

Praktické cvičení č.9

datum _____ jméno _____

Téma praktika:

Seznámení se systémem TOXI LAB pracujícím na principu TLC
Seznámení s toxikologickým screeningen s využitím kazet
Seznámení s přístrojem VIVA – E (Siemens) a stanovením drog na přístroji Cobas 6000

Přístroje a pomůcky:

TOXI LAB:
Extrakční zkumavky- TOXI-TUBES A (dodáváno firmou ANSYS)
Centrifuga - typ T62.2
Koncentrační kalíšky- Disposable Concentration Cups (kat.č. 152)
OMEGA -12 Extraction Solvent Concentrator and Screen –používá se pro zakoncentrování vzorků (kat.č.153)
Elektrický ohřívač (kat.č. 118)
Chromatogram – TOXI•GRAM 106A (kat.č. 106A)
Vzorkové disky – TOXI•DISCS Blank A (kat.č.186)
Vyvíjecí chromatografická komora s uzávěrem - Chromatography Jar with Cap (kat.č. 113A)
Reagenční komora s uzávěrem – TOXI •DIP A-2 Reagent Jar with Cap (kat.č. 114A-2)
Reagenční komora s uzávěrem – TOXI •DIP H₂ O Reagent Jar with Cap (kat.č. 114A-H₂O)
Jehla pro manipulaci se vzorkovými disky

Úkoly:

- 1) Seznámení se systémem TOXI LAB a průkaz Prothazinu tímto systémem

TOXI•LAB je systém založený na principu chromatografického dělení na tenké vrstvě (TLC) určený pro detekci a identifikaci léčiv v moči. Chromatografické dělení probíhá na základě kombinace rozdělovací (dle rozpustnosti) a absorpční chromatografie (dle afinity k nosiči). Souprava je určena pouze pro kvalitativní průkaz léčiv v moči.

Pracovní postup zahrnuje extrakci , zakoncentrování, eluci, vlastní chromatografii a detekci. Vzorek moči je extrahován do rozpouštědla pomocí extrakční zkumavky. Extrakt je naaplikován a zakoncentrován ve speciální kovové koncentrační misce na malý disk. Vysušený disk s naaplikovaným extraktem je vložen do chromatogramu a chromatogram vyvíjen v malém množství organického rozpouštědla. K eluci analytu ze vzorkového disku na chromatogram dojde během migrace vyvíjecího činidla. Jakmile vyvíjecí činidlo dosáhne nejvyšší pozice (9,5 cm) chromatogram se vysuší při 100 °C (±20°C) asi 30-60 s. Po ponoření chromatogramu do koncentrovaného detekčního činidla se ihned objeví barevná reakce v místě standartu a vzorku, poté se ponoří do vody, může se prohlédnout v UV světle a event. postříkat Dragendorffovým činidlem. Vyhodnocení se provádí pomocí DRUG COMPENDIA.

Reagencie:

Extrakční činidlo – octan etylnatý

Eluční činidlo- ethylacetát a koncentrovaný amoniak- příprava: smíchat 3 ml (A Developing

Solution– ethylacetát) + 20 µl konc. amoniaku, nalít před stanovním do vyvíjecí chromatografické komory s uzávěrem (Chromatography Jar)

Pracovní postup:

1. Extrakce vzorku do rozpouštědla pomocí extrakčních zkumavek TOXI•TUBES
 - do zkumavky TOXI•TUBES napipetovat 5 ml vzorku moče
 - míchat převrácením zkumavky 2-5 minut
 - centrifugovat při 2 500 ot/min po dobu 5 minut
2. Vysušení vzorku
 - popsat konc. kalíšek jménem pacienta
 - do koncentračních kalíšků vložit vzorkové disky -TOXIDISCS Blank A
 - napipetovat získaný čistý extrakt do označeného kalíšku
 - paralelně do dalšího kalíšku napipetovat standart léku
 - kalíšky vložit do OMEGA -12 Extraction Solvent Concentrator , přikrýt mřížkou a umístit na elektrický ohřívač a nechat vysušit
3. Nanesení vzorku na chromatogram TOXI•GRAM
 - pomocí jehly nanést vzorkový disk na určené místo na chromatogram A s předpipetovanými standardy
 - po nanesení vzorkového disku položit na elektrickou plotnu, mimo startovací místo (asi 2 min.)
4. Chromatografie
 - připravit čerstvé eluční činidlo do vyvíjecí chromatografické komory (Chromatography Jar)
 - vložit chromatogram do vyvíjecí chromatografické komory
 - skvrny nechat dojít do konce chromatogramu (asi 9,5 cm)
 - vyjmout, položit na elektrickou plotnu mimo startovací místo a nechat vysušit (asi 1 min.)
5. Detekce
 - nalít formaldehyd na dno nádoby A-1 tak, aby nedosahoval po červené dno
 - chromatogram vložit do nádoby A-1 s formaldehydem přibližně na 2 min.
 - vyjmout, položit na elektrickou plotnu mimo startovací místo a nechat vysušit
 - vložit do reagenční komory (TOXI•DIP A-2 Reagent Jar) s koncentrovanou kys. sírovou, po chvíli vyjmout a držet nad parami vyvíjecího činidla až do objevení se žluté skvrny meperidinu – dráha 1 uprostřed vyvíjecí dráhy.
 - vyjmout a vložit do reagenční komory (TOXI •DIP H₂ O Reagent Jar) s deionizovanou vodou
 - vyjmout, položit na sklo a vyhodnotit

Závěr:

- 2) Seznamte se s kazetami na toxikologický screening od firmy ALLDIAG
 - a) kazety na jednotlivé drogy
 - b) multidrokové kazety na deset drog

Výsledek – pozitivní, negativní nebo hraniční.

3) a) Krátké seznámení s přístrojem VIVA – E

Princip:

Jedná se o techniku Emit® II - homogenní enzymatická imunoanalytická technika sloužící k analýze specifických složek v lidské moči. Test je založen na kompetici mezi látkou ve vzorku a látkou značenou enzymem glukoso-6-fosfát dehydrogenázou (G6PDH) o vazebná místa na protilátce. Aktivita enzymu klesá při vazbě na protilátku, proto lze koncentraci látky ve vzorku měřit podle změny aktivity enzymu. Aktivní enzym mění nikotinamidadenindinukleotid (NAD) na NADH, což způsobí změnu absorbance, která se měří spektrofotometricky. Endogenní sérová G6PDH neinterferuje, protože koenzym NAD působí pouze s bakteriálním enzymem (*Leuconostoc mesenteroides*) použitým v tomto testu.

Metoda je semikvantitativní – skupinový test.

b) Stanovení drog na přístroji Cobas 6000

Stanovení je založeno na kinetické interakci mikročástic v roztoku (KIMS), která je měřena jako změna průchodu světla. V případě absence látky ve vzorku se volné protilátky váží na látku vázanou na mikročástici, a vytváří agregáty. Jak probíhá agregace ve vzorku, který neobsahuje drogu, absorbance roste. Jestliže vzorek moči obsahuje dotyčnou látku, probíhá kompetice s částicemi s navázaným derivátem látky o volné protilátky. Protilátka vázaná na drogu ve vzorku není již dostupná pro podporu agregace částic a následný vznik struktury částic je inhibován. Přítomnost drogy ve vzorku úměrně snižuje nárůst absorbance vůči koncentraci drogy ve vzorku. Obsah drogy ve vzorku je určen poměrem ke známé hodnotě cut-off koncentrace drogy.

Metoda je semikvantitativní – skupinový test.