2/06/zlom 6.4.2006 10:24 Stránka 103
proLékaře.cz | 5.12.2026

Srovnání enzymatické a kyselé hydrolýzy při toxikologickém screeningu z malého množství moče

Vorel F., Dědičová M., Lázničková J.

Soudnělékařské oddělení Nemocnice České Budějovice, a.s.

Souhrn

V práci je prezentován toxikologický screening zaměřený na průkaz kyselých, neutrálních a bazických léčiv a drog v moči. Je srovnávána výtěžnost hydrolytického štěpení pomocí ß-glukuronidázy (enzymatická hydrolýza) a pomocí 0,1 M kyseliny chlorovodíkové (kyselá hydrolýza) ze 2 ml moče po extrakci na pevné fázi (SPE) a identifikaci plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí (GC-MS).
Paracetamol, buprenorfin a morfin mají výrazně vyšší výtěžnost při použití enzymatické hydrolýzy. Naopak hydrolýza 0,1 M kyselinou chlorovodíkovou se jeví vhodnější pro průkaz benzodiazepinů. Je časově i finančně méně náročná, extrakty obsahují méně balastních látek z matrice.

Klíčová slova: toxikologický screening – léčiva, drogy – hydrolýza – SPE, GC-MS

Summary

The Comparison of the Enzymatic and the Acid Hydrolyse at the Toxicological screening of the small amount of Urine

The article deals with the toxicological screening directed at the identification and confirmation of the acid, neutral and basic medicaments and drugs in the urine. The efficiency of the hydrolysation using ß-glukuronidase (enzymatic hydrolyses) and using 0.1M hydrochloric acid (acid hydrolyses) from 2 ml of the urine were compared. The solid phase extraction (SPE) and the GC-MS identification were used.
The efficiency of the extraction of paracetamol, buprenorphine and morphine is better by means of the enzymatic hydrolyses. Vice-versa the acid hydrolyses appears to be more applicable for benzodiazepines. The acid hydrolyses is faster and cheaper and the extracts contain less of the ballast materials.

Key words: toxicological screening – medicaments, drugs – hydrolysis – SPE, GC-MS

Soud Lék., 51, 2006, No. 2, p. 27–29

Úvod

V toxikologické praxi se stále častěji setkáváme se žádostí o toxikologické vyšetření, kdy je k dispozici pouze zkumavka krve (většinou po stanovení koncentrace etanolu) a zkumavka (2-7 ml) moče (1). Jde tedy o záchyt a průkaz širokého spektra toxikologicky významných látek ve velmi nízké koncentraci z malého objemu materiálu, obsahujícího navíc mnoho balastních, vyšetření znesnadňujících látek.

Imunochemické metody umožní skupinový záchyt drog a některých léků v moči. Jde však o orientační vyšetření, které nelze samo o sobě ve forenzních případech akceptovat, neboť zde je nutná nezpochybnitelná identifikace jednotlivých látek, eventuálně stanovení jejich koncentrací v krvi pro posouzení ovlivnění. Navíc mnoho toxikologicky významných látek takto zachytit ani nelze.

Drogy, léčiva a jejich metabolity se vylučují močí jednak ve volných extrahovatelných formách a jednak vázané ve formě konjugátů, nejčastěji s kyselinou glukuronovou (2). Pro úspěšnou extrakci organickou fází je nutné vazbu na konjugáty uvolnit. Nejběžnějším způsobem uvolnění vazeb je hydrolytické štěpení. V praxi se provádí buď pomocí enzymu, nebo minerální kyselinou event. hydroxidem (např. izolace kanabinoidů) (3, 4). Použití koncentrované kyseliny chlorovodíkové je účinné pro štěpení vazby na konjugát, ale zároveň dochází i k změnám struk-

2/06/zlom 6.4.2006 10:24 Stránka 104
proLékaře.cz | 5.12.2026

tury některých labilních analytů (6-monoacetylmorfin – morfin, benzodiazepiny – benzofenony). Při použití 0,1 M kyseliny chlorovodíkové dochází k rozštěpení glukuronidové vazby, ale 6-monoacetylmorfin (6-MAM) je možné zachytit (5).

V práci je porovnána výtěžnost analytů po hydrolytickém štěpení pomocí ß-glukuronidázy/arylsulfatázy a 0,1 M kyseliny chlorovodíkové.

Pro izolaci analytů byla použita extrakce na pevné fázi na kolonkách SPEC Plus 3 ml DAU. Původní formy, acetylderiváty a silylderiváty byly analyzovány pomocí GC-MS.

Materiál

K porovnání účinnosti hydrolýzy byly použity moče od dobrovolníků a moče odebrané při pitvách. Vzorky močí obsahovaly léčiva a drogy kyselé, neutrální a bazické povahy, ve volné či vázané formě, původní formy a metabolity v terapeutických koncentracích. Z nich byl připraven zásobní směsný vzorek, který obsahoval: ibuprofen, paracetamol, fenobarbital, propyfenazon, metamfetamin, tramadol, bromazepam, 7-aminoflunitrazepam, kodein, morfin, 6-MAM, buprenorfin. Jako interní standard byl použit metaqualon.

Metoda

Princip

Směsný vzorek moči s obsahem léčiv a drog byl podroben jednak hydrolýze enzymatické (HE) a jednak kyselé 0,1 M kyselinou chlorovodíkovou (HK). Hydrolyzáty byly extrahovány na kolonce SPEC PLUS 3 ml Dau a analyzovány GC-MS bez derivatizace, po silylaci a po acetylaci.

Chemikálie

Všechny použité chemikálie byly v kvalitě p.a.

ß-glukuronidáza /arylsulfatáza Helix Pomatia, aktivita ß-glukuronidázy 30 F.U./ml, aktivita arylsulfatázy 60 F.U./ml, Merck

Extrakční kolonky SPEC PLUS 3 ml DAU, ANSYS Technologies, INC.

Silylační činidlo N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid with 1% Trimethylchlorsilane, BSTFA s 1% TMCS, Fluka

Standardy

Metamfetamin.HCl, tramadol.HCl, fenobarbital, kodein, 7-aminoflunitrazepam, morfin.HCl trihydrát, 6-monoacetylmorfin.HCl hydrát a buprenorfin.HCl byly dodány firmami Alltech, Sigma, Fluka, Radian International.

Ibuprofen, paracetamol, bromazepam, propyfenazon a metaqualon byly získány z lékových přípravků.

Podmínky GC-MS

plynový chromatograf s hmotnostním detektorem Finnigan MAT 9001 GCQ plus

kapilára DB-5, 30 m x 0,25 mm x 0,25 mm, J.W.Scientific, Folsam, USA

teplota splitless injektoru 260 °C

teplota MS transfer line 250 °C

teplota iontového zdroje 200 °C

teplotní program: 60 °C, po 1 min. 20 °C /min. do 250 °C, 250 °C konstantně po dobu 21,5 min., 30 °C /min do 270 °C, 270 °C konstantně po dobu 7 min.

150 °C, po 2 min. 30 °C /min. do 290 °C, 290 °C konstantně po dobu 20,5 min

hmotnostní detektor v módu EI, rozsah 55 až 400 m/z

průtok nosného plynu helia 1,25 ml/min

nástřik 1 ml extraktu

Hydrolýza enzymatická

2 ml moči, interní standard metaqualon (200 ng), 60 µl ß-glukuronidázy/arylsulfatázy a 0,7 ml 0,1M acetátového pufru pH 4 bylo inkubováno 2 hod. při 65 °C. Po ochlazení byl hydrolyzát odstředěn při 3000 ot/min po dobu 5 minut a supernatant podroben extrakci na kolonce SPEC PLUS 3 ml DAU.

Hydrolýza 0,1M kyselinou chlorovodíkovou

2 ml moči, interní standard metaqualon (200 ng) a 0,2 ml 0,1M kyseliny chlorovodíkové (event. více – výsledné pH 4) bylo inkubováno po dobu 30 min. při 120 °C. Po ochlazení byl hydrolyzát odstředěn při 3000 ot/min. po dobu 5 min. a supernatant podroben extrakci na kolonce SPEC PLUS 3 ml DAU.

Extrakce na kolonce SPEC PLUS 3 ml DAU

1. 500 µl methylalkoholu
2. 500 µl destilované vody
3. upravený vzorek moči
4. 500 µl destilované vody
5. 500 µl acetátového pufru pH 4
6. vakuum 5 min.
7. 500 µl n-hexanu
8. vakuum 2 min.
9. eluce: 1 ml ethylacetát : methylalkohol 98 : 2 2 ml dichlormethan : isopropylalkohol : hydroxid amonný 4 : 1 : 0,1
10. odpaření rozpouštědla při 40°C v proudu dusíku
11. rozpuštění odparku ve 100 µl methylalkoholu – analýza GC-MS
12. odpaření 50 µl methylalkoholového extraktu

2/06/zlom 6.4.2006 10:24 Stránka 105
proLékaře.cz | 5.12.2026

a derivatizace 50 µl BSTFA s 1% TMCS v etylacetátu (1 : 3, 70 °C, 30 min.) – analýza GC-MS

13. odpaření 40 µl methylalkoholového extraktu a derivatizace 50 µl anhydridu kyseliny octové v pyridinu (3 : 2, 60 °C, 30 min.) – analýza GC-MS

Výsledky

Izolace kyselých, neutrálních i bazických látek z moče je provedena postupně a eluáty spojeny v jeden výsledný extrakt.

Tab. 1. Relativní koncentrace léčiv a drog v moči po hydrolýze enzymatické (HE) a po hydrolýze 0,1 M kyselinou chlorovodíkovou (HK) bez derivatizace (relativní koncentrace po HE = 1).

Látka	HK
Ibuprofen	1,05
Paracetamol	stopy
Fenobarbital	1,06
Propyfenazon	0,79
Kodein	0,42
Metamfetamin	0,50
Tramadol	0,89
Bromazepam – HY (ABB)	1,44
7-aminoflunitrazepam	1,53

Tab. 2. Relativní koncentrace léčiv a drog v moči po hydrolýze enzymatické (HE) a po hydrolýze 0,1 M kyselinou chlorovodíkovou (HK) po silylaci (relativní koncentrace po HE = 1).

Látka	HK
Kodein.TMS	0,43
Morfin.2TMS	0,12
6-MAM.TMS	1,41

Tab. 3. Relativní koncentrace léčiv a drog v moči po hydrolýze enzymatické (HE) a po hydrolýze 0,1 M kyselinou chlorovodíkovou (HK) po acetylaci (relativní koncentrace po HE = 1).

Látka	HK
Paracetamol.AC	0,22
Buprenorfin.AC	0,14

Výsledky koncentrací analytů jsou průměrem ze 3 analýz a jsou uvedeny v relativních hodnotách. Koncentrace léčiv a drog po hydrolýze enzymatické odpovídají relativní hodnotě 1 a k té jsou vztaženy relativní koncentrace léčiv a drog po hydrolýze 0,1 M kyselinou chlorovodíkovou. Pro porovnání byl použit jako interní standard metaqualon.

Relativní hodnotu koncentrací léčiv a drog bez derivatizace, po silylaci a po acetylaci uvádí tab. 1- 3.

Diskuse

Paracetamol, buprenorfin a morfin mají výrazně vyšší výtěžnost při použití enzymatické hydrolýzy. Větší nález morfinu po HE lze částečně vysvětlit vyšším stupněm rozkladu 6-MAM na morfin, jak vyplývá ze srovnání výtěžnosti obou hydrolýz pro 6-MAM.

Naopak hydrolýza 0,1 M kyselinou chlorovodíkovou se jeví se jako vhodnější pro průkaz benzodiazepinů. Je časově i finančně méně náročná, extrakty obsahují méně balastních látek z matrice.

Závěr

Hydrolytické štěpení moče, extrakce na pevné fázi a analýza GC-MS umožňuje ve spojení s imunochemickými metodami komplexní toxikologický screening pro malé množství materiálu. Dává obraz o přítomnosti léčiv a drog v moči a tím usnadní další cílený záchyt event. stanovení koncentrace v krvi.

Literatura

1. **Balíková, M.:** Vývojové trendy toxikologických vyšetření v praxi. Soud. Lék., 49, 2004, 1, s. 7–10. – 2. **Večerková J.:** Biotransformace léčiv a její význam pro toxikologickou praxi. Karolinum, Praha 1997. – 3. **Balíková, M., Marešová, V., Večerková, J.:** Citlivý GC-MS průkaz benzodiazepinů v moči ve formě jejich trimethylsilylderivátů. Soud. Lék., 44, 1999, 3, s. 34–42. – 4. **Pfleger, K., Maurer, H., H., Weber, A.:** Mass Spectral and GC Data of Drugs, Poisons, Pesticides, Pollutans and their Metabolites. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim 1992. – 5. **Polettini A., Stramesi C., Vignali C., Montana M.:** Determination of opiates in hair. Effects of extraction methods on recovery and on stability of analytes. Forensic Sci Int, 84, 1997, s. 259–269.

MUDr. František Vorel, CSc.
Soudnělékařské oddělení
Nemocnice České Budějovice, a.s.
B. Němcové 44
370 87 České Budějovice