

TOXIKOLOGIE A ANALÝZA DROG

Martin Kuchař
Ústav chemie přírodních látek

Používané metody v klinické a forenzní analýze

Terénní analýza
Imunochemie, chromatografické metody
IR a Raman spektroskopie

Detekce a analýza drog

- **Terénní analýza**
 - Analýza neznámých látek (drogy, výbušniny)
 - Metody – jednoduché „color“ test, imunochemické testy typu LFIA
 - Mobilní detektory na bázi IR, Raman, GCMS (iontrap)
- **analýza v kriminalistické laboratoři**
 - Předběžná analýza (TLC, GC-FID)
 - Konfirmační analýza včetně kvantifikace na dožádání
 - Nové drogy - velké množství derivátů – absence standardů pro kvalitativní analýzu (certifikované standardy pro kvantitativní stanovení)
 - FTIR, GC-MS, LC-MS
- **analýza v toxikologické laboratoři**
 - Předběžný screening (imunochemické metody)
 - Správný výběr a odběr vzorku
 - Nutné znát indicie, kterou látku hledat (příklad fentanyl – nízké koncentrace, GHB – endogenní látka),
 - Konfirmační analýza s kvantifikací v případech fatálních případů, soudně nařízená toxikologická analýza
 - Analýza neznámé noxy – náročné, specializovaná pracoviště (HRMS - QTOF, Orbitrap)

- terénní identifikace
 - dosud běžně používané testy „color test“ nelze použít v případě NSD – nespecifické. Různé NSD i ze stejné skupiny poskytují různé barevné reakce



Správný odběr vzorku

Barevné reakce nových syntetických drog

Marquis													
	AMPH	MDMA	PMMA	2C-B	DOB	Mescaline	BZP	TFMP	mCPP	MeOPP	Psilocin	αMT	reagent
Mecke													
	AMPH	MDMA	PMMA	2C-B	DOB	Mescaline	BZP	TFMP	mCPP	MeOPP	Psilocin	αMT	reagent
Mandelin													
	AMPH	MDMA	PMMA	2C-B	DOB	Mescaline	BZP	TFMP	mCPP	MeOPP	Psilocin	αMT	reagent
Simons I													
	AMPH	MDMA	PMMA	2C-B	DOB	Mescaline	BZP	TFMP	mCPP	MeOPP	Psilocin	αMT	reagent
Simons II													
	AMPH	MDMA	PMMA	2C-B	DOB	Mescaline	BZP	TFMP	mCPP	MeOPP	Psilocin	αMT	reagent

Páleníček T., Kuchař M.: *Adiktologie*, 4 (2011)

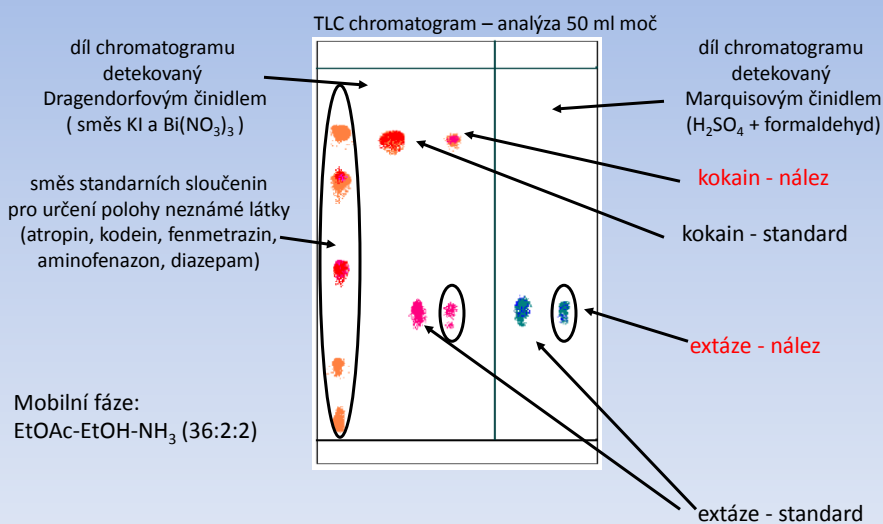
Screeningové metody TLC

Standardní frakční extrakce léčiv metodou kapalina – kapalina

- 50 ml moč, žaludeční obsah, pH = 3.0, vytřepat se 100 ml diethyleteru, organickou fází odpařit – získá se extrakt obsahující neutrální a kyselé analyty – EK
- vodná fáze, pH = 10.0, vytřepat se 100 ml diethyleteru, organickou
- fází před odpařením zakápnout ředěnou HCl – získá se extrakt obsahující báze (alkalické) analyty – EA
- 20 ml vytřepané moče – hydrolytické štěpení konjugátů varem s minerální kyselinou (HCl, H_3PO_4)
varem s alkálií
enzymy (šetrné, ale drahé)
- hydrolyzát se neutralizuje pH = 7.0, vytřepat se 100 ml diethyleteru, organickou fází odpařit – získá se extrakt obsahující konjugované metabolity - EH

Metodika převzata: Ústav soudního lékařství a toxikologie 1. LF UK a VFN

Screeningové metody TLC intoxikace kokainem a extází



Metodika převzata: Ústav soudního lékařství a toxikologie 1. LF UK a VFN

Imunochemické metody

Imunoanalýza je jedna z nejcitlivějších metod

vlastnosti protilátek:

- schopnost protilátek **vázat se na široké množství** přirozených i umělých sloučenin, které se chovají jako antigeny. (Protilátky jsou proteinového charakteru a jejich velké množství vazebných míst je odvozeno z obrovského počtu kombinací sekvencí aminokyselin.)
- **specifita** protilátky pro reagující látku. Tato vlastnost umožňuje stanovení velmi nízkých (až pikomolárních, 10^{-12}) koncentrací látek za přítomnosti dalších podobných sloučenin (např. stanovení stopových množství hormonů ve vzorku krve).
- **síla vazby** protilátky s antigenem.

Využití reakce protilátka - antigen *in vitro* je základem imunochemických metod.

Imunoanalýza zahrnuje skupinu imunochemických metod, které k detekci využívají dobře měřitelné **značené látky – indikátoru** a tím dosahují vysoké citlivosti (detekční limity těchto metod dosahují hodnot 10^{-15} až 10^{-20} mol/L). Indikátorem může být radioaktivní izotop (radioizotopové metody) nebo jiná látka: enzym, fluorescenční značka, DNA, koloidní částice a pod. Indikátor je obvykle navázaný na protilátku (imunometrická analýza), nebo na antigen.

Historie imunoanalýzy

„Počátky imunoanalýzy spadají do 50. let 20. století, kdy fyzikové **Rosalyn Yalowová** a **Solomon Berson** (pracovní i životní partneři) popsali princip **kompetitivní radioimunoanalýzy (RIA)**, s jejíž pomocí změřili do té doby nedetekovatelná množství inzulinu v krvi. Yalowová a Bersonovi bylo jasné, že obdobné metody, založené na soutěži značeného a neznačeného antigenu o vazebná místa, bude možné vypracovat i pro další analyty, a tuto možnost chtěli poskytnout celému světu. Proto své poznatky uveřejnili bez patentové ochrany. V roce 1977 obdržela R. Yalowová (S. Berson se toho již nedožil) za vývoj radioimunoanalýzy pro peptidové hormony Nobelovu cenu. Později se hledaly i jiné možnosti značení molekul tak, aby byla umožněna stejně citlivá detekce. V roce 1971 se objevily metody, které místo radioizotopů využívaly enzymy. Jejich autory byli Eva Engvallová s Peterem Perlmanem ze Švédska a Bauke van Veemen s Antonem Schuursem z Holandska. Zatímco Holanďané svůj systém patentovali, Engvallová a Perlman věnovali světu metodu ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) stejně velkoryse, jako to před nimi s RIA udělali Rosalyn Yalowová a Solomon Berson.“

Lapčík O. Od vyvrácené hypotézy k Nobelově ceně. Vesmír 2009:88, 704-707.

Protilátky (angl. *antibody*, Ab) jsou proteiny produkované vyššími živočichy jako součást imunitní odpovědi. Protilátky patří mezi glykoproteiny, které nazýváme **imunoglobuliny**. Hlavními charakteristikami protilátek jsou:

- **afinita**
- **avidita**
- **specifita pro určitý antigen**

Afinita je energie vazby (síla vazby) protilátky s jednou antigenní determinantou antigenu. Je mírou síly interakce antigen-protilátka a je ji možné kvantitativně vyjádřit pomocí asociační konstanty (K_{as}) reakce. Kvalitní protilátky používané pro účely imunoanalýzy by měly mít $K_{as} = 10^{10} - 10^{12} \text{ L.mol}^{-1}$.

Avidita je vazebná energie mezi celou molekulou antigenu a protilátkou, neboť většina antigenů je multivalentních, tj. má několik vazebných determinant pro různé protilátky.

Specifita protilátky je charakterizována minimální interferencí s jinými látkami, než je látka, pro jejíž stanovení je určena. Mírou specifity protilátky je procento zkřížené reakce s látkou, pro jejíž stanovení není určena.

Podle způsobu přípravy a charakteru dělíme protilátky do dvou základních skupin, na:

- protilátky **polyklonální**
- protilátky **monoklonální**

Antigen

Antigeny jsou makromolekulární látky přirozeného nebo syntetického původu, které imunitní systém rozeznává jako cizí. Jejich přítomnost v organismu stimuluje tvorbu protilátek, resp. navozuje imunitní odpověď.

- **Kompletní Imunogen** charakterizují dvě vlastnosti:

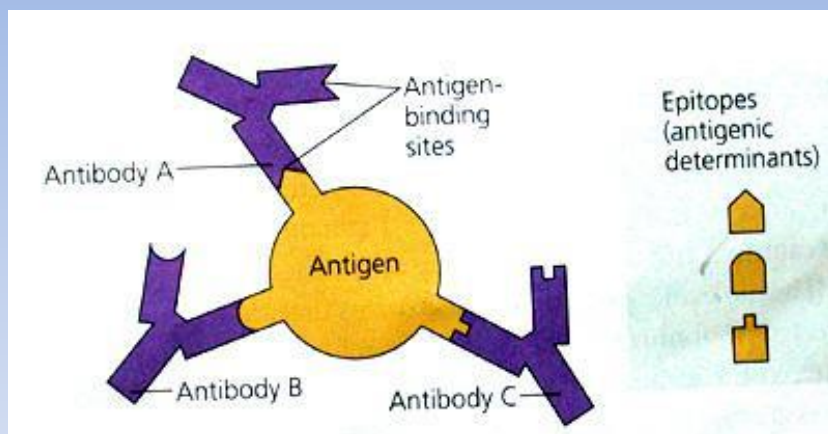
- **imunogenicita**, neboli schopnost navodit imunitní odpověď (tvorba protilátek, zapojení regulačních a výkonných lymfocytů), a
- **specifita**, tj. schopnost s těmito lymfocyty a protilátkami reagovat. Imunogen reaguje jen s těmi lymfocyty a protilátkami, jejichž tvorbu vyvolal.

(podmínky: relativní molekulová hmotnost $> 10\,000$, rozpustnost, elektrický náboj, tvar molekuly (konformační struktura), dostupnost epitopů.)

- **Hapten** má malou molekulu ($M_r < 2000$) a je schopen specifické vazby na protilátky, ale **není schopen vyvolat imunitní odpověď. Je tedy pouze součástí molekuly kompletního antigenu**. Typickými hapteny jsou některá léčiva, drogy (resp. jejich metabolity), nízkomolekulární hormony nebo některé peptidy.

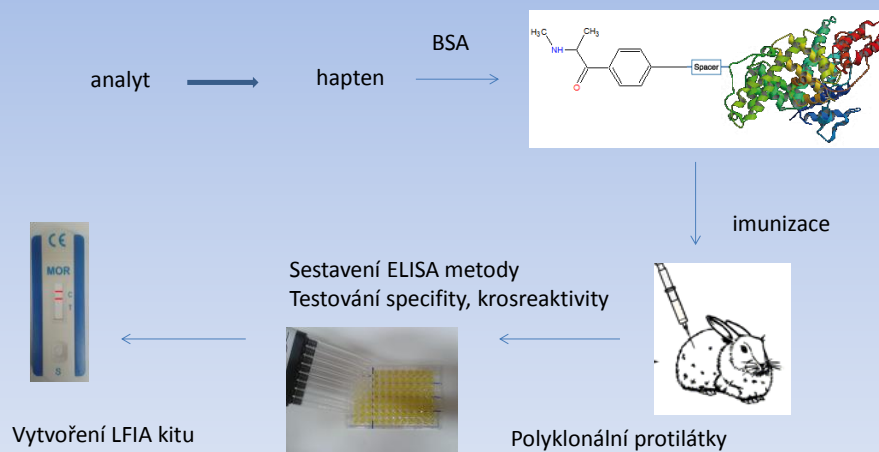
Každý imunogen se skládá z makromolekulárního nosiče a nízkomolekulárních determinantních skupin tzv. antigenních determinant neboli epitopů

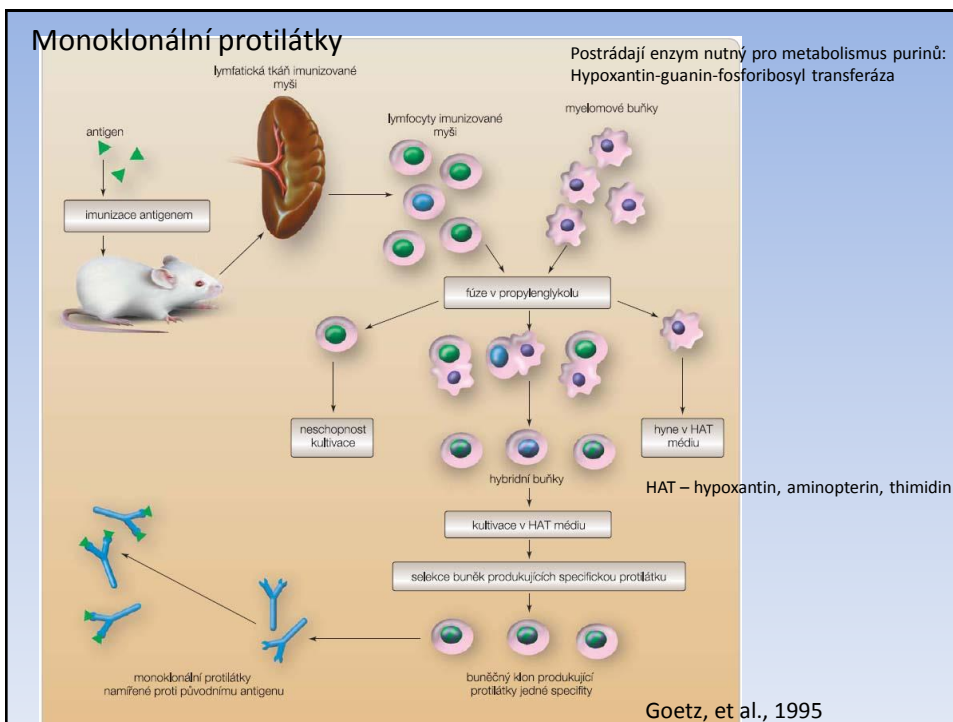
Antigen a různé epitopy s navázanými protilátkami.



Zdroj: worldofbiology09.wikispaces.com

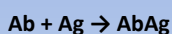
Metodika tvorby polyklonálních protilátek a následných imunochemických testů





Reakce protilátka-antigen

Při reakci antigen-protilátka vzniká **protilátkově-antigenní komplex (imunokomplex)**.



Ab = protilátka, Ag = antigen, AbAg = imunokomplex

Reakce je reverzibilní. Vazba v imunokomplexu je nekovalentní, závisí na několika druzích slabých sil, jako jsou hydrofobní vazby, vodíkové můstky, van der Waalovy síly a interakce iontů. O pevnosti vazby rozhoduje rovnovážná konstanta.

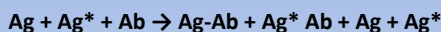
Imunoanalytické metody

využívají reakci mezi antigenem a specifickou protilátkou, tedy imunochemický princip. Protilátka musí být specifická, tzn. musí reagovat pouze s příslušným antigenem.

Pro kvantitativní vyjádření výsledku analýzy je třeba, aby některá ze základních komponent byla označena tzv. **indikátorem**, jehož přítomnost lze citlivě a dostupně měřit. K těmto účelům byly nejprve využívány radionuklidy, např. ^{125}I (označení radioimunoanalýza nebo RIA). V současné době jsou používány další substance různého charakteru: např. enzymy, fluorofory, luminofory apod.

Imunoanalytické metody

• Kompetitivní



konstantní množství protilátky a značeného antigenu, přičemž jeho množství je vždy větší než množství protilátky. Výsledkem reakce je vznik dvou komplexů, neznačeného (Ag-Ab) a značeného (Ag* -Ab), ve kterých jsou antigeny vázány na protilátku. Podíl značeného antigenu (indikátoru), vázaného na protilátku (množství značeného komplexu, B - "bound"), jako volná frakce (F - "free"), pak množství nevázaného indikátoru. Po oddělení frakcí se měří odezva (radioaktivita, absorbance, fluorescence, luminiscence)

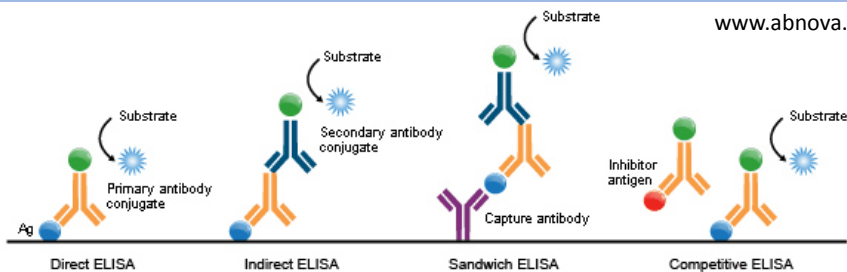
• Nekompetitivní metody

Nekompetitivní metody jsou charakterizovány tím, že specifická protilátka je v reakci přítomna v nadbytku. S ní tentokrát reaguje antigen, který je určenou látkou (Ag) a pro kvantifikaci tentokrát slouží vhodně označená samotná specifická protilátka (Ab*).



Množství komplexu [Ag-Ab*] je tentokrát přímo úměrné množství stanoveného antigenu.

ELISA (enzyme linked immunoassay)



Přímá ELISA: imobilizovaný antigen, nutnost značení primární protilátky

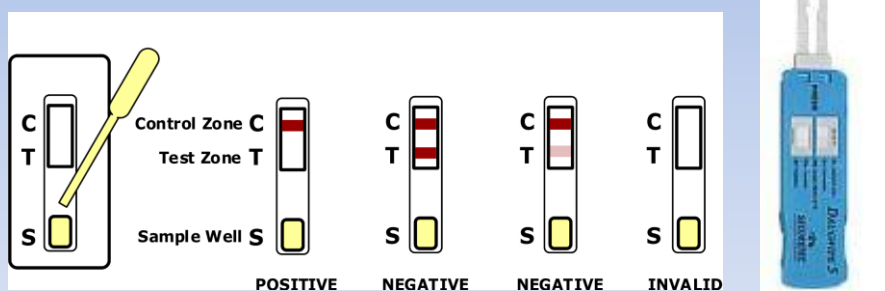
Nepřímá ELISA: imobilizovaný antigen, použití značené sekundární protilátky (komerčně dostupné), nevýhoda – možná krosreaktivita

Sandwich ELISA: antigen je vázán mezi 2 protilátkami, vysoká citlivost a selektivita, antigen nemusí být předem purifikován, antigen musí obsahovat min. 2 vazebná místa pro protilátku

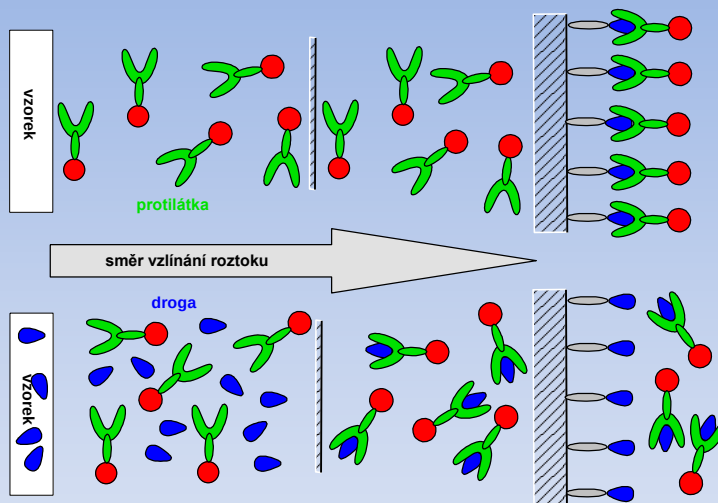
Kompetitivní ELISA: antigen ve vzorku a imobilizovaný antigen soutěží o vazebné místo protilátky, měří se pokles odezvy v porovnání s jamkou kde je pouze inhibovaný antigen

LFIA metoda

- Interakce cílové molekuly (**antigenu-např. drogy**) s odpovídající **protilátkou**
- vznik imunokomplexu - vyvolání měřitelného signálu nebo optické detekce
- Uživatelsky příjemný formát, široce rozšířen pro terénní detekci



LFIA (lateral flow immunoassay)



Specifita protilátek a křížové reakce uvnitř skupiny

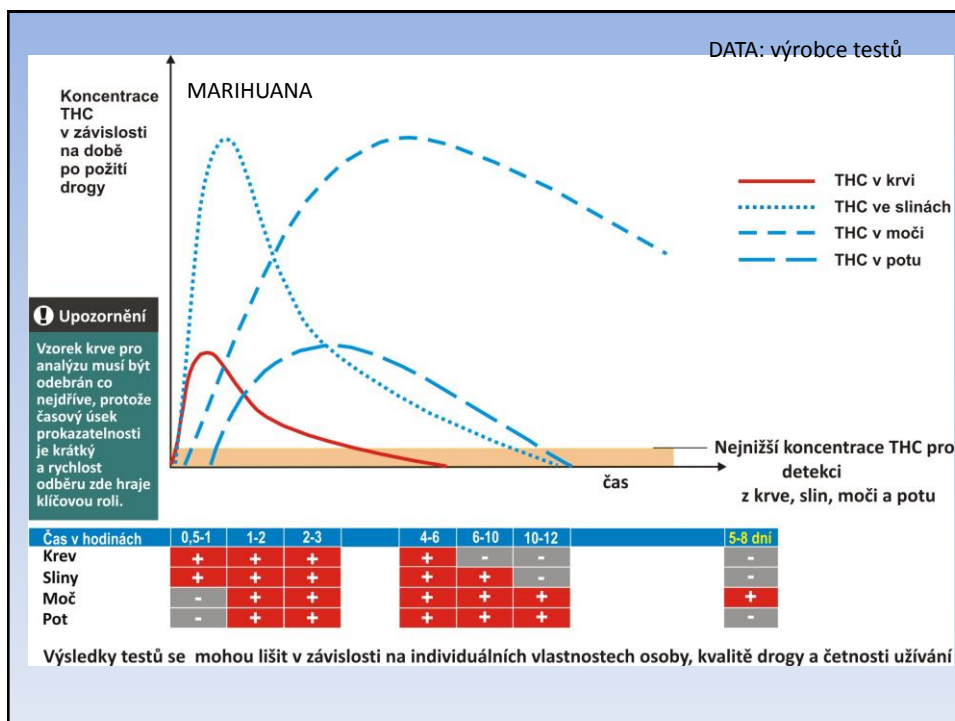
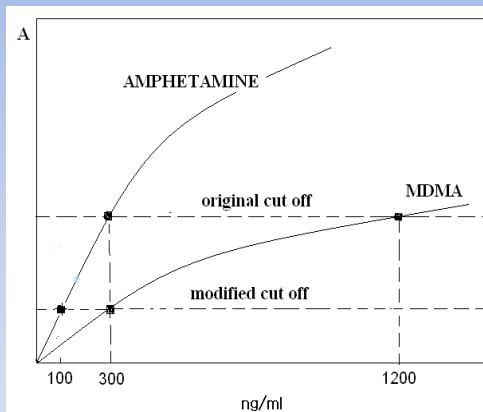
- 1) Odlišná reaktivita strukturně příbuzných drog ve zvolené skupině– např. nevyhovující citlivost pro detekci MDMA

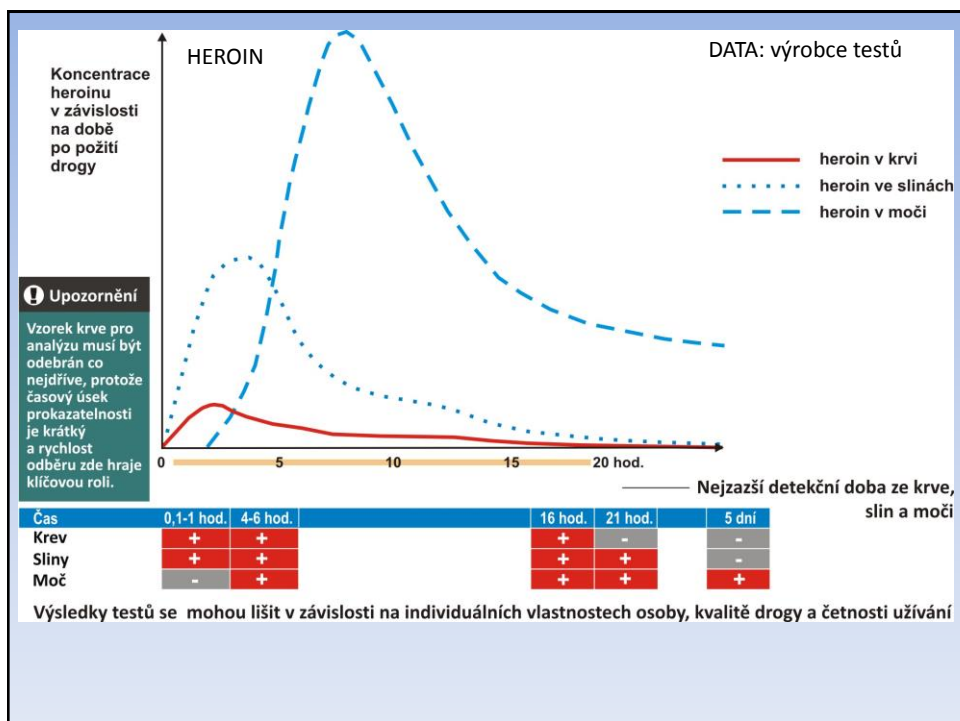
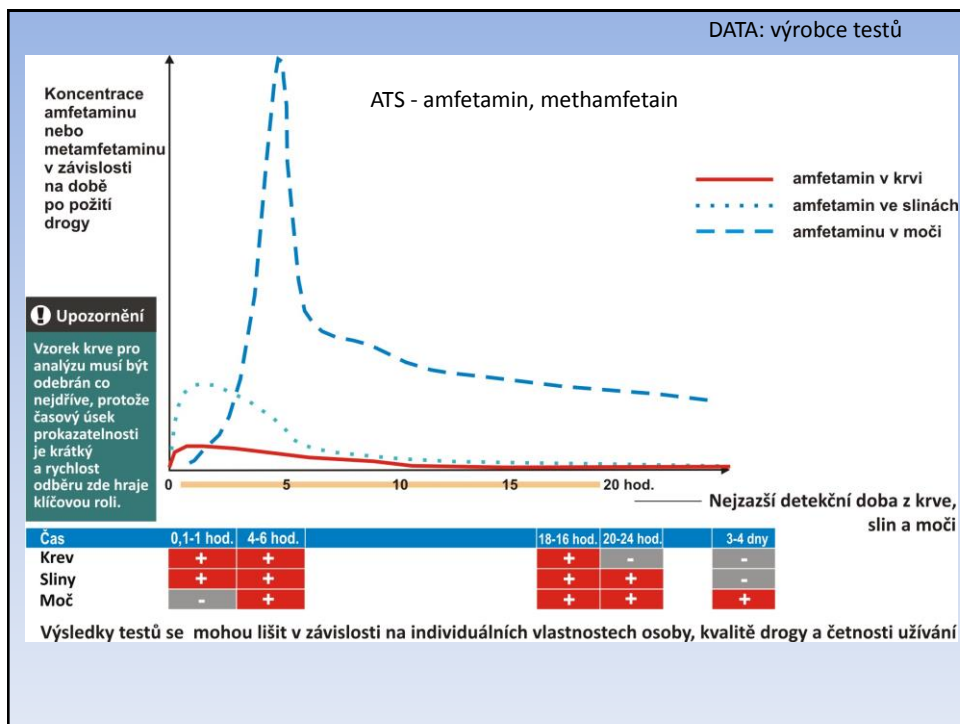
Modifikací cut off – také záchyt MDMA

Cut-off (level) - prahová množství

Prahové množství znamená nejnížší koncentraci (úroveň) drogy ve slinách a potu, které lze orientačním drogovým testem zjistit.

Parametr prahového množství je u každé drogy stanoven zvlášť.





Imunoanalýzy v toxikologii

Přednosti

- Technicky jednoduché
- Citlivé
- Rychlé
- Důležité vstupní informace o vzorku
- Vhodné pro terénní aplikace, tzv. on site testing

Nedostatky

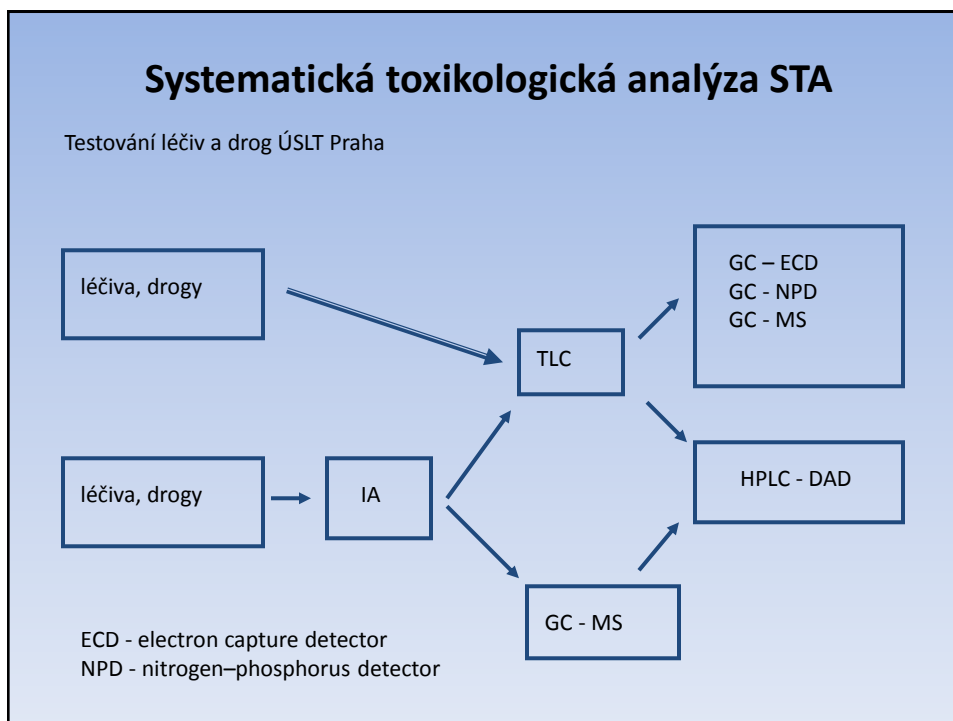
- Pouze cílená detekce vybraných skupin
- Potenciální interference, záleží na protilátkách
- Orientační výsledky
- Nutná confirmace
- Stálý přísun reagentů, ekonomická náročnost

Toxikologické laboratorní vyšetření

Testování léčiv a drog v biologickém materiálu

	krev, sérum	sliny	moč	vlasy
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

DETEKČNÍ OKÉNKO	
DROGA	PRŮMĚRNÁ DETEKČNÍ DOBA
ALKOHOL (pouze pro srovnání)	3 - 10 hodin
AMFETAMIN	1 - 2 dny
KOKAIN	více než 4 dny
HEROIN	1 - 2 dny
METAMFETAMIN - PERVITIN	1 - 2+ dny
EXTÁZE	1 - 2+ dny
MARIHUANA - METABOLITY	
• 1 joint	více než 2 týdny
• joint 3x týdně	3 - 4 týdny
• joint denně	4 - 6 týdnů
• silný a pravidelný uživatel	více než 4 týdny



Příklady směsných intoxikací z praxe

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, Sactal 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

DATA: M. Balíková

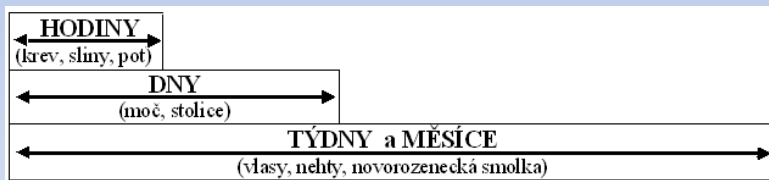
Volba vzorku

Tradiční materiály

- krev
- moč
- žaludeční obsah
- pitevní materiály

Alternativní materiály

- sliny
- pot
- mekonium (smolka)
- vlasy



Marie Balíková: Forenzní a klinická toxikologie, Galén 2007

VLASY

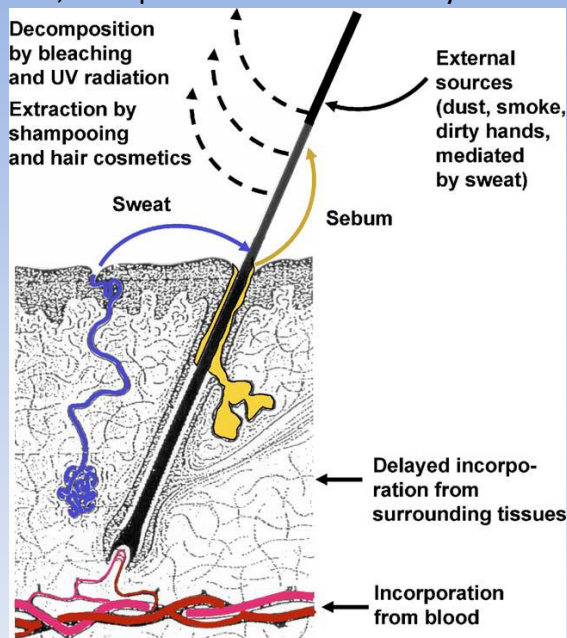
- Vlasy stabilní materiál
- Chronický abúzus drog v určitém časovém intervalu
- Patologické nálezy např. při pitvě
- Podezření na chronické otravy

- Komplexní mechanismus inkorporace drog do vlasů
- Stopové analýzy – GC-MS nebo LC-MS

- První analýzy tox ve vlasech – těžké kovy už dříve dostupnou metodou AAS
- 1979 – opiáty
- 1982 důkaz kokainu ve vlasech (USA)
- Nové citlivé a specifické metody GC-MS (LC-MS)

- Dnes – detekovat stále nižší kvanta (ng/mg až pg/mg)

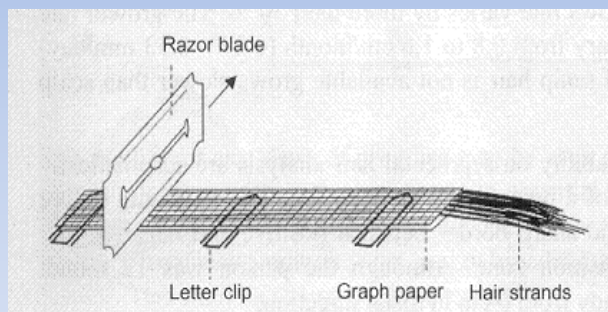
Struktura vlasu, inkorporace a eliminace analytu z vlasu



F. Pragst, M.A. Balikova: Clinica Chimica Acta 370 (2006) 17–49

Příprava vzorku pro sekvenční vlasovou analýzu

- Odstřížení vzorku z temene hlavy (průměr tužky)
- Odstranění kontaminantů – mytí vlasů
- Segmentace po 1 cm (odpovídá zhruba 1 měsíci růstu)
- Homogenizace a extrakce
- analýza



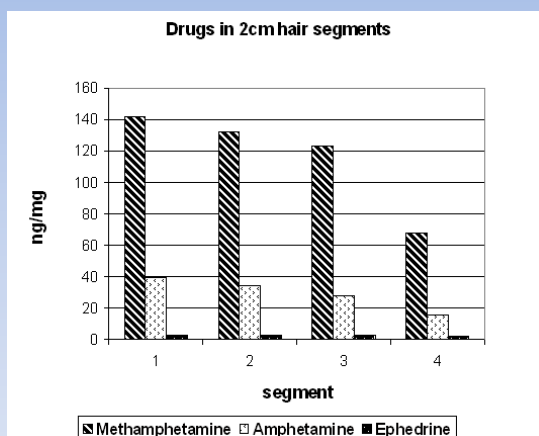
Marie Balíková: *Forenzní a klinická toxikologie*, Galén 2007

Methamfetamin ve vlasech

30 letý muž zemřel krátce po aplikaci drogy

Při pitvě zjištěny arterioskleróza a krvácení do malého mozku

Vlasová analýza potvrdila chronický abúzus MA min. cca 8 měsíců, vzrůstající trend

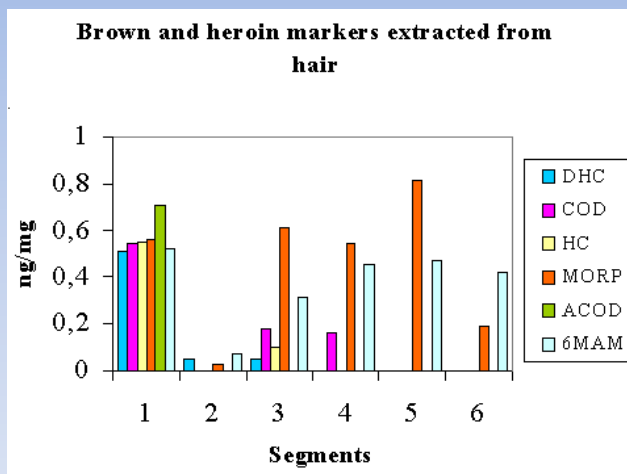


DATA: M. Balíková

Opiáty ve vlasech

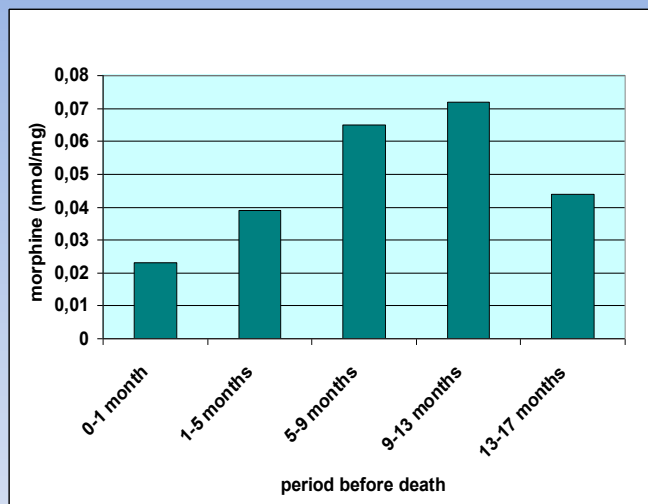
Fatální předávkování –
žena, 24 let

Prokázán chronický
abúzus spektra různých
opiatů během aspoň 6
měsíců



DATA: M. Balíková

33



M. Balíková: *Journal of Chromatography* 2003

SLINY

- Bohaté zásobení krví z krčních artérií
- transport drog z krve do slin
- podobné detekční okénko jako v krvi
- jednodušší neinvazivní odběr vzorku

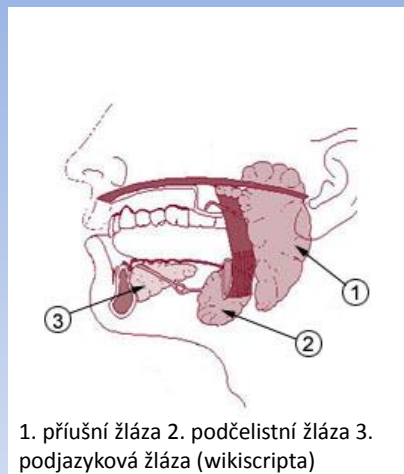
Složení:

99-98% voda, elektrolyty, proteiny (mucin),
enzymy (amyláza)

Klidová tvorba 0,5 ml/min

Po stimulaci 3-5 ml/min

pH 5,7 až 7- z krve snadno přechází báze (amfetaminy)



1. příušní žláza 2. podčelistní žláza 3. podjazyková žláza (wikiscrpta)

Transport drog z krve do slin

- Pasivní difuze (lipofilní molekuly, přednostně báze)
- Aktivní sekrece (elektrolyty)
- Ultrafiltrace (polární molekuly, cukry)

Dvojit faktory ovlivňující pasivní difuzi z krve do slin:

Sliny:

- rychlost toku
- vazba na proteiny slin
- výskyt enzymů

Droga:

- ionizovatelnost, pKa
- polarita
- konformace izomerů
- plazmatická volná frakce
- výše plazmatické hladiny

Marie Balíková: *Forezní a klinická toxikologie*, Galén 2007

Hladiny ve slinách jsou odrazem volného podílu v krvi

přibližně kopírují stejný časový průběh
(ale variabilita toku slin, variabilita pH a míry přestupu)
Šíře detekčního okna řádově podobná krvi
Parentní drogy > metabolity (pasivní difuze)
 $\text{pH slin} < \text{pH plazmy} = \text{usnadněn transport bází do slin}$
koncentrace bází-sliny > koncentrace bází-plazma

Praktické aspekty:

Odběr - volným tokem
- odsátím vakuem
- adsorpcí na vatový tampon

Problémy v praxi:

Nedostatečný a nestálý objem vzorku od různých osob
Suchá ústa - nemožnost odběru vzorku
Viskozita slinných vzorků, zbytky potravy, vlivy bakterií
Kontaminace ústní dutiny – pasivní kouření, pasivní expozice

Po odběru je nutno registrovat:

dobu a způsob odběru, pH a objem získaného vzorku, případná konzervace

Marie Balíková: Forenzní a klinická toxikologie, Galén 2007

MEKONIUM

Mekonium – novorozenecká smolka – první stolice novorozence.

Tvorba od cca 12 týdne těhotenství

Mekonium – střevní obsah plodu. Tvorba postupně ve vrstvách ze spolýkané plodové vody a ze sekretu žluče do střev

Složení: voda, mukopolysacharidy, lipidy, proteiny, enzymy žlučové kyseliny, sole.

Hodnota pH mekonie lehce kyselá (pH 6,8) – hromadění bází

Medicinské využití analýz: neonatologie. Zjišťování abuzu drog v průběhu těhotenství – transfer drog do embrya placentární bariérou

Široké časové detekční okno: Akumulace drog v těhotenství - srovn. krátkodobá detekce v moči dítěte i matky

Sběr mekonie: z plenky dítěte – neinvazivní, 1-5 dní po porodu

Droga s vazbou na plazmatické bílkoviny a ionizovaná v krvi matky (nízká pK_a) – jen malý díl k dispozici pro pasivní difuzi Báze o vyšší hodnotě pK_a – báze- přechází snadno z krve matky do kyslejšího prostředí v krvi plodu – depo v mekoniu

Marie Balíková: Forenzní a klinická toxikologie, Galén 2007

Co si pamatovat z dnešní přednášky

- Metody terénního testování vzorků (IR, Raman, color test)
- Základní znalost principů GC-MS, LC-MS, IR a Ramanovy spektrometrie
- Princip imunoanalýzy (používané metody, ELISA, LFIA, cut-off level)
- Materiál pro toxikologickou analýzu (moč, krev, netradiční - vlasy, mekonium)