

# **Toxikologická analýza v moči – drogy, léky a jejich metabolity**

Viktor Voříšek

Ústav klinické biochemie a  
diagnostiky LF UK a FN v Hradci  
Králové

---

## **Problematika klinické toxikologie**

- Diferenciální diagnostika bezvědomí neznámé etiologie
- Konfirmace diagnózy
- Monitoring vývoje intoxikace
- Odhalení abusu
- Zjištění nadužívání preskribovaného lč

# Toxikologické rozdělení nox-skupiny

- chemikálie v zemědělství ( herbicidy)
- **léčivé přípravky ( zejména HVLP vč drog )**
- potravinářská aditiva ( konzervancia )
- průmyslové substance ( rozpouštědla, mazadla, meziprodukty chem. výrob aj.)
- přírodní jedy rostlinného i živočišného původu ( fytotoxiny, mykotoxiny, anorganické látky-minerály)
- spalné produkty ( pohonných hmot např.)

---

## Kvalitativní analýza

- systematické hledání neznámé noxy
- rozlišení mezi skutečnou či zdánlivou intoxikací
- neznámá anamnéza
- nejasný klinický obraz stavu
- toxické projevy indikující celou skupinu ( betablokátory, diuretika, laxativa)
- kombinované otravy ( alkohol + léčiva )

# Kvantitativní analýza

- strategie detoxikace a léčby otravy ( antidota, např. paracetamol v. acetylcystein)
- monitoring úspěšnosti detoxikace
- stanovení prognózy otravy (paraquat)
- rozlišení mezi toxickou a terapeutickou dávkou
- kombinovaná otrava ( př. ethanol + methanol)
- toxikokinetické kalkulace
- toxikologický monitoring (expoze těžkými kovy)

---

## MOČ-oblíbená tělní tekutina analytického toxikologa

- prolongace výskytu noxy a jejich metabolitů oproti krvi
- poměry metabolitů II.biotransformační fáze k volným formám
- kvantita v moči v komparaci ke kvantitativní analýze v krvi

# Odběr vzorků a jeho vliv na bioanalýzu xenobiotik

- **Krev, resp. serum (plazma)** vypovídá o aktuálním stavu vyšetřovaného, klinický význam, analyticky problematické s ohledem na LOD, LOQ
  - **Moč:** obsahuje původní látky a jejich metabolity několik dní až týdnů po jednorázovém požití drogy, klinický i forenzní význam, analyticky dobře řešitelný problém
  - **Žaludeční obsah:** prognóza otravy
  - **Sliny:** pro nelaboratorní složky, diskutabilní
  - **Pot:** aktuální stav
  - **Vlasy:** obsahují původní látky a jejich metabolity až 3 měsíce po jednorázovém abusu
- 

## MOČ-neoblíbená matrice analytického toxikologa

- biochemické složení moči má několik negativních dopadů na analytický výsledek
- interference řady látek na úrovni – detekční, separační, hrozí devastace určitých částí instrumentu při nedodržení správné laboratorní praxe při přípravě analytického vzorku

# ODBĚRY MOČE

- alterace primárního vzorku ze strany testované osoby
- velikost objemu dle analytické techniky
- jednorázová moč
- opakované odběry při odhalování abusu

---

## Zbarvení moče

- **červený/růžový** odstín:  
ampicilin, anilin, borůvky, ibuprofen, Pb, Hg, Fe  
nytoin, chinin, rifampicin
- **oranžový**: warfarin, rifampicin, paprika
- **hnědý**: nitrofurantoin

# INSTRUMENTÁLNÍ IMUNOCHEMICKÉ METODY V ANALYTICKÉ TOXIKOLOGII

- RIA
- **ENZYME MULTIPLIED IMMUNOASSAY TECHNIQUE (EMIT)**
- **FLUORESCENCE POLARIZATION IMMUNOASSAY (FPIA)**
- KINETIC INTERACTION OF MICROPARTICLES IN SOLUTION (**KIMS**)
- **CLONED ENZYME DONOR IMMUNOASSAY (CEDIA)**
- ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (**ELISA**)





## RYCHLÁ IA – on site devices

- pro extralaboratorní terén
- policie
- riziková pracoviště
- školy
- nutnost confirmace v laboratoři
- v laboratoři NEJSOU NA MÍSTĚ

# Trendy

Pro extralaboratorní terén  
kapesní reflektometry

- **RapiScan** - Cozart
- **ORALSCREEN hand-held Analyzer** – Avitar
  - ENVITEC ( pot)
  - UltiMed

pro laboratoře

**EIA, ELISA mikrotitrační destičky,  
mikročipy**

---

## IMUNOANALÝZA – TROCHA HISTORIE

- EMIT, využití pro detekci THC poprvé publikována NIDA ( Maryland, USA, Ed. R.E.Villette) v roce 1976
- K. E. Rubenstein *et al.* , Homogeneous enzyme immunoassay. A new immunochemical technique, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1972, 47, 846–851. ([PubMed](#)) první publikace



# FPIA

- W. B. Dandliker *et al.* , Fluorescence polarisation immunoassay. Theory and experimental method, *Immunochemistry*, 1973, 10, 219–227.

---

## VÝHODY IMUNOANALÝZY

- RYCHLOST přímá analýza v primárním vzorku bez potřeby jeho složitější předchozí úpravy
- MOŽNOST PLNÉ AUTOMATIZACE  
není třeba analytického toxikologa k vlastnímu měření = možnost implementace metodik do celkového spektra např. biochemických metod
- PŘIBLÍŽENÍ EXTRALABORATORNÍMU TERÉNU
- VYSOKÁ CITLIVOST

# NEVÝHODY IMUNOANALÝZY

- OMEZENÝ ANALYTICKÝ ZÁBĚR-DNES  
POTŘEBA IDENTIFIKOVAT MINIM.300  
PARENTNÍCH NOX + METABOLITY,  
CELKEM 900
- NIŽŠÍ SPECIFITA
- INTERFERENCE XENOGENNÍCH LÁTEK  
STRUKTURNĚ PŘÍBUZNÝCH ( NĚKDY  
VÝHODA)

---

## **Málo uváděné nevýhody imunochemických metod v toxikologické analýze**

- finanční náročnost
- Nelineární nebo semilog kalibrace

# PROFIL TOXI IA I.

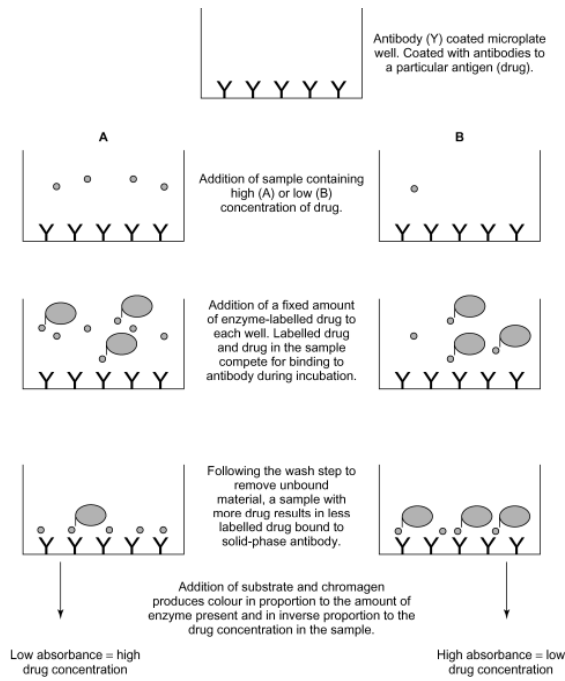
- BARBITURÁTY
- BENZODIAZEPINY
- TCA
- SALICYLÁTY
- PARACETAMOL
- OPIÁTY
- 6-MAM
- BUPRENORFIN
- LSD

---

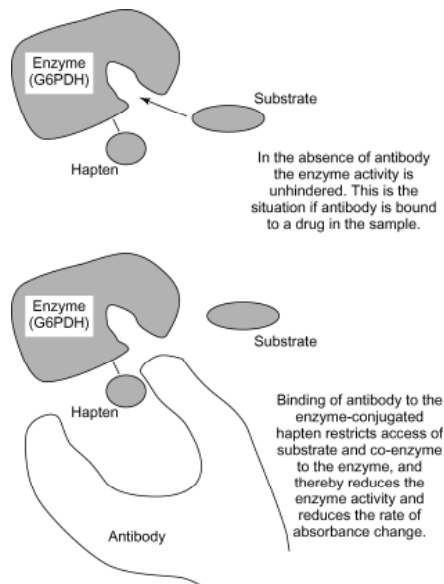
# PROFIL TOXI IA II

- AMFETAMINY
- MDMA
- THC
- Met KOKAINU
- METHADON
- + TDM PROFIL ( DIGOXIN, AMIKACIN, VANKOMYCIN, CyA, Tacro, Siro, Evero?, MTX, AEP : VALPROÁT, FENOBARBITAL, KARBAMAZEPIN, FENYTOIN

# HETEROGENNÍ IA



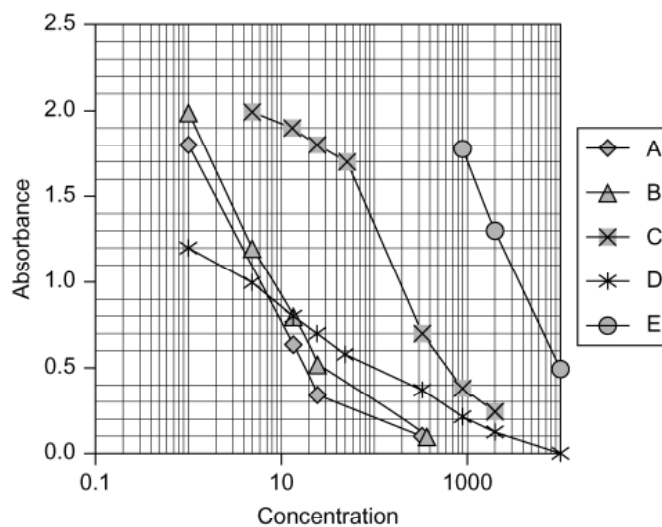
# EMIT Princip



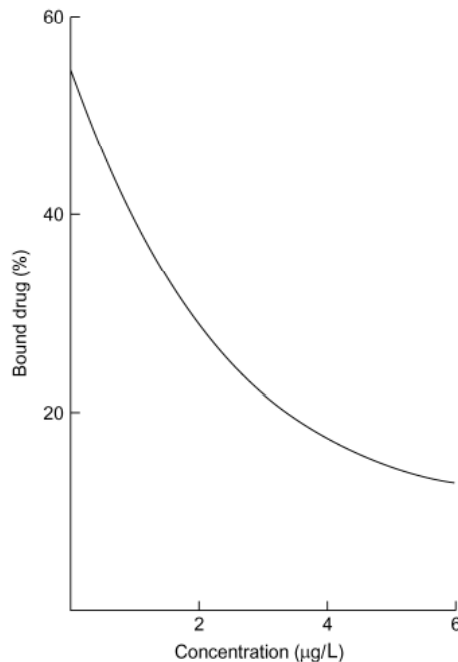
# ZKŘÍŽENÁ REAKCE-VÝHODA I OMEZENÍ

$$\text{Cross reactivity (\%)} = \frac{100 \mu\text{g/L apparent morphine}}{1000 \mu\text{g/L added codeine}} \times 100 = 10 \%$$

## Zkřížená reakce



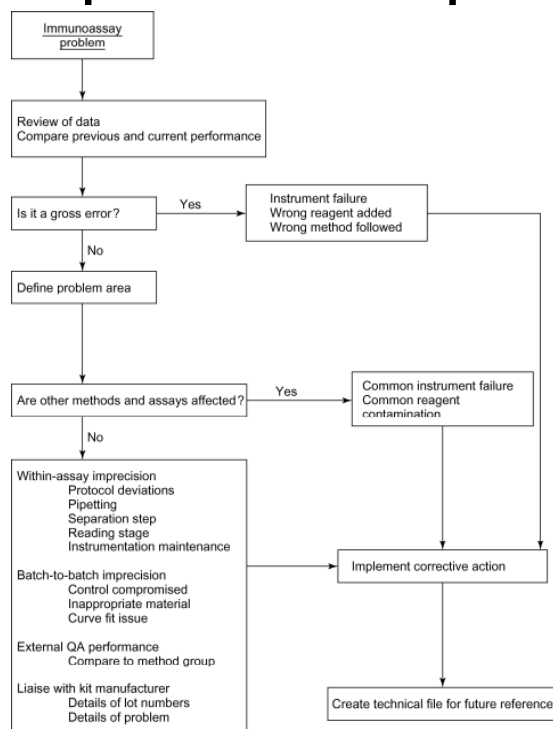
# KALIBRACE IA



## IA-DOBŘÍ NÁSTROJ PRO RYCHLOU ORIENTACI V MONITORINGU ELIMINACE URČITÉ NOXY

- IA v toxikologii maximálně semikvantita dle % cross react
- **AVŠAK** lze použít v monitorování detoxikace, profil poměrů krev/moč
- Př.: otrava diazepamem může být bez problému pomocí S-Benzo sledována

# IMUNOANALÝZA- specifický přístup k řešení problémů

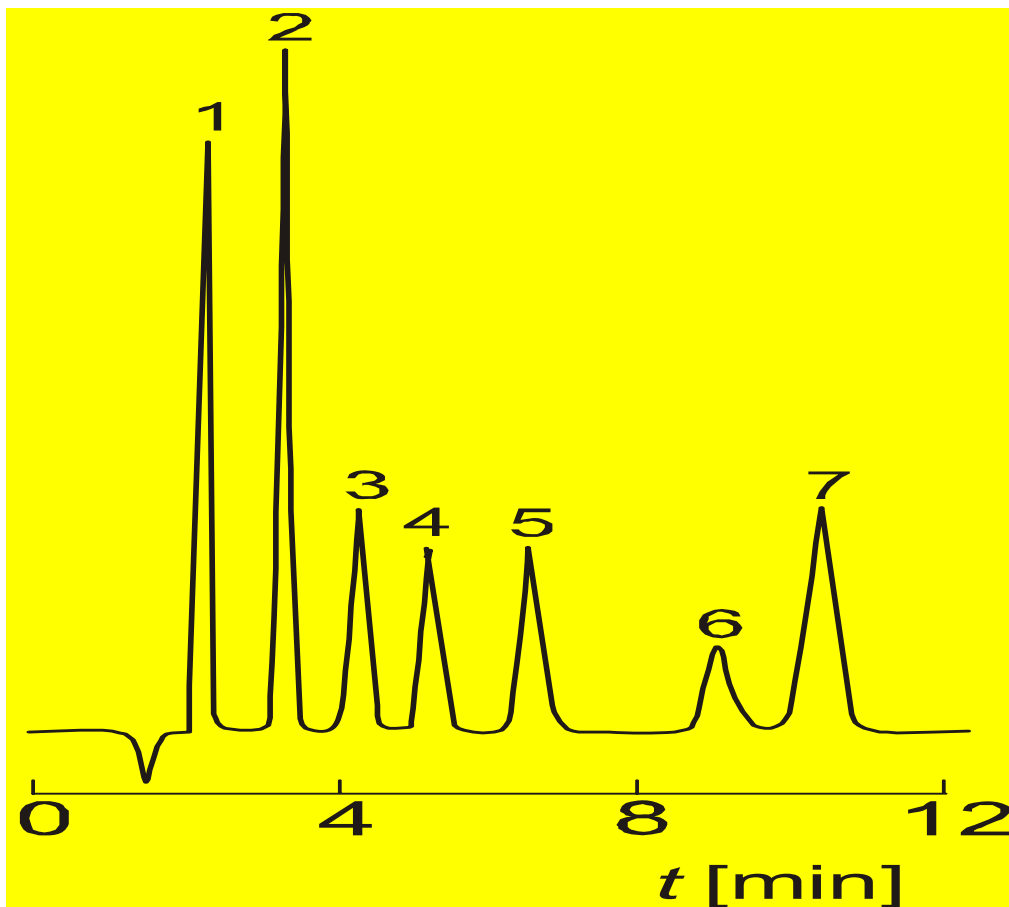


## IMUNOANALÝZA-SOUHRN

- **měla, má a bude mít své nezastupitelné místo v toxikologické bioanalýze**
- **v laboratoři jako součást integrálního detekčního systému STA**
- **v extralaboratorním terénu jako rychlé imunoprecipitační orientační testy s nutností laboratorní confirmace**

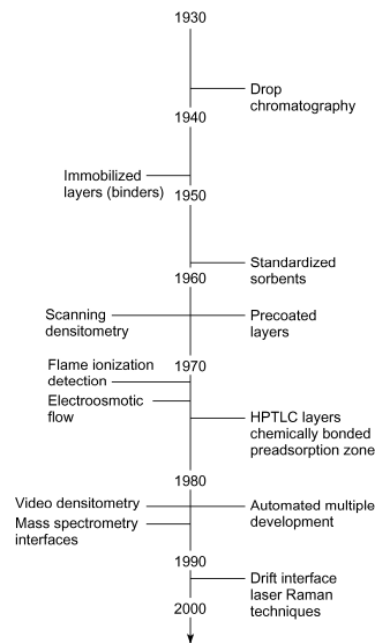
# ROZDĚLENÍ METODIK DLE ANALYTICKÉHO CÍLE

- SPECIÁLNÍ
- TLC
- HPLC
- GC-FID
- GC-MS
- LC-MS
- PLNÉ AUTOMATY
- EMIT
- FPIA
- CEDIA
- ELISA
- HPLC TOX.I.S. (dříve REMEDI)
- LC-MS Cliquid ( MS nadstavba TOX.I.S.)

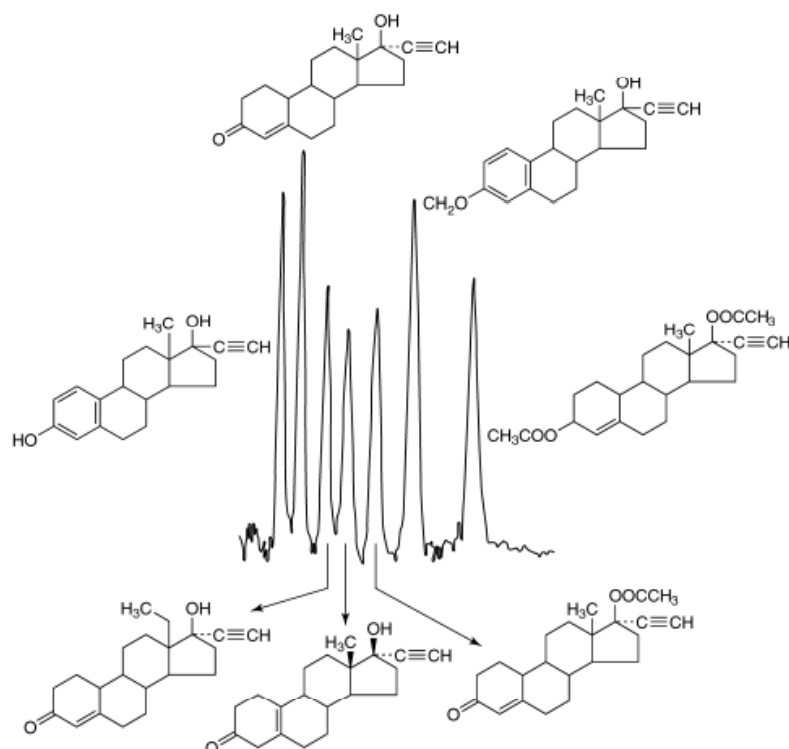




# EVOLUCE TLC V ANALYTICE



## HPTLC



***Prominence TOX.I.S.***  
**HPLC/PDA for identification of drugs in  
human urine-stav na ÚKBD FN HK**

- **Vývoj vhodné akvizice:** kombinace toxikologicky závažných aktuálně se vyskytujících léčiv: alprazolam, zolpidem, karbamazepin, levomepromazin, trazodon aj.
- **Ilegální návykové látky:** v případě úspěchu postavení výše uvedené akvizice, budou o službě detekovány pouze imunochemicky a identifikace statim výše uvedených lč

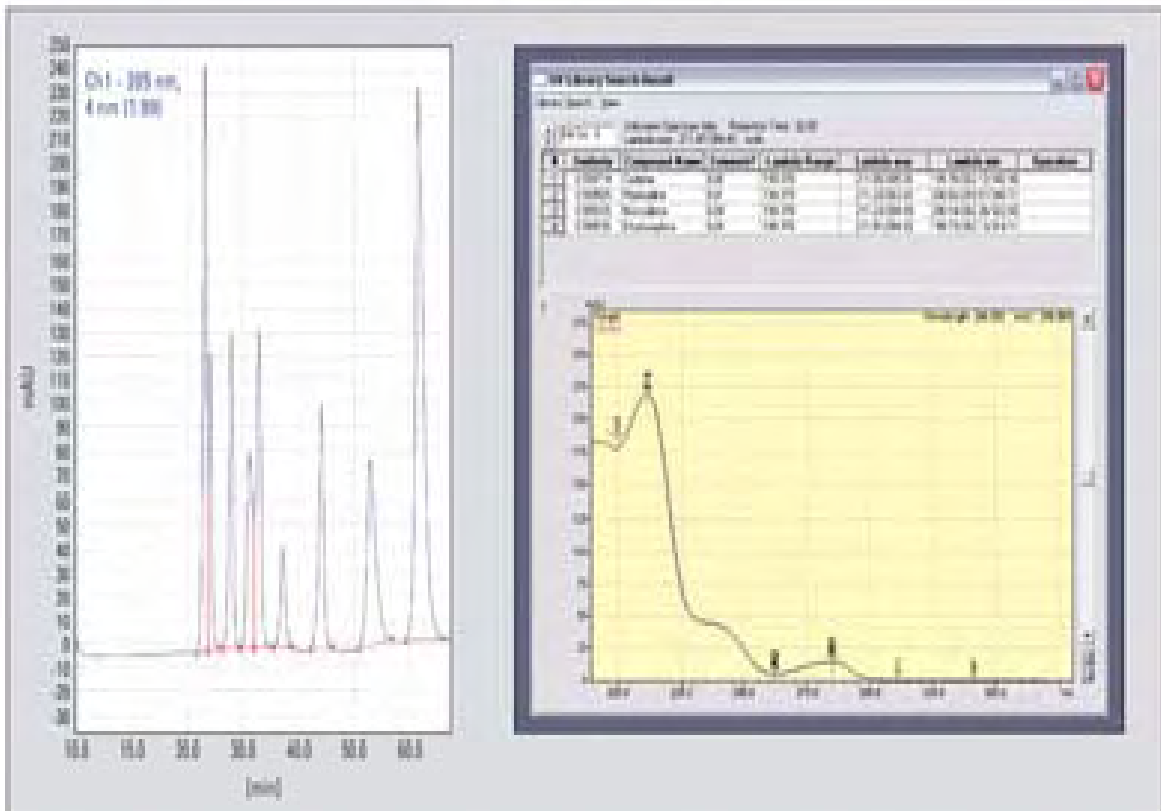
---

## RECIPE®

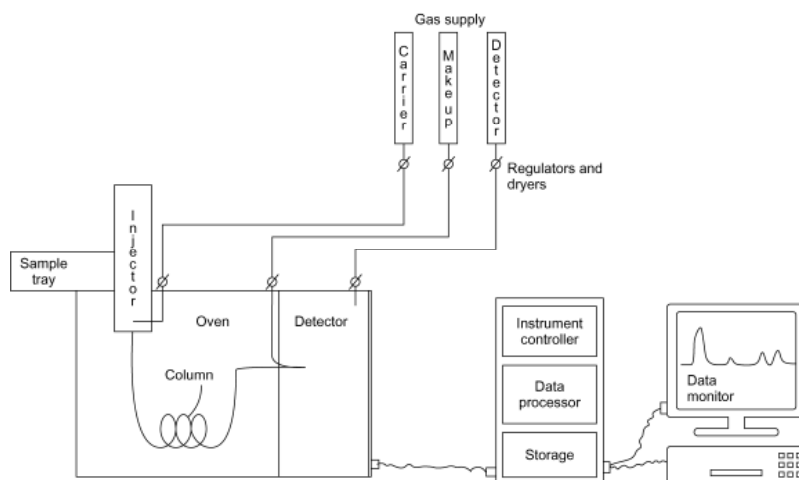
**Drogen im Urin - On-line  
Analytik mit TOX.I.S.™  
náhrada REMEDI DPS a UBZ**

**Dieser ClinRep® Reagenzienkit ist für  
die Anwendung auf dem TOX.I.S.™  
System von Shimadzu konzipiert,  
einem HPLC-System, welches für das  
Drogen-Screening**

# TOX I.S.



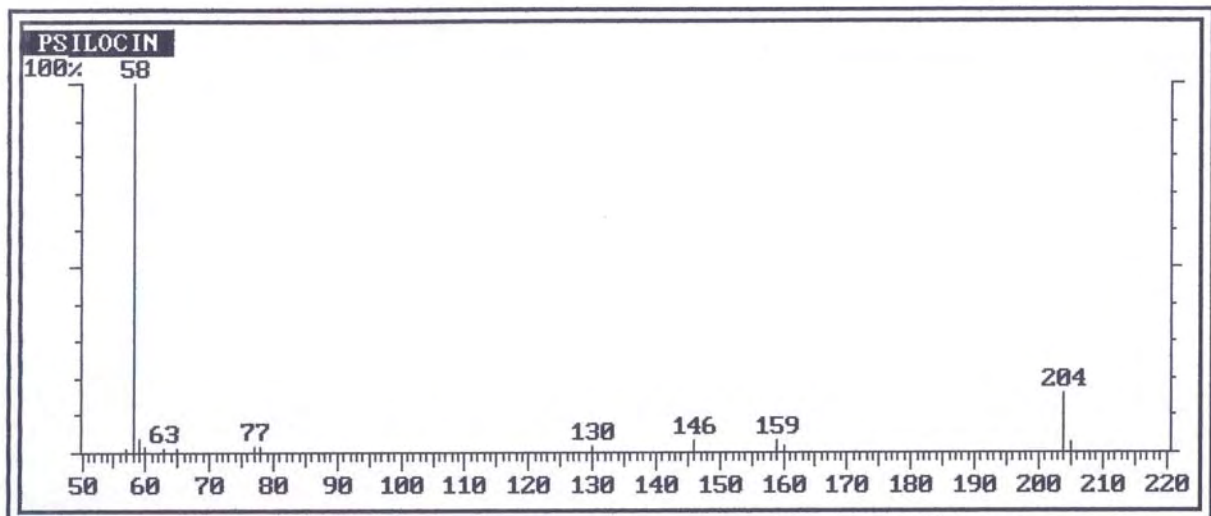
# GC-MS



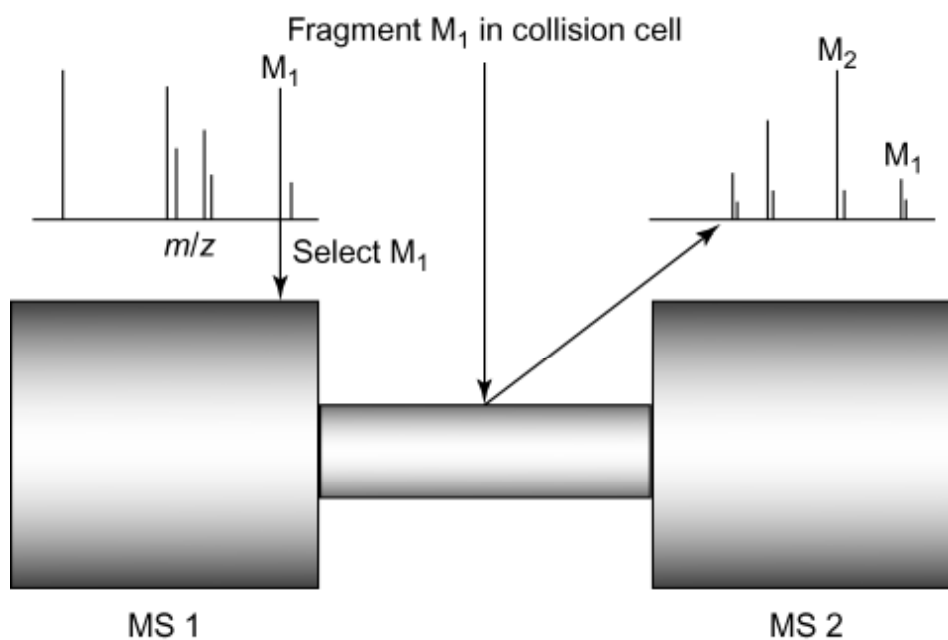
## GC-MS V ANALYTICKÉ TOXIKOLOGII

- STÁLE ZLATÝ STANDARD
- EXTRAKCE
- PŘÍPADNÁ DERIVATIZACE
- SCREENING
- IDENTIFIKACE
- KONFIRMACE

## GC-MS spektrum psilocinu



## LC-MS-MS





## IONIZACE ZA ATMOSFERICKÉHO TLAKU

- nejčastěji používané rozhraní pro spojení LC(HPLC)-MS konfigurace
- kombinace termální a pneumatické desolvatace
- limitace průtoku mobilní fáze nL/min- mL/min
- ESI
- APCI

# ESI-ElectroSpray Ionization

- Princip: analyzovaný vzorek je rozprašován do oblasti s vysokým potenciálovým spádem ( rozdílem). Potenciál tvoří sestava dvou elektrod: tryska ESI + vstupní elda MS optiky
- Výhody: výborná pro polární, iontové nebo basické sloučeniny – všechny, které nesou výrazný náboj, excelentní pro biopolymery

---

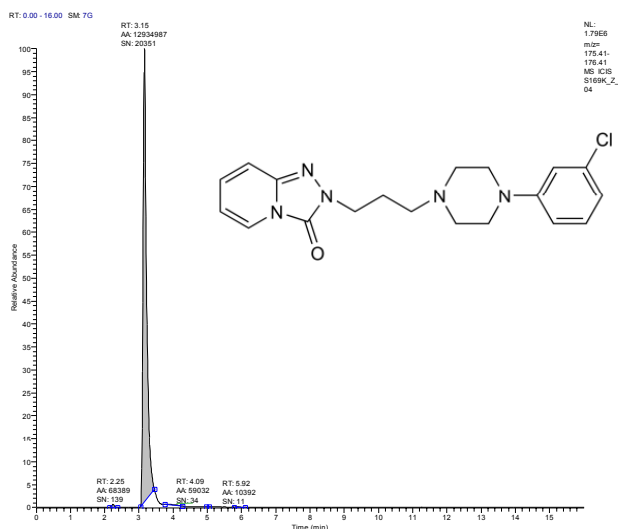
## APCI-Atmospheric Pressure Chemical Ionization

- Princip: Ionizace v plynné fázi v oblasti vysokého pole koronového výboje
- Výhody: výborná pro méně polární analyty
- Nevýhoda: nelze analyzovat nad 2000 Da

# Trazodon

2-[3-[4-(3-Chlorophenyl)-1-piperaziny]propyl]-1,2,4-triazolo[4,3-a]-pyridin-3(2H)-on

KOLONA: ASCENTIS-RP-AMIDE, SUPELCO, 50 x 4.6. mm,3  
µm



## MATRICE (MATRIX) MOČI

- voda
- endogenní interferenty nízkomolekulární
- endogenní interferenty vysokomolekulární
- exogenní interferující látky ( konkurence mezi analyty na úrovni ZI), soli – **suprese iontů**
- částice sedimentu



# HYDROLÝZA KONJUGOVANÝCH METABOLITŮ

Získ volných forem z důvodů:



◇ získ zplynitelných forem pro GC

◇ nedostupnost kalibrantů  
konjugátů

◇ nízké koncentrace ( dle IA  
screeningu)

Chemická ( kyselá n. bazická )

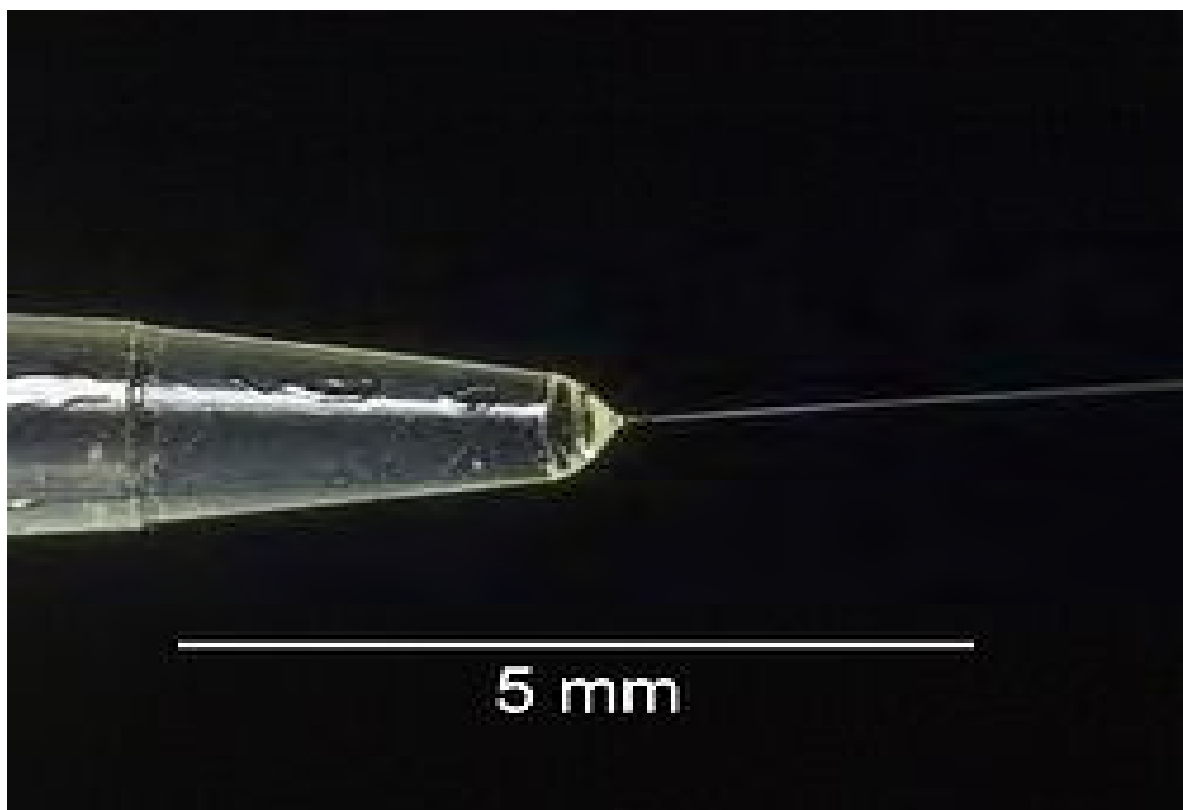
**Enzymatická** – vhodnější (  
degradace 6-MAM po kyselé  
hydrolýze )



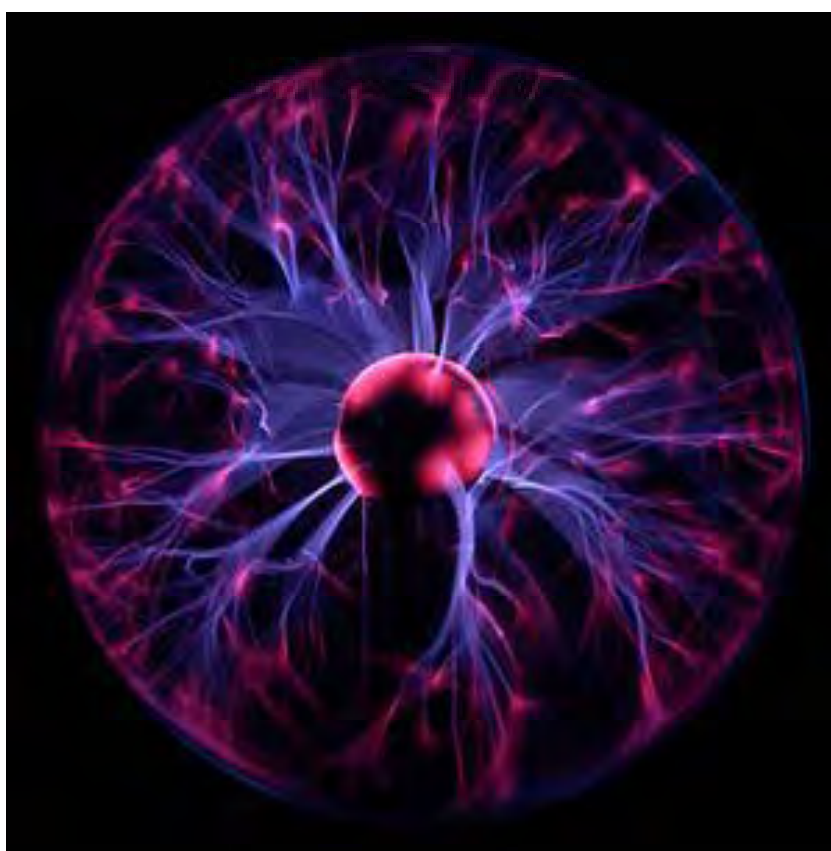
## ŘEDĚNÍ V PŘÍPADĚ LC-MS

Možnost přímého nástřiku  
za předpokladu, že:

- Očekávaná koncentrace  
analytu > LOD
- Vodou n. MF
- **nebezpečí kontaminace  
vnitřní optiky**



Photograph of a meniscus of polyvinyl alcohol in aqueous solution showing a fibre drawn from a Taylor cone by the process of electrospinning

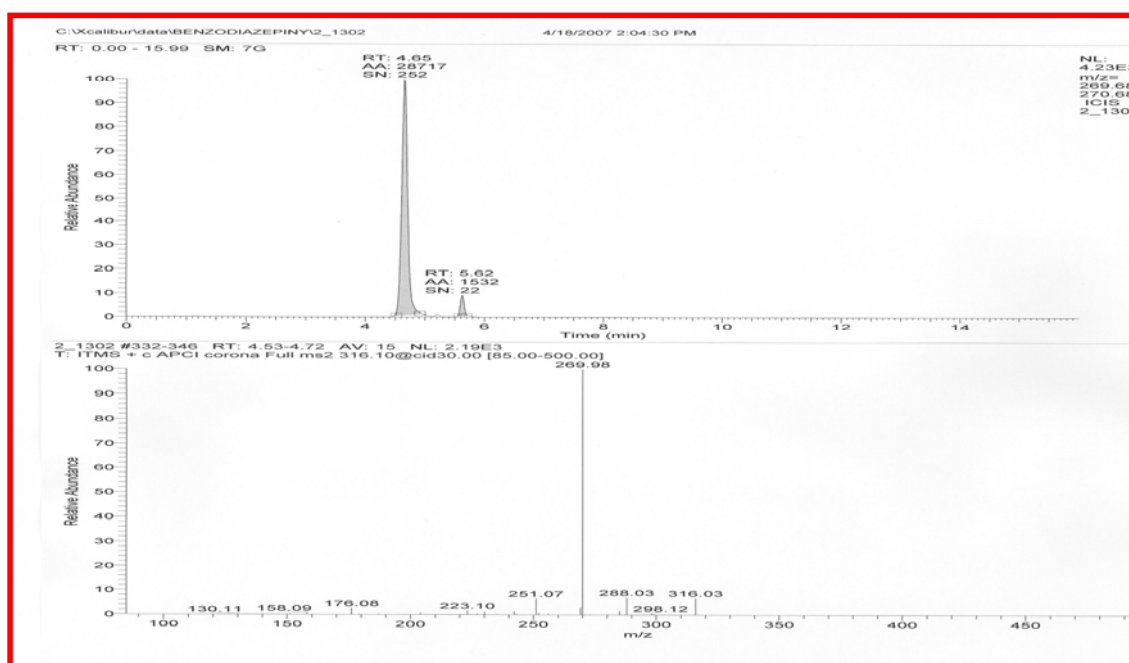


APCI perspektivní ZI s ohledem na vzorky moči

# Porovnání doby přípravy anal.vz. ve screeningu GC/ITD v. LC/LIT

<i><b>KROK</b></i>	<i><b>GC/ITD</b></i>	<i><b>LC/LIT</b></i>
<b>centrifugace</b>	<b>5</b>	<b>5</b>
<b>LL extrakce</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
<b>supernatant</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>Odpařování pod N<sub>2</sub></b>	<b>5</b>	<b>5</b>
<b>derivatizace</b>	<b>30</b>	<b>0</b>
<b>rekonstituce</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>finální filtrace</b>	<b>0</b>	<b>5</b>
<i><b>celková doba</b></i>	<i><b>52</b></i>	<i><b>27</b></i>

## Příklad 2/vzorek 2\_1302 MS<sup>2</sup> klonazepam v plném skenu/+APCI



## Pozitivní forensní případy záchytu drog a léčiv v dopravě 2008

