

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Příprava biologického materiálu před vyšetřením na přítomnost benzodiazepinů.

Hradec Králové 2007

Petra Růžičková

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v seznamu použité literatury.

.....

Podpis

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Poznámka: Zpravidla se místo těchto dvou stránek vkládá okopírovaný originál. Zde jsou umístěny pouze pro správné počítání stránek.

Děkuji RNDr.Miluši Herrmannové za připomínky a cenné rady,
PharmDr.Petře Kovaříkové. Ph.D. za mimořádnou trpělivost a odbornou
pomoc a mým kolegyním na pracovišti za pochopení při vypracování mé
bakalářské práce.

Obsah

1. Úvod.....	9
2. Cíl práce.....	10
3. Benzodiazepiny.....	11
3.1 Základní charakteristika nejčastěji prokazovaných derivátů diazepamů.....	13
3.2 Osud léčiva v organismu.....	20
3.3 Biotransformace vybraných benzodiazepinů.....	21
4. Biologický materiál.....	25
5. Úprava biologického materiálu.....	29
5.1 Terapeutické monitorování léčiv.....	29
5.1.1 Naředění biologického materiálu.....	29
5.1.2 Deproteinace biologického materiálu pro potřeby TDM.....	30
5.1.3 Membránové separační metody.....	31
5.1.4 Extrakční metody pro účely TDM.....	31
5.1.5 Uvolnění konjugovaných složek.....	39
5.2 Klinická praxe.....	40
5.2.1 Orientační stanovení benzodiazepinů.....	40
5.2.2 Záchytové orientační imunometody.....	40

5.2.3 Deproteinace.....	40
5.2.4 Extrakce kapalinou.....	41
5.2.5 Kyselá hydrolyzy pro průkaz benzodiazepinů.....	42
5.2.6 Extrakční techniky před instrumentací Gc a HPLC.....	43
5.3 Forezní praxe.....	45
5.3.1 Extrakce benzodiazepinů z orgánů.....	45
5.3.2 Extrakce benzodiazepinů z vlasů.....	47
6. Shrnutí a závěr.....	48
7. Použitá literatura	49

Seznam obrázků

Obrázek 1.	Vzorec benzodiazepinu.....	11
Obrázek 2.	Vzorec diazepamu.....	14
Obrázek 3.	Vzorec alprazolamu	15
Obrázek 4.	Vzorec nitrazepamu.....	17
Obrázek 5.	Vzorec bromazepamu.....	18
Obrázek 6.	Vzorec clonazepamu.....	19
Obrázek 7.	Vzorec 1,3 dihydro-1,4- benzodiazepin-2-onu.....	21
Obrázek 8.	Skleněné dělicí nálevky	33
Obrázek 9.	Schema konvenční a membránové SPE.....	35
Obrázek 10.	Extrakční disk..	36
Obrázek 11.	Špičky automatických pipet naplněné sorbetem.....	37
Obrázek 12.	Schéma On-line SPE.....	38
Obrázek 13.	Homogenizátor dle Pottera a Elvehjema.....	46

Seznam tabulek

Tabulka 1. Nejběžněji prokazované benzodiazepiny.....	12
Tabulka 2. Hromadně vyráběné léčivé přípravky diazepamů.....	14
Tabulka 3. Hromadně vyráběné léčivé přípravky alprazolamu.....	15
Tabulka 4. Hromadně vyráběné léčivé přípravky nitrazepamů.....	17
Tabulka 5. Hromadně vyráběné léčivé přípravky bromazepamů....	18
Tabulka 6. Hromadně vyráběné léčivé přípravky klonazepamů....	19

1. Úvod

V druhé polovině dvacátého století nastal v oblasti farmaceutických věd nebyvalý rozvoj. Zdokonalování výzkumu a nových technologií způsobily, že současná farmakoterapie má k dispozici velké množství hromadně vyráběných léčivých přípravků. Benzodiazepiny ve farmacii zaznamenáváme v 70. letech minulého století. V medicíně patří mezi nejpoužívanější psychofarmaka, pokrývající značný počet prokazovaných léčiv v rámci terapie. Bohužel, na jejich příkladu je možné ukázat, že látka s takovou celospolečenskou závažností jako je léčivo, může v mnohých případech ztratit svoji základní funkci léčit. Benzodiazepiny patří dle statistik mezi nejčastěji zneužívané drogy, ať už jako drogy hlavní, nebo vedlejší, doplňková, většinou zneužívaná k pervitinu, heroinu a subutexu.

S problematikou prokazování benzodiazepinových derivátů se můžeme setkat v mnoha úrovních systému zdravotnictví, ať již jako lékař či sestra u lůžka pacienta při intoxikacích, při kontrole terapie na psychiatrických odděleních, v laboratořích provádějících terapeutické monitorování léčiv v laboratořích klinické biochemie, toxikologie, pracovního a soudního lékařství, které zabezpečují identifikaci cizorodých látek v biologickém materiálu.

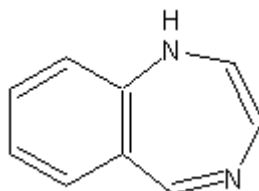
2. Cíl práce

Cílem mé bakalářské práce bylo shrnout v praxi nejčastěji používané metody úpravy biologického materiálu před stanovením benzodiazepinů a také moderní metodické přístupy, které jsou pro laboratorní praxi nové. V první části se práce věnuje problematice noxy, tedy benzodiazepinovým derivátům, jejich biotransformaci a přítomnosti v různých biologických materiálech. Druhá část je zaměřena na metody úpravy biologického materiálu využívané v rámci terapeutického monitorování léčiv, v biochemických a toxikologických laboratořích, jakož i metody používané ve forenzní toxikologii.

3. Benzodiazepiny

Benzodiazepiny jsou skupinou látek používaných hlavně jako anxiolytika, hypnotika, sedativa, myorelaxancia a antiepileptika. Podporují účinek kyseliny gamma-aminomáselné¹ (GABA), která je hlavním inhibítozem neurotransmiterů. Tyto inhibiční účinky jsou zprostředkovány specifickými benzodiazepinovými receptory v komplexu GABA, receptor a kanál pro chloridové ionty. GABA otvírá chloridové kanály v membránách a oslabuje tím reakci na depolarizující podněty. V důsledku tohoto děje klesá dráždivost neuronu.²

Základní strukturu celé skupiny benzodiazepinů tvoří benzodiazepin, chemický název 1*H*-benzo-1,4-diazepin, bicyklická sloučenina obsahující ve své struktuře benzenové jádro a sedmičlenný heterocyklus se dvěma atomy dusíku (viz obr.1).³



Obrázek 1.

Tato sloučenina slouží jako výchozí struktura pro odvození dalších derivátů používaných v léčebné praxi. K těmto látkám patří například diazepam, oxazepam, chlordiazepoxid, nitrazepam, bromazepam, triazolam i flunitrazepam, který je spolu s midazolamem, temazepamem, lorazepamem a alprazolamem považován za jeden z nejnávykovějších benzodiazepinů.

Pro zachování aktivity jednotlivých derivátů je důležitá přítomnost základního skeletu, který je v poloze 5 substituován fenylem. Dále účinek

ovlivňuje substituce v poloze 7, zejména halogenidy (anxiolytický účinek) a nitroskupinou (hypnotický účinek). Pro ovlivnění kvantitativních účinků je vhodná substituce v poloze 1,2,3 a 4, například připojením triazolového kruhu v polohách 1 a 2 (alprazolam).⁴

Benzodiazepiny mají velkou terapeutickou šíři a nelze se tedy jimi tak snadno předávkovat. Velmi nebezpečné jsou však kombinace s jinými tlumivými látkami, včetně alkoholu, kdy může dojít k útlumu dechu a následné smrti. Dalším rizikem je snadný vznik psychické a somatické závislosti. Stav po předávkování benzodiazepiny lze vyřešit pomocí specifického antidota. Tato látka (flumazenil) působí jako antagonist benzodiazepinů. Má sice afinitu k benzodiazepinovým receptorům, ale chybí mu vnitřní aktivita.²

Ze statistiky ÚZIS za rok 2006 vyplývá, že v toxikologické laboratoři Ústavu soudního lékařství v Praze 2 byly v biologickém materiálu nejběžněji prokazovanými benzodiazepiny deriváty uvedené v tabulce č. 1.⁵

léčivo	HVLP
diazepam	Diazepam
alprazolam	Xanax, Neurol
nitrazepam	Nitrazepam
bromazepam	Lexaurin
klonazepam	Rivotril

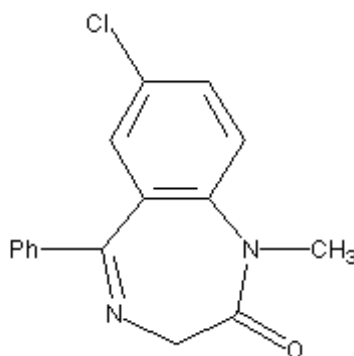
Tabulka 1.

3.1 Základní charakteristika nejčastěji prokazovaných derivátů benzodiazepinu

Benzodiazepiny vykazují mimo anxiolytických účinků, také účinky tlumivé, myorelaxační a antikonvulsivní. Jsou předepisovány nejčastěji při úzkostných stavech, fobiích a poruchách spánku, dále pak také jako antiepileptika. Kromě toho je možné jejich využití jako myorelaxačního prostředku a také v anestezii (diazepam, viz obr.2, léčivé přípravky tab. 2). Alprazolam (viz obr.3 a tab. 3) má schopnost ve vyšších dávkách působit také na panické úzkostné stavy, fobie a obsese. Výrazný hypnotický účinek vykazuje nitrazepam (viz obr., tab. 4), který se zároveň používá jako antikonvulzivum při křečích. Intenzivní, rychle nastupující anxiolytický účinek na začátku léčby má bromazepam (viz obr., tab. 5). Klonazepam (viz obr., tab.6), v nitrožilní aplikaci, se používá při epileptických záchvatech s křečovými stavy pro své výrazné antikonvulzní a sedativní účinky.

Benzodiazepiny však vykazují řadu nežádoucích účinků, jako je únava, útlum až ospalost, svalová slabost, bolesti hlavy a sucho v ústech. Závažným nežádoucím účinkem je riziko vzniku závislosti a ovlivnění schopnosti řídit motorová vozidla. Můžou vyvolat deprese nebo naopak stavy euforie. U některých pacientů může dojít k útlumu krvetvorby, hypotenzi, inkontinenci moči, hepatotoxicitě nebo alergické kožní reakci. U všech preparátů se doporučuje léčbu přerušit postupně a dávky snižovat dle individuálních plazmatických hladin, které by měly činit 25-30 ng/ml.⁶

Diazepam

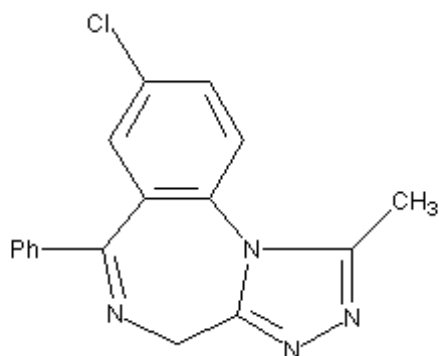


Obrázek 2.: chemický vzorec diazepamu ³

Název přípravku	Složení	Forma léku
Diazepam Slovafarma 2mg	Diazepamum 2mg	tablety
Diazepam Slovafarma 5mg	Diazepamum 5mg	tablety
Diazepam Slovafarma 10mg	Diazepamum 10mg	tablety
Diazepam Biotika	Diazepamum 5 mg v 1 ml roztoku	Injekční roztok

Tabulka 2. ⁶

Alprazolam



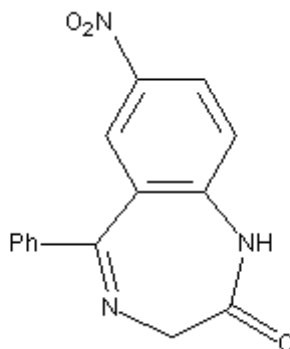
Obrázek 3.: chemický vzorec alprazolamu³

Název přípravku	Složení	Forma léku
Frontin 0,25mg	Alprazolamum 0,25mg	Tablety
Frontin 0,5mg	Alprazolamum 0,5mg	Tablety
Frontin 1mg	Alprazolamum 1mg	Tablety
Helex 0,25	Alprazolamum 0,25mg	Tablety
Helex 0,5	Alprazolamum 0,5mg	Tablety
Helex 1	Alprazolamum 1mg	Tablety
Neurol 0,25	Alprazolamum 0,25mg	Tablety
Neurol 1,0	Alprazolamum 1mg	Tablety
Xanax 0,25mg	Alprazolamum 0,25mg	Tablety

Název přípravku	Složení	Forma léku
Xanax 1mg	Alprazolamum 1mg	Tablety
Xanax 2mg	Alprazolamum 2mg	Tablety
Xanax SR 0,5mg	Alprazolamum 0,5mg	Tablety
Xanax SR 1mg	Alprazolamum 1mg	Tablety
Xanax SR 2mg	Alprazolamum 2mg	Tablety
Xanax SR 3mg	Alprazolamum 3mg	Tablety

Tabulka 3. ⁶

Nitrazepam

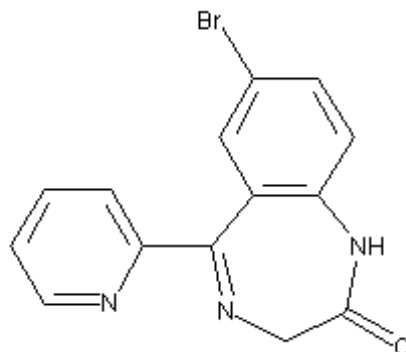


Obrázek 4. .: chemický vzorec nitrazepamu ³

Název přípravku	Složení	Forma léku
Nitrazepam Slovakofarma	Nitrazepamum 5mg	Tablety
Nitrazepam Slovakofarma Forte	Nitrazepamum 10mg	Tablety

Tabulka 4. ⁶

Bromazepam

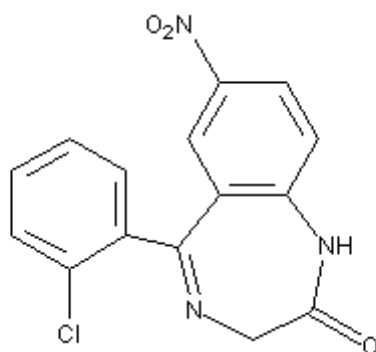


Obrázek 5. .: chemický vzorec bromazepamu ³

Název přípravku	Složení	Forma léku
Lexaurin 1,5	Bromazepamum 1,5mg	Tablety
Lexaurin 3	Bromazepamum 3mg	Tablety

Tabulka 5. ⁶

Klonazepam



Obrázek 6.: chemický vzorec klonazepamu³

Název přípravku	Složení	Forma léku
Rivotril Inj.	Clonazepamum 2,5/ml, 1mg/1ml	Injekce
Rivotril 0,5mg	Clonazepamum 0,5mg	Tablety
Rivotril 2,0mg	Clonazepamum 2mg	Tablety
Rivotril 2,5mg/ml	Clonazepamum 2,5mg/ml	Perorální kapky
Rivotril	Clonazepamum 1mg/ml	Injekce

Tabulka 6.⁶

3.2 Osud léčiva v organismu

Léčiva obecně dosahují cílového orgánu krevní cestou, musí se tedy nejdříve do krve absorbovat. Tato **absorbce** závisí na druhu aplikace léčiva a způsobu podání. Benzodiazepiny se podávají buď perorálně, účinná látka se absorbuje do krve ze žaludeční a střevní sliznice nebo přímo vstupují do krve při intravenózním podání. Při případném nanesení léčiva na sliznici úst (klonazepam) se látka nanáší přímo na místo absorpce a tím je urychleno vstřebání do krve.

Absorbované léčivo se z krve dostává dále do různých tělních tkání. V této **distribuční** fázi se benzodiazepiny částečně váží na plazmatické bílkoviny, část léčiva zůstává nevázaná. Volná (nevázaná) frakce difunduje přes kapilární stěnu a dosáhne efektorového orgánu. Vázané léčivo působí jako inaktivní rezervoár.²

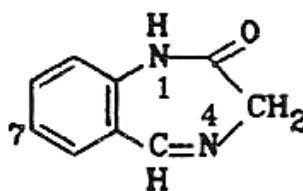
Hlavním orgánem **metabolismu** léčiv jsou játra, kde dochází k jejich chemické přeměně-biotransformaci. Většina léčiv, ke kterým patří i benzodiazepiny, se transformují pomocí nespecifických enzymů lokalizovaných v hladkém endoplazmatickém retikulu buněk. Enzymy působí tak, že mění strukturu a vlastnosti léčiva, aby bylo možné ho snadno z organismu vyloučit ledvinami. Obvykle probíhá biotransformace ve dvou fázích. V **první fázi** dochází k chemickým reakcím jako je oxidace, redukce nebo hydrolýza. Dojde k odkrytí funkčních skupin molekuly léčiva, polarita molekuly se zvyšuje a tím je navozen stav, který je předpokladem pro druhou fázi biotransformace. V **druhé fázi** dochází k syntetickým, konjugačním reakcím. Léčivo i jeho metabolity se spojují s endogenními sloučeninami, například s kyselinou glukuronovou, sírovou nebo octovou. Vzniklé konjugáty jsou polárnější a tak snadněji

eliminovatelné než původní léčivo. Avšak některá léčiva jsou přeměněna na dostatečně polární metabolity již v první fázi biotransformace a jsou vylučována bez následné konjugace. V průběhu biotransformace se též mění i farmakologický účinek léčiv. Při první fázi dochází buď k aktivaci nebo inaktivaci léčiva, v průběhu druhé fáze jsou léčiva vždy inaktivována.⁷

Při **exkreční** fázi je léčivo nezvratně vyloučeno z organismu. Mezi hlavní exkreční mechanismy patří renální a biliární exkrece, v menší míře je léčivo vylučováno slinami, potem a u kojících matek mateřským mlékem.²

3.3 Biotransformace vybraných benzodiazepinů

Terapeuticky využívané benzodiazepiny jsou většinou deriváty 1,4-benzodiazepin-2-onu. Chemický vzorec (viz obr. 7.)⁸ Největší počet léčivých přípravků jsou však deriváty 1,3-benzodiazepin-2-onu.



Obrázek 7.

Z hlediska biotransformačních reakcí je důležitý substituent v poloze 7. U chlorderivátů (diazepam) probíhají v první fázi biotransformace reakce oxidační. Demetylací diazepamu vzniká nordiazepam, hydroxylací jádra

vzniká 3-hydroxydiazepam. Kombinací obou reakcí dojde k vytvoření 3-hydroxynordiazepamu a nordiazepamu. Ty jsou pak použity jako prekurzor pro následnou konjugaci s kyselinou glukuronovou a sírovou. V menší míře probíhá zároveň i hydroxylace substituentu s následnou konjugací. V případě, že je substituována v poloze 7 nitroskupina (nitrazepam, klonazepam), probíhá biotransformace odlišným způsobem. Hlavní metabolickou reakcí této skupiny benzodiazepinů je redukce nitroskupiny na odpovídající aminy. Nitrazepam je transformován na dva hlavní metabolity, redukovanou formu často označovanou jako aminonitrazepam a její acetylderivát. Klonazepam je redukován na amin, následuje acetylace vzniklého aminu a hydroxylace v poloze 3.

Další variantou biotransformace benzodiazepinů je hydrolytické štěpení cyklu, které bylo pozorováno u obou typů derivátů, jak chlorderivátů, tak i nitroderivátů. Vznikají substituované benzofenony, považované za skutečné metabolity.

Následuje konjugační reakce, při které dochází ke spojení složky organismu vlastní a xenobiotika. Konjugáty tvoří metabolity léčiva.⁸

Diazepam

Ze zažívacího traktu se rychle vstřebává, maximální koncentraci v plazmě dosahuje za 0,5 až 2 hodiny. Po perorálním podání dosahuje vyšších plazmatických koncentrací než při parenterálním způsobu aplikace. Vysoké procento léčiva (98-99%) se váže na proteiny krevní plazmy. Průměrný poločas diazepamu v plazmě je 30 hodin. Vylučován je převážně močí ve formě metabolitů, stolicí (10%). Diazepam přechází do mateřského mléka.⁹

Alprazolam

Alprazolam se po perorálním podání z GIT rychle a dobře vstřebává, maximálních hladin v plazmě dosahuje za 1-2 hodiny. Na plazmatické bílkoviny se váže z 70-80%. Poločas alprazolamu je 10-15 hodin. Je vylučován močí ve formě konjugátů. Alprazolam přechází do mateřského mléka, proto je jeho užívání v době kojení nevhodné.⁹

Nitrazepam

Nitrazepam se rychle absorbuje z GIT, maximální koncentraci v plazmě dosahuje za 0,5 až 4 hodiny. 85-88% léčiva se váže na plazmatické bílkoviny, eliminační poločas kolísá mezi 24-29 hodinami. Asi 5% léčiva se vylučuje močí v původní formě, zbytek ve formě metabolitů. V době laktace je jeho užívání nevhodné, protože přechází do mateřského mléka.⁹

Bromazepam

Po perorálním podání je maximální koncentrace bromazepamu v krevní plazmě dosaženo během 1 až 2 hodin. Na plazmatické bílkoviny se váže průměrně 70% léčiva. Poločas eliminace je 12 hodin (od 8 do 20 hodin), avšak u starších pacientů může být delší. Vylučuje se močí ve formě konjugátů. Předpokládá se přestup do mateřského mléka. Z kvantitativního hlediska převládají dva metabolity: 3-hydroxy-bromazepam a 2-(2-amino-6-brom-3-hydroxybenzoyl) pyridin.⁹

Klonazepam

Podaný per os dosahuje maximální plazmatické koncentrace za 1-4 hodiny. Na plazmatické bílkoviny váže z 85%. Eliminační poločas je mezi 20 až 60 hodinami. Vylučuje se z 10-30% stolicí, zbytek močí.

Hlavní metabolit je 7-amino-clonazepam. Přestupuje přes placentární bariéru, lze tedy předpokládat také přestup do mateřského mléka.⁹

4. Biologický materiál

Analýzu na přítomnost benzodiazepinů lze provádět v různých druzích biologického materiálu. Při volbě, jaký materiál použijeme, vycházíme z několika hledisek.¹⁰

•Vhodnost pro sledování stanoveného cíle

Jiný materiál bude preferovat laboratoř monitorující lékové hladiny (krev, plazma, sérum)¹¹, biochemická laboratoř (krev, sérum, plazma, moč)¹². V toxikologické laboratoři bude preferována moč, žaludeční obsah, sliny, vlasy a krev, v laboratoři forenzní toxikologie jsou využívány mimo výše jmenované materiály ještě orgány.

• Dostupnost materiálu

Zejména v klinické praxi záleží na dostupnosti vhodného materiálu, v souvislosti s charakterem odběru (invazivní, neinvazivní).

• Metodické možnosti

Rozhodnutí, jaký biologický materiál zvolíme, záleží na zavádění různých analytických postupů a metod.

• Problematika biotransformace

Farmakokinetika xenobiotik se v různých druzích biologického materiálu liší. Záleží zejména na způsobu vylučování léčiva do jednotlivých tělních kompartmentů.¹⁰

Krev

Hladina xenobiotika v krvi závisí na době, která uplynula od vstupu noxy do organismu, rychlosti vstřebávání a vylučování. I když je krev často používána, tvoří z hlediska analýzy na přítomnosti xenobiotik nejsložitější soustavu. Pevné součásti krve, erytrocyty, jsou součástí intracelulárního systému, který je s okolním extracelulárním systémem v rovnováze. Udržet rovnováhu tohoto systému i po odběru krve je značně složité. Vlivem teploty i nešetrného odběru krve může dojít k hemolýze, totálnímu vyplavení intracelulárního obsahu. Při analýzách je třeba těmto skutečnostem věnovat pozornost, protože tímto způsobem může dojít ke zkreslení výsledků stanovení¹⁰. Z hlediska specifčnosti nálezů benzodiazepinů v krvi vycházíme v toxikologické analýze z nálezů původních forem i některých metabolitů⁸

Sérum

Sérum vzniká srážením nativní krve. U akutních stavů, kdy je potřeba prokázat benzodiazepiny okamžitě, se doba srážení urychluje odběrem do speciálních zkumavek s přídavkem akcelerátoru a plastových kuliček. Ke zřetelnějšímu oddělení dojde při odstředění nativní krve.¹⁰

Plazma

Plasma se získá odstředěním krve s přídavkem antikoagulačního prostředku. K odběru se používají komerčně vyráběné zkumavky s přídavkem citrátu sodného, oxalátu sodného, heparinu a sodné nebo draselné soli kyseliny ethylendiaminotetraoctové (EDTA). Vzorek je okamžitě připraven pro další zpracování, také objemově je získ vzorku oproti séru vyšší. Biochemické laboratoře preferují heparinát sodný a

draselnou sůl EDTA¹², v problematice monitorování léčiv se používá jako antikoagulans ještě citrát sodný a oxalát sodný¹⁰.

Moč

V moči nacházíme převážně metabolity původních forem léčiv, tedy i benzodiazepinů. V důsledku biotransformace jsou metabolity látkami polárnějšími, než původní forma a jejich resorbce z tubulárního systému je snížena. Proto se v moči hromadí. Tento fakt je výhodný zejména v toxikologickém screeningu při použití komerčně vyráběných imunochemických setů (Syva Rapid test, Dynex test, Chemtrue test). Při identifikačních analýzách je však nutné se zaměřit na průkaz odpovídajících benzofenonů, vzniklých po hydrolytickém štěpení metabolitů benzodiazepinů.¹³ Pro odběr moči na biochemické vyšetření celkových benzodiazepinů je vyžadován, dle České společnosti klinické biochemie, odběr do plastových nádobek¹².

Při monitorování lékové terapie je moč ve většině případů nevhodná. Problémem jsou zejména naředění objemu moči závislé na příjmu tekutin, variabilní ovlivnění pH potravou a náročnost hodnocení nálezu, vzhledem k časově nekontrolovanému odběru vzorku¹⁰.

Žaludeční obsah

V žaludečním obsahu se nacházejí nezměněná léčiva. Není výjimkou ani nálezy celých tablet. V klinické toxikologii se využívá také první porce žaludečního výplachu a zvratky.¹⁴

Orgány

Ve forenzní praxi se post mortem odebírají k analýze játra, ledviny a slezina. V extraktech z orgánů se nachází zejména metabolity benzodiazepinů, při masivních otravách i původní formy těchto léčiv.¹⁵

Mateřské mléko

V současné době se klade velký důraz na kojení novorozenců. Je tedy nezbytné vědět, do jaké míry přechází léčivo do mateřského mléka.

Babjuk uvádí sledování lékových hladin karbamazepinu u kojících matek.¹⁰

Sliny

Většina léčiv, tedy i benzodiazepiny, přechází difúzí do slin, kde jejich hladina zpravidla dobře koreluje s plazmatickou koncentrací. Nicméně zatím jsou sliny považovány za alternativní materiál, využívaný k jednoduchému neinvazivnímu screeningu například DynexTest[®] SalivaScreen.^{16,17}

Vlasy

Noxa je uzamčená do buněčných struktur vlasu, který postupně odrůstá. Rozložení podél délky vlasu odpovídá výskytu léčiva v krevní cirkulaci v minulosti.¹⁶ Vlasy jsou stejně jako sliny zatím považovány za alternativní materiál.

5. Úprava biologického materiálu

Cílem úpravy biologického materiálu je rozrušení biologické matrice a extrakce sledované látky. Protože vzorky jsou složité směsi, je nutné odstranit rušivé endogenní látky, které by mohly interferovat při vlastní analýze nebo poškodit kolony v následně použitém chromatografickém systému. Při sledování léčiv v biologickém materiálu je většinou nutné stanovit požadovanou noxu ve velice nízké koncentraci, proto je často nutné provést během úpravy zakoncentrování vzorku.

5.1. Terapeutické monitorování léčiv

Terapeutické monitorování léků (TDM) má za cíl určit správný režim dávkování léčiv v průběhu terapie. Určování koncentrace benzodiazepinů v průběhu terapie je publikováno u karbamazepinu a klonazepamu v souvislosti s jejich antiepileptickými účinky.¹⁰

V některých laboratořích je sledována hladina diazepamu a desmethyldiazepamu dle doporučení ošetřujícího lékaře a farmakologa.¹⁸ Lékové hladiny se sledují zejména při nedostatečné terapeutické odpovědi na léčbu, při podezření na toxické vedlejší účinky a nežádoucí interakci s jinými léčivy.

Používané analytické metody vyžadují různé postupy při úpravě biologického materiálu. Vzorek je potřeba upravit tak, aby forma a koncentrace léčiva odpovídala možnostem detekce.

5.1.1 Naředění biologického materiálu

Metoda je jednoduchou úpravou biologického materiálu, používanou jak před extrakcí organickými rozpouštědly, tak před HPLC analýzou. Výtěžek je obvykle vyšší než při přímé extrakci organickými rozpouštědly.

Faith doporučuje zředit moč vodou 1:4, plazmu 1:5, eventuelně v případě plazmy použít k ředění 5% kyselinou trichloroctovou.⁷

5.1.2 Deproteinace biologického materiálu pro potřeby TDM

Je další metodou zpracování biologického vzorku, zejména plazmy, pro další analytický postup. Účelem je odstranění rušivého vlivu endogenních látek. Tím je zajištěna ochrana kolon a kapilár při následné HPLC analýze. Odstranění proteinů provádíme precipitací, denaturací pomocí enzymů, dialýzou nebo ultrafiltrací. Do supernatantu přechází volná i vázaná frakce léčiva.¹⁰

Precipitace pomocí silných kyselin nebo hydroxidu

Obecně rozšířená je precipitace kyselinou trichloroctovou, kyselinou sulfosalicylovou nebo čerstvě připraveným hydroxidem hořečnatým.¹⁰

Vysolování neutrálními solemi

V této metodě se používá zejména síran amonný, ve speciálních případech síran hořečnatý. Do roztoku biopolymeru se sůl přidává po malých dávkách v pevném stavu nebo jako nasycený roztok za stálého míchání. Precipitát je poté oddělen centrifugací.¹⁹

Precipitace těžkými kovy

Použití solí těžkých kovů je velmi účinné, výhodou je neutrální pH výsledného supernatantu.¹⁹

Precipitace organickými rozpouštědly

Z hlediska následné instrumentace HPLC, eventuelně GC, je výhodné použití ethanolu v poměru 1:2. Další rozpouštědla používaná k precipitaci jsou acetonitril, aceton a methanol.

Enzymová deproteinace

Deproteinace probíhá působením proteolytických enzymů. Zvláště výhodná je tato technika pro základní screening. Pro deproteinaci vzorku před vyšetřením na přítomnost benzodiazepinů Babjuk doporučuje použít směs proteinas.

5.1.3 Membránové separační metody

Při ultrafiltraci zůstává vázaná složka léčiva společně s proteiny na stejné straně membrány. Supernatant prošlý membránou obsahuje jen volně vázanou složku léčiva.¹⁰

Membránová filtrace

Někdy je tato technika označována jako ultrafiltrace. Molekuly v roztoku se oddělují na základě své velikosti průchodem přes polopropustnou membránu. Membrány jsou vyráběny s různou velikostí pórů a také pro

různé objemy (například Centrisart , Sartorius). Oddělení volné a vázané frakce vzorku se provádí centrifugací v úhlovém rotoru.¹⁹

5.1.4 Extrakční metody pro účely TDM

Další možností, jak odstranit endogenní látky z biologického materiálu a izolovat benzodiazepiny a jejich metabolity, je použití extrakčních metod. Účelem extrakce v TDM je separace konkrétní látky od balastů, které by mohly při stanovení interferovat. Nejpoužívanější technikou je extrakce kapalinou, modernějším přístupem je pak extrakce na pevných fázích.¹⁰

Extrakce kapalinou-liquid liquid extrakce(LLE)

Základním principem této metody je dělení látek mezi dvě nemísitelné kapalně fáze. První fází je vodná složka, druhou tvoří s vodou nemísitelné organické rozpouštědlo. Více hydrofilní analyty preferují polární složku, zatímco hydrofobní látky přecházejí snadno do organického rozpouštědla. Během extrakce tedy přechází léčivo z biologického materiálu (vodná složka) do s vodou nemísitelného organického rozpouštědla. Rozpouštědlo se odpaří dosucha, odparek je většinou rozpuštěn v mobilní fázi a nastříkovan na kolonu. Analyty se rozdělují mezi tyto fáze na základě různých rozdělovacích koeficientů . Extrakční proces závisí na fyzikálně chemických vlastnostech rozpouštědla, pH vodné fáze, vzájemnému poměru fází, způsobu a době trvání extrakce a způsobu předchozího zpracování vzorku.

• **Vlastnosti rozpouštědla**

Rozpouštědlo volíme především dle charakteru extrahované látky.

Rozpouštědla používaná pro LLE by měla mít následující vlastnosti:

- nízká rozpustnost ve vodě (< 10%)
- těkavost
- kompatibilita s HPLC detekcí
- vhodná polarita pro maximální výtěžnost
- vysoká čistota pro minimální kontaminaci vzorku

Pro extrakci benzodiazepinů se používá v metodách TDM jako rozpouštědlo diethylether a chloroform.

• **Vliv pH vodné fáze**

Úpravou pH vodné fáze dosáhneme vyšší selektivity a výtěžnosti extrakce. Benzodiazepiny jsou látky, které patří mezi amfotery a baze. Při vyšším pH vodné složky je potlačena jejich disociace a tak lépe přecházejí do organického rozpouštědla.

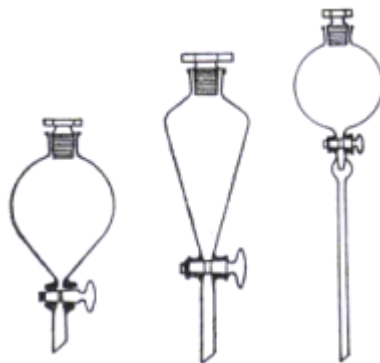
• **Vliv vzájemného poměru nemísitelných fází**

Babjuk uvádí jako nejvhodnější poměr vodné a organické fáze 1:5 až 1:10. Větším množstvím organického rozpouštědla dosáhneme vyššího výtěžku extrakce.

• **Způsob a doba trvání extrakce**

Vyšší extrakční účinnost zajistí dvojnásobná extrakce s poloviční dávkou rozpouštědla. Doba extrakce nemá být neúměrně dlouhá, protože hrozí

tvorba emulzí. Běžně se používají skleněné dělicí nálevky o různých objemech (viz obr č.8)



Obrázek 8.: Dělicí nálevky

Vytřepávat je také možné přístroji s regulací intenzity třepání a časovým spínačem.

V systému TDM je stanovovaná látka známá, je tedy možné použít analytický postup na stanovení mikrokvant a extrakci provádět ve skleněných zkumavkách. Po vytřepání na automatizované třepáče se extrakt odebere poloautomatickou pipetou s vyměnitelnou špičkou.¹⁰

Mikroextrakce kapalina-kapalina, Liquid Phase Micro Extraction (LPME)

V roce 1996 byla poprvé představena metoda miniaturizace LLE. Metoda využívá kapky rozpouštědla na konci teflonového vlákna. Jedná se o jednoduchou a rychlou metodu úpravy vzorku biologického materiálu před instrumentací HPLC. Nověji se používá kapky rozpouštědla na špičce nástřikové jehly před instrumentací GC.^{20,21}

• Hollow Fibres Liquid Phase Micro Extraction (HF-LPME)

Do roztoku vzorku je ponořené duté porézní vlákno, které je vyplněno extrakčním činidlem. Publikována byla metoda stanovení mirtazapinu z plazmy s následnou chirální separací.²²

• Single Drop Extraction(SDE)

Kapka rozpouštědla natažená do nástřikového pístu je pomocí jehly ponořena do nádoby s analyzovaným roztokem. Po 15 minutách extrahování kapkou rozpouštědla je kapka pístem opět vtažena ven. Vytažená jehla z nádoby se vzorkem je posléze injektována do chromatografického přístroje.²³

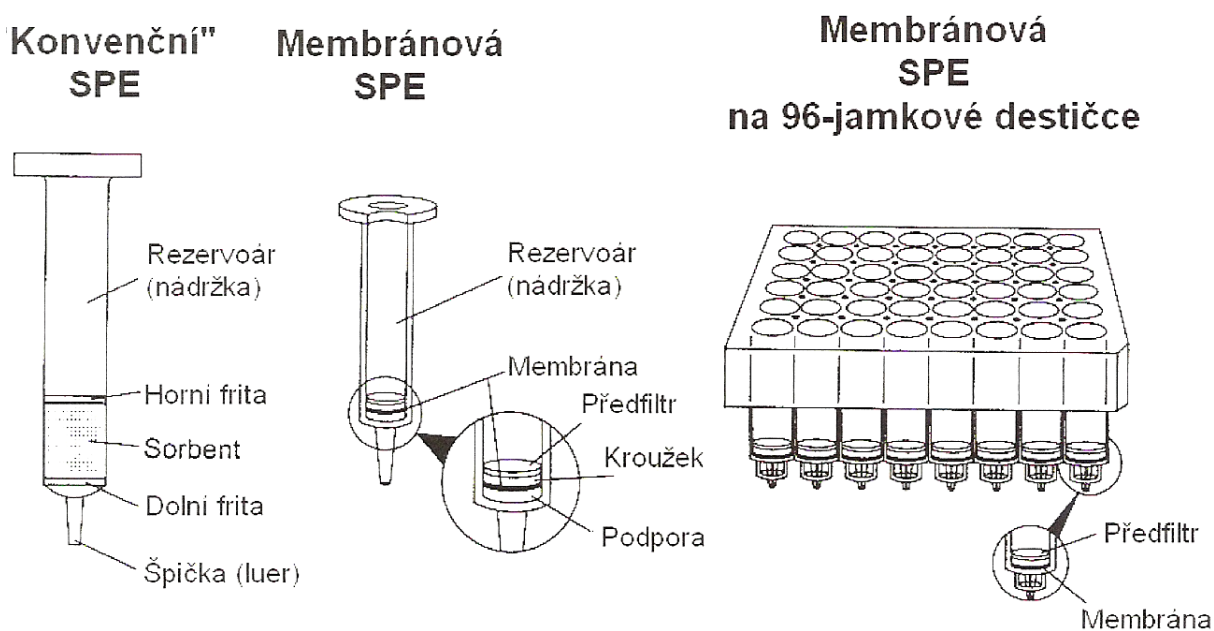
Extrakce na pevné fázi(Solid Phase Extraction, SPE)

Technika izolace, čištění nebo obohacování stanovované složky na malých kolonkách naplněných sorbetem, iontoměničem nebo gelem. Vzorek v roztoku se prolévá podtlakem, zachycené složky se po promytí uvolní vhodným rozpouštědlem. Tato často používaná metoda je vhodná nejen k odstranění biomatrice, ale i pro zakoncentrování vzorku. Výhodou je práce s menšími objemy, jednoduché provedení, snadné skladování a transport vzorků. Kolonky mají tvar injekční stříkačky (obr.9), sorbenty mohou mít různé fyzikálně-chemické vlastnosti. Pro separaci benzodiazepinů jsou vhodné nepolární sorbety, především s navázanými funkčními skupinami C18 např, Supelco, Strata (XPhenomenex), LiChrolut(Merck).^{24,25,26,27}

Pro extrakci benzodiazepinů byl publikován tento postup. Kolonka se propláchne předepsaným rozpouštědlem, pro benzodiazepiny je vhodná směs hexanu, acetonu, methanolu a vody. Dojde tak k aktivaci pevné fáze

pro interakci se vzorkem. Následně se upraví prostředí pro vlastní vzorek propláchnutím roztokem hydrogenuhličitanu draselného pufovaného na pH 7. Po nadávkování se vzorek sorbuje na pevné fázi, matrice prochází volně kolonkou. Propláchnutím ethylacetátem dojde k vypláchnutí zbytku biomatrice, avšak žádané léčivo zůstává sorbováno na kolonce. Eluce benzodiazepinů se provádí opět směsí hexanu a acetonu. Před analýzou pomocí GC je eluát vysušen dusíkem.²⁴

Pro separaci benzodiazepinů z moče byl s dobrým výsledkem použit materiál Sep-Pak, elučním činidlem v tomto případě byla směs methanolu a vody.²⁸



Obrázek 9. : Schema SPE

Možnost použití několika (až desítek) SPE kolonek či disků současně, zkracuje dobu potřebnou k přípravě vzorku. Set na 96. místné destičce viz obr.9.

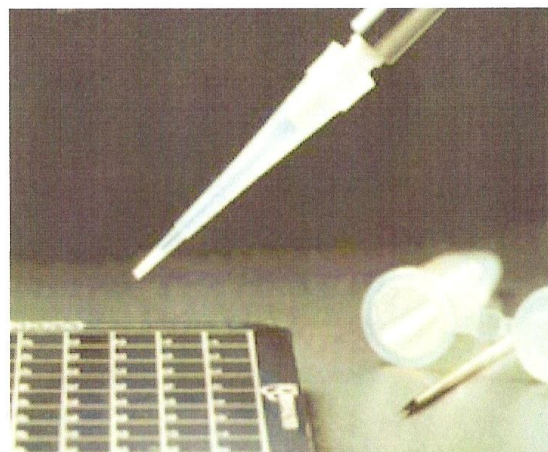
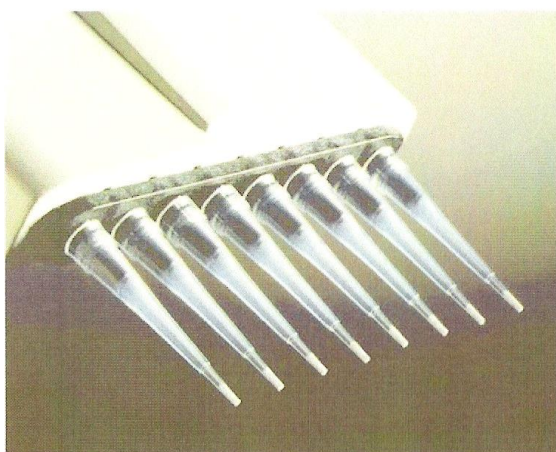
• Membránová SPE- extrakční disky

Jedna z moderních forem SPE jsou tenké membrány z teflonu umístěné v SPE kolonkách.(viz obr. 10). Hlavními výhodami této metody je možnost zakoncentrování vzorku ve velmi úzké zóně membrány a také malé množství rozpouštědla potřebného k eluci. Tyto disky byly zkoušeny pro separaci neutrálních a bazických léčiv z moče s vysokou návratností. Vzorek moče byl zředěn 2 ml fosfátového pufru a aplikován do předupraveného disku a následně vymyt vodou. Pro eluci neutrálních látek byla použita směs acetonu a ethylacetátu 1:1, pro bazická léčiva pak ethylacetát obohacený amoniakem. Po následném vysušení následovala analýza pomocí GC.²⁹



Obrázek 10: Extrakční disk

Sorbenty pro extrakci mohou být také umístěny přímo do špiček automatických pipet. (viz obr.11) Tato metoda se nazývá SPE-PTs (Solid phase extraction-pipette tips) a její použití bylo popsáno při extrakci diazepamu z plazmy, před následnou instrumentací GC.³⁰



Obrázek 11.: Špičky automatických pipet naplněné sorbentem.

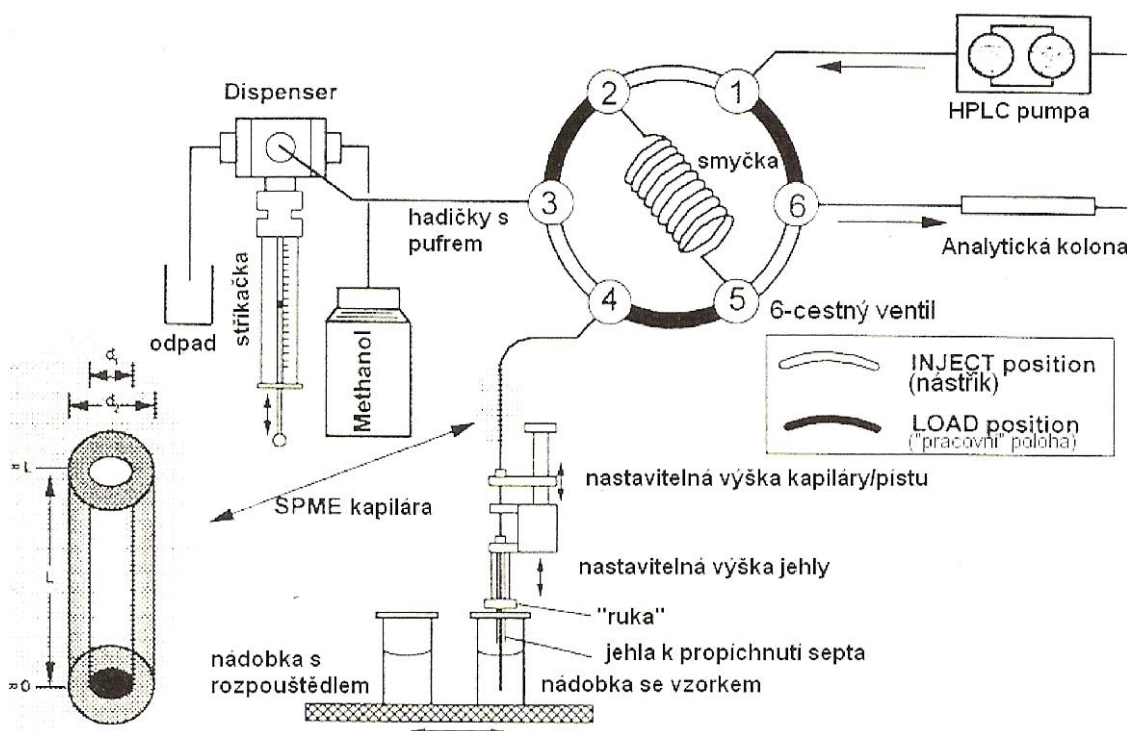
- Polymery s molekulárním otiskem (Molecular Imprinting Polymers-MIPS)

Připravují se polymerací vysoce zesíťovaného polymeru s monomerem obsahujícím „templátovou“ molekulu. Po jejím odstranění je polymer použit jako selektivně vázající medium pro látky strukturně podobné.

Metoda byla použita pro extrakci diazepamu a jeho metabolitů z vlasů.³¹

• On line SPE

Proces SPE je přímo spojen s analytickou metodou, nejčastěji HPLC (obr.12). Tento postup byl zkušeno pro analýzu alprazolamu, klonazepamu a nitrazepamu ze séra a plazmy s vysokou návratností.³² Výhodou této metody je přímé dávkování vzorku tělních tekutin a tím bezpečná manipulace s infekčním materiálem. Metoda je vysoce citlivá a přesná. Dále byla metoda použita při analýze antidepresiv a jejich metabolitů v plasmě, v tandemu LC-MS-MS.³³



Obrázek 12.: Schéma On-line SPE

Mikroextrakce tuhou fází (Solid Phase microextraction, SPME)

Tato metoda byla vyvinuta speciálně pro následnou instrumentaci HPLC nebo GC analýzu. Sorbent je nanesen na vlákno ve formě tenkého filmu. Povrch tohoto vlákna chrání ocelová kapilára, do které je možné vlákno zasouvat. Zasunutím vlákna do vzorku, nebo držením vlákna nad povrchem vzorku, se analyt sorbuje na polymerní materiál vlákna. Následuje desorpce přímo do GC, nebo v upraveném dávkovacím ventilu do HPLC.^{34,35} Tato metoda byla použita při extrakci benzodiazepinů v biologickém materiálu s následnou GC-MS analýzou.

5.1.5 Uvolnění konjugovaných složek

Jak vyplývá z biotransformace benzodiazepinů, jsou vylučovány do moče ve formě vázané na konjugáty. Pro získání léčiva v původní formě, je nutné provést rozštěpení konjugovaných složek. Štěpení se provádí pomocí enzymů, nebo silnou minerální kyselinou za extrémních podmínek.

Enzymová hydrolýza

Konjugáty jsou štěpeny specifickými enzymy. Glukuronáty beta-glukuronidasou, sulfáty sulfatasou. Babjuk uvádí tento postup enzymové hydrolýzy. V acetátovém pufru je 2 hodiny inkubováno 2 ml moči a 1 ml beta-glukuronidasy při 60. stupních Celsia. Po následném přidání extrakční činidla a mírném protřepání po dobu 2 minut se vyčká oddělení jednotlivých složek. Po oddělení extrahované složky je možno pokračovat v další analýze.¹⁰

Kyselá hydrolýza

Působením silné minerální kyseliny se konjugát rozštěpí za současného uvolnění původní formy i některých benzofenonů. Používá se zejména kyselina chlorovodíková, použití kyseliny sírové je méně vhodné, protože poskytuje barevné produkty. Babjuk doporučuje pro kvantitativní stanovení tento postup: Směs 1 ml moče a 1 ml HCl konc. je vařena na vodní lázni pod zpětným chladičem. Po ochlazení je možno pokračovat v extrakci.¹⁰

5.2 Klinická praxe

Při podezření na otravu benzodiazepiny se jako první setkává s odebraným materiálem biochemická laboratoř. Laboratoř provede jednoduchý screening moče pomocí imunochemických setů na stanovení benzodiazepinů a potvrdí tak diagnózu lékaře. Při otravě neznámou toxikou, kde přítomnost benzodiazepinů nemůžeme vyloučit, je potřeba biologický materiál podstoupit laboratoři toxikologické. V některých zdravotnických zařízeních jsou obě laboratoře spojeny. Pro toxikologické vyšetření při otravách je nutné od pacienta odebrat krev, moč a žaludeční obsah, eventuálně prvou porci výplachu žaludku.³⁷

5.2.1 Orientační stanovení benzodiazepinů

Pro jednoduchou orientační identifikaci benzodiazepinů se používá moč a sérum bez předchozí úpravy vzorku. Materiál se nanese přiloženou pipetkou na komerčně vyráběnou imunochemickou destičku, v případě diagnostických proužků se proužek do materiálu ponoří. Tyto diagnostické testy jsou založeny na reakci specifické protilátky se stanovovanou toxikou. Umožňují však pouze skupinovou detekci. Vyrábějí se buď jako jednoúčelové, pro identifikaci samotných benzodiazepinů, nebo je možné toxiku identifikovat společně s ostatními zneužívanými drogami.^{38,39,40}

5.2.2 Záchytové orientační imunometody

Záchyt je realizován pomocí imunochemických analytických systémů uspořádaných do automatických analyzátorů. Tento přístup umožňuje práci s velmi malými vzorky bez předchozí analytické úpravy (sérum, moč, sliny). V případě nutnosti použití jiného materiálu (krev, žaludeční obsah) je nutné biologický materiál nejprve deproteinovat acetonem, acetonitrem

nebo methanolem, eventuálně extrahovat dostupnými metodami. Takto upravený analyt je po rozpuštění ve vyhovujícím médiu je připraven k analýze.^{16,40}

Přehled imunochemických metod

- EIA (Enzyme Immunoassay)
- CEDIA (Cloned Enzyme Donor Immunoassay)
- KIMS (Kinetic Interaction of Microparticulates in Solution)
- ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
- RIA (RadioImmunoassay)

U závažných stavů pacienta musí na imunochemické vyšetření rychle navazovat analytické postupy umožňující cílené potvrzení benzodiazepinů z biologického materiálu. Tyto analytické postupy jsou shodné s postupy používanými při terapeutickém monitorování léčiv. Jedná se zejména o deproteinaci a extrakci.

5.2.3 Deproteinace

Pro průkaz diazepamů se krev deproteinuje acetonitrilem a následně je supernatant přímo analyzován chromatografickými metodami.⁴¹

5.2.4 Extrakce kapalinou-liquid liquid extrakce (LLE)

V klinické toxikologické praxi se tato technika používá k izolaci různých lékových frakcí, které jsou pak dále zpracovány. Nejvhodnějším biologickým materiálem pro izolaci benzodiazepinů v klinické toxikologii

je žaludeční obsah a moč.¹³ Modifikace LLE vypracovaná v roce 1983 je součástí screeningových metod při záchytu a identifikace léčiv a jejich metabolitů pomocí chromatografie na tenkých vrstvách. Je dodnes používanou a uznávanou metodou, která se používá i ve forenzní toxikologii.

Postup

50 ml vzorku se okyselí několika kapkami zředěné HCl (konc.HCl a voda v poměru 1:2)

Extrakti provádíme dvěma porcemi diethyletheru (po 80 ml). Extrakty se spojí a odpaří na vodní lázni do sucha. Odparek bude obsahovat léčiva slabě kyselá a neutrální. Oddělená vodná fáze se alkalizuje pevným uhličitanem sodným a opět extrahuje dvěma porcemi diethyletheru. Před odpařením obou frakcí se extrakty okyselí několika kapkami uvedené zředěné HCl pro zadržení některých bazických léčiv. Odparek bude obsahovat bazická léčiva, přítomny budou i některá další léčiva neutrální. Při extrakci žaludečního obsahu očekáváme nález původních forem benzodiazepinů z tablet. Pro průkaz v moči se musí zvolit metoda kyselé hydrolyzy před vlastní extrakcí. Příslušné konjugáty jsou hydrolyzou štěpeny na benzofenony, na jejichž nález se důkaz benzodiazepinů zakládá. Výjimku tvoří nitrazepam. Hlavní metabolity nitrazepamu (aminonitrazepam, acetylovaný aminonitrazepam a 2-amino-5nitrobenzofenon) jsou nacházeny v alkalických extraktech před provedením hydrolyzy. Po hydrolyze se uvolní další podíl benzofenonu. Průkaz nitrazepamu se tedy opírá o nález všech tří metabolitů v alkalickém extraktu a nález benzofenonu uvolněného hydrolyzou.

5.2.5 Kyselá hydrolýza pro průkaz benzodiazepinů

Po provedení LLE se odměří z extrahované moče 20 ml. Dále se přidáme 20 ml destilované vody a 27 ml koncentrované HCl. Směs se přivede varu a po dobu 5 minut se vaří. Po vychlazení se směs neutralizuje pevným NaOH, za stálého míchání a chlazení do pH 8. Po ochlazení se extrahuje dvěma porcemi diethyletheru po 140 ml a odpaří na vodní lázni. Odparek bude obsahovat uvolněná léčiva původních forem a štěpy metabolitů.

Vorel ve své práci srovnával enzymatickou a kyselou hydrolýzu moče z hlediska výtěžnosti po extrakci na SPE. Kyselá hydrolýza se ukázala výhodnější, jak pro nižší obsah balastních látek z biomatrice, tak i pro menší časovou i finanční náročnost.⁴²

5.2.6 Extrakční techniky před instrumentací GC a HPLC

- LLE techniky při použití krve

Pro průkaz diazepamů lze extrahovat krev upravenou přidávkem roztoku chloridu amonného. Extrakce se provádí ethylacetátem s následnou instrumentací GC a HPLC. Další možností je krev naředit zředěným roztokem amoniaku a extrahovat diethyletherem, nebo pufrovat uhličitanovým pufrem a extrahovat butylacetátem. Další možností je krev s přidávkem amoniaku extrahovat toluenem. Oxazepam lze extrahovat z krve pufrované TRIS (hydroxymethyl-aminometan) na pH 9,2. Extrakce se provádí n-butyl chloridem. Pro průkaz většiny benzodiazepinů se krev upraví přidávkem roztoku chloridu amonného a extrahuje směsí chloroform, propan-2-ol a heptan v poměru 60:14:26. Následuje odpaření.⁴¹

•LLE techniky při použití moče

Nejdříve se provede kyselá hydrolýza. Moč s koncentrovanou HCl je přivedena k varu a vařena po dobu třiceti minut. Po provedené kyselé hydrolýze při pH 8-9 je dále extrahována směsí dichlormethan – 2-propanol – ethylacetát-(1:1:3) , nebo extrahována směsí dichlormethan - isopropanol-ethylacetát (1:1:3).⁴¹

•SPE techniky při použití krve

Alprazolam a diazepam lze extrahovat pomocí kolonek naplněných křemelinou-CHem Elut. Vzorek je předepsaným způsobem zředěn, aplikován na kolonky , vymytí balastů a vlastní extrakce se provádí ethylacetátem. Na kolonkách Bond

Elut lze zachytit oxazepam. Kolonka je promývána ethylacetátem s přídavkem roztoku amoniaku. Při stejném postupu lze použít i kolonky Bond Elut Certify.⁴¹

•SPE techniky při použití moče

Moč zředěná kyselinou fosforečnou je aplikována do předpřipravené kolonky Bond Elute SCX. Promytí se provádí methanolem s přídavkem amoniaku. Takto lze extrahovat oxazepam a diazepam. Nitrazepam a oxazepam lze úspěšně zachytit nejen z moče, ale i z plazmy pufrováním vzorku na pH 6 fosfátovým pufrem a elucí ethylacetátem s přídavkem amoniaku.⁴¹

Pro průkaz benzodiazepinů s následnou instrumentací GC-MS byla Balíkovou a kol publikována metoda převedení benzodiazepinů na silylovanou formu po enzymové hydrolýze.⁴³

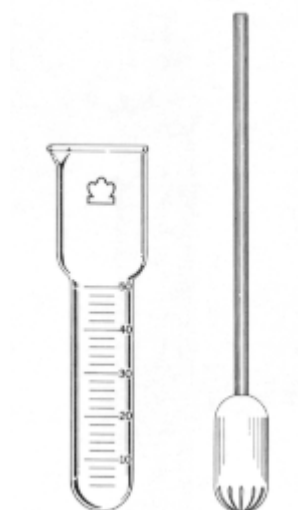
5.3 Forenzní praxe

Toxikologie forenzní diagnostikuje otravu na mrtvém lidském těle. Patří mezi ostatní toxikologické disciplíny, mnoho metod má společných s toxikologií klinickou a terapeutickým monitorováním léčiv. Závěry soudně lékařské toxikologie mají kriminalistický a právní význam.¹⁵

Možnost odběru biologického materiálu je limitována pouze možnostmi analytických metod a přístrojové techniky příslušné laboratoře. (HPLC, GC a tandemové techniky, zejména GC-MS⁴⁴ a SPE-LC-MS/MS⁴⁵). Post mortem jsou odebírány krev, moč, žaludeční obsah, orgány (játra, ledvina, slezina) a, je-li potřeba, také některý alternativní materiál, například vlasy. Problematika uvolnění benzodiazepinů z krve, moče a žaludečního obsahu je shodná s technikami klinické toxikologie. Po extrakci orgánů nacházíme metabolity a teprve při masivních otravách původní formu.

5.3.1 Extrakce benzodiazepinů z orgánů

Orgány je třeba nejprve homogenizovat. Pro homogenizaci malých množství měkkých tkání je nejvhodnější použití homogenizátoru dle Pottera a Elvehjema.¹⁵ Skládá se ze silnostěnné zkumavky a zabroušeného pístu, který je spojen s elektromotorkem. Do zkumavky se vloží tkáň, předem rozstříhaná na malé kousky. Po nasazení pístu se spustí motorek. Píst se zkumavkou zvolna posunuje nahoru a dolů. Homogenizace nemá trvat déle než 1 minutu, aby nedošlo k přílišnému zahřátí vzorku. Zkumavku je možné chladit v nádobce s ledem.(viz obr.13). Běžněji se homogenizuje pomocí speciálních laboratorních drtičů a mixérů.⁴⁶



Obrázek 13.: Homogenizátor dle Pottera a Elvehjema

Po zhomogenizování jsou orgány extrahovány metodou dle Dresslera.⁴⁷ Homogenizát je okyselen kyselinou vinnou a digerován ethanolem po dobu 48 hodin. Pak je ethanol zfiltrován a odpařen na vodní lázni. Odparek je dále rozpuštěn v horké vodě, ochlazen a extrahován metodou LLE s následnou instrumentací TLC. Velice účinnou a rychlou metodu používá Gross: 10g jater se extrahuje za tepla v ultrazvukové lázni 15-30 minut v acetonu. Po filtraci je aceton odpařen a ke zbytku je přidáno 5ml 1M kyseliny sírové. Vzorek je poté extrahován 2krát hexanem (po 5 ml), odstředěn a horní organická vrstva hexanu je oddělena za pomoci vakua. Vzorek jater ve zkumavce je po přidání uhličitanu sodného a 0,5 ml konc. amoniaku krátce protřepán. Následuje třepání vzorku 5ml chloroformu a centrifugace. Pak je za pomoci vakua oddělena horní vrstva obsahující vzorek jater, přenesena na kolonky naplněné síranem sodným a ponechána

eluovat. Eluát je tak připraven na analýzu GC-MS. Tuto metodu používá Gross také při zpracování moče, nebo séra , bez extrakce acetonem v ultrazvukové lázni.⁴⁸

5.3.2 Extrakce benzodiazepinů z vlasů

Vzorky vlasů mají v současné forensní toxikologii čím dál tím větší význam. Umožňují vytvořit profil dlouhodobého zneužívání benzodiazepinů, ale i jiných drog. Když uvážíme, že vlasy rostou rychlostí asi 1 cm za měsíc, můžeme sledovat hladiny látek v jednotlivých měsících. (sekvenční analýza). Volba vlasů také souvisí s dostupností dalšího biologického materiálu. Když je tělo v pokročilém stadiu rozkladu a není v důsledku rozkladných procesů možno žádný jiný materiál odebrat, jsou vlasy jedinou volbou. Postup pro odběr vlasů zatím nebyl standardizován. Patočka uvádí jako nejlepší způsob odebírat vlasy ze zadní části hlavy, kde je nejmenší variabilita v rychlosti jejich růstu. Odebraný vzorek se skladuje při pokojové teplotě v hliníkové folii nebo plastové trubici. Dále je nutné vzorek promýt saponáty, aby byly odstraněny rušivé látky. Vlasy jsou následně rozstříhány na fragmenty o délce 1 milimetru a homogenizovány. Dále se vzorek rozruší methanolem, kyselinou popřípadě alkalickým hydroxidem. Poté následuje LLE nebo SPE.^{49,50} Publikována byla extrakce pomocí MIPS.³¹ Vlastní stanovení je provedeno instrumentací GC-MS nebo LC-MS , popřípadě HPLC-MS. Musíme si ale v uvědomit, že analýza vlasů neprokáže akutní otravu, nebo zda byla příčinou smrti otrava. Může pouze prokázat, zda vyšetřovaný užíval delší dobu nějakou látku ve významnějších dávkách.

6. Shrnutí a závěr

V této rešeršní práci byla představena problematika přípravy biologického materiálu před vyšetřením na přítomnost benzodiazepinů jak z hlediska noxy, tak z hlediska metod úpravy biologického materiálu. V přehledu jsou uvedeny metody v laboratořích běžně používané, byť jsou možná některé na první pohled zastaralé. Praxe však ověřila jejich stálou platnost a spolehlivost a v řadě metod i jejich ekonomickou dostupnost, což platí hlavně pro forenzní praxi. Jsou zde však uvedeny i nové a moderní metodické přístupy, které mohou po ověření jejich účinnosti některé starší metody nahradit, eventuelně doplnit stávající metody, které jsou v laboratořích využívány. Vypracování této rešeršní práce bylo přínosem i pro mou profesi laborantky v laboratoři forenzní toxikologie Ústavu soudního lékařství a toxikologie I.LF UK a VFN v Praze. Seznámení s některými novými metodami mě inspirovalo k budoucímu vyzkoušení některých metod a jejich případnému zařazení mezi naše běžně používané metody.

7. Seznam použité literatury

1. Novotná J.: Čs.fyziologie,49,2000,č 4, s.199-207
2. Lüllmann H., Mohr K., Ziegler A., Bieger D. : Barevný atlas farmakologie, Grada, Praha 2001, s.192-193
3. [http:// www.eurochem.cz](http://www.eurochem.cz) 3/2007
4. Hartl J., Palát K., Doležal M., Miletín M., Opletalová V.: Farmaceutická chemie II., Karolinum, Praha 1993, s.30-31,34,64-67
5. <http://www.uzis.cz/> 3/2007
6. <http://sukl.cz> 3/2007
7. Faith L., Helia O. a kol.,: Liečivé látky a ich metabolity v analýze, Osveta, Martin 1987, s. 38-41
8. Večerková J.: Biotransformace léčiv a její význam pro toxikologickou praxi, Karolinum, Praha 1997 s.11-55
9. Mikroverze AISLP, dostupná z <http://intranet.vfn.cz/> 5/2007
10. Babjuk J., Perlík F., Šídlo Z.,: Bioanalytika léků. Avicenum, Praha 1990 s.31-65.

11. Loub L., Podrapská J., Zima T., Popov P., ÚKB VFN, Praha ,
dostupné na http://www.cskb.cz/Simple_version/Sjezd/abs_poster/p55.htm, 4/2007
12. Autorský kolektiv: Preanalytická fáze., Česká společnost
klinické biochemie ČSL JEP a SEKK s.r.o., 2005 s.13,47,56.
13. Večerková J.: Postupy při záchytu a identifikaci léčiv a jejich
metabolitů v biologickém materiálu pomocí chromatografie na
tenkých vrstvách., Univerzita Karlova v Praze, Praha 1983
s.137-146
14. Ticháček M., Drábková J.,: Akutní intoxikace po požití léků.,
dostupné na [http:// cls.cz/dp](http://cls.cz/dp) 4/2007
15. Vorel F.jun. a kol.: Soudní lékařství., Grada, Praha 1999, s.494-
510
16. Balíková M.: Forenzní a klinická toxikologie, Galén, Praha
2004, s.54,93,125.
17. <http://www.dynex.cz> 3/2007
18. <http://www.mnof.cz/okbprirucka/index.php?id=351> 4/2007
19. Káš J. Kodíček M. Valentová O.: Laboratorní techniky
biochemie. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze,
Praha 2006, s. 9-18

20. Pedersen-Bjergaard S., Rasmussen K.E.: J. Chromatogr. B 817, 2005, s. 3-12
21. Flanagan R.J., Morgan P.E., Spencer E.P., Whelpton R.: Biomed. Chromatogr. 20, 2006 s. 530-538
22. Santana F.J.M., Oliveira A.R.M., Bonato P.S.: Anal. Chimica Acta 549, 2005, s.96-103
23. <http://analyt.wz.cz> 4/2007
24. Wang. L, Zhao H, Qiu Y., Zhou Z. : J. chromatogr. A 1136, 2006, s. 99-105
25. Gaillard Y., Gay-Montchamp J-P., Ollagnier M.: J. chromatogr. 622, 1993, s.197-208
26. Saracino M.A., Gandolfi O., Albert L., Kenndler E., Raggi M.A.: J.Chromatogr. 1122, 2006, s.21-7
27. Stevens J., Crawford M., Robinson G., Roenneburg L.,: J.Chromatogr. A 1142, 2007, s.81-83
28. Cassas M., Berrueta L.A., Gallo B., Vincente F. : J.Pharm.Biomed.Anal 11(4-5), 1993, s. 277-84
29. de Zeeuw R.A., Wijsbeek J., Franke J.P.,: J. Anal.Toxicol., 24(2), 2000 s. 97-101

30. van Hout M.V., van Egmont W.M., de Zeev R.A., de Jong G.J. :
J. Chromatogr. B 766, 2001, s. 37-45
31. Ariffin M.M., Miller E.I., Cormack P.A., Anderson R.A.,: J.
Chem.,79(1) ,2007, s. 256-62
32. Akerman K.K., Jolkkonen J., Parviainen M., Penttila I.,: Clin.
Chem.,42 (9) 1996 : 1412-6
33. de Castro A. et al., J. Chromatogr. A, 2007,
10.1016/j.chroma.2007.01.137
34. <http://www.labicom.cz/default.aspx?section=5> 3/2007
35. Fusek M. : dostupné na <http://www.uochb.cas.cz/Bulletin272/fusek.html> 4/2007
36. Ulrich S.,: J. Chromatogr. A 902, 2000, s. 167-194
37. Zima T. a kol. Laboratorní diagnostika, Galén 2002,590-592
38. <http://www.mnof.cz/okbprirucka/index.php?id=396> 3/2007
39. <http://www.elektro-svet.eu/elektro/compex/produkty> 3/2007
40. West A., Kohler-Schmidt H., Baudner S., Blaschke G.,:Int
J.Legal Med. 1995,108(2):105-109

41. Drummer O.H.: J. Chromatogr. B 733, 1999, s. 27-45
42. Vorel F., Dědičová M., Lázníčková J.: Soud.Lék.51, 2006, č. 2
s.27-29
43. Balíková M. a kol. :Soud.Lék. 35, 1999, 44 č.3, s. 34-42
44. Fitzgerald R.L., Rexin D.A., Herold D.A.: J.Anal.Toxikol. 17(6)
1993: s.342-7
45. Cheng W-C., Yau T-S., Wong M-K., Chan L-P., Mok V. K-K.,:
Forens.Sc. Int, 162, 2006, s.95-107
46. <http://www.unimed.cz> 2/2007
47. Horáková O. a kol.: Materia pharmaceutica, Osveta, Martin 1987, s.
52-123
48. Gross R., ústní sdělení 2/2007
49. <http://toxicology.emtrading.cz/modules.php?name=News&file=article&sid=70> 4/2007
50. Racek J. et kol.: Klinická biochemie. Galén, Praha 2006, s.295

