

ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

ΠΡΟΣΑΝΑΤΟΛΙΣΜΕΝΗ ΣΕ

ΚΛΙΝΙΚΑ ΚΑΙ ΔΙΚΑΣΤΙΚΑ

ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΑ

Τζούλια Αττά – Πολίτου
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια
Εργαστηρίου Αναλυτικής Χημείας
Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Αθηνών

1

A. ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΟΥ ΕΞΥΠΗΡΕΤΕΙ ΤΟΥΣ ΣΚΟΠΟΥΣ ΤΗΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ



ΠΙΘΑΝΕΣ ΠΕΡΙΠΤΩΣΕΙΣ

- Δηλητηρίαση από γνωστό δηλητήριο
- Δηλητηρίαση από λήψη άγνωστης ουσίας
- Διαφορική διάγνωση
(τα παρατηρούμενα συμπτώματα προέρχονται από λήψη δηλητηρίου ή από νόσημα;)
- Έμμεσοι προσδιορισμοί
- Παρακολούθηση στάθμης θεραπευτικώς χορηγουμένων φαρμάκων με στόχο την εξατομίκευση της δόσολογίας)

2

ΑΙΤΙΑ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΕΩΝ

ΠΟΣΟΣΤΟ %

Φάρμακα	46,1
Είδη οικιακής χρήσης	26,6
Τρόφιμα	8,8
Διάφορες χημικές ουσίες	7,4
Δήγματα ερπετών και εντόμων	3,3
Καλλυντικά	3,2
Φυτοφάρμακα	3,5
Φυτά	1,1

3

ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΕΙΣ ΜΕ ΦΑΡΜΑΚΑ

ΠΟΣΟΣΤΟ %

Ηρεμιστικά	22,0
Ασπιρίνη	14,2
Αντιβιοτικά	9,3
Παυσίπονα	5,2
Αντιβηχικά	6,5
Αντιϊσταμινικά	4,2
Εξωτερικής χρήσης	4,1
Ωτικές και ρινικές σταγόνες	3,8
Ορμόνες	2,6
Καρδιαγγειακά	7,8
Βαρβιτουρικά	0,2
Διάφορα	20,1

4

ΟΞΕΙΑ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΗ ΑΠΟ ΓΝΩΣΤΟ ΔΗΛΗΤΗΡΙΟ

ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

1. Βαθμός έκθεσης στο δηλητήριο
2. Τρόπος και οδός επαφής
3. Ποσότητα
4. Σύγκριση με τοξική ή θανατηφόρο δόση
5. Πρώτες βοήθειες

5

ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΗ ΑΠΟ ΑΓΝΩΣΤΗ ΟΥΣΙΑ

• ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

1. Τρόπος επαφής (δέρμα, αναπνευστικό, πεπτικό)
2. Συμπτωματολογία
3. Χρόνος που μεσολάβησε από τη λήψη μέχρι τη δειγματοληψία
4. Βιολογικά δείγματα προς ανάλυση:
αίμα, ούρα, στομαχικό περιεχόμενο,
εμέσματα, υγρά πλύσης στομάχου

6

ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΗ ΑΠΟ ΑΓΝΩΣΤΗ ΟΥΣΙΑ

Γενικό Screening

Li	Γλουτεθιμίδιο
Br ⁻	Μετροβαμάτη
Paraquat	Αλκοόλη
Φαινοθειαζίνες	Παρακεταμόλη
Βενζοδιαζεπίνες	Σαλικυλικά
Βαρβιτουρικά	Μεθακουαλόνη
Τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά	

7

Η ΕΝΝΟΙΑ ΤΟΥ ΕΠΕΙΓΟΝΤΟΣ ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΟΥ ΣΤΗΝ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΕΙΣ ΟΞΕΙΩΝ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΕΩΝ

- Αποστολή δειγμάτων για τοξικολογική ανάλυση συνήθως **μετά** την παροχή πρώτων βοηθειών και τη συμπτωματική αγωγή
- Για την διενέργεια της τοξικολογικής ανάλυσης θα διευκόλυνε να γίνεται λήψη βιολογικών υγρών **πριν και μετά** τη χορήγηση της συμπτωματικής αγωγής
- Κριτήρια για την επιλογή της αναλυτικής μεθόδου (ταχεία, ευχερής, αναπαραγωγίμη, ευαίσθητη, εκλεκτική, εξειδικευμένη)
- Συνεκτίμηση της φύσης του βιολογικού υλικού και των χαρακτηριστικών της αναλυτικής μεθόδου
- Πλεονεκτήματα - Μειονεκτήματα βιολογικών υλικών
- Αναγκαιότητα ποιοτικού ή και ποσοτικού προσδιορισμού

8

ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ

ΔΗΛΗΤΗΡΙΑ

ΝΟΣΗΜΑΤΑ

Έμετος, διάρροια,
επιγαστρικό άλγος

άλατα βαρέων μετάλλων
οργανοφωσφορικοί εστέρες
παρασιτοκτόνα

γαστρίτιδα
κωλικός νεφρού
έμφραγμα μυοκαρδίου
έλκος στομάχου
ειλεός

Σπασμοί

οργανοφωσφορικοί εστέρες
χλωριωμένα εντομοκτόνα
στρυχνίνη
ατροπίνη
νικοτίνη

επιληψία
τέτανος
όγκοι εγκεφάλου
υπερπυρεξία

9

ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ

ΔΗΛΗΤΗΡΙΑ

ΝΟΣΗΜΑΤΑ

Κώμα

αλκοόλες
βαρβιτουρικά
οργανοφωσφορικοί εστέρες
οπιούχα

ουραιμία
οξέωση
εγκεφαλικό επεισόδιο

Μυδρίαση

ατροπίνη
σκοπολαμίνη
εφεδρίνη
αμφεταμίνη

επιληψία
γλαύκωμα

Μύση

οργανοφωσφορικοί εστέρες
οπιούχα
πιλοκαρπίνη
μουσκαρίνη

συνδρομές Κ.Ν.Σ.

10

ΕΜΜΕΣΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ

- Παράδειγμα :
προσδιορισμός μεθαιμοσφαιρίνης στο αίμα
- μεθαιμοσφαιρίνη δημιουργείται όταν ο Fe^{2+} της αιμοσφαιρίνης οξειδωθεί προς Fe^{3+}
- Μεθαιμοσφαιριναιμία προκαλείται από οξειδωτικά δηλητήρια (νιτρικά, χλωρικά, ναφθαλίνη, κ.λπ.)
- Εκδηλώσεις μεθαιμοσφαιριναιμίας
ανάλογες προς το ποσοστό της αιμοσφαιρίνης που έχει μετατραπεί προς μεθαιμοσφαιρίνη
15% : κυάνωση
30 - 40 % : δύσπνοια, αδυναμία, ζάλη
60% : αναπνευστική έκπτωση, αίμα σοκολατόχρουν

11

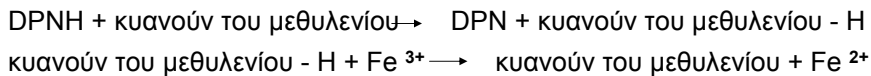
ΕΜΜΕΣΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ

- Παράδειγμα :
προσδιορισμός μεθαιμοσφαιρίνης στο αίμα
- Δεν απαιτείται η ταυτοποίηση της ένωσης που προκάλεσε την απόκλιση από το φυσιολογικό των επιπέδων της μεθαιμοσφαιρίνης στο αίμα (δηλαδή ποιο δηλητήριο προκάλεσε μεθαιμοσφαιριναιμία)
- Σε ποσοστό της μεθαιμοσφαιρίνης > 20 - 40%, χορηγείται το ειδικό αντίδοτο για την μεθαιμοσφαιριναιμία

12

ΕΙΔΙΚΟ ΑΝΤΙΔΟΤΟ ΓΙΑ ΜΕΘΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΑΙΜΙΑ : ΚΥΑΝΟΥΝ ΤΟΥ ΜΕΘΥΛΕΝΙΟΥ

- Σε συγκεντρώσεις μεθαιμοσφαιρίνης > 20 - 40% :
απαραίτητη η φαρμακευτική αναστροφή με αναγωγή του Fe^{3+}
της μεθαιμοσφαιρίνης προς τον Fe^{2+} της αιμοσφαιρίνης
- Για την αναστροφή χρησιμοποιείται διάλυμα κυανού του
μεθυλενίου που επιδρά στην ανηγμένη μορφή της
διπυριδινονουκλεοτίδης (DPNH) και ανάγεται σε λευκοβάση
του μεθυλενίου -H
- Πρώτες βοήθειες: χορήγηση οξυγόνου



13

ΠΟΡΕΙΑ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

- Κάθε περίπτωση είναι διαφορετική (case study)
- Η εμπειρία καθοδηγεί τον αναλυτικό τοξικολόγο στον τρόπο που θα μεθοδεύσει τα βήματα της τοξικολογικής ανάλυσης, ανάλογα με τη διατιθέμενη αναλυτική υποδομή του εργαστηρίου στο οποίο εργάζεται
- Η κλινική εικόνα του ασθενή (συμπτωματολογία) προσανατολίζει τον αναλυτικό τοξικολόγο σε πιθανά φάρμακα ή ουσίες που ενδεχομένως προκάλεσαν την οξεία δηλητηρίαση
- Ο αναλυτικός τοξικολόγος απαιτείται να έχει γνώσεις τόσο Αναλυτικής Χημείας όσο και Τοξικολογίας
- Παρακάτω παρατίθεται ενδεικτικά η πορεία μιας συνήθους τοξικολογικής ανάλυσης για την περίπτωση δηλητηρίασης από άγνωστο δηλητήριο που περιλαμβάνει τις αναλυτικές μεθόδους που αξιοποιούνται σε αναλύσεις ρουτίνας¹⁴

ΠΟΡΕΙΑ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

1. Screening test στα ούρα Χρωματοδεικτικές αντιδράσεις

- Γρήγορες προσανατολιστικές δοκιμασίες για την ανίχνευση φαρμάκων στα ΟΥΡΑ
- Ενδεικτικές
- Κατευθύνουν τα επόμενα βήματα της τοξικολογικής ανάλυσης

15

Screening test στα ούρα Χρωματοδεικτικές αντιδράσεις

Αντιδραστήριο	Πιθανή παρουσία	Χρώμα
αντιδραστήριο FeCl_3	σαλικυλικά	κυανοϊώδες
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4 + \text{NaHCO}_3$	paraquat	μπλέ
αντιδραστήριο FPN ($\text{FeCl}_3 + \text{HClO}_4 + \text{HNO}_3$)	φαινοθειαζίνες	ρόδινο -ιώδες
αντιδραστήριο Mandelin ($\text{NH}_4\text{VO}_3 + \text{H}_2\text{SO}_4$)	στρυχνίνη	ιώδες
Αντιδραστήριο Dragendorff (KBiI_4)	αλκαλοειδή	

16

ΠΡΟΣΑΝΑΤΟΛΙΣΤΙΚΟ SCREENING ΓΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΑ ΟΥΡΑ

2. ΣΥΣΤΗΜΑ TOXI-LAB

- Τυποποιημένο σύστημα που στηρίζεται σε χρωματογραφία επί λεπτής στιβάδος
- Σύστημα εκχύλισης για:
 - α) βασικά και ουδέτερα φάρμακα
 - β) όξινα και ουδέτερα φάρμακα

17

TOXI LAB



18

TOXI LAB

1. Extraction

Pipet the sample into the extraction tube. Mix and centrifuge.

2. Concentration

Place a blank disc in a concentration cup for each sample. Transfer the upper (organic) layer from the extraction tube into the cup. Evaporate the organic layer to concentrate the analyte onto the disc.

3. Inoculation

Insert the dry disc into one of the center spaces (sample channels) of the TOXI-LAB Chromatogram.

4. Development

Develop the TOXI-LAB Chromatogram in developing solution. Pink dye markers will migrate with the solvent front. Remove the TOXI-LAB Chromatogram and dry it briefly.

5. Detection

A broad spectrum of analytes can be detected and differentiated by position (R_f) and color reaction through the detection stages.



1



2



3



4

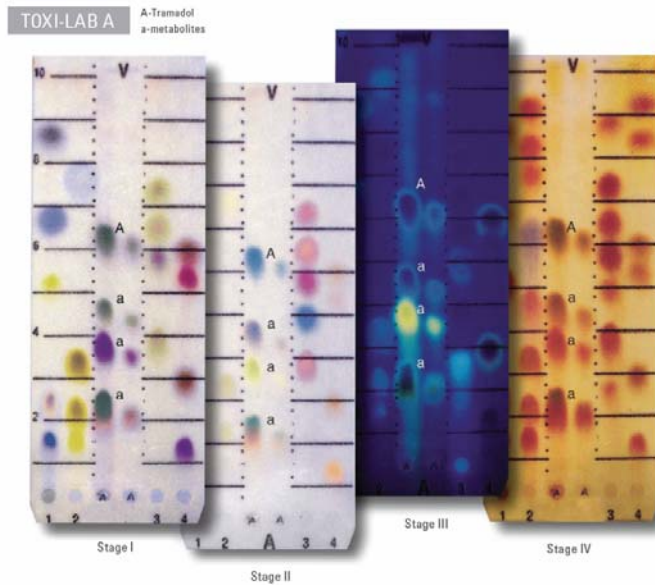


5

ΣΥΣΤΗΜΑ TOXI-LAB ΓΙΑ ΒΑΣΙΚΑ ΚΑΙ ΟΥΔΕΤΕΡΑ ΦΑΡΜΑΚΑ

- Διαδικασία εκχύλισης
5ml ούρα + ρυθμιστικό διάλυμα pH 9 + διαλύτης εκχύλισης
Συμπύκνωση οργανικού διαλύτη σε πλακίδιο που περιλαμβάνει δίσκο προσροφητικού υλικού
- Προσαρμογή του δίσκου σε ειδική επιστρωμένη πλάκα TLC που φέρει δίσκο με προσροφημένες πρότυπες ουσίες
- Διαλύτης ανάπτυξης
(μεθανόλη, νερό, οξικός αιθυλεστέρας, αμμωνία)
- Αντιδραστήρια εμφάνισης
 1. Ατμοί φορμαλδεΐδης
 2. αντιδραστήριο Mandelin (βαναδικό αμμώνιο+ H_2SO_4)
 3. Αντιδραστήριο Dragendorff ($KBiI_4$)
 4. Παρατήρηση πλάκας TLC κάτω από λάμπα υπεριώδους στα 366 nm και έλεγχος φθορισμού

ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΟΧΙ-LAB ΓΙΑ ΒΑΣΙΚΑ ΚΑΙ ΟΥΔΕΤΕΡΑ ΦΑΡΜΑΚΑ



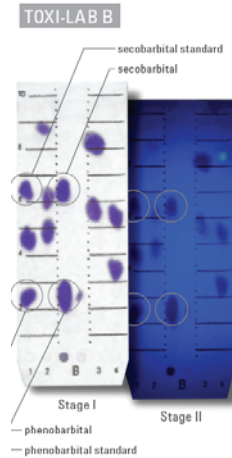
21

ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΟΧΙ-LAB ΓΙΑ ΟΞΙΝΑ ΚΑΙ ΟΥΔΕΤΕΡΑ ΦΑΡΜΑΚΑ

- Διαδικασία εκχύλισης
5ml ούρα + ρυθμιστικό διάλυμα pH 4,5 + διαλύτης εκχύλισης
- Συμπύκνωση οργανικού διαλύτη σε πλακίδιο που περιλαμβάνει δίσκο προσροφητικού υλικού
- Προσαρμογή του δίσκου σε ειδική επιστρωμένη πλάκα TLC που φέρει δίσκο με προσροφημένες πρότυπες ουσίες
- Διαλύτης ανάπτυξης
(χλωροφόρμιο, οξικός αιθυλεστέρας, αμμωνία)
- Αντιδραστήρια εμφάνισης
 1. Διάλυμα διφαινυλοκαρβαζόνης
 2. Διάλυμα νιτρικού αργύρου
 3. Διάλυμα νιτρικού υδραργύρου οξιτισμένο με H_2SO_4
 4. Παρατήρηση πλάκας TLC κάτω από λάμπα υπεριώδους στα 366 nm και έλεγχος φθορισμού

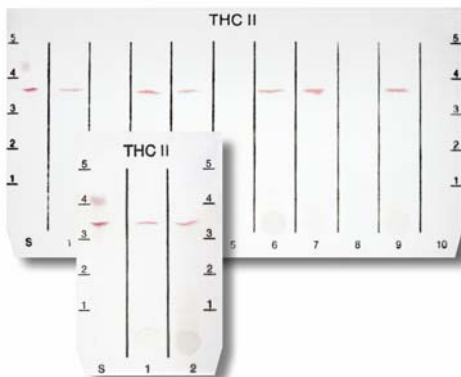
22

ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΟΧΙ-LAB ΓΙΑ ΟΞΙΝΑ ΚΑΙ ΟΥΔΕΤΕΡΑ ΦΑΡΜΑΚΑ



23

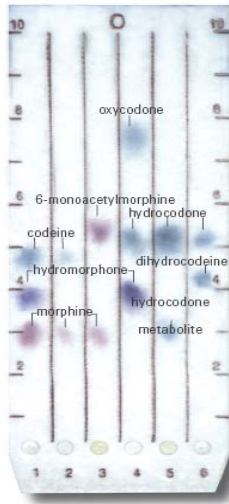
TOXI LAB D9-THC-COOH in urine (THC)



Screening or confirmation for
D9-THC-COOH (marijuana metabolite)
in urine

- Sensitivity:
15 ng/mL for both screening and
confirmation
- Quick: Results in 20 minutes.
- Specific: No interfering substances.
- Cost-effective: Low startup cost and no
capital investment. No expensive
instrument maintenance or maintenance
contracts.

24



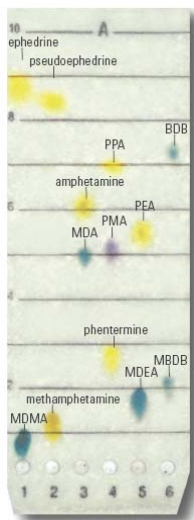
Differentiate individual opiates

LTD Opiate

When you need to know exactly which analyte produced a positive opiate class drug screen result, turn to the TOXI-LAB LTD Opiate System. With TOXI-LAB LTD, you can distinguish between morphine, normorphine, 6-monoacetylmorphine (6-MAM), hydromorphone, codeine, norcodeine, hydrocodone, dihydrocodeine, and oxycodone.

- **Quick:** Analyzes 10 to 20 specimens in 60 minutes.
- **Specific:** Differentiates individual drugs in the Opiate class.
- **Sensitive:** Limit of detection is 200 ng/mL.

25



Sympathomimetic Amine (SMA)

Differentiation Special Procedures

From ecstasy to methamphetamine, the TOXI-LAB Sympathomimetic Amine (Amphetamines) Special Procedures can help you quickly detect and differentiate SMAs - up to 10 specimens in 45 minutes.

- **Quick:** Analyzes 10 specimens in 45 minutes.
- **Specific:** Differentiates MDMA, MDA, MDEA, amphetamine, methamphetamine, PMA, MBDB and BDB, ephedrine/pseudoephedrine, phentermine, phenylpropranolamine, and phenethylamine.
- **Sensitive:** Limit of detection is 250-500 ng/mL for most SMAs.

26

3. ΠΡΟΣΑΝΑΤΟΛΙΣΤΙΚΟ SCREENING ΓΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΑ ΟΥΡΑ Ή ΤΟΝ ΟΡΟ ΜΕ ΤΗ ΒΟΗΘΕΙΑ ΑΝΟΣΟΧΗΜΙΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ

Πλεονεκτήματα

- Δεν απαιτείται προκατεργασία δείγματος
- Πολύ μικρός ο απαιτούμενος όγκος δείγματος
- Ταχύτητα στη λήψη αποτελεσμάτων

Μειονεκτήματα

- Διασταυρούμενη δραστικότητα

ΟΥΡΑ: Ποιοτικός έλεγχος (ανίχνευση)

ΟΡΟΣ: ημιποσοτικός προσδιορισμός

Όριο ανίχνευσης : ποικίλει ~1μg/ml

Cut off : ρυθμίζεται από τον αναλυτή

27

3. ΠΡΟΣΑΝΑΤΟΛΙΣΤΙΚΟ SCREENING ΓΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΑ ΟΥΡΑ Ή ΤΟΝ ΟΡΟ ΜΕ ΤΗ ΒΟΗΘΕΙΑ ΑΝΟΣΟΧΗΜΙΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ

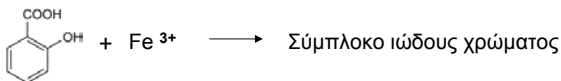
Κατηγορίες φαρμάκων που ελέγχονται στο δείγμα
(κριτήριο η συμπτωματολογία)

- Βαρβιτουρικά
- Αμφεταμίνες
- Οπιούχα
- Βενζοδιαζεπίνες
- Κανναβινοειδή
- Κοκαΐνη
- Παρακεταμόλη
- PCP
- κ.λπ.

28

4. ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑ ΣΤΗΝ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΑΛΙΚΥΛΙΚΩΝ ΣΤΟΝ ΟΡΟ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ TRINDER

1. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ



2. Αντιδραστήριο Trinder : $[\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 + \text{HgCl}_2 + \text{HCl}]$ σε νερό
3. Πρότυπα διαλύματα (working calibrators) : 20, 40, 100, 200, 500 mg/mL
από διαλύματα παρακαταθήκης 2g/L
4. Διαδικασία (procedure)

ΑΓΝΩΣΤΟ	ΠΡΟΤΥΠΑ	ΤΥΦΛΟ	ΔΕΙΓΜΑ ΕΛΕΓΧΟΥ
100 μL ορός	100 μL προτ. δ/τος	100 μL H_2O	100 μL ορός control
1mL H_2O	1mL H_2O	1mL H_2O	1mL H_2O
1mL Trinder	1mL Trinder	1mL Trinder	1mL Trinder

- α) Παραμονή διαλυμάτων για 5 λεπτά
 - β) Φυγοκέντρηση αγνώστου και δείγματος ελέγχου
 - γ) Διαχωρισμός υπερκειμένου
 - δ) Μέτρηση απορρόφησης υπερκειμένου σε $\lambda = 540\text{nm}$
 - ε) Κατασκευή καμπύλης αναφοράς από τα πρότυπα διαλύματα, A σε $\lambda = 540\text{nm}$
- $\text{ΣΑΛΙΚΥΛΙΚΑ (mg/L)} = (\text{A αγνώστου} / \text{A προτύπου}) \times \text{C προτύπου}$
ή μέσω της εξίσωσης της καμπύλης αναφοράς

29

ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑ ΣΤΗΝ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Ανίχνευση και φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός HbCO στο αίμα

HbO_2 : Φάσμα απορρόφησης με δύο μέγιστα στο ορατό
στα 579 και 542 nm (πρασινοκίτρινο τμήμα του φάσματος).

HbCO : Φάσμα απορρόφησης παρόμοιο με αυτό της HbO_2 με τη διαφορά
ότι η ταινία του κίτρινου είναι δεξιότερα μετατοπισμένη.

Δυσκολία διάκρισης HbO_2 και HbCO μέσω των φασμάτων απορρόφησης.

Χρησιμοποιείται έμμεση μέθοδος :

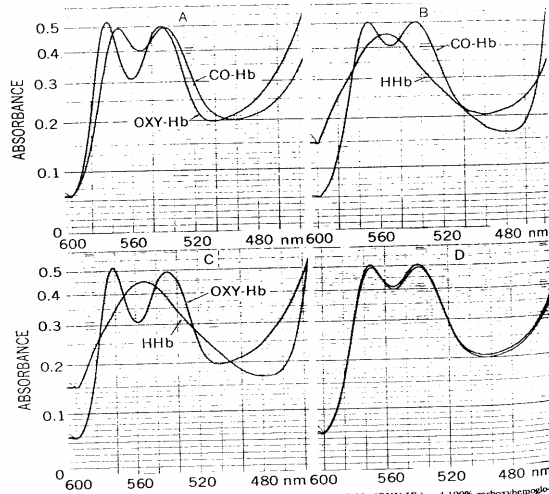
Προσθήκη αναγωγικής ουσίας στο δείγμα π.χ. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (διθειονικό Na)

- Σε περίπτωση HbO_2 : αναγωγή της HbO_2 προς Hb
Αντικατάσταση των δύο ταινιών απορρόφησης της HbO_2 από μία
πλατεία ταινία απορρόφησης της Hb στα 555 nm (στο ενδιάμεσο).
- Σε περίπτωση HbCO : λόγω σταθερού δεσμού δεν γίνεται αναγωγή.
Στο φάσμα παραμένουν οι δύο ταινίες απορρόφησης.

30

ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑ ΣΤΗΝ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Φάσματα HbO₂ και HbCO πριν και μετά την προσθήκη αναγωγικής ουσίας



F I G U R E 25-9. Spectral curves (overtraced). A, 100% oxyhemoglobin (OXY-Hb) and 100% carboxyhemoglobin (CO-Hb) before treatment with sodium dithionite. B, 100% oxyhemoglobin (now Hb) and 100% carboxyhemoglobin after treatment of both with sodium dithionite. C, 100% oxyhemoglobin before and after treatment with sodium dithionite. D, 100% carboxyhemoglobin before and after treatment with sodium dithionite. (Reproduced by permission of the Institute for Clinical Science, from Tietz, N.W., Fiereck, E.A.: The spectrometric measurement of carboxyhemoglobin. Ann. Clin. Lab. Sci., 3:36-42, 1973.)

31

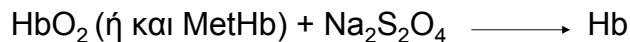
Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός HbCO στο αίμα

Σε ασθενώς αλκαλικό διάλυμα

HbO₂ λ = 576-578 και 540-542 nm

HbCO λ = 568-572 και 538-540 nm

Hb λ = 555 nm



Ο λόγος της απορρόφησης στα 541 και στα 555 nm (A_{541}/A_{555}) σχετίζεται γραμμικά με την % HbCO

32

5. ΑΕΡΙΟΣ ΚΑΙ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΓΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ

- Συνήθως αποτελεί το τελικό στάδιο της τοξικολογικής ανάλυσης για τις περισσότερες ουσίες εκτός από τα ναρκωτικά και τις ουσίες doping
- Χρησιμοποιούνται ποικίλοι ανιχνευτές
- Προσανατολίζεται στην κατηγορία φαρμάκων που έχει θεωρηθεί πιθανή από το προσανατολιστικό screening (βήματα 1,2,3,4)
- Εφαρμόζονται γενικές μέθοδοι για όξινα φάρμακα και άλλες για βασικά φάρμακα
- Προηγείται προκατεργασία και εκχύλιση του δείγματος
- Επιτυγχάνεται ταυτοποίηση και στη συνέχεια ποσοτικός προσδιορισμός
- Για ποσοτικό προσδιορισμό ενδείκνυται η χρήση εσωτερικού προτύπου
- Καμπύλη αναφοράς στο ίδιο βιολογικό υλικό (υπόστρωμα)
- Για ούρα: απαραίτητη η υδρόλυση (όξινη, αλκαλική ή ενζυμική)

33

ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

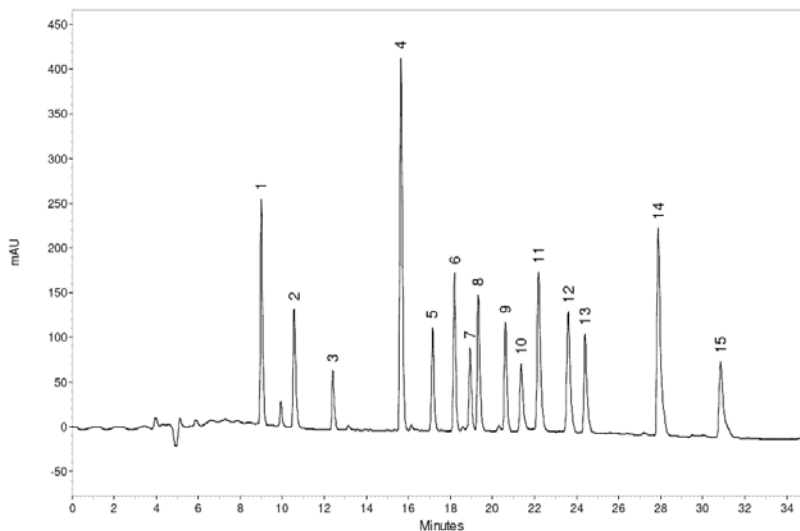


Figure 2. Chromatogram of 15 drugs standard solution ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$ each drug, detected at 210 nm). Conditions: Agilent TC-C18 column, 250 mm \times 4.6 mm, 5 μm ; detection wavelength, 210 nm; injection volume: 50 μL ; mobile phase, 20 mmol/L KH_2PO_4 buffer solution (pH 3.0) (A) and acetonitrile (B); flow rate, 1.5 mL/min; gradient elution: 0–30 min, 5% B–50% B; 30–35 min, 50% B–60% B. Peak identification: 1; alprazolam, 2; benzedrine, 3; atropine, 4; bucinazine, 5; chloridazepoxide, 6; doxapine, 7; fentanyl, 8; tetracaine, 9; haloperidol, 10; phenytoin, 11; oxazepam, 12; alprazolam, 13; domipramine, 14; diphenoxylate, 15; diclofenac.

6. ΑΕΡΙΟΣ ΚΑΙ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ ΓΙΑ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ

- LC/MS
- GC/MS
- Τεχνικές απαραίτητες για έλεγχο ναρκωτικών και doping ουσιών (φαρμακοδιέγερση) σε δείγματα ούρων και άλλων βιολογικών υλικών, λόγω της εξαιρετικής ευαισθησίας, εκλεκτικότητας και αξιοπιστίας τους.

35

7. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΟΣ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ INTERPRETATION OF RESULTS

Θα πρέπει το αποτέλεσμα της ανάλυσης να συμφωνεί με :

- Συμπτωματολογία του ασθενούς
- Πληροφορίες
- Στην τοξικολογική ανάλυση συχνότατα ανιχνεύονται τα φάρμακα που χορηγήθηκαν από τον θεράποντα γιατρό για την αντιμετώπιση των συμπτωμάτων του ασθενή (συμπτωματική αγωγή)
- Διερεύνηση του ερωτήματος:
έχει προκληθεί η κλινική εικόνα του ασθενούς από την ουσία που ανιχνεύθηκε κατά την τοξικολογική ανάλυση ή μήπως ανιχνεύθηκε η ουσία που χορηγήθηκε για την συμπτωματική αγωγή κατά την εισαγωγή του ασθενούς στο νοσοκομείο;

36

7. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΟΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

- Η σημασία του θετικού και του αρνητικού αποτελέσματος στην Τοξικολογία

θετικό αποτέλεσμα: δηλώνει λήψη

αρνητικό αποτέλεσμα : δεν δηλώνει αναγκαστικά την απουσία λήψης

- Η σημασία του ψευδώς θετικού και του ψευδώς αρνητικού αποτελέσματος στην τοξικολογική ανάλυση

37

B. ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΟΥ ΕΞΥΠΗΡΕΤΕΙ ΤΟΥΣ ΣΚΟΠΟΥΣ ΤΗΣ ΔΙΚΑΣΤΙΚΗΣ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ



- Ποικίλα τα πειστήρια (βιολογικά υλικά ή μη βιολογικά δείγματα, π.χ σκόνες, φυτά, κ.λπ.)
- Διερεύνηση της αιτίας του θανάτου:
Τοξικολογική ανάλυση σε μεταθανάτιο υλικό που λαμβάνεται κατά τη διενέργεια νεκροτομής (σπλάχνα και βιολογικά υγρά)
- Τοξικολογική ανάλυση σε βιολογικά υλικά (ζώντος ή θανόντος) για υπέρβαση δοσολογίας θεραπευτικώς χορηγούμενων φαρμάκων
- Τοξικολογική ανάλυση σε βιολογικά υλικά (ζώντος ή θανόντος) για ανίχνευση απαγορευμένων ουσιών (ναρκωτικά, doping)
- Τοξικολογική ανάλυση για απόδοση ευθυνών (οδήγηση υπό την επήρεια οινοπνεύματος)

38

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΙΑΤΡΟΔΙΚΑΣΤΙΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΗΛΙΔΩΝ ΑΙΜΑΤΟΣ

- Είναι πράγματι αίμα;
- Χρωστικές αντιδράσεις
(δίδουν ψευδώς θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα)
 - α) αντίδραση βενζιδίνης
 - β) αντίδραση πυραμιδόνης
- Φασματοφωτομετρική ανάλυση
φάσμα απορρόφησης της αιμοσφαιρίνης (στο ορατό)

39

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΙΑΤΡΟΔΙΚΑΣΤΙΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΗΛΙΔΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ

- Συνήθη ερωτήματα:
 - Είναι πράγματι σπέρμα;
 - Πρόκειται για βιασμό;
- Χρωματοδεικτικές αντιδράσεις
- Ανοσοβιολογικές μέθοδοι
- Ενζυμικές μέθοδοι
- Ανίχνευση για παρουσία όξινης φωσφατάσης.
Το ένζυμο περιέχεται στο φυσιολογικό ιστό του προστάτη σε μεγάλη συγκέντρωση

40

ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΤΟΞΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΔΙΚΑΣΤΙΚΗ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ

- οργανικά δηλητήρια
- μεταλλικά δηλητήρια
- αέρια δηλητήρια
- πτητικά δηλητήρια
- άλλα δηλητήρια

41

ΠΕΙΣΤΗΡΙΑ ΓΙΑ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΝΕΚΡΟΤΟΜΗ

- Δειγματοληψία
αίμα, ούρα, στομαχικό περιεχόμενο,
εντερικό περιεχόμενο, ήπαρ, τμήμα
εγκεφάλου, πνεύμονος, χολή, υαλοειδές
υγρό, νύχια, τρίχες, κ.λπ.
- Σωστή συσκευασία των πειστηρίων
- Συντήρηση των πειστηρίων
- Αποστολή στο τοξικολογικό εργαστήριο

42

ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

1. Πιθανή σήψη
2. Μεγάλη ποικιλία πειστηρίων
3. Παρουσία ουσιών σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις στα βιολογικά υγρά και στα σπλάγχνα

43

ΕΡΩΤΗΜΑΤΑ ΠΟΥ ΠΡΟΚΥΠΤΟΥΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΟΥ ΘΕΤΙΚΟΥ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

1. Ποσότητα του δηλητηρίου που έχει ληφθεί
Εκτιμάται από τις συγκεντρώσεις της ουσίας στα πειστήρια και αξιολογείται αν αντιστοιχούν σε θεραπευτικές, τοξικές ή θανατηφόρες δόσεις
2. Οδός από την οποία έχει ληφθεί το δηλητήριο
Αξιολογούνται οι συγκεντρώσεις στο αίμα και στο ήπαρ. Αν ο λόγος συγκεντρώσεων αίμα / ήπαρ είναι ≥ 3 , πιθανότερη η λήψη από το στόμα
3. Χρόνος που πέρασε από τη λήψη
4. Συχνότητα λήψης (εφ άπαξ ή χρόνια λήψη)

44

ΕΛΕΓΧΟΣ ΨΥΧΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΤΑ ΟΥΡΑ (drugs of abuse)

- **Κατηγορίες ουσιών**

1. οπιούχα
2. κανναβινοειδή
3. βενζοδιαζεπίνες
4. κοκαΐνη
5. φαινυλοκυκλιδίνη (PCP)
6. Διαιθυλαμίδιο του λυσεργικού οξέος (LSD)
7. Βαρβιτουρικά
8. Αμφεταμίνες
9. Συνθετικά ανάλογα της μορφίνης (π.χ. μεθαδόνη)

45

ΕΛΕΓΧΟΣ ΨΥΧΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΤΑ ΟΥΡΑ

- **ΑΝΟΣΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ** για προκαταρκτικό έλεγχο
- **GC /MS (ή LC /MS)** για ταυτοποίηση

cut off: κατώφλιο (όριο) αποδοχής θετικού αποτελέσματος
cut off > όριο ανίχνευσης (Detection Limit)

Το cut off τόσο για τον προκαταρκτικό έλεγχο όσο και για τον τελικό έλεγχο με GC/MS καθορίζεται από οργανισμούς όπως οι:

1. NIDA (National Institute on Drug Abuse)
2. DOD (Department of Defense)

46

ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΗ

- Η Δ9 τετραϋδροκανναβινόλη (Δ9 THC) είναι το σημαντικότερο ψυχοδραστικό συστατικό της ινδικής καννάβης
- Ο σημαντικότερος μεταβολίτης της Δ9 THC είναι το Δ9 THC –COOH και το γλυκουρονίδιό του



47

ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΗ – Βιομετατροπή

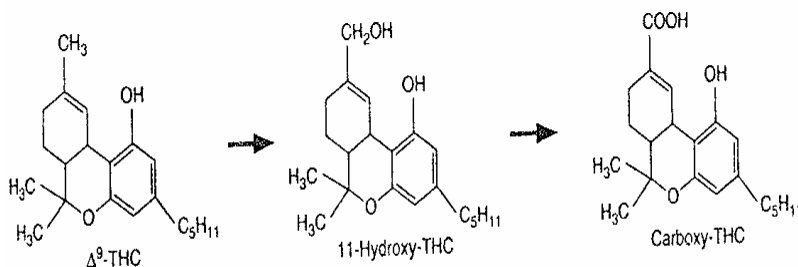


FIGURE 25-16. Principal metabolic route for THC in humans.

Εικόνα από βιβλιογραφία υπ.αριθμ.15, σελ. 1197

48

Έλεγχος κανναβινοειδών στα ούρα

1. Ανοσοχημική μέθοδος

(δεν διακρίνεται η πρόσφατη από τη χρόνια χρήση)

- calibrator : Δ^9 THC -COOH
- cut off: 100 ng/ml
- Διασταυρούμενη δραστικότητα: άλλοι μεταβολίτες
- Ανίχνευση:
 - μέχρι 2-5 μέρες από την τελευταία χρήση
 - Χρόνιοι χρήστες: μέχρι και 10 μέρες από την τελευταία χρήση και μερικές φορές θετικό αποτέλεσμα στα ούρα μέχρι και 3-4 εβδομάδες
- Προτιμότερη η έκφραση του αποτελέσματος ανά mg κρεατινίνης
- Σε παθητικό κάπνισμα : Δ^9 THC -COOH < 12 ng/ml
- **2. GC/MS**
- αλκαλική υδρόλυση, παραγωγοποίηση, cut off: 15 ng/ml

49

ΟΠΙΟΥΧΑ

➤ Το όπιο περιέχει 24 αλκαλοειδή τα σπουδαιότερα των οποίων είναι:

- Μορφίνη
- Κωδεΐνη
- Θηβαΐνη
- Παπαβερίνη



➤ Συνθετικά ανάλογα της μορφίνης:

- Προποξυφαίνιο
- Μεθαδόνη
- Μεπεριδίνη
- Φαιντανύλη

➤ Ειδικό αντίδοτο δηλητηρίασης με οπιούχα: ΝΑΛΟΞΟΝΗ

50

Ηρωίνη (Diacetylmorphine)

Παρασκευάζεται με ακετυλίωση της μορφίνης



51

ΟΠΙΟΥΧΑ - ΒΙΟΜΕΤΑΤΡΟΠΗ

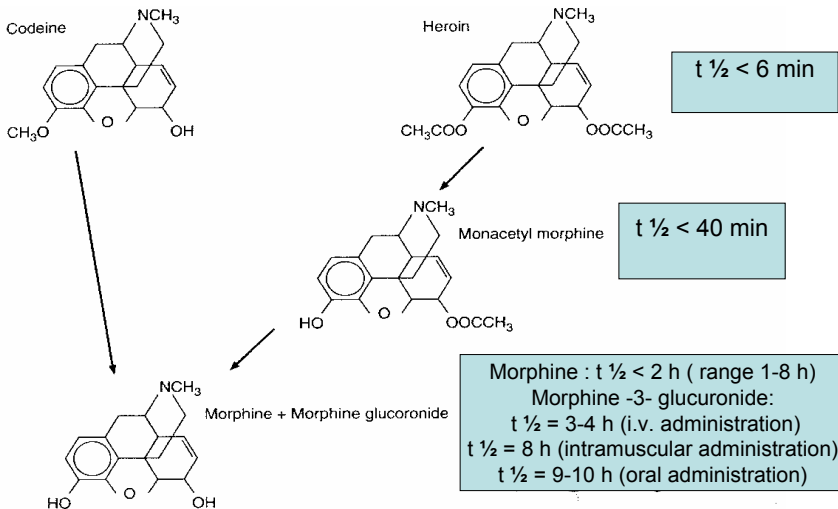


FIGURE 25-22. Metabolism of the opiates. (From Warner, A.: Opiates: Use, abuse, and current methods of detection and measurement. In-Service Training and Continuing Education, Vol. 9, No. 10. American Association for Clinical Chemistry, April 1988.)

Κωδεΐνη

- Διαθέτει **αντιβηχικές ιδιότητες** και μόλις το 10% των αναλγητικών ιδιοτήτων της μορφίνης
- Αποτελεί το δραστικό συστατικό πολλών αντιβηχικών σιροπιών.
Σε πολλά θεραπευτικώς χορηγούμενα φαρμακευτικά σκευάσματα η κωδεΐνη συνυπάρχει μαζί με μη ναρκωτικά αναλγητικά (π.χ. ασπιρίνη ή παρακεταμόλη)
- Μετά από λήψη **σκευάσματος κωδεΐνης**, το 10% της ποσότητας της κωδεΐνης μετατρέπεται σε μορφίνη, οπότε στα ούρα ανιχνεύεται τόσο η παρουσία κωδεΐνης όσο και μορφίνης.

Σε αυτή την περίπτωση :

Σε χρόνο < από 24 ώρες από τη λήψη του σκευάσματος :

➤ συγκέντρωση **κωδεΐνης** στα ούρα > συγκέντρωση **μορφίνης** στα ούρα

Σε χρόνο > από 24 ώρες από τη λήψη του σκευάσματος :

➤ συγκέντρωση **μορφίνης** στα ούρα > συγκέντρωση **κωδεΐνης** στα ούρα

- Η κωδεΐνη αποτελεί συνήθως πρόσμιξη της ηρωΐνης, οπότε :
σε χρήστες ηρωΐνης, είναι δυνατόν στα ούρα να ανιχνευθεί και κωδεΐνη.
Σε αυτή την περίπτωση :
➤ συγκέντρωση **μορφίνης** στα ούρα > συγκέντρωση **κωδεΐνης** στα ούρα
- Δύσκολη η διάκριση, κατά την ανάλυση των ούρων, μεταξύ χρήστη ηρωΐνης και ατόμου που ελάμβανε αντιβηχικό σκεύασμα κωδεΐνης.

53

Φαρμακευτικά σκευάσματα κωδεΐνης



54

Έλεγχος οπιούχων στα ούρα

1. Ανοσοχημική μέθοδος

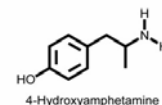
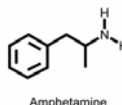
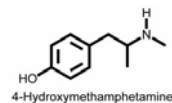
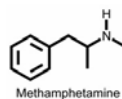
(cut off: 300 ng/ml)

Αποτέλεσμα σε ισοδύναμα μορφίνης (ng/ml)

- Ανίχνευση:
μέχρι 1-4 μέρες από την τελευταία χρήση
- **2. GC/MS**
- Απογλυκουροنيδοποίηση (β-γλυκουροنيδάση), παραγωγοποίηση

55

Αμφεταμίνη - Μεθαμφεταμίνη



- Διεγερτικά του Κ.Ν.Σ.
- Στα ούρα απεκκρίνεται το 30% της δόσης ως μητρική ουσία
- Με όξινη διούρηση (χορήγηση NH_4Cl) απομακρύνεται με νεφρική απέκκριση το 70% της ληφθείσας δόσης
- Το ecstasis υπάγεται στις αμφεταμίνες
- Έλεγχος στα ούρα

1. Ανοσοχημική μέθοδος

(cut off: 1000 ng/ml)

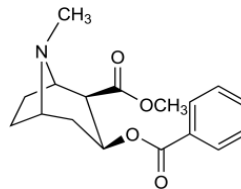
διασταυρούμενη δραστικότητα από συμπαθομιμητικές αμίνες
όπως:

εφεδρίνη, ψευδοεφεδρίνη, φαινυλπροπανολαμίνη, φαιντερμίνη

2. GC/MS : εκχύλιση, παραγωγοποίηση

56

Κοκαΐνη



- Διεγερτικό του Κ.Ν.Σ. ($t_{1/2} = 0,5-1h$)
- Βιομετατροπή: μεταβολίτες
 - α) βενζοϋλοεκγονίνη ($t_{1/2} = 4 - 7h$)
 - β) μεθυλεστέρας της εκγονίνης ($t_{1/2} = 3 - 4 h$)
- Έλεγχος στα ούρα
- 1. **Ανοσοχημική μέθοδος**
calibrator : βενζοϋλοεκγονίνη
(cut off: 300 ng/ml)
- Ανίχνευση:
 - μέχρι 1-3 μέρες μετά από εφ άπαξ χρήση
 - Χρόνιοι χρήστες: μέχρι και 10 - 12 μέρες από την τελευταία χρήση
- **2. GC/MS** : εκχύλιση, παραγωγοποίηση



57

DOPING - ΟΡΙΣΜΟΙ

1. Doping είναι η χορήγηση ή η χρήση από έναν αγωνιζόμενο κάθε είδους ουσίας που είναι ξένη προς το σώμα ή κάθε φυσιολογικής ουσίας σε μη φυσιολογική ποσότητα ή με μη φυσιολογικό τρόπο λήψεως, με μόνο σκοπό την τεχνητή αύξηση της σωματικής ικανότητας κατά τον αθλητικό συναγωνισμό
(Ειδική Επιτροπή Συμβουλίου της Ευρώπης, 1963)
2. Doping είναι οποιαδήποτε ενέργεια μεταβάλλει με οποιοδήποτε μέσο την αγωνιστική διάθεση
3. Doping είναι η παράβαση των νόμων ή των κανόνων των αρμόδιων αθλητικών οργανισμών που αφορούν τη χρήση ουσιών ή ομάδων ουσιών που οι οργανισμοί αυτοί έχουν απαγορεύσει
(Συμβούλιο της Ευρώπης, 1985)



58

Έλεγχος DOPING ουσιών στα ούρα Κατηγορίες ουσιών που προκαλούν φαρμακοδιέγερση

1. ψυχοκινητικά διεγερτικά
(αμφεταμίνες και παράγωγά τους)
2. Συμπαθομιμητικές αμίνες
(εφεδρίνη, μεθυλεφεδρίνη, μεθοξυφαιναμίνη, κ.λπ.)
3. Αναβολικά στεροειδή
(μεθυλοτεστοστερόνη, δεϋδρομεθυλοτεστοστερόνη, νανδρολόνη, μεθανδριόλη, κ.λπ.)
4. διεγερτικά του Κ.Ν.Σ.
(καφεΐνη, μικρορένη, βεμεγρίδη, κ.λπ.)
5. Αναλγητικά ναρκωτικά
(μορφίνη, κωδεΐνη, πεθιδίνη, κ.λπ.)

59

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Toxicology, the basic science of poisons, Casarett and Doull's, 7th edition, Editor: Curtis D. Klaasen, McGraw-Hill Publishing Co., 2008.
2. Disposition of toxic drugs and chemicals in man, R.C. Baselt, 8th edition, Biomedical Publications, Foster City, CA, ISBN 978-0-9626523-7-0, 2008.
3. General and Applied Toxicology, B. Ballantyne, T. Marrs, T. Syversen (editors), 3rd edition, 2009.
4. Principles of drug action, A. Goldstein, L. Aronow, S. Kalman, 2nd edition, J. Wiley, editor.
5. The pharmacological basis of therapeutics, Goodman and Gilman's, 11th edition, Laurence L. Brunton, editor in chief, John S.Lazo and Keith L. Parker, Associate editors, McGraw – Hill International editions.
6. Fundamental toxicology for chemists, J. Duffus and H. Worth, The Royal Society of Chemistry, 1996.
7. Forensic Science, Andrew R.W. Jackson, Julie M. Jackson, 2nd edition, (Chapter 7: Forensic Toxicology and drugs of abuse), Pearson Education Limited, 2008.
8. Τοξικολογία, Α. Κουτσελίνη, Εκδόσεις Γ. Παρισιάνος, 2004.
9. Τοξικολογία του ανθρώπου, Κ. Χουρδάκης, 2^η έκδοση, University Studio Press, 2004.
10. Τοξικολογία, Σ. Αθανασέλης, Μ. Στεφανίδου – Λουσιδου, Α. Ντονά, Υπουργείο Εθνικής Παιδείας και Θρησκευμάτων, Παιδαγωγικό Ινστιτούτο. Οργανισμός Εκδόσεως Διδακτικών Βιβλίων, Έκδοση 2006.
11. Εγχειρίδιο δηλητηριάσεων, Π. Βλάχος, 1996, Ιατρικές Εκδόσεις Ζήτα.
12. Ιατροδικαστική, Α. Κουτσελίνη, Εκδόσεις Γ. Παρισιάνος, 2002.
13. Τοξικολογία, Γ. Αγιουτάντη, Εκδόσεις Γ. Παρισιάνος, 1973.
14. Forensic Science, Andrew R.W. Jackson, Julie M. Jackson, 2nd edition, (Chapter 7: Forensic Toxicology and drugs of abuse), Pearson Education Limited, 2008.
15. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 2nd edition, Carl A. Burtis, Edward R. Ashwood, Editors, 1994
16. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons, edition 2003, Editors A. C. Moffat, M. D. Osselton, B. Widdop

60