

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
 $\text{Etanol} + \text{NAD}^+ \rightleftharpoons \text{Acetaldehyd} + \text{NADH} + \text{H}^+$
Acetaldehyd se působením aldehyd-dehydrogenázy mění na acetyl-CoA
 $\text{Acetaldehyd} + \text{NAD}^+ \rightleftharpoons \text{Acetyl-CoA} + \text{NADH} + \text{H}^+$

Konečným produktem metabolizace je kyselina octová (respektive 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

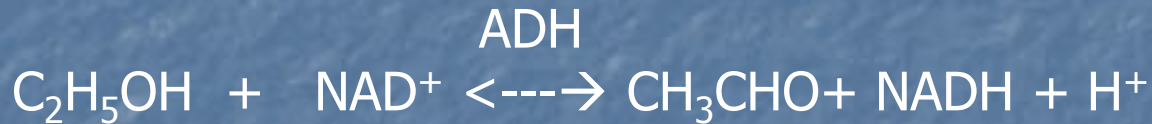
Odběr materiálu:

- Odběr pro stanovení etanolu - do běžných odběrových zkumavek (sérum, plasma)
- Nabrat plnou zkumavku
- Zabránit použití desinfekčních prostředků obsahujících alkohol
- Vzorke 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 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

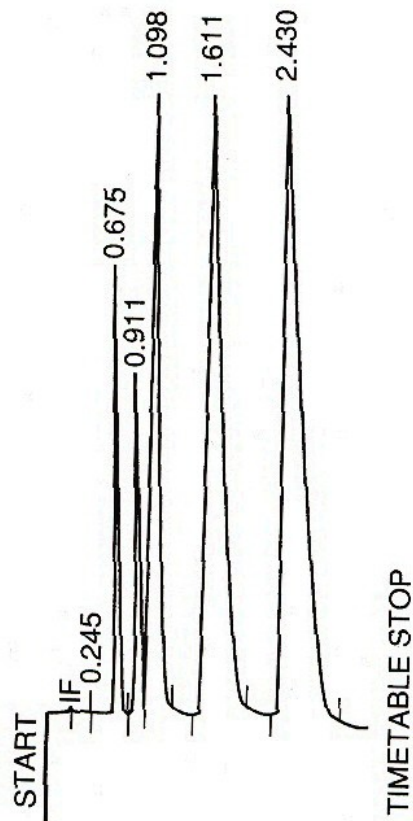


FIGURE 27-8. Headspace gas chromatography of alcohols.

RT*	Analyte
0.675	Methanol
0.911	Acetone
1.098	Ethanol
1.611	Isopropranol
2.430	n-Propranol (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

- Největší míra toxicity způsobena jeho metabolity – formaldehydem a především kyselinou mravenčí vznikající v játrech
- 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.
- Záleží na poměru metanol : etanol. Je-li v požitém destilátu výrazně více etanolu, přetrvává metanol v těle a je postupně vylučován plicemi 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:

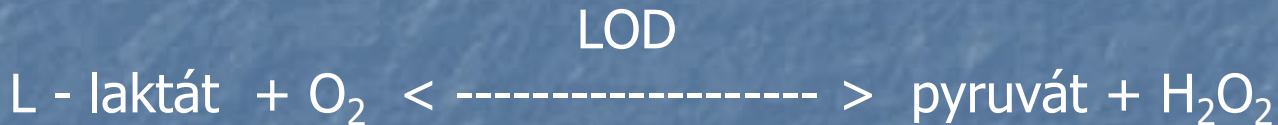
- K odběru pro stanovení v plasmě se využívají zkumavky s fluorid/EDTA nebo fluorid/oxalátem
- Vzorek je nutné stočit co nejdříve, nejpozději do 2 hod po odběru

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