

# Etanol

Miroslava Beňovská

# Etanol

- Etanol je obsažen v alkoholických nápojích: whisky, slivovice apod. obsahují 30 – 60 %, vína 6 – 12 % a pivo 2 – 5 % etanolu

V klinické praxi se vyskytují:

- Projevy chronického zneužívání (alkoholické léčebny, psychiatrie)
- Akutní otravy způsobené záměrným nebo i náhodným požitím velkého množství etanolu, často v kombinaci s požitím různých léků a drog

Klinická oddělení potřebují rychle

- potvrdit či vyloučit otravu alkoholem
- zvolit odpovídající terapii

K tomu nejčastěji slouží **enzymatické stanovení etanolu**

# Etanol

- Po požití se etanol rychle vstřebává již v žaludku ( rychleji na lačno)
- Rychle proniká prakticky všemi membránami včetně placenty

- Poměrně rychle se v organismu metabolizuje:  
nejdříve působením alkohol - dehydrogenázy vznikne acetaldehyd  
 $\text{Etanol} + \text{NAD}^+ \xrightarrow{\text{ADH}} \text{Acetaldehyd} + \text{NADH} + \text{H}^+$   
Acetaldehyd se působením aldehyd-dehydrogenázy mění na acetyl-CoA  
 $\text{Acetaldehyd} + \text{NAD}^+ \xrightarrow{\text{ALDH}} \text{Acetyl-CoA} + \text{NADH} + \text{H}^+$

Konečným produktem metabolizace je kyselina octová (respektive  $\text{CO}_2$  a voda)

- Rychlost eliminace etanolu z organismu je u konkrétního jedince prakticky konstantní ( u mužů asi 100 mg etanolu na kg tělesné hmotnosti za hodinu, u žen jen asi 85 mg/kg/hod )
- Metabolizace bývá ukončena během 6 – 8 hodin
- Asi 5 % požitého etanolu se vylučuje z organismu v nezmetabolizované formě močí, potem apod.

# Etanol

## Klinické údaje:

- Etanol se vstřebává v gastrointestinálním traktu a dostává se do krve
- 0,6-0,8 ‰(g/l ) - počínající opilost
- 1-2 ‰ opilost
- Přes 2 ‰ těžkou intoxikaci
- Smrtelná dávka je 6-8 g/kg tělesné hmotnosti ( tedy u dospělého asi 300-500 g etanolu)
- Při chronickém používání vznikají nemoci jaterní, poškození ledvin a nemoci nervové
- Etanol zvyšuje citlivost organismu na otravy některými látkami (tetrachlormetan, anilin, olovo, rtuť); interakce s řadou léků

# Etanol

## Klinické údaje:

- Koncentrační časový profil v krvi, dechu i slinách je prakticky stejný
- Pomocným kritériem při stanovení etanolu je srovnání naměřené osmolality séra a vypočtené osmolality ( $2 \times \text{Na} + \text{glukoza} + \text{urea}$ ) - Osmolární gap 23 mmol/kg odpovídá cca 1 ‰ etanolu
- **Referenční rozmezí:** 0 mmol/l , 0 g/kg neboli promile (o/oo)
- Poznámka: Přepočet výsledku -  $\text{mmol/l} / 22,32 = \text{o/oo}$

# Etanol

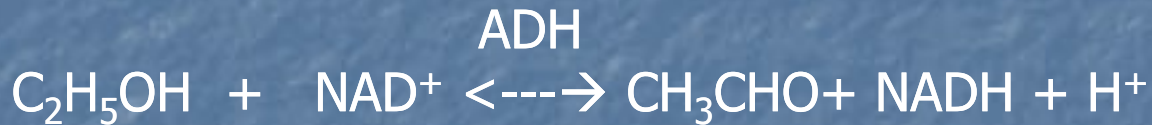
## Odběr materiálu:

- Odběr pro stanovení etanolu - do běžných odběrových zkumavek (sérum, plasma)
- Nabrat plnou zkumavku
- Zabránit použití desinfekčních prostředků obsahujících alkohol
- Vzorky ihned po odběru dobře uzavřít (pokud se stanovení neprovádí bezprostředně, uchovávat při 2 – 8 °C)
-

# Stanovení etanolu v krvi, séru a plasmě:

## Enzymaticky:

- Enzymatický test prováděný na automatických analyzátorech je založen na oxidaci alkoholu s  $\text{NAD}^+$  na acetaldehyd za katalýzy alkoholdehydrogenasy (ADH).



- Vznikající NADH je přímo úměrný obsahu alkoholu ve vzorku a fotometricky se stanovuje při 340 nm
- Metoda je specifická pro etanol i v přítomnosti acetaldehydu, acetonu, butanolu, etylenglykolu, izopropanolu, metanolu a propanolu v koncentracích do 20 g/l
- Stanovení není určeno pro soudně lékařské a forenzní účely

# Stanovení etanolu v krvi, séru a plasmě:

## Headspace plynová chromatografie

- Krev je zahřívána ve speciální uzavřené lahvičce
- Zahřátím se etanol uvolní z krve do vzduchového prostoru v lahvičce ( headspace )
- Určitá část z tohoto prostoru je automaticky injektována do plynového chromatografu
- Před analýzou jsou vzorky krve nebo séra naředěny roztokem chloridu sodného s obsahem n-propanolu jako vnitřního standardu. Chlorid sodný zvyšuje tlak par etanolu a eliminuje rozdíly v matrici
- Plynová chromatografie je jediná metoda použitelná pro forenzní (soudní) účely



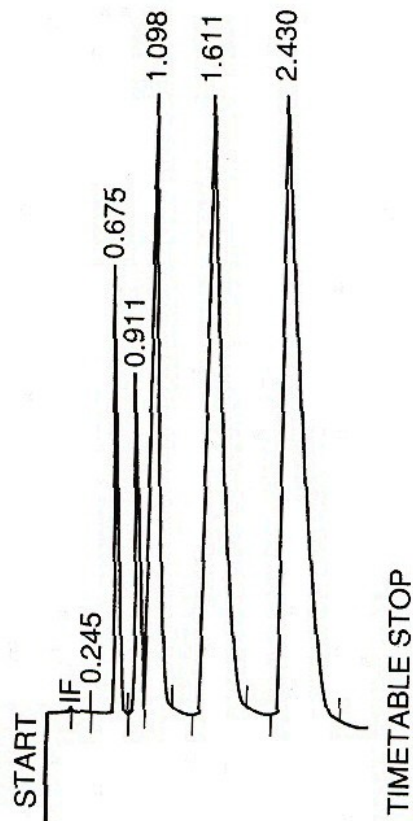


FIGURE 27-8. Headspace gas chromatography of alcohols.

RT*	Analyte
0.675	Methanol
0.911	Acetone
1.098	Ethanol
1.611	Isopropranol
2.430	n-Propanol (IS)

\*RT: Retention time (min).

# Stanovení etanolu

## Dechová zkouška – screeningový test

- Časté použití vzhledem k nebezpečnosti a protizákonnosti či limitaci požití alkoholu při řízení motorových vozidel a v zaměstnání
- Princip:
  - IČ absorpční spektroskopie ( nejčastěji)
  - Fotometrie - etanol se při oxidačně – redukční reakci s bichromanem v prostředí kyseliny sírové oxiduje na kyselinu octovou
  - Elektrochemická oxidace
- Mezi alkoholem v krvi a v dechu je ustavena rovnováha přibližně 2100:1 (krev : dech)

# Stanovení etanolu

## Ve slinách

- Snadný a neinvazivní sběr
- Sliny absorbovány do vatového tamponu, ten vložen do testovací kartridže
- Reakce založena na reakci s ADH s vizuální end point detekcí (2 min inkubace)
- Koncentrace odpovídá sérovým hodnotám

## V moči

- Koncentrace alkoholu je přibližně 1,3x vyšší než v krvi - může být variabilní, omezený význam stanovení
- Při stanovení etanolu v moči vadí obsah cukrů v moči, který může způsobit pozitivní interferenci v důsledku metabolizace cukrů na etanol

# **Intoxikace metanolem a stanovením jeho metabolitu – kyseliny mravenčí**

# Aféra metanol

- Na podzim roku 2012 série otrav metanolem
- Intoxikace způsobeny konzumací pančovaných alkoholických nápojů s nejasným původem
- Přijetí řady opatření zamezujících prohloubení krize (zákaz prodeje a vývozu nápojů s obsahem alkoholu nad 20%)
- V souvislosti s intoxikací metanolem hospitalizováno 117 osob, z toho 37 zemřelo
- Stále existuje velké množství tohoto nebezpečného alkoholu

## ■ **Metabolismus metanolu**

- I když metanol samotný tlumí funkci centrálního nervového systému, největší míra toxicity je způsobena až jeho metabolity – formaldehydem a především kyselinou mravenčí vznikající v játrech (obr. 1). Působením alkoholdehydrogenázy dochází k pomalé přeměně metanolu na formaldehyd, který se pak rychle oxiduje v přítomnosti aldehyddehydrogenázy na kyselinu mravenčí. Alternativní cestou odbourávání metanolu je **oxidace folátovou metabolickou dráhou**. Reakce je pomalá a její rychlost se zvyšuje s koncentrací kyseliny folinové, což je aktivní redukováná forma kyseliny listové. Konečným produktem oxidace metanolu je **oxid uhličitý** a voda.
- Celková eliminace metanolu je pomalá, odpovídá zhruba 1/7 rychlosti odbourávání etanolu. Etanol má ve srovnání s metanolem asi dvacetkrát vyšší afinitu k alkoholdehydrogenáze a je tedy preferovaným **substrátem**. Z výše uvedených fakt vyplývá, že velmi záleží na poměru metanol : etanol. Je-li v požitém destilátu výrazně více etanolu, přetrvává metanol v těle a je postupně vylučován plícemi a močí, aniž by se hromadil ve formě kyseliny mravenčí.



# Laktát

- Laktát (sůl kyseliny mléčné) vzniká především v kosterním svalstvu, mozku, kůži a erytrocytech
- Přibližně 65% laktátu je zpracováno v játrech
- Větší množství laktátu vzniká při dlouhodobé intenzivní fyzické aktivitě
- Laktát je konečným produktem glykolýzy za anaeorobních podmínek
- Signifikantní laktátovou acidózu představuje koncentrace laktátu větší než 5 mmol/l a pH menší než 7,25
- Pot obsahuje značné množství laktátu - zabránit dotykání se špiček
- **Referenční rozmezí**

P- laktát :	0,6 - 2,3	mmol/l
CSF-laktát :	1,2 - 2,1	mmol/l



# Laktát

## Stanovení v plasmě a likvoru

Preanalytické požadavky:

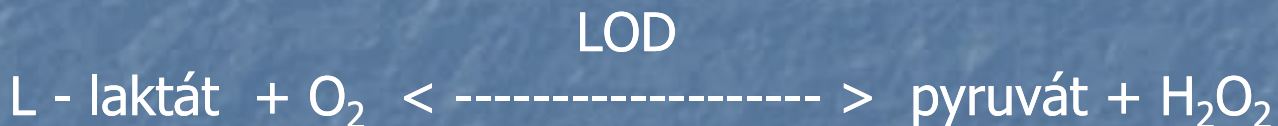
- K odběru pro stanovení v plasmě se využívají zkumavky s fluorid/EDTA nebo fluorid/oxalátem
- Vzorek je nutné stočit co nejdříve, nejpozději do 2 hod po odběru

# Stanovení laktátu s laktátdehydrogenasou:

- $$\text{L - laktát} + \text{NAD}^+ \xrightleftharpoons[\text{(pH 9-9,6)}]{\text{LD}} \text{pyruvát} + \text{NADH} + \text{H}^+$$
- 
- $$\text{pyruvát} + \text{L - glutamát} \xrightleftharpoons{\text{ALT}} \text{L-alanin} + \text{oxoglutarát}$$
- Reakce laktát - pyruvát běžně běží výrazně vlevo
- Při pH 9 - 9,6 a následné reakci, kdy je spotřebováván pyruvát se rovnováha posunuje vpravo
- Fotometricky se měří nárůst absorpance NADH při 340 nm

# Stanovení laktátu s laktátóxidásou:

- Laktát je v přítomnosti specifického enzymu laktátóxidasy oxidován na pyruvát:



- Peroxid vodíku dále reaguje oxidační kopulací např. s 4-aminofenazonem a 1,7 – dihydroxynaftalenem v přítomnosti peroxidasy (POD) za vzniku barviva - absorbance je přímo úměrná koncentraci laktátu



# Stanovení laktátu v hemolyzátu či plasmě

- Elektrochemicky na POCT či glukometrech s využitím biosenzoru
- S využitím kapilárního odběru
- V senzoru je zabudován enzym LOD, který katalyzuje vznik peroxidu vodíku  
$$\text{L - laktát} + \text{O}_2 \text{ < ----- > pyruvát} + \text{H}_2\text{O}_2$$
- Peroxid vodíku se rozkládá na platinové elektrodě za uvolnění elektronů – generovaný proud se stanoví amperometricky