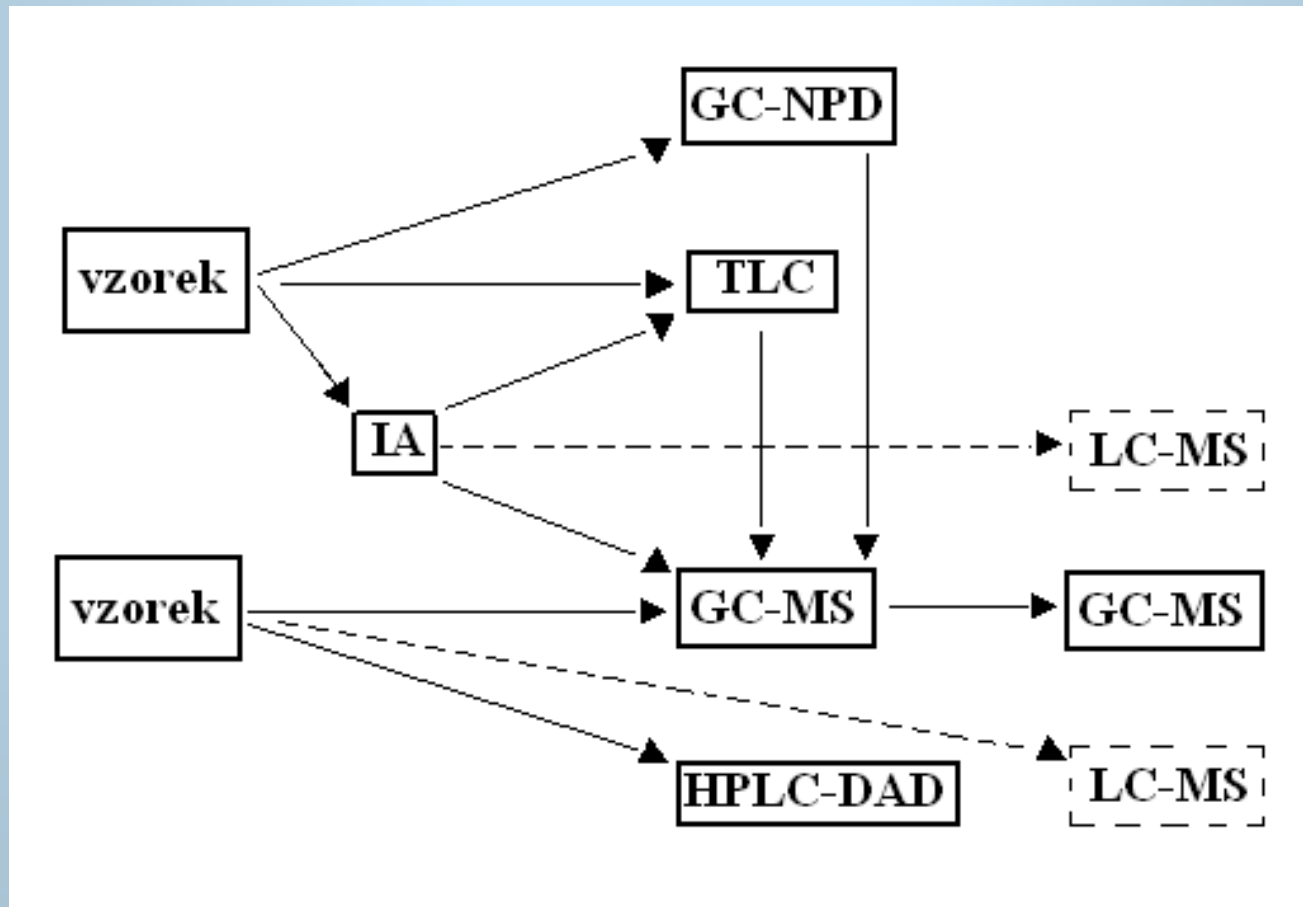
1) Orientační, nespecifické metody:

- Widmarkova metoda (redukující látky)
- Enzymatická metoda (možné interference)
- Osmometrická metoda (příčiny zvýšení osmolality)

2a) Specifická plynová chromatografie

2b) Duální systém plynové chromatografie (2 kolony)

Kombinace toxikologických metod (organické extraktivní 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 nox
- kompromisní řešení
- méně citlivé

2) Konfirmační metody

- optimalizované pro úzkou škálu látek předem specifikovaných
- mohou využívat derivatizační postupy
- mají nižší mez detekce, jsou více citlivé
- mohou pracovat ve speciálním SIM režimu hmotnostních spekter - vyšší citlivost

Potvrzování imunochemického skupinového záchytu drog

Př. kontrolní analýzy v moči

Logický požadavek:

- ❑ 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

GC-MS potvrzování imunochemického skupinového záchytu drog v moči - specifická úprava vzorku

Pozitivní imunozáchyt	Úprava moče	Běžná derivatizace
Opiáty typu morfinu	<ol style="list-style-type: none"> 1) Případná hydrolýza minerální kyselinou 2) SPE pH 9 3) Zakoncentrování 	Silylace
Budivé aminy Amfetaminy	<ol style="list-style-type: none"> 1) Extraktivní acetylace aj. 2) Zakoncentrování 	Acetylace Trifluoracetylace
Kokain a metabolity	<ol style="list-style-type: none"> 1) SPE pH 6 2) Zakoncentrování 	Silylace
Kanabinoidy	<ol style="list-style-type: none"> 1) Hydrolýza alkálií 2) SPE 3) Zakoncentrování 	Silylace

Konfirmace pomocí GC-MS

Využití chemické derivatizace

Derivatizace je cílená chemická reakce pro určitý typ sloučenin. Není použitelná pro záchyt neznámých nox

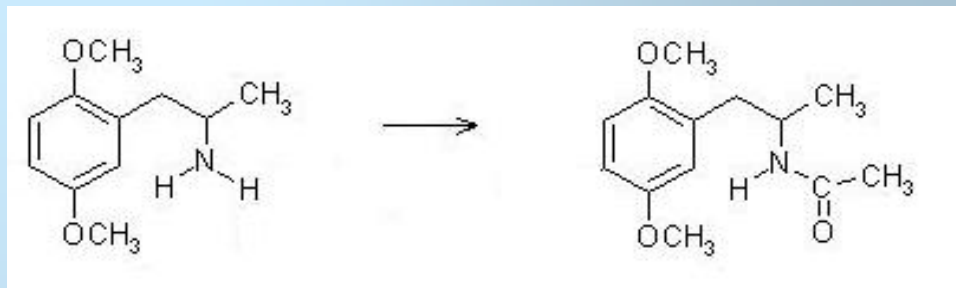
- ❑ Snížení polaritý analytů, zlepšení separace, detekce
- ❑ Získání více specifického hmotnostního spektra
- ❑ Podpořit identifikaci domnělé látky

<u>Původní analyt</u>	<u>Typ derivátu</u>
kyselina	silyl, alkyl, halogenalkyl aj.
alkohol, fenol	silyl, acetyl, propionyl, butyryl, halogenacetyl aj.
amin	acetyl, halogenacetyl aj.
vicinální dioly, glykol	cyklické boronáty aj.

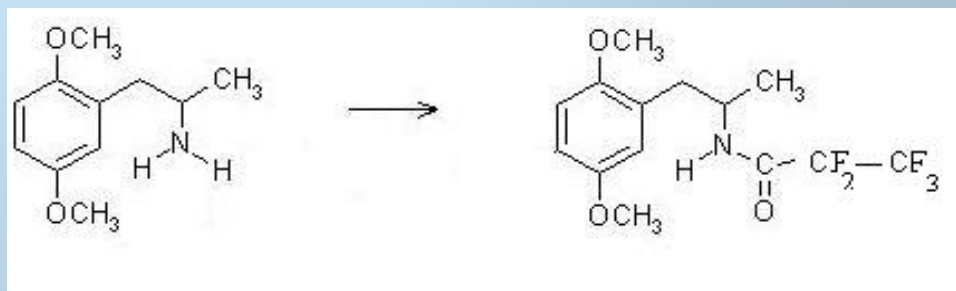
Chemická derivatizace analytů - 1

Typy reakcí:

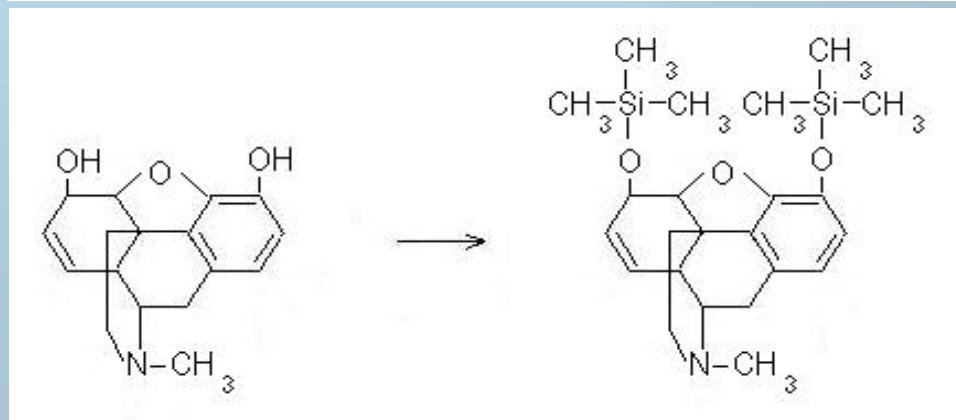
1) Acetylace aminů, fenolů



2) Tvorba perfluorderivátů

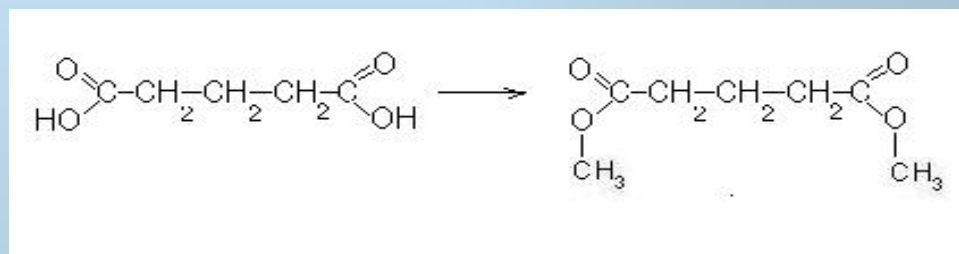
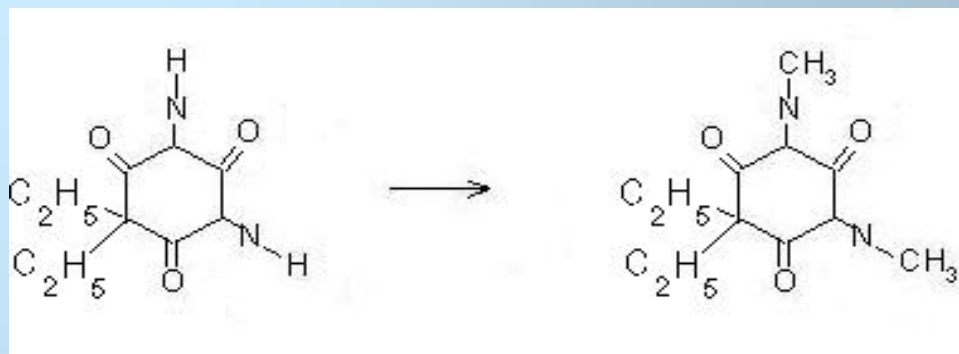


3) Silylace kyselin, fenolů

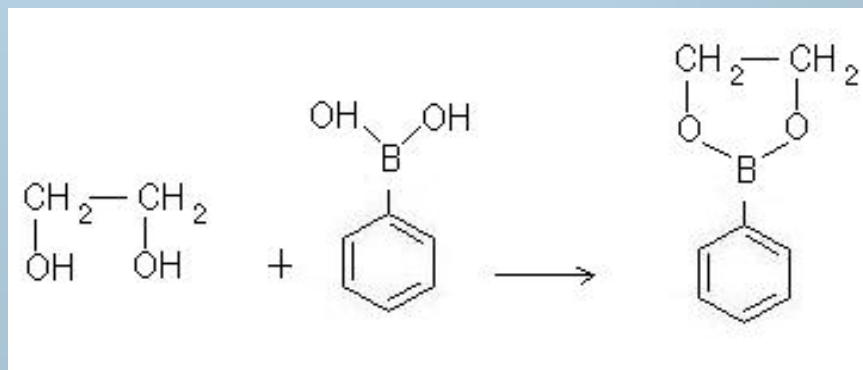


Chemická derivatizace analytů - 2

4) Alkylace kyselin



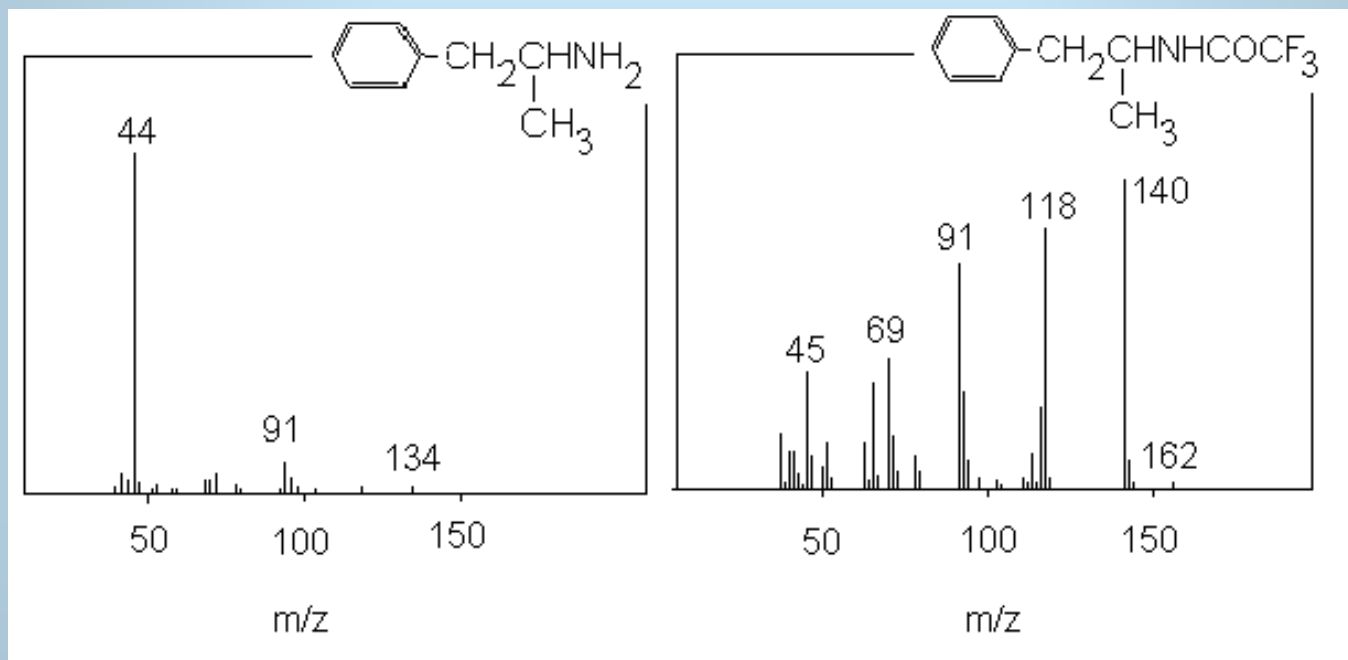
5) Speciální reakce př. vicinální dioly- tvorba cyklických etherů



Specificita spekter amfetaminu

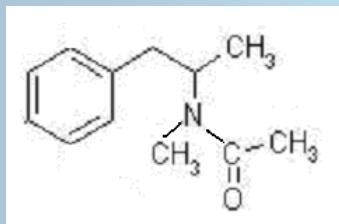
Původní forma

TFA derivát



Acetylovaný methamfetamin

EI a CI ionizace

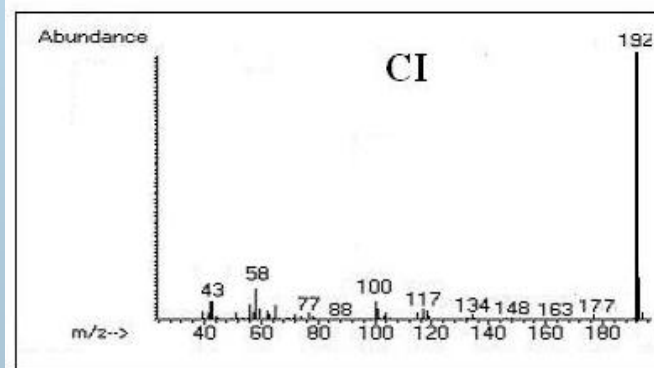
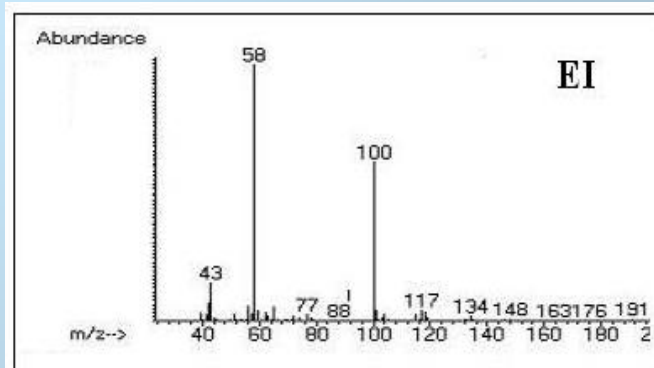


$C_{12}H_{17}NO$

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

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)

- Přivolána RZS, následně policie.
- 35 pacientů hospitalizováno v 5 nemocnicích
- Toxikologická laboratoř bombardována dotazy "TOE" ?
- Policie doručila vzorek bylinného čaje
- Poté sady biologických tekutin nezaručené označení
- Toxikologická analýza čaje - extrakce alkaloidů pH 9, GC-MS screening pro neznámé noxy,
- Následně analýza biologických vzorků - odpovídající nálezy jako v čaji
- Dodatečně s časovým odstupem připravena kalibrace a kvantifikace s pomocí dostupných standardů

Hromadná otrava neznámou noxou (3)

Výsledky analýz:

Odhad průměrné dávky (V=150 ml)

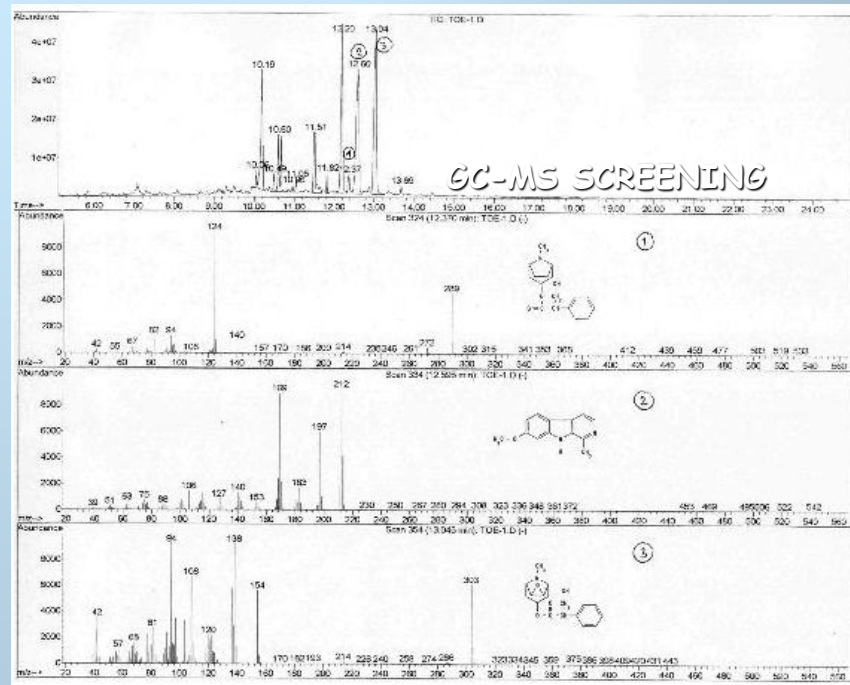
- atropin 4 mg
- harmin 27 mg
- skopolamin 78 mg

Průměrná sérová koncentrace:

- atropin 5 ng/ml
- harmin 8 ng/ml
- skopolamin 13 ng/ml

Pacienti:

někteří propuštěni z nemocnic
za pár hodin, jiní vyžadovali
intenzivní léčbu s řízeným dýcháním



Léčba, laboratoř - úhrada
zdravotní pojištění

Těžká otrava 2 osob neznámou noxou - odhalená příčina: DOB (1)

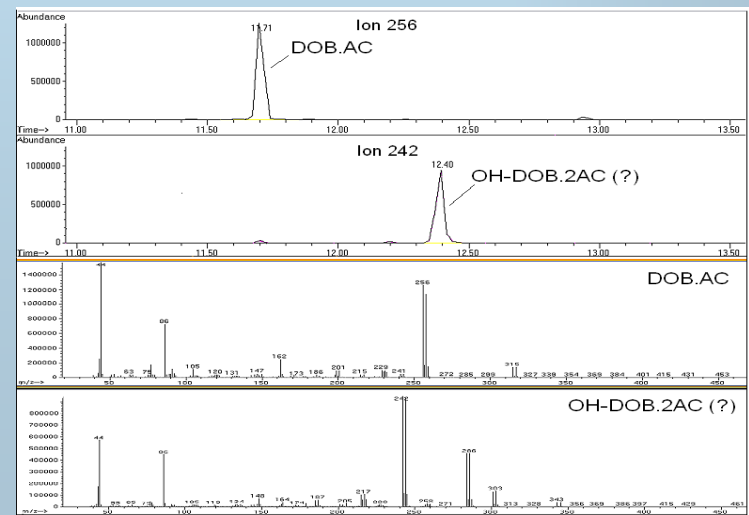
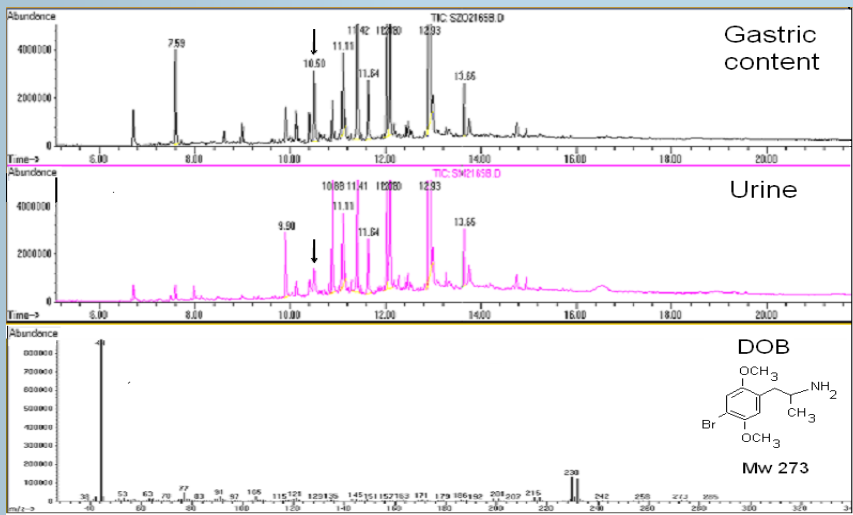
Dodatečná historie události (za řadu dní):

- 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

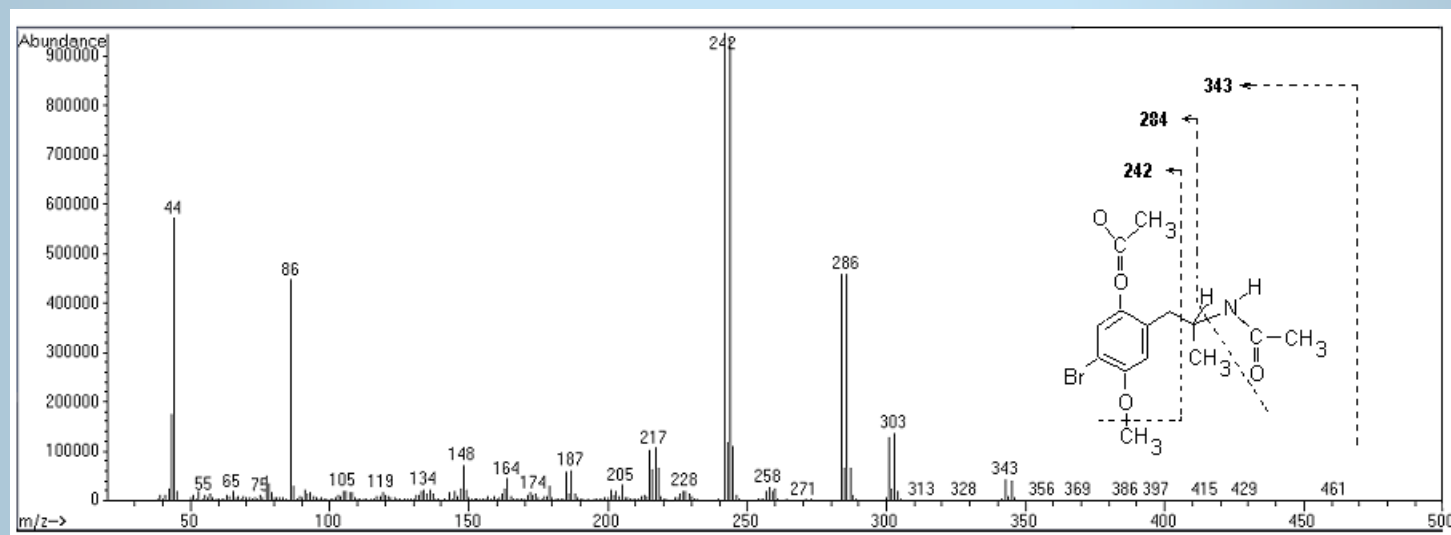
Těžká otrava neznámou noxou - (2)

Toxikologické analýzy, tápání v neznámu, IA neefektivní:

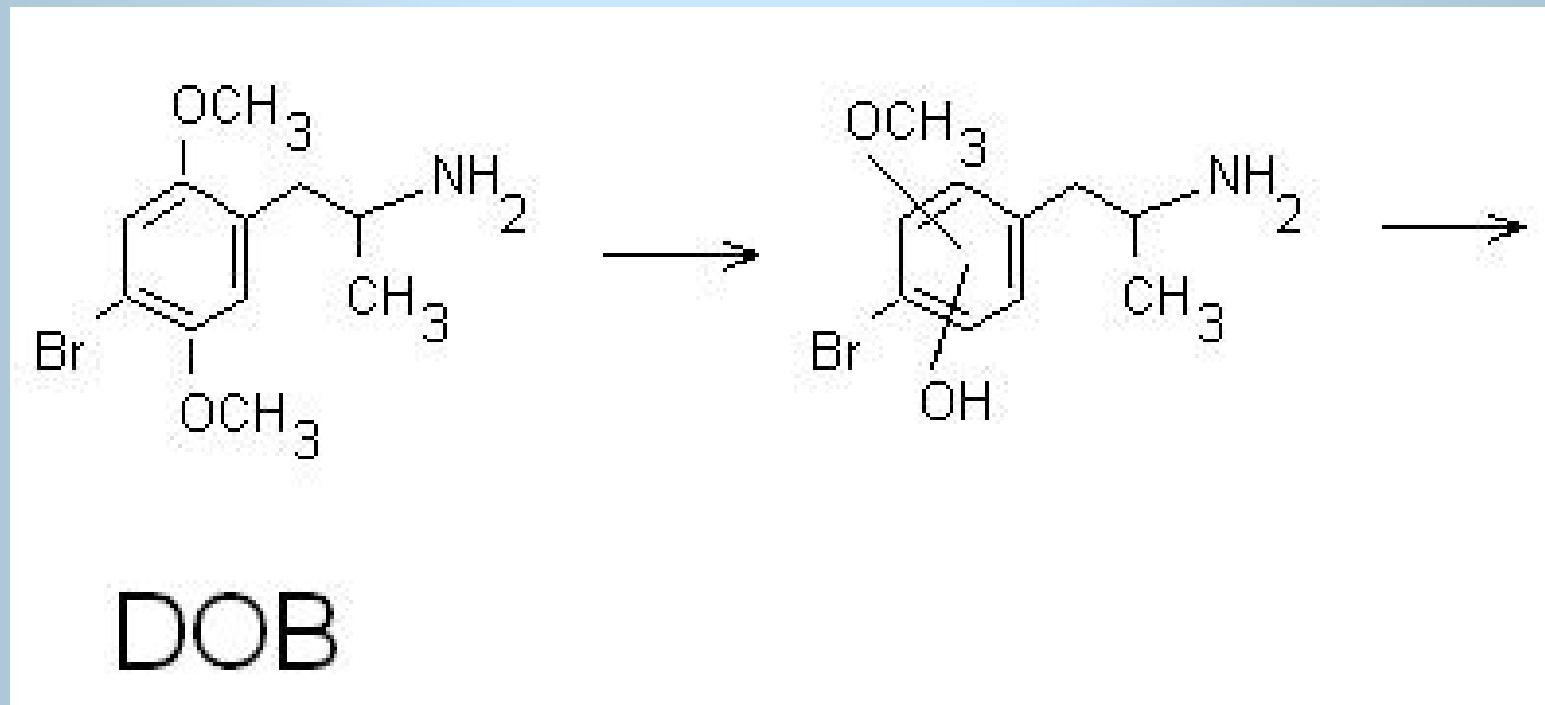
- Těžká acidóza (pH 6,6) - methanol, glykoly negativní
- CEDIA screening: poz. THCOOH, poz. KOKAIN, neg. AMPH (!)
- GC-MS screening neznámé noxy : hit podle knihovny: DOB ?
- GC-MS konfirmace jako acetylderivát: DOB a metabolit



Struktura a fragmentace Př. acetylderivát metabolitu DOB



Biotransformace - neznámé metabolity DOB



Hmotnostní spektra nasvědčují O-demethylaci, neumožňují ale jasně rozlišit strukturní izomery

Těžká otrava neobvyklou noxou - (3)

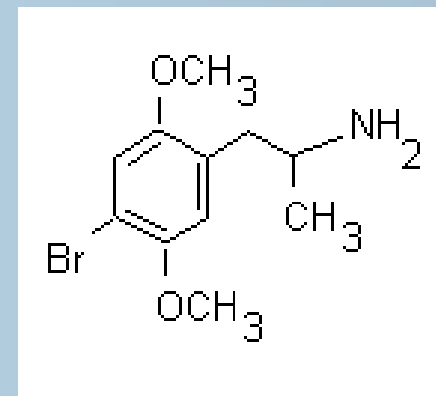
TOXIKOLOGICKÉ NÁLEZY - SOUHRN

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

2,5-Dimethoxy-4-brom-amfetamin

Poprvé zjištěn 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



Toxikologická literatura:

- H. Lüllmann aj.: Farmakologie a toxikologie; Grada 2002
- O. H. Drummer: The Forensic Pharmacology of Drug Abuse; Arnold Publ. 2001
- J. Večerková: Biotransformace léčiv a její význam pro toxikologickou praxi; Karolinum 1997
- M. Balíková: Forezní a klinická toxikologie; Galén 2004
- R. J. Flanagan et al.: Fundamentals of Analytical Toxicology, Wiley 2007
- J. Patočka aj.: Vojenská toxikologie; Grada 2004
- S. Moeschlin aj.: Klinik und Therapie der Vergiftungen; Thieme 1986
- A. C. Moffat aj. ed.: Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in Pharmaceuticals, Body Fluids and Postmortem Material; Pharmaceutical Press 2004