

Biológiai minták vizsgálata mérgezés, kábítószer- fogyasztás gyanúja esetén

Dr. Hidvégi Előd
NSZKK Toxikológiai Szakértői Intézet

Kriminalisztikai anyagvizsgálatok
2019. március 12.



Vázlat

1. Bevezetés
2. A toxikológiai vizsgálatok célja, vizsgálati minták
3. A vizsgálatokat befolyásoló tényezők
4. A vizsgálati rendszer
5. Szűrővizsgálatok
 - Immunkémiai vizsgálatok
 - UHPLC-MS/MS vizsgálatok
6. Megerősítő vizsgálatok
 - Mintaelőkészítési eljárások
 - Stimulánsok megerősítő vizsgálata
 - Természetes kannabinoidok megerősítő vizsgálata
 - Szintetikus kannabinoidok megerősítő vizsgálata
 - Ópioidok megerősítő vizsgálata
7. Összefoglalás



1. Bevezetés

Az igazságügyi toxikológia fő igazságügyi szakértői határterületei



*282/2007. (X. 26.) Korm. rendelet



A „méreg” fogalma

Paracelsus:

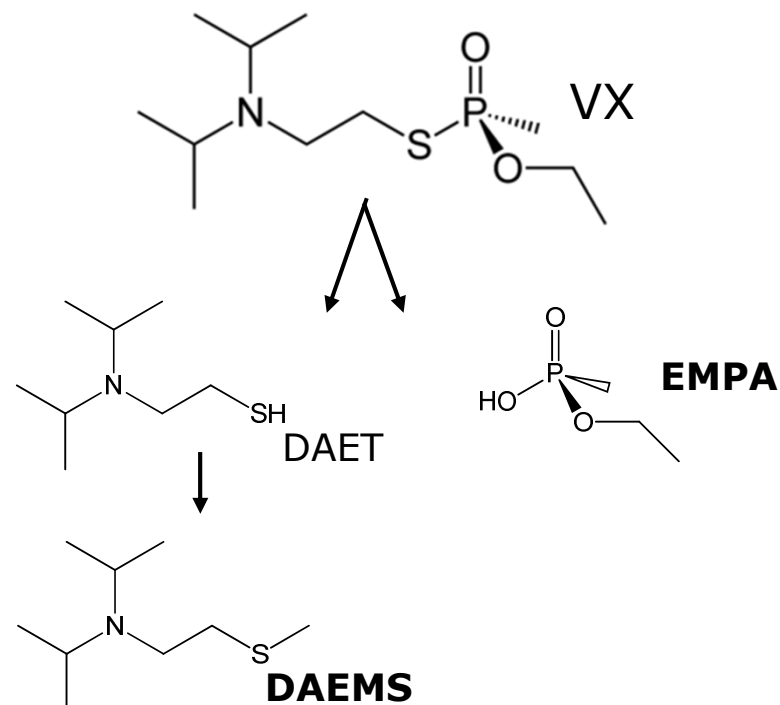
***„Alle Ding’ sind Gift und nichts ohn’ Gift;
allein die Dosis macht, das ein Ding kein
Gift ist.”***

(Minden dolog méreg, csupán a mennyiség teszi, hogy egy anyag nem méreg.)



1. eset

Kuala Lumpur, 2017. február 13.: A repülőtéren 2 nő méreggel meggyilkolja Kim Jong-Namot, az észak-koreai diktátor, Kim Jong-Un féltestvérét.



Halálát feltehetően a **VX** (venomous agent X) nevű igen erős idegméreg okozta. Ez ún. kolinészteráz gátló vegyület, amely izombénulást, végső esetben légzésbénulást okoz. LD₅₀ értéke 10 mg (bőrön át felszívódva).

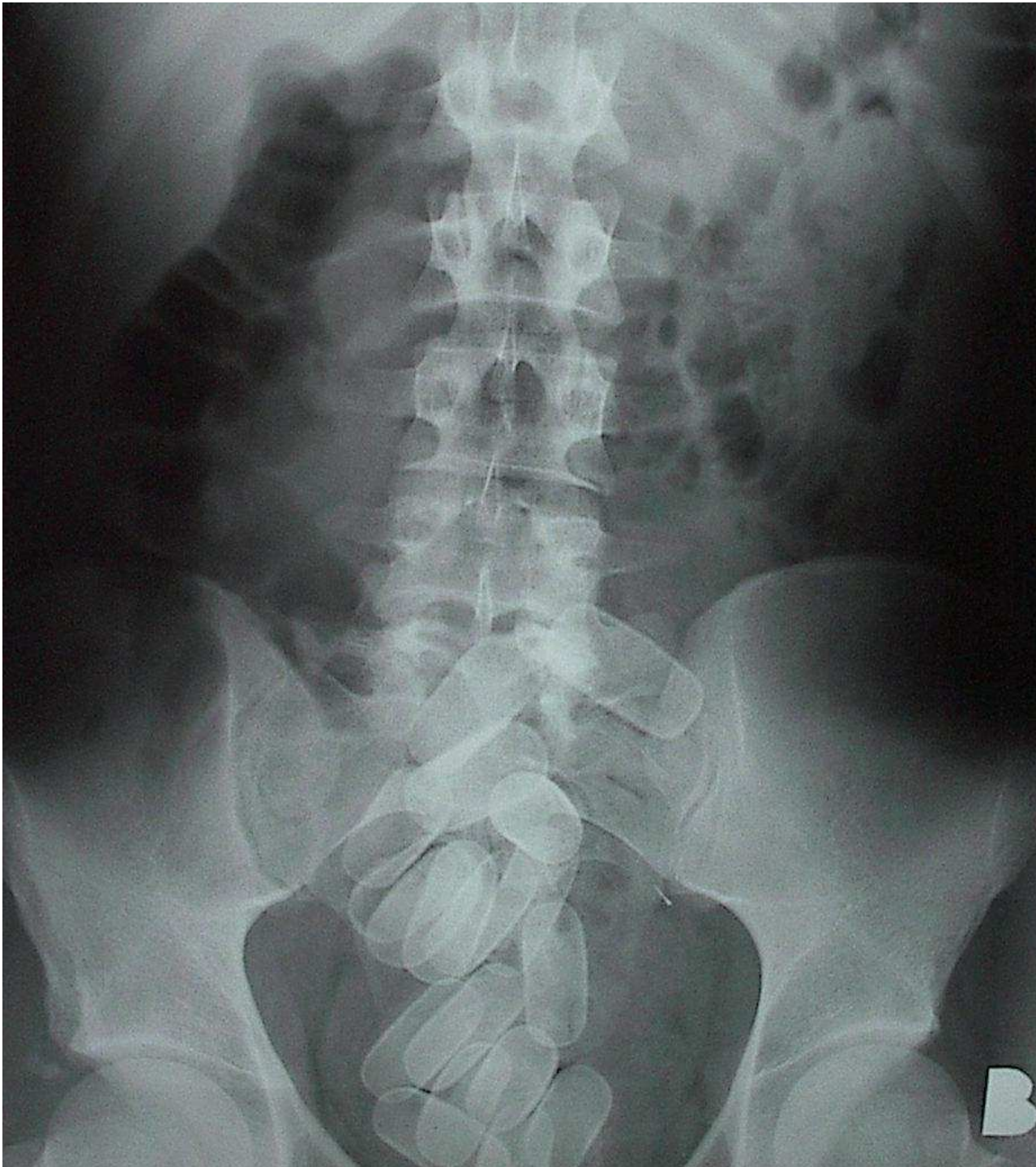
Feltehetően külön vitték fel prekurzorait, ill. egy katalizátort az arcra.



2. eset

**Kokain-tartalmú
„body-pack”
kapszulák a
gasztrointesztinális
traktusban.**

Az első Röntgen-
felvétel közvetlenül a
csempész
feltartóztatása után
készült.





Röntgenes
nyomonkövetés:

A **kapszulák**
kiürülése a
gastrointesztinális
traktusból.

Az illető ugyanakkor
rosszul lett,
eszméletlen
állapotba került,
kokainmérgezés
tüneteit mutatta.





Egy „szétpukkadott” kapszula maradványa a pylorusból való eltávolítás után.

A **„body-pack” tartalma két irányba ömlött ki** belőle: a gyomor ill. a vékonybél irányába [„tube-effect”].

A szervezetbe került becsült kokainmennyiség kb. 3 g volt. A szakszerű ellátás ellenére a csempész 18 nap után meghalt.



Mérgek osztályozása

	LD₅₀	Valószínű halálos adag felnőtt emberen egyszeri per os bevitel esetén
Rendkívül mérgező	1 mg/kg	Néhány csepp, morzsányi (pl. nikotin)
Nagyon mérgező	1 – 50 mg/kg	1 kávéskanál, késhegynyi (pl. KCN)
Mérsékelten mérgező	50 – 500 mg/kg	Kupicányi, diónyi (pl. szalicilsav)
Enyhén mérgező	0,5 – 5 g/kg	Vizespohárnyi (pl. etilén-glikol)
Viszonylag nem mérgező	5 – 15 g/kg	0,5 – 1 liter
Gyakorlatilag ártalmatlan	15 g/kg	1 liter felett



(Dr. Kerner Ágnes)

A mérég fogalma

- olyan kémiai anyag, mely veszélyes az élő szervezetre
- a **toxicitás** alapvetően **biológiai fogalom**
- az **igazságügyi toxikológia vizsgálatok** nem biológiai próbákon alapulnak
- az analitikai toxikológiai vizsgálatok egymásra épülő, többlépcsős vizsgálatok

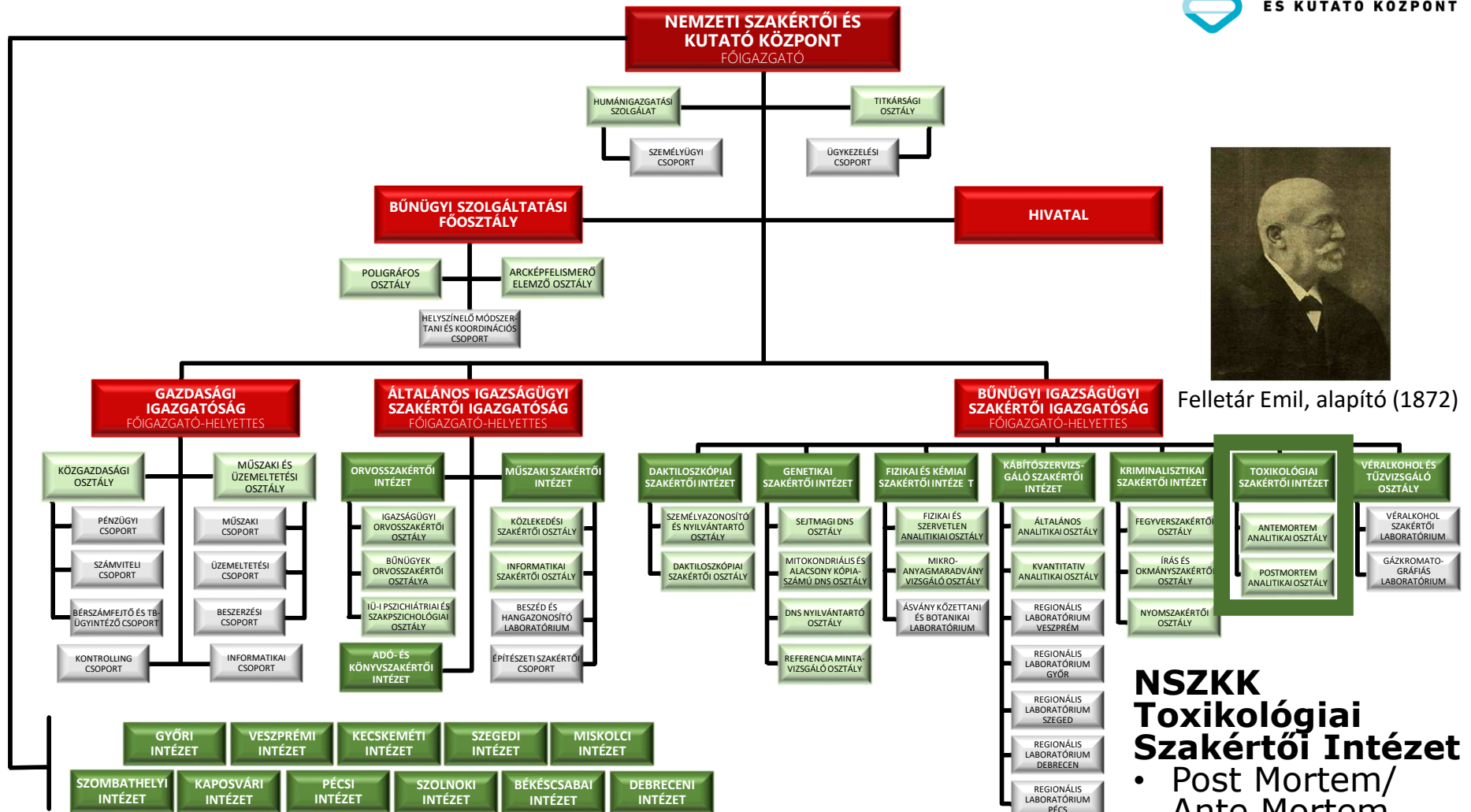


2. A toxikológiai vizsgálatok célja, vizsgálati minták

Esettípusok

- Kábítószerfogyasztás [Btk. 178. §/(6)], új pszichoaktív anyag tartása [*fogyasztása*][2012. évi II. tv. 199/B. §]
- Bódult állapotú gépjárművezetés [Btk. 237. §]
- Kifosztás [Btk. 366. §/(1)/a)]
- Szexuális kényszerítés/erőszak/visszaélés [Btk. 196-198. §]
- Kóros szenvedélykeltés [Btk. 181. §]
- Heveny mérgezés (rosszullét, kórházi kezelés, halál)
- Agresszív, furcsa viselkedés
- Orvosi terápiával, munkahelyi méregexpozícióval összefüggő esetek
- Nem jellemző: terápiás monitorozás (metadon), absztinencia-vizsgálat





Felletár Emil, alapító (1872)

**NSZKK
Toxikológiai
Szakértői Intézet**

- Post Mortem/ Ante Mortem Analitikai Osztály
- Évi 11 000 vizsgálati ügy

A gyanúsított fogyasztott-e kábítószer vagy új pszichoaktív anyagot? A tiltott anyag milyen mennyiségben található a vérben, vizeletben?

- Fogyasztási markerek (*nem inherens* hatóanyag, specifikus bomlástermék, származék, „műtermék”)
- Minta/mátrixismeret: *vér, szérum, plazma*
- Tanúsított minőségi és mennyiségi összehasonlító minták (addicionált liofilizált vér, vizelet)







Mintavételi egységdobozok

- **I: Vizelet**
(kábítószerfogyasztás igazolására)
- **II: Vér+vizelet**
(bódult állapotú gépjárművezetés esetén)



Vizsgálati minták

	Vizelet	Vér	Vér	Vér
Mintaedény				
Jellemző	vizelet	gyorsított alvadású vér, felülúszóként szérum nyerhető (főleg kábítószer-vizsgálat)	alvadásgátolt teljes vér (főleg véralkohol-meghatározás)	alvadásgátolt teljes vér (főleg véralkohol-meghatározás)
Adalék	nincs	kovasavgél	K-oxalát (8 mg, szilárd)	K-oxalát NaF



Minták – *ante mortem*

Minta	Előny	Hátrány
<i>Vizelet</i>	Elegendő mennyiség Széles kimutatási időablak Egyszerű mintavétel Elterjedt	Manipulálható Anyavegyület alacsony koncentrációban Mennyiségi meghatározásnak kevés a haszna (pl. farmakológiai hatás, befolyásoltság)
<i>Vér</i>	Elterjedt A legutóbbi használatra utal Utal(hat) a farmakológiai hatásokra Nem manipulálható Sok referencia-adat Anyavegyület nagyobb eséllyel van jelen Bódult állapotú gépjárművezetés esetén!	Invazív mintavétel, spec. személyzet Rövid kimutatási időablak
<i>Nyál</i>	Egyszerű mintavétel Anyavegyület is jelen van Korreláció a plazmakoncentrációval A legutóbbi használatra utal Egyszerű mintaelőkészítést igényel	Szűk kimutatási időablak Kis mintamennyiség Szájon át történő kontamináció veszélye A mintavétel befolyásolja a koncentrációt
<i>Haj</i>	Igen széles kimutatási időablak (hónapok) Könnyű mintavétel	A friss használat nem mutatható ki Erős környezeti kontamináció Nehezen interpretálható eredmények
<i>Izzadság</i>	Kumulatív használati info. Anyavegyület Egyszerű mintavétel	Környezeti kontamináció veszélye Nagy egyéni variancia Speciális mintavételi eszköz szükséges Mennyiségi meghatározásnak kevés a haszna Kevés minta



3. A vizsgálatokat befolyásoló tényezők

Az abúzsuszerek szervezetbe kerülése

Száj ill. orrnyálkahártyán/ tüdön át

- füstölés
- inhalálás
- szippantás

Szájon át

- lenyelve

Injektálva

Bőrön át

metabolizmus

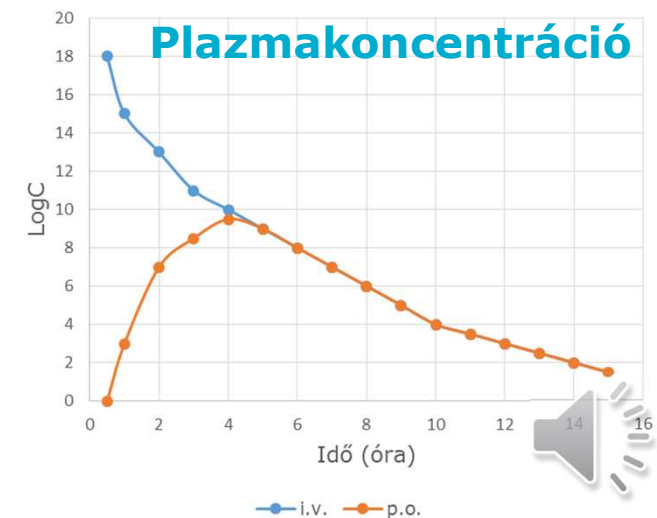
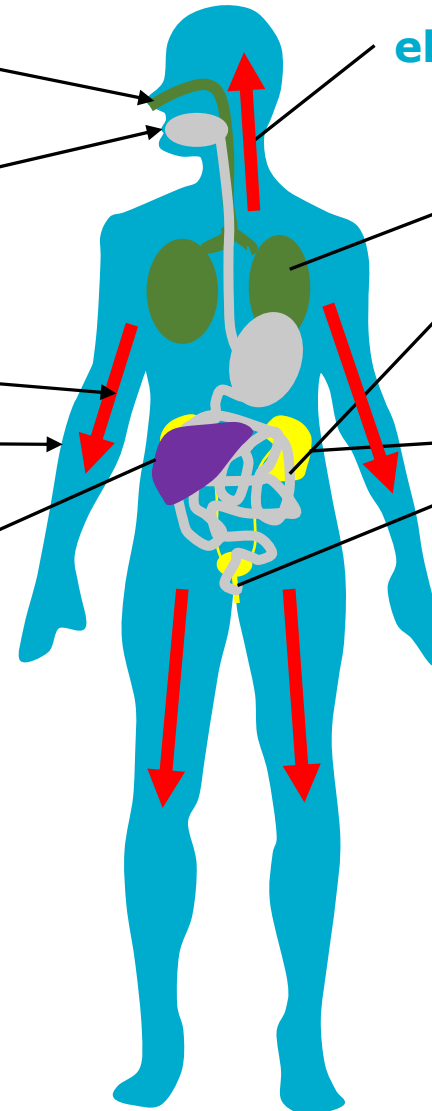
eloszlás

felszívódás

kiválasztás,
kiürülés

Farmakokinetikai paraméterek:

- dózis
- abszorpció
- biohasznosulás
- megoszlási térfogat
- „clearance”-érték
- fehérjekötődés
- pKa-érték
- (first pass) metabolizmus
- eliminációs vagy exkréciós felezési idő



Kábítószerek kiürülése

Fogyasztott hatóanyag (csoport)	Kiürülés a vizelettel bomlatlan formában	Fő bomlástermék, kiürülés a vizelettel
Amfetamin	30% (pH-függő)	
MDMA	65%	
THC	<0,1%	Konjugált 9-Karboxi-THC – 25%
Heroin	0,1%	Konjugált morfin – 38% 6-Acetilmorfin (spec. marker) – 1,3%
Kokain	1-9%	Benzoilekgonin – 45%
Mefedron (katinon)	Igen (?%)	
AB-CHMINACA (SC)	<1%	Konjugált AB-CHMINACA-karbonsav – ?%



Fő metabolikus folyamatok

- **Fázis I.**

- **Oxidáció**

- **Mikroszomális kevert funkciójú oxidázok** [CYP450] (aromás és alifás oxidáció, epoxidáció, N-, O- és S-dealkiláció, oxidatív deamináció, N-, S- és foszfotionát-oxidáció, dehalogénezés)
- **Alkohol dehidrogenáz**
- **Aldehid dehidrogenáz**
- **Aldehid oxidáz**
- **Xantin oxidáz**
- **Flavin-monooxygenáz**
- **Aromatáz**

- **Redukció**

- **Hidrolízis**

- **Észter**
- **Amid**
- **Hidrazid és karbamát**

- **Hidratáció**

- **Detioacetiláció**

- **Izomerizáció**



Fő metabolikus folyamatok

- **Fázis II.**
 - **Glükuronidáció/glikozidáció**
 - **Szulfatálódás**
 - **Metilezés**
 - **Acetiláció**
 - **Aminosav-konjugáció**
 - **Glutation-konjugáció**
 - **Zsírsav-konjugáció**
 - **Kondenzáció**



Kábítószeres és bomlástermékek stabilitása a vizsgálati mintákban

Vegyület (csoport)	Átalakulás	Tartósítás	Mechanizmus
Kokain	Enzimatis átalakulás ekgonin-metilészterre (pszeudokolinészteráz); lúgos közegben intenzívebb	NaF/KF hozzáadása	Észterázok gátlása
THC-COOH-glükuronid	Enzimatis átalakulás THC-COOH-vá (észterázok)	NaF/KF hozzáadása	Észterázok gátlása
Katinonok	Bomlás a kalcserje katinonjával analóg módon, lúgos közegben intenzív.	Na-azid hozzáadása	Bakteriális lebontás gátlása

A bomlást késleltető tényezők:

- lezárás,
- hűtés (+4, -20, -80 °C), kémhatás (szobahőmérsékleten fokozatos „alkalizálódás” megy végbe, főleg a baktériumoknak köszönhetően, amelyek az ureát ammóniává alakítják)
- sötét, megfelelő tárolóedény, tartósító anyagok.



A vizelet kreatinin-szintje mint vonatkoztatási alap

- Ürülése állandó ütemű
- A kiürülés üteme jobban becsülhető
- Felmerül a minta-hígítás gyanúja, ha a szintje $< 200 \mu\text{g/ml}$

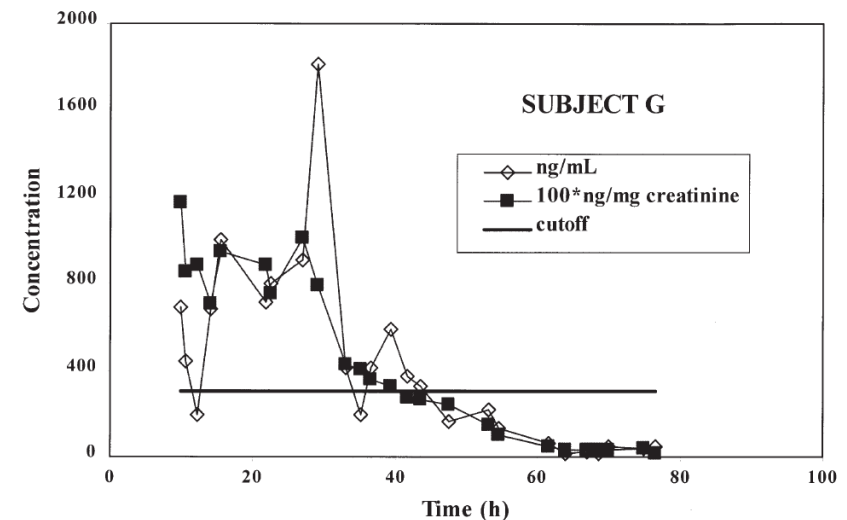


Figure 1. Urine concentration of total morphine (Tmor) with time (after 9 h) following heroin administration for a representative human subject. Concentration expressed as ng/mL and 100*ng/mg of creatinine demonstrating the smoothing effect of the latter units. Cutoff chosen for instructive purposes was 300 ng/mL.

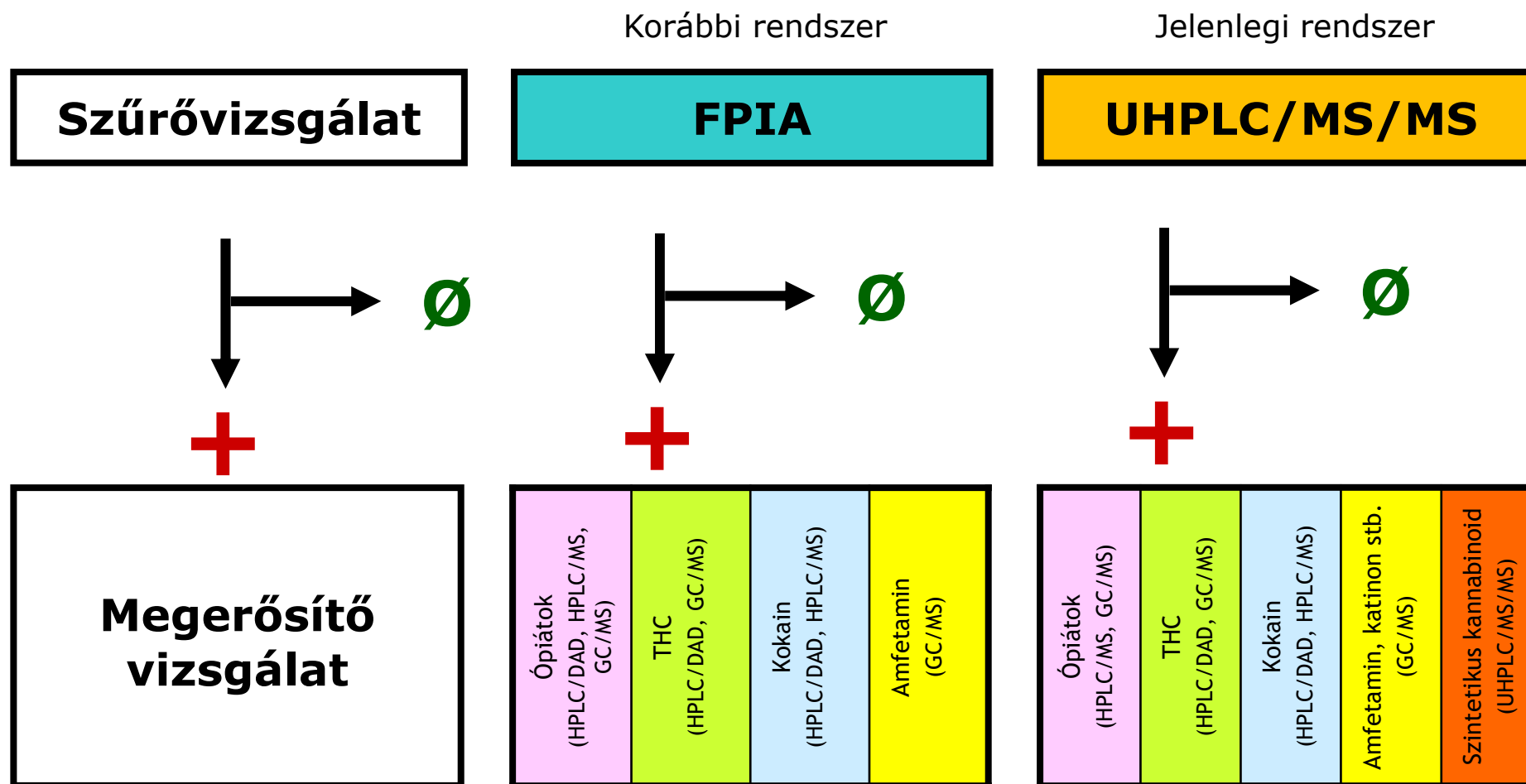
(Smith et al. 2001.)

A vizeletminta-hamisítás leggyakoribb eszközei

- Nitrit ion
- Szélsőséges kémhatás (pH <3 vagy >11)
- Króm(VI) ion
- Halogén
- Glutáraldehid
- Piridin
- Felületaktív anyagok

4. A vizsgálati rendszer

az NSZKK Toxikológiai Szakértői Intézetben



A teljes rendszer eredő szelektivitása nagyobb, mint az egyes vizsgálatoké külön-külön (pl. 2-3- és 4-MMC azonosítása UHPLC/MS/MS és GC/MS vizsgálatokkal).



A Toxikológiai Szakértői Intézetben folyó vizsgálatok folyamata

1. Minták **érkeztetése**
2. Regisztráció (elektronikus és papír alapú)
3. UHPLC-MS/MS **szűrővizsgálat**
4. **Szignálás** (szakértőkhöz rendelés)
5. **Megerősítő vizsgálatok**
 - **Mintaelőkészítés** (LLE, SPE, SLE, fehérjementesítés, centrifugálás, bepárlás, származékkészítés)
 - **Elemzés, kiértékelés:** Denzitometria, GC-FID, HPLC-DAD, GC-MS, GC-MS/MS, HPLC-MS, UHPLC-MS/MS)
6. **Szakértői vélemény**
7. Díjjegyzék → rendőrség, ügyészség, bíróság → igazságügyi orvosszakértő



Szűrővizsgálat

Fontos kritérium:

- Lehető legtöbb vegyület egyidejű kimutatása
- „Fals negativitás” elkerülése
- „Fals pozitivitás” minimumra szorítása



Nem ad kétséget kizáró vizsgálati eredményt!
Előzetes szakvéleményben érdemi eredményt leírni nem tudunk.

A jelenleg használt **UHPLC-MS/MS** szűrővizsgálat **jóval szélesebb spektrumú** a korábban alkalmazott FPIA elemzéssel szemben, amely **csak a klasszikus szerek vizsgálatára** volt megfelelő, az új designer drogokra (főleg szintetikus kannabinoidok és katinonok) nem mutatott kellő keresztreakciót.



5. Szűrővizsgálatok

Gyorsteszték

- Immunkémiai eljáráson alapszik

- Gyors
- Könnyen használható helyszínen
- Csoport specifikus

DE:

- **Csak klasszikus kábítószerekre kapható!**
- Keresztreakciók miatt **fals pozitívítás** is lehet
- Az új designer drogokkal mérsékelt vagy nincs keresztreakció, ami fals negatív eredményre vezet

Önmagukban nincs bizonyító erejük!



Immunkémiai tesztek működése

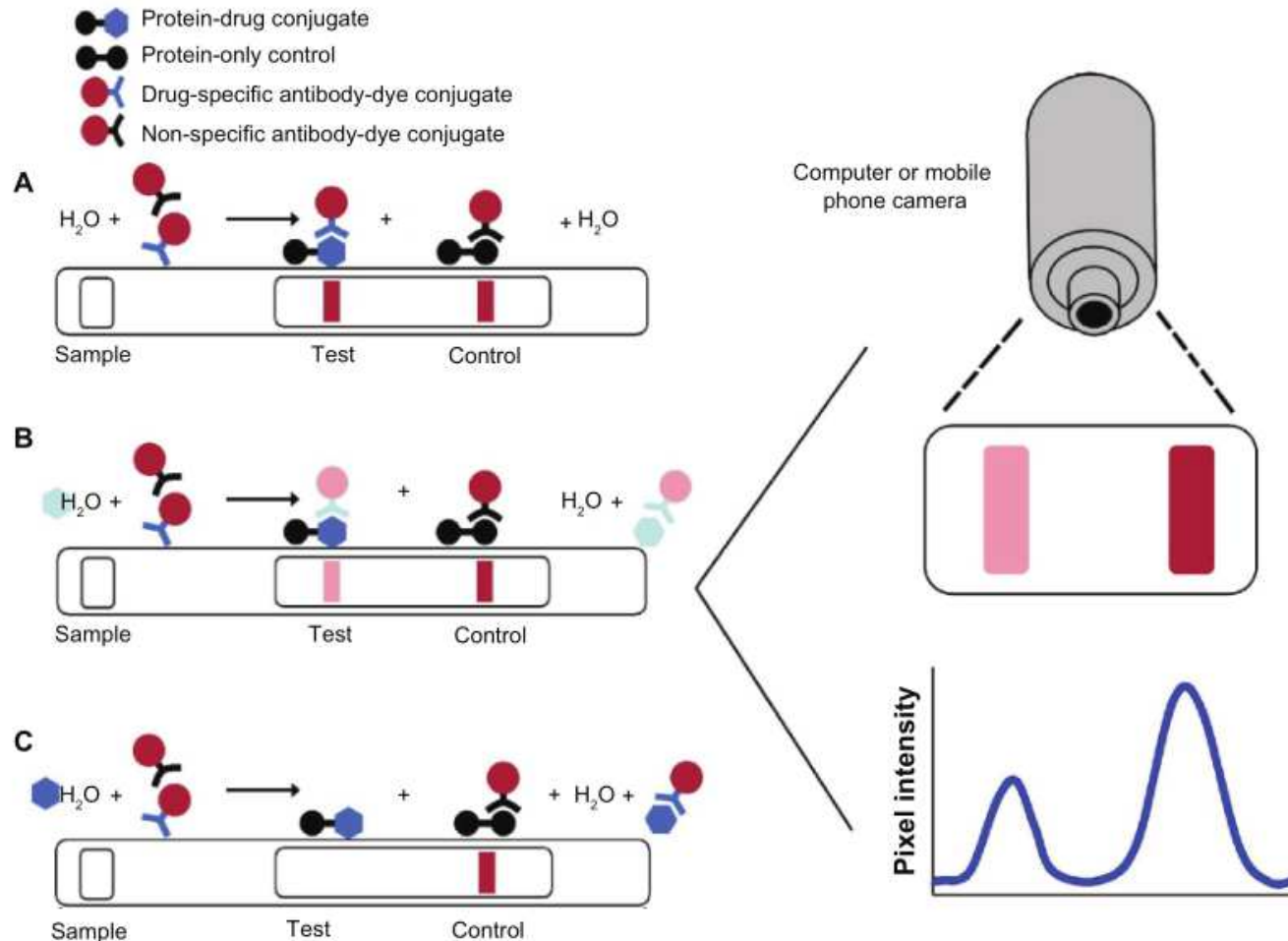


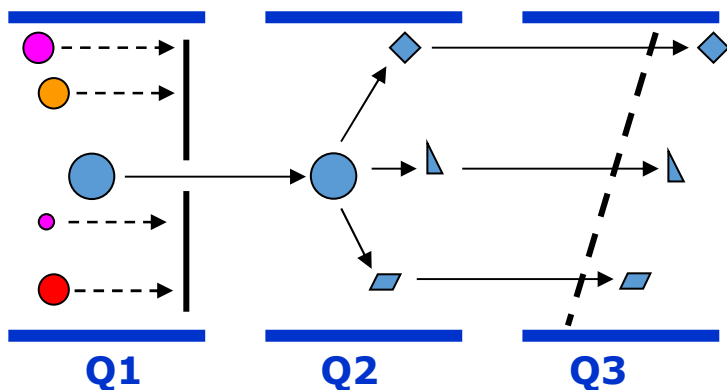
Figure 1. Test strip immunoassay system. **A)** Liquid samples are placed on the test strip sample area, where capillary action draws the fluid along with dye conjugated antibodies across a test area and control area. If no drugs (blue hexagons) are present, dye will bind at both locations, causing two bands to appear. **B)** At intermediate doses, drug-dye binding is incomplete, resulting in a light test band which varies in intensity according to the drug concentration. A camera and image analysis software can then quantify the relative intensity of the two bands. **C)** If drugs are present at sufficient concentrations, they completely bind the drug specific dye and prevent a band from appearing in the test area at all.

Ultranagy teljesítményű folyadékkromatográfiás – tandem tömegspektrometriás rendszer



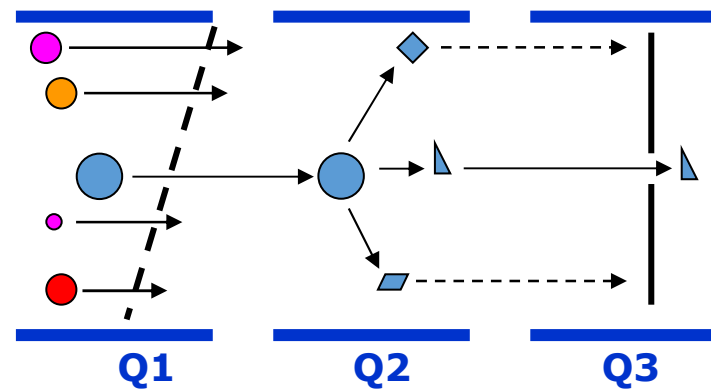
Hármas quadrupól tandem tömegspektrometria – lehetséges mérési funkciók

Product Ion Scan



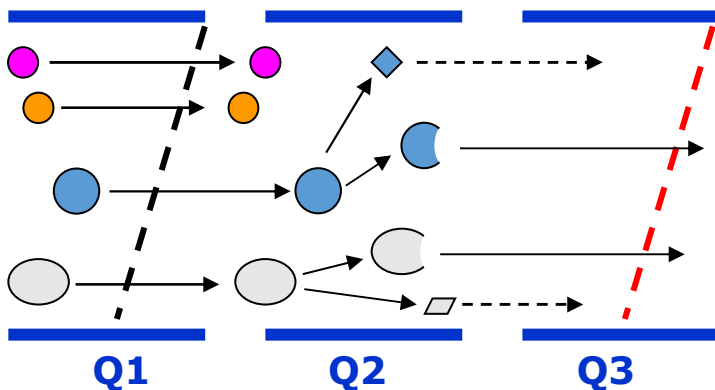
anyaion kiválasztása
fragmention pásztázása

Precursor Ion Scan



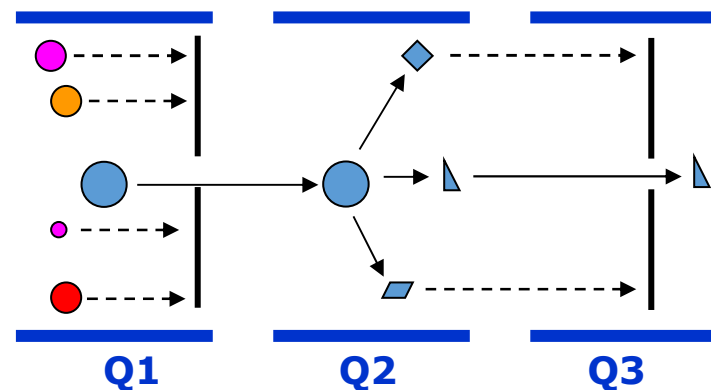
anyaion pásztázása
fragmention kiválasztása

Neutral Loss Scan



a Q1 és Q3 pásztáz
a semleges tömegével eltolva

Multiple Reaction Monitoring (MRM)



anyaion kiválasztása
fragmention kiválasztása



Hármas quadrupól tandem tömegspektrometria

Mintalőkészítés

(szűrés):

100 µl minta (vér, vizelet)

+ **300 µl acetonitril**

+ kevertetés (extrakció)

+ centrifugálás

(fehérjementesítés,

„dilute and shoot”)

„Scheduled MRM”

- Szűrés: 1-2 átmenet
- Megerősítés: 3 átmenet

The screenshot displays the 'Instrument Parameters' window for a mass spectrometer. The 'MS' section is active, showing 'Positive' ion mode and 'End Time: 7,757 min'. The 'AutoPurge' and 'Baseline Check Parameters' tabs are also visible. The 'MRM(+)' section is expanded, showing a list of 10 MRM events with their respective compound names and m/z values. The 'Acq. Time' is set to 0,501 - 1,301 min, and the 'Compound Name' is 'Morfin-Glük'. The 'Ch' table shows the precursor and product m/z values for each channel, along with pause and dwell times, and Q1, Q3 resolutions and pre-bias voltages.

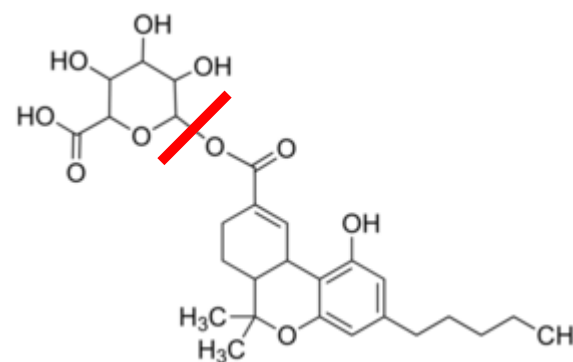
Type	Event#	+/-	Compound Name	m/z	Time (0,501 min - 7,757 min)
MRM	1	+	Morfin-Glük	462,00>286,20, 4	
MRM	2	+	Psilocibin	285,10>58,10	
MRM	3	+	morfin	286,00>165,05, 286,00	
MRM	4	+	Ekgonin-metilészter	200,00>8	
MRM	5	+	Bufotenin	205,10>58,10	
MRM	6	+	bk-MPA	170,00>152,05	
MRM	7	+	Hidromorfin	286,10>185,00	
MRM	8	+	Cathine	152,00>134,20	
MRM	9	+	PEA	122,20>105,00	
MRM	10	+	Pszilocin	205,20>58,25	

Ch	Precursor m/z	Product m/z	Pause Time (msec)	Dwell Time (msec)	Q1 Pre Bias(V)	CE	Q3 Pre Bias(V)
Ch1	462,00	286,20	3,0	5,0	-22,0	-31,0	-21,0
Ch2	462,00	200,95	3,0	5,0	-22,0	-44,0	-22,0
Ch3	462,00	164,90	3,0	5,0	-22,0	-55,0	-18,0

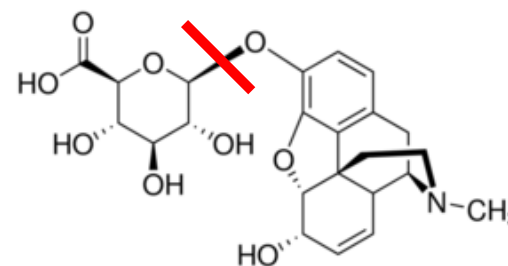
6. Megerősítő vizsgálatok

Mintaelőkészítés: Hidrolízis-módszerek

1. Kémiai (lúgos közeg)



2. Enzimes (*E. coli* glükuronidáz)



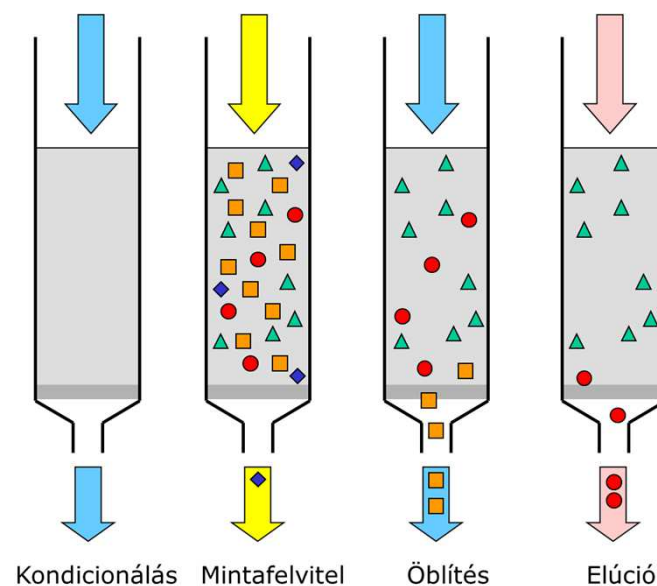
Szilárd fázisú extrakció (SPE)

1. Klasszikus SPE

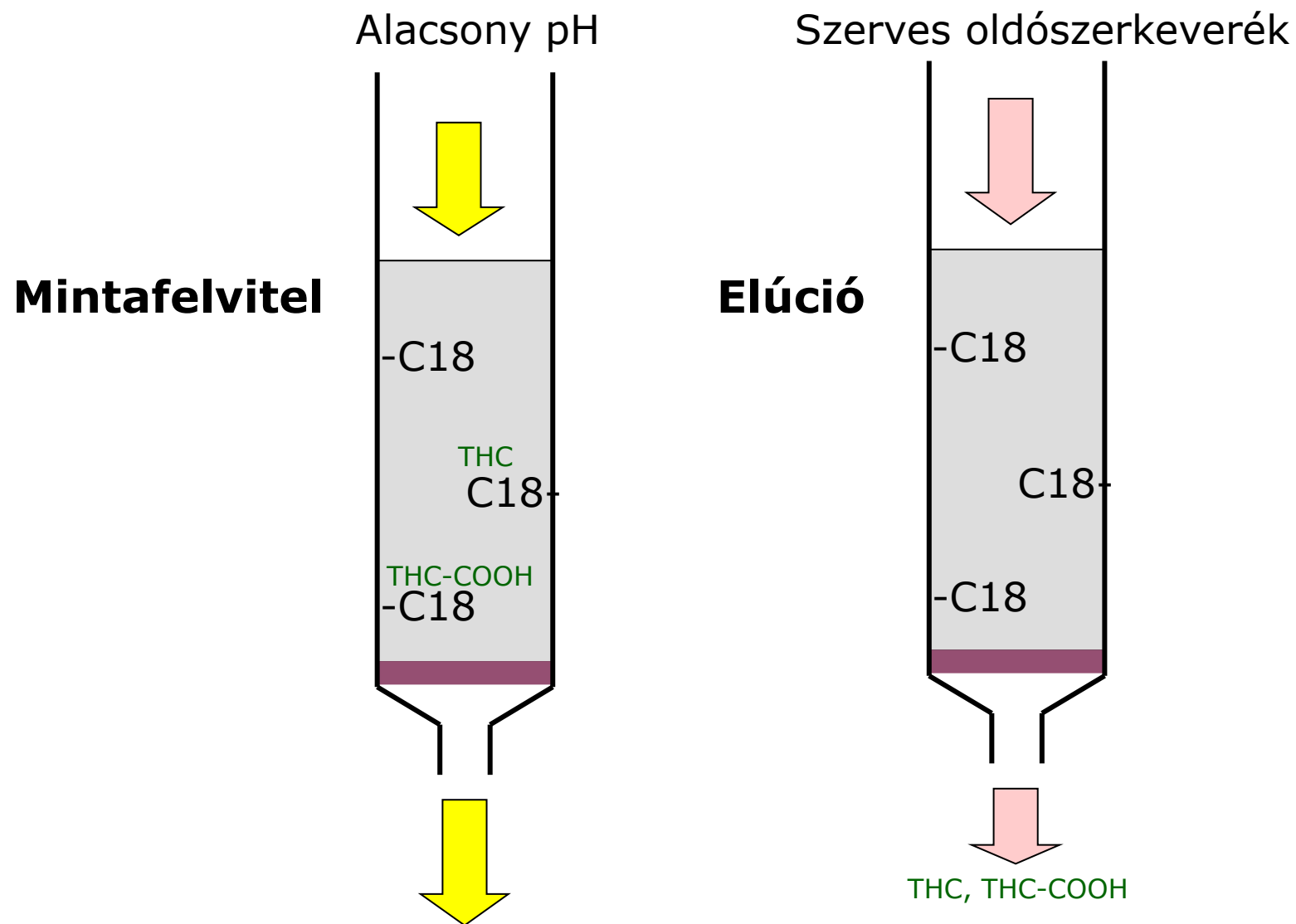
- **Hidrofób** (Isolute C18, Bakerbond narc-1) – *THC és metabolitok*
- Kevert fázis: **erős kationcserélő + hidrofób** (Isolute HCX, Oasis HLB) – *főleg bázikus és neutrális komponensek*

2. „Supported Liquid Extraction” (SLE)

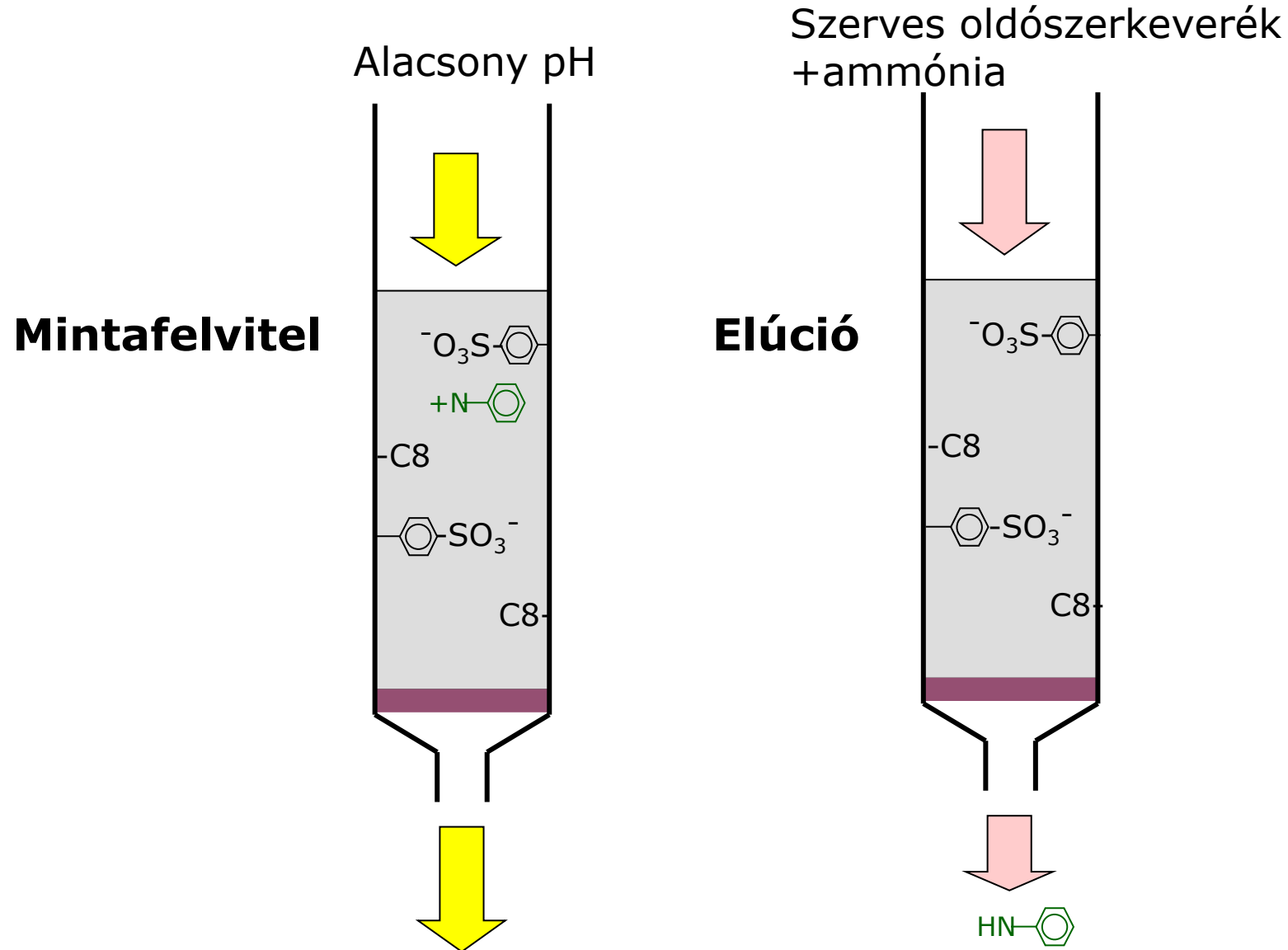
- Diatómaföld alapú, elősegített folyadék-folyadék extrakció – *szintetikus kannabinoidok*



Oktadecil-szilika (C18)



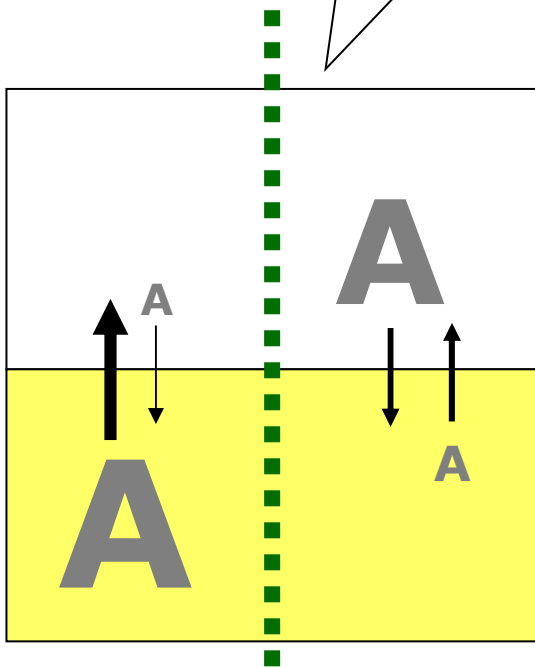
Erős kationcserélő -apoláros kevert fázis



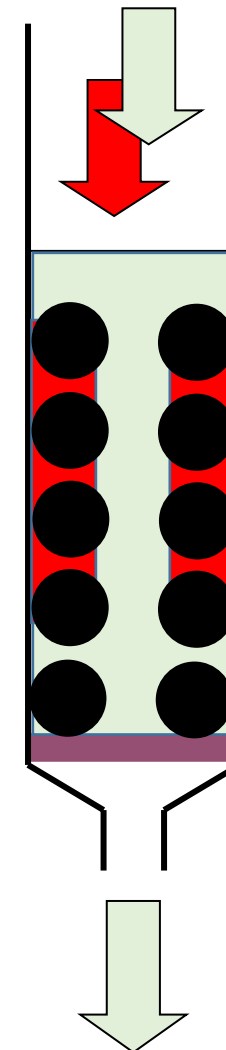
Folyadék-folyadék extrakció

SLE (supported liquid extraction)
diatómaföld alapú töltet

Egyensúly alakul ki:
Sebességek azonosak
A koncentráció-arány jellemző (K , $\log P$ - pH)



- 1. Mintafelvitel**
- 2. Perkoláció**
szerves oldószer
(keverékkel)



Amfetamin- és katinon- származékok GC-MS elemzése – extraktív acilezés

1. 1,3 ml vér- vagy vizeletminta Eppendorf csőben
+ 10-15 µl belső standard oldat (metoxifenamin vagy deuterált analógok keveréke)
+ Metanol (megfelelő mennyiség)
+ 75 µl cc. NaHCO₃
+ 75 µl 5M KOH
+ 50 µl deszt. víz
+ 250 µl toluol
+ 35 µl MBTFA
2. Kevertetés (vortex)
(20 perc, 1200 rpm, R.T., Grant PHMT)
3. Centrifugálás (20 perc, 8000 rpm)
4. Felső fázis elválasztása (100 µl-es üvegszűkítős fiolába)
+ 30 µl MBTFA (80 °C, 20 perc)



Gázkromatográf- tömegspektrométer

GC-MS



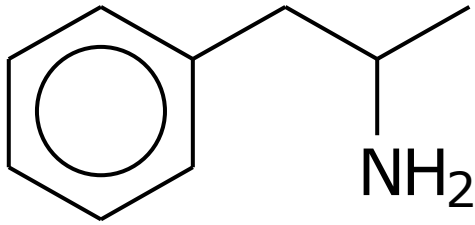
Metabolitok vizsgálata

Egyes vegyületek, elsősorban metabolitok esetén a poláris funkciós csoportok (amino-, hidroxil, karboxil, oxo-) módosítására (**származékképzésre**) van szükség, hogy alkalmassá tegyük őket a GC elemzésre.

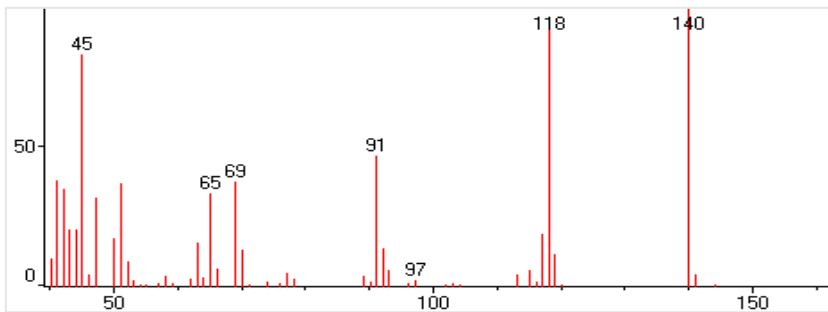
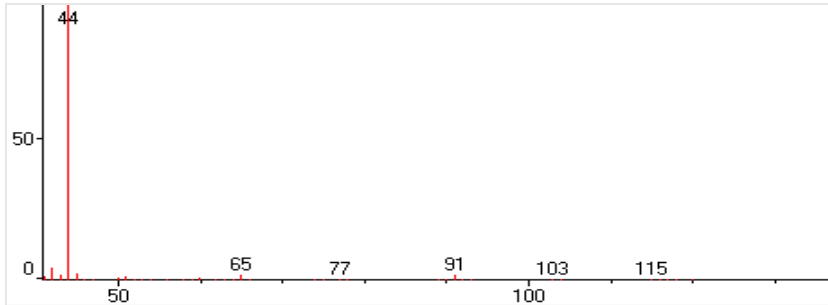
Származékképzés

- **Ópiátok:** szililezés (BSTFA), acilezés (PFPA, HFBA)
- **Kokain és metabolitjai:** szililezés (BSTFA, MTBSTFA), acilezés (PFPA, HFBA)
- **Természetes és szintetikus kannabinoidok:** szililezés (MSTFA, BSTFA, MTBSTFA), acilezés (PFPA, HFBA, TFA), metilezés
- **Amfetaminok, katinonok:** metil-, propyl kloroformát, pentafluoro-oktanoil klorid, szililezés (MTBSTFA), acilezés (HFBA, PAA, AA, PFPA)

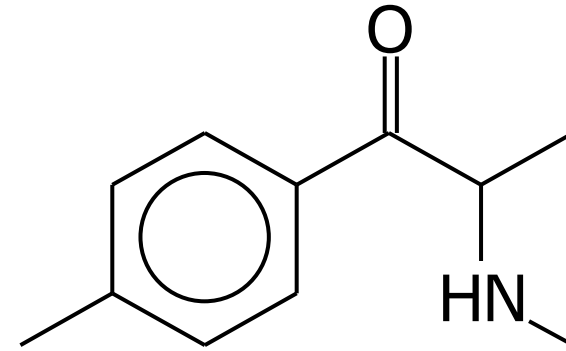




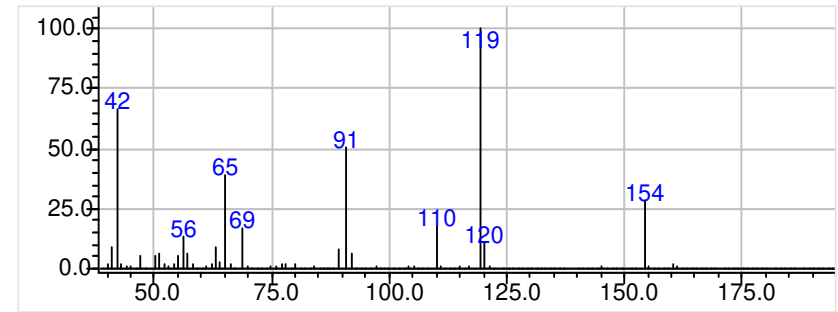
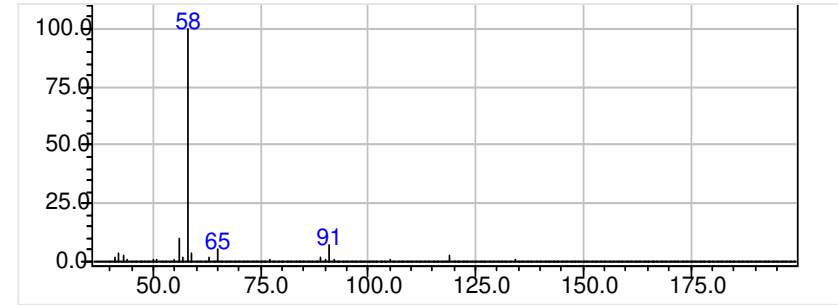
Amfetamin



+MBTFA



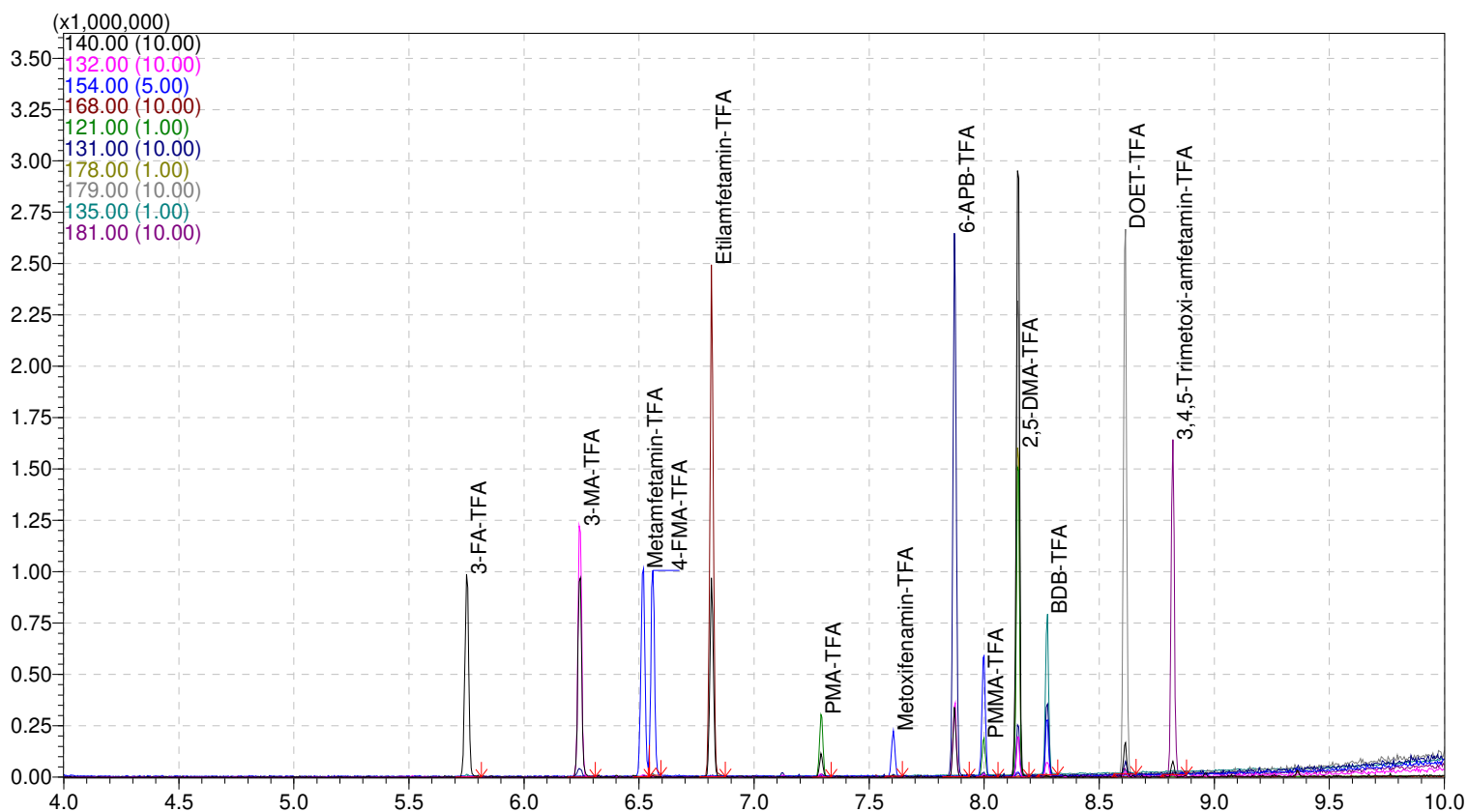
Mefedron



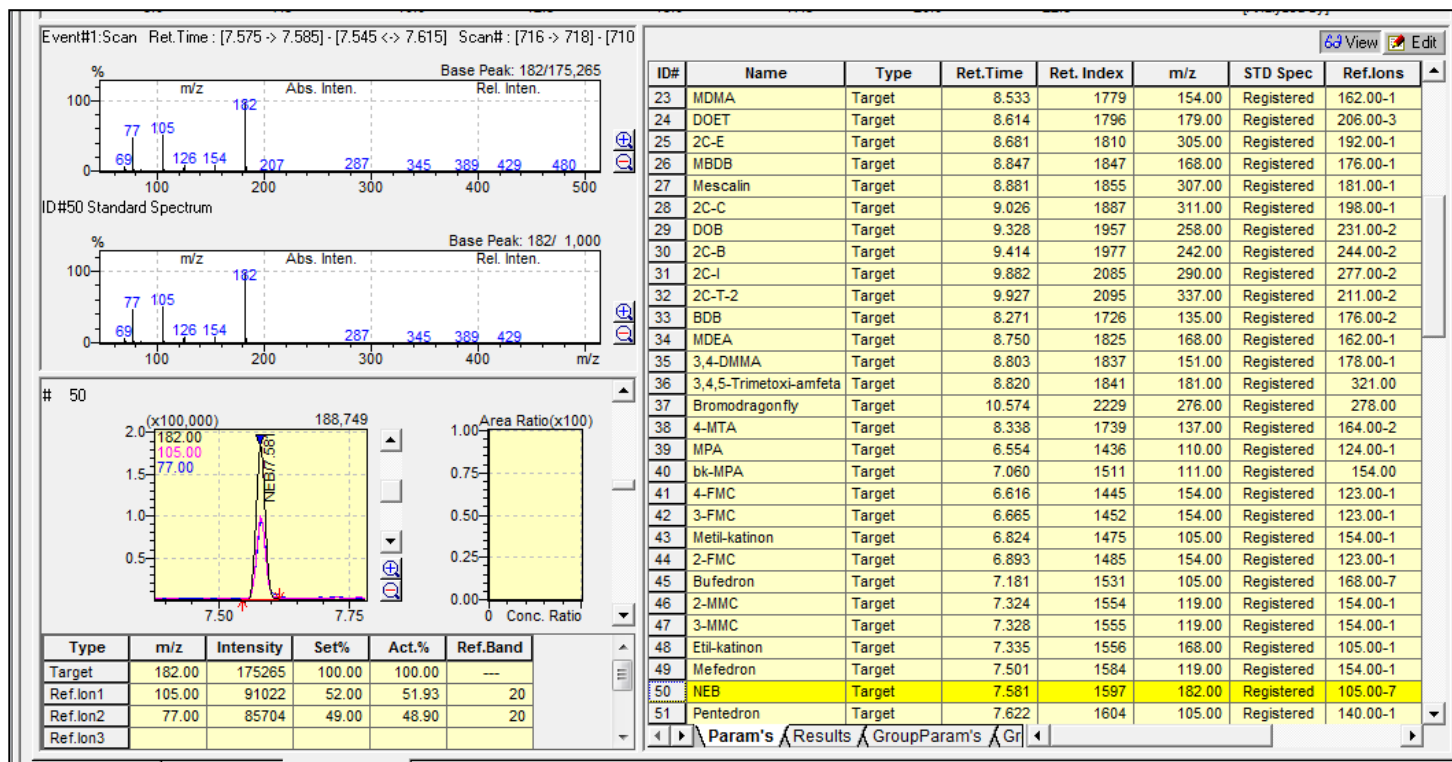
Trifluoracil származékképzés hatására amfetamin és kation-származékok esetében hatékonyabb elválasztást, karakterisztikusabb tömegspektrumokat, emiatt szelektívebb azonosítást és kisebb LOD-értékeket kapunk.



Amfetamin-származékok GC-MS vizsgálata TFA-származékként



Azonosítás – GC-MS



Retenciós idő: változhat a degradáció, ill. a kolonna rövidülése miatt; helyzeti izomérek elválasztása kritikus!

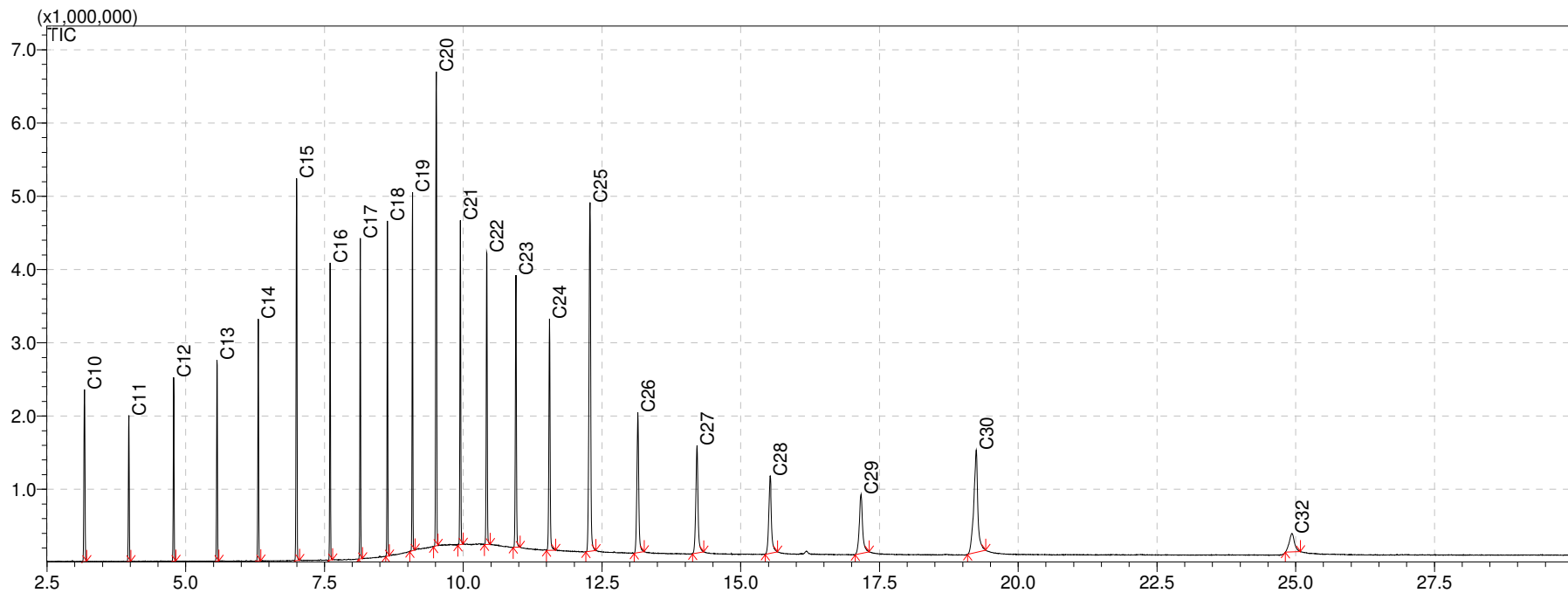
Retenciós index: egy adott rendszeren belül viszonylag stabil

Fragmension-arányok: ha önmagában alkalmazzuk, akkor egyes átfedő, magas koncentrációban jelen lévő mátrixkomponensek miatt fals pozitív eredményre vezethet; a helyzeti izomérek esetén kissé eltérhet

Tömegspektrum: ha önmagában alkalmazzuk, akkor egyes átfedő, magas koncentrációban jelen lévő mátrixkomponensek miatt fals negatív eredményre vezethet



A célvegyületek Kováts-féle retenciós indexének meghatározása

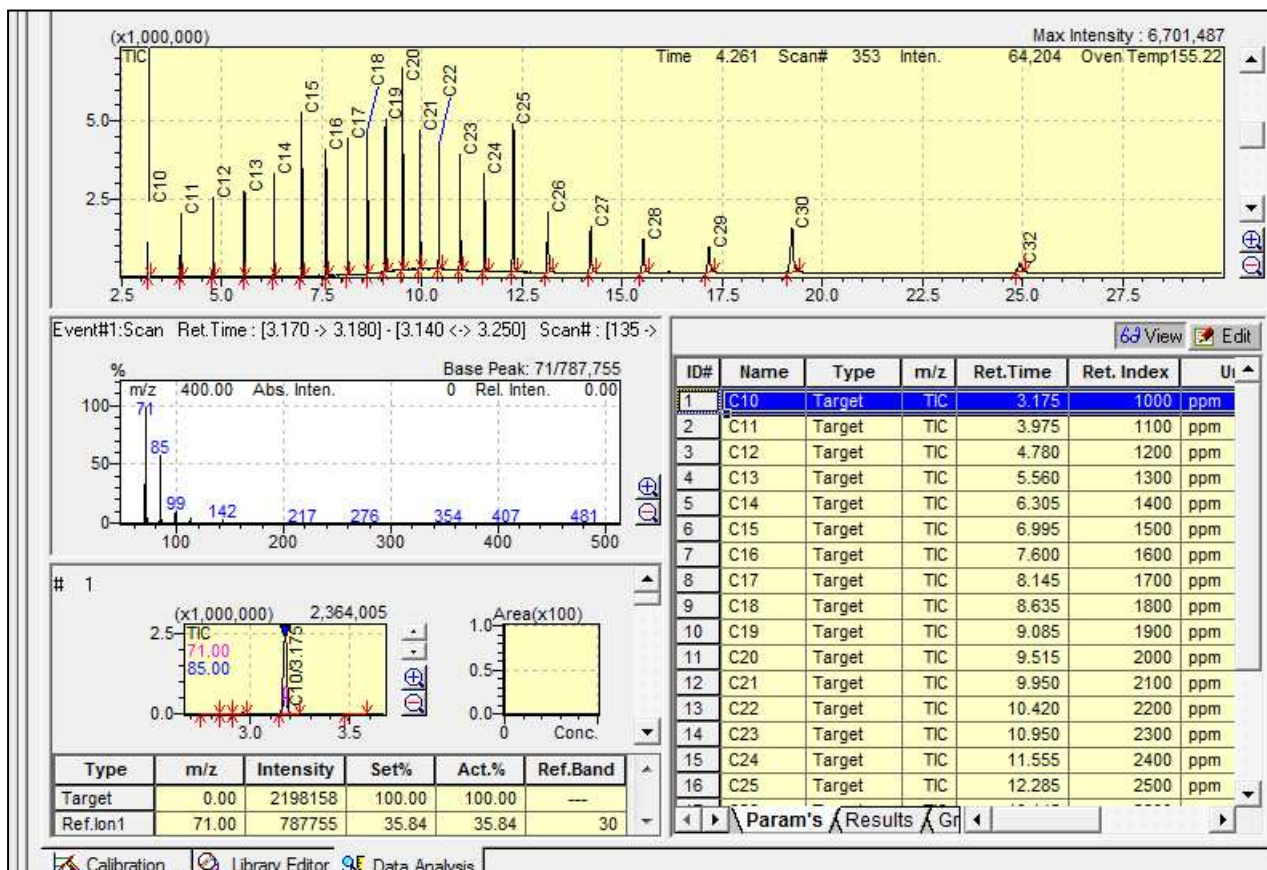


Retenciós index standard keverék alapján

n-Oktán (C8) — *n*-Dotriakontán (C32) [elvileg]

n-Dekán (C10) — *n*-Dotriakontán (C32) [gyakorlatban]





$$I = 100 \left[z + \frac{\log t'_{Ri} - \log t'_{Rz}}{\log t'_{(z+1)} - \log t'_{Rz}} \right]$$

$T_{kol} = \text{áll.}$

$$I^T = 100 \left[\frac{t_{Ri}^T - t_{Rz}^T}{t_{R(z+1)}^T - t_{Rz}^T} + z \right]$$

$\Delta T_{kol} = \text{áll.}$



Mennyire lehet egyértelműen következtetni egyes bomlás-termékek jelenlétéből a kábítószer-fogyasztásra?

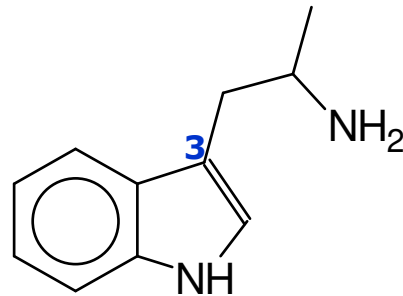
- **amfetamin** pl. az alábbiakból keletkezhet: *benzofetamin, szelegilin, famprofazon, fenetillin, fenproporex, klobenzorex, lisdexamfetamin, mafenorex, prenilamin*
- **mCPP** keletkezhet a **trazodon** nevű gyógyszerhatóanyagból (Trittico)



2-aminopropil-indolok elválasztása

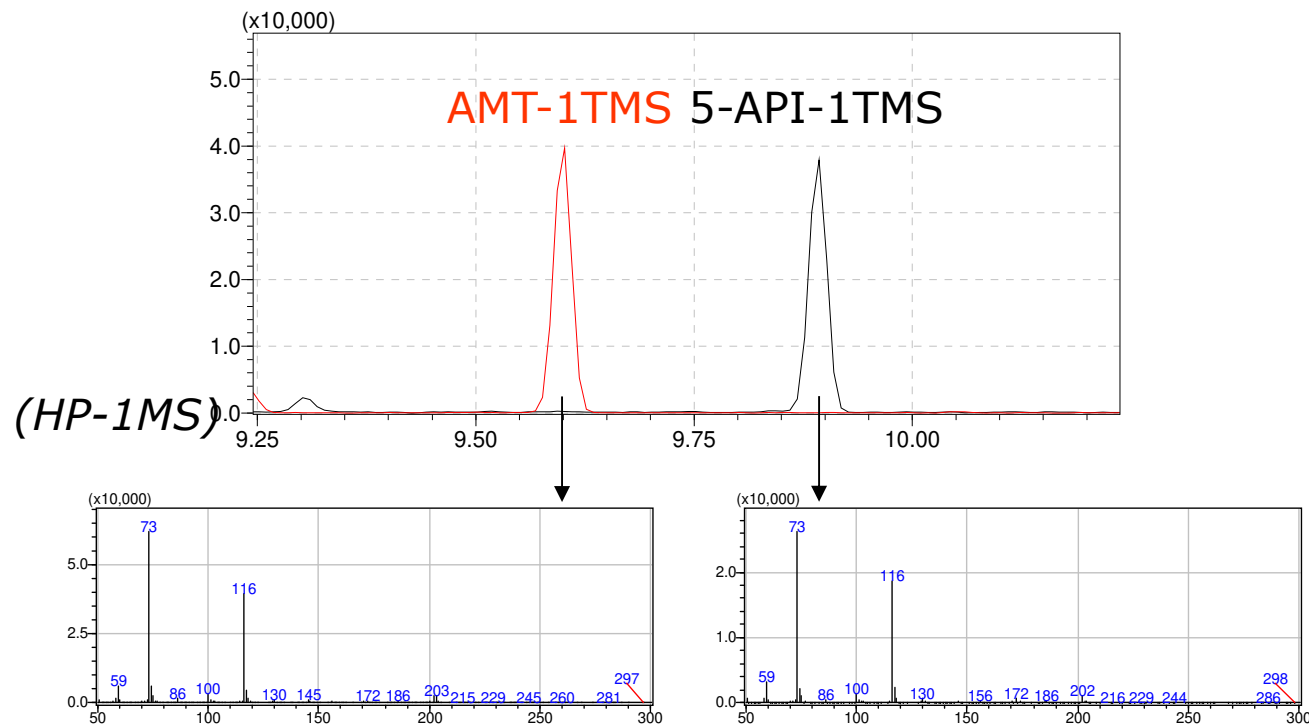
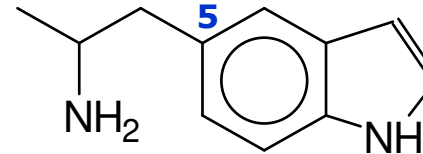
3-IT

[3-(2-aminopropil)indol,
 α -Metil-triptamin, AMT]



5-IT

[5-(2-aminopropil)indol,
5-API]



α -PHP

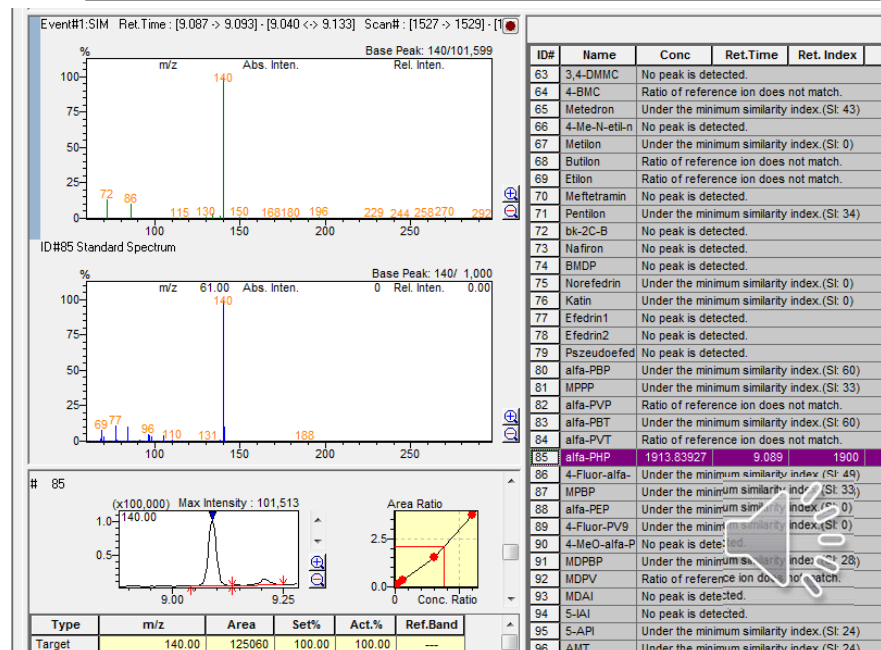
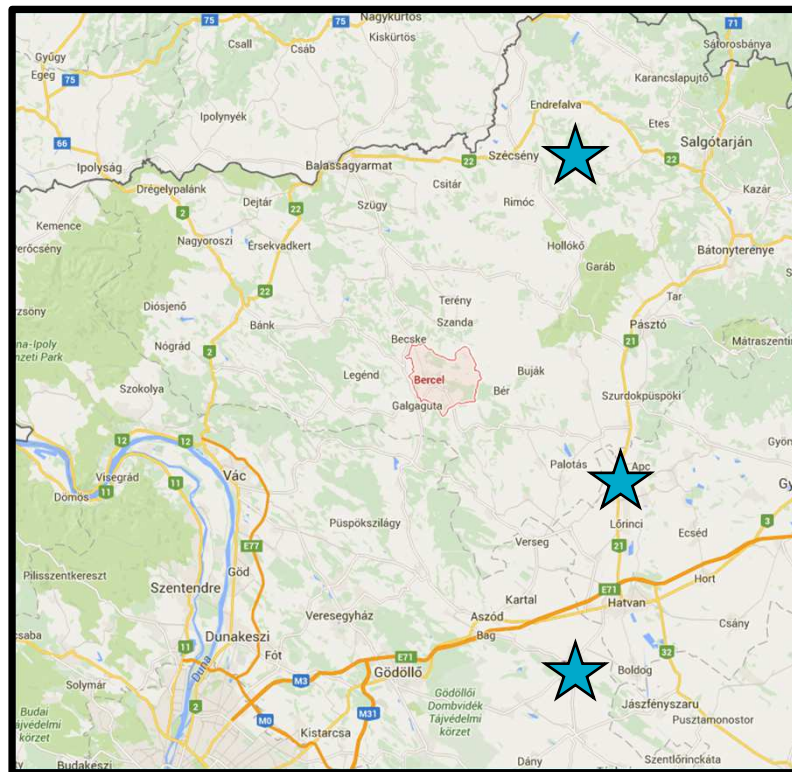
(α -pirrolidinohexanofenon)

2015-ben 3 haláleset

1. 30-35 é. ffi. **agresszív**, a kerítéseken keresztül több telekre bemászott, egy üzlet ajtaját megrongálta, kés van nála. A rendőri intézkedés során rosszul lett, hyperpyrexia, habzó száj, lassú pulzus. A mentők kiérkezésekor életjeleket nem adott, újraélesztés sikertelen.
2. 30-35 é. ffi. rendőri intézkedés során **elhalálozott**.
3. 30-35 é. ffi., rendszeres drogfogyasztó („kristály, bio drog”), elhanyagolt küllemű, megelőző 3 napon nagyobb adagokban fogyasztott. Rendőri intézkedés után **kórházba szállították**. Mentő a földön fekvő, agitált, kontaktusképtelen állapotban találta. Eszméletvesztés, elégtelen légzés, hyperkalaemia, eltérő pupillatágasság, magas testhőmérséklet stb. Aznap este az intenzív osztályon elhunyt.

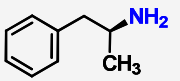
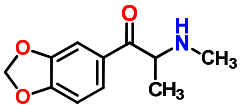
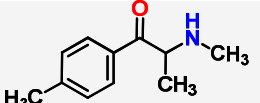
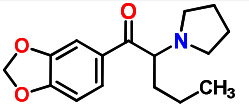
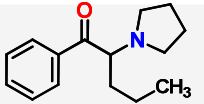
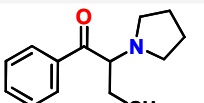
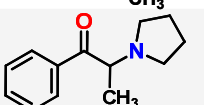
Toxikológiai vizsgálat

Mindhárom esetben magas α -PHP-szint a vérben.



Katinonok

Változó arányú dopaminerg és szerotonerg hatások

		neurotranszmitter visszavétel gátlás, IC ₅₀ , nM		<i>patkányagy preparátum</i>
		DA	5-HT	IC ₅₀ arány DA/5-HT
	d-amfetamin	93	3420	0,027
	metilon	1230	1020	1,2
	mefedron	762	422	1,8
	MDPV	4,1	3300	0,001
	α-PVP	12,8	>10,000	<0,001
	α-PBP	63,3	>10,000	<0,006
	α-PPP	197	>10,000	<0,020

mozgásstimuláló
hatás egérben

MDPV

α-PVP

α-PBP

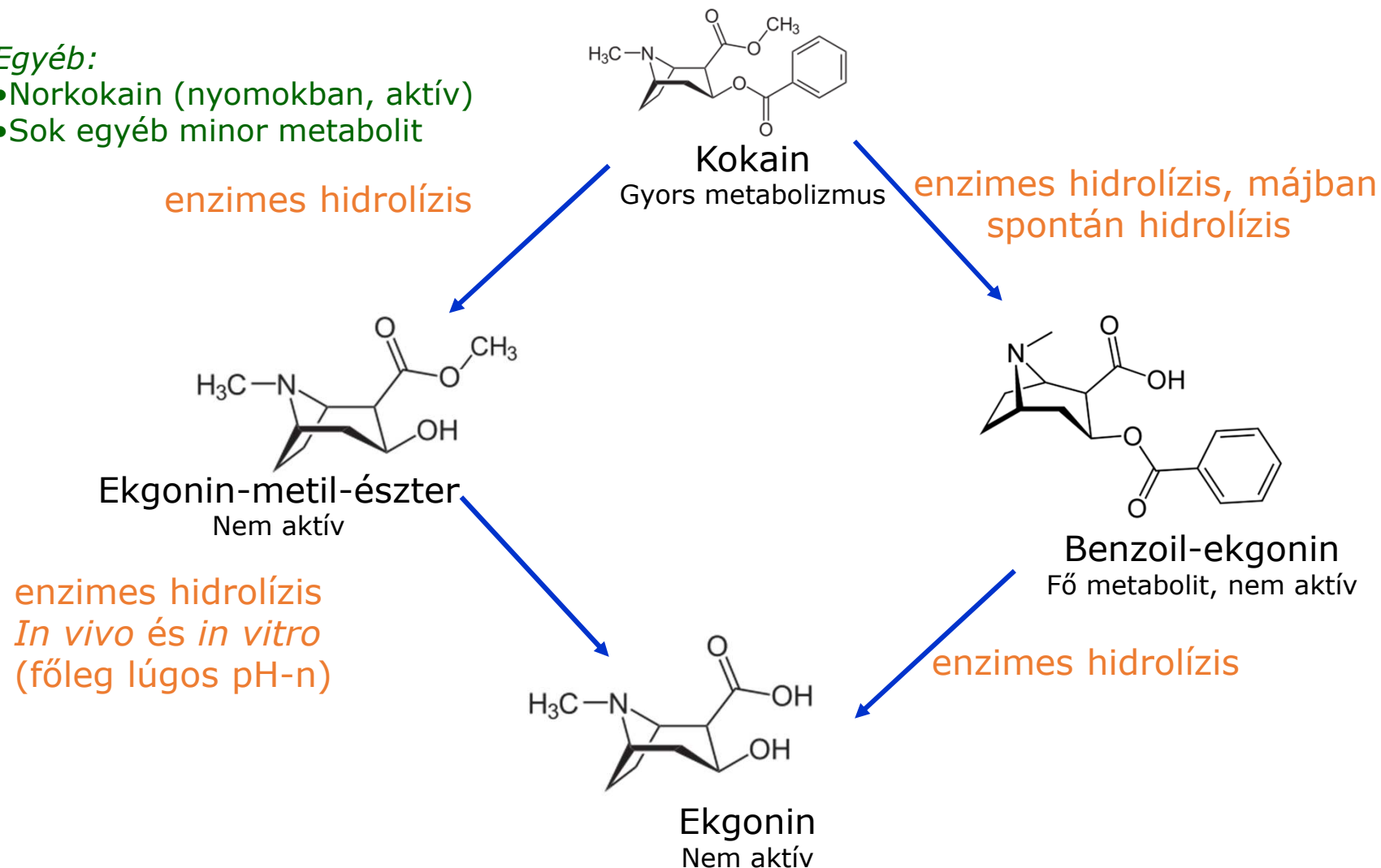
α-PPP

Kokain-metabolizmus

Megerősítő vizsgálat vérben, vizeletben:
HPLC-DAD („diode array detector”), HPLC-MS

Egyéb:

- Norkokain (nyomokban, aktív)
- Sok egyéb minor metabolit



Kokain exkréciója a vizelettel

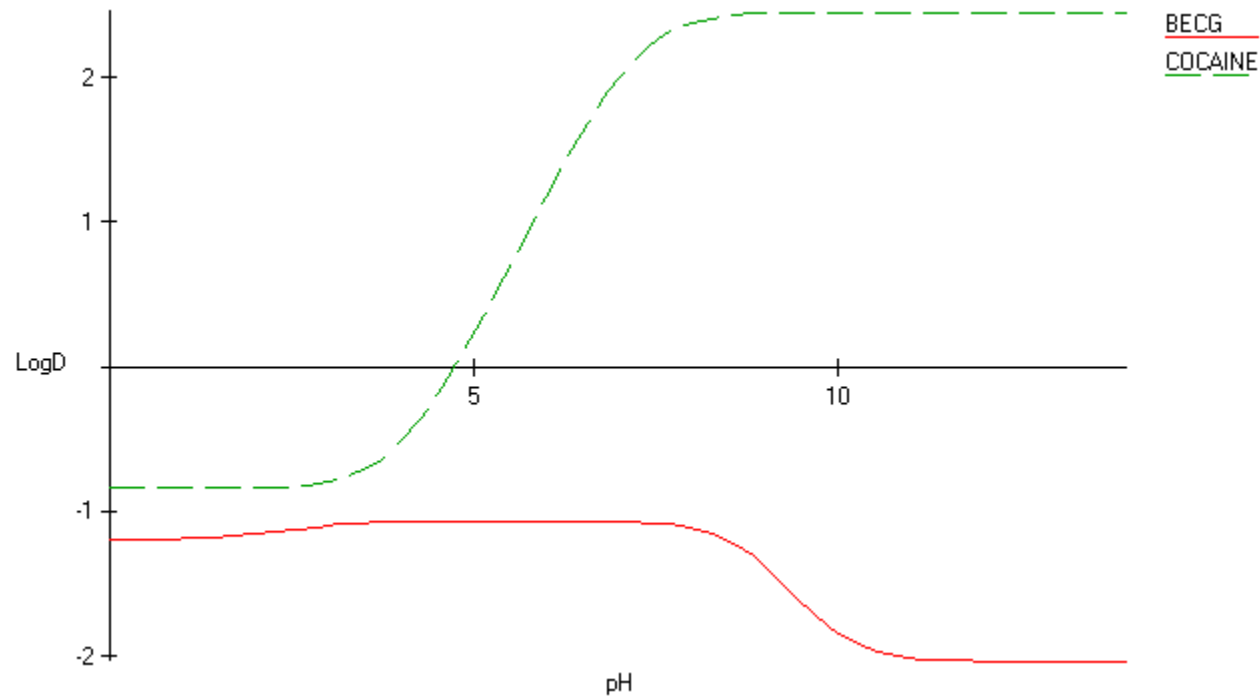
- változatlan: kb. 1 - 9%
- **Benzoilekgonin:** 35 - 55%
- **Ekgonine-metilészter:** 32 – 49 %
- **Ekgonin:** < 5%
- A változatlan forma vizelet-exkréciója magasabb, ha a vizelet savas pH-jú.
- Speciális kokain-metabolitok:
 - **Kokaetilén:** Ha egyidőben alkoholfogyasztás is történt.
 - **Metilekgonidin:** Ha a kokaint cigarettában szívják.

***Per os* fogyasztáskor a gyomor-bélrendszerben megkezdődik a hidrolízis, ezért így kevésbé toxikus a kokain.**

A kokain és metabolitjainak vizelettel történő eliminációja általában 48 órán belül teljes.

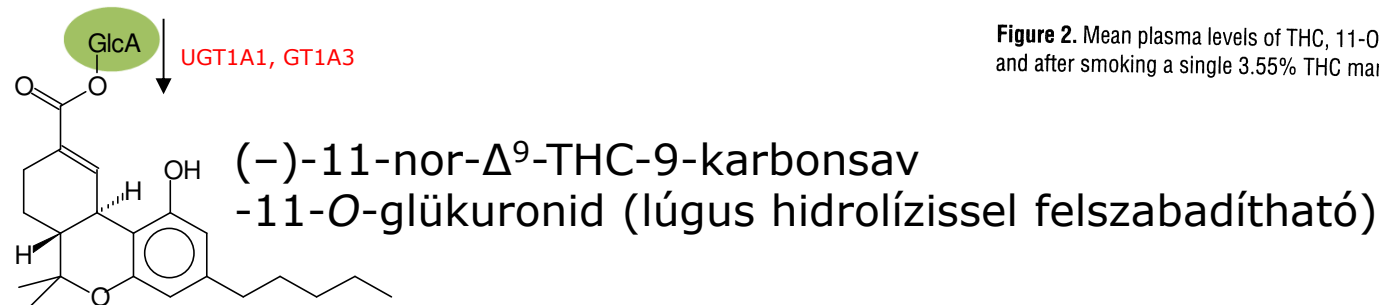
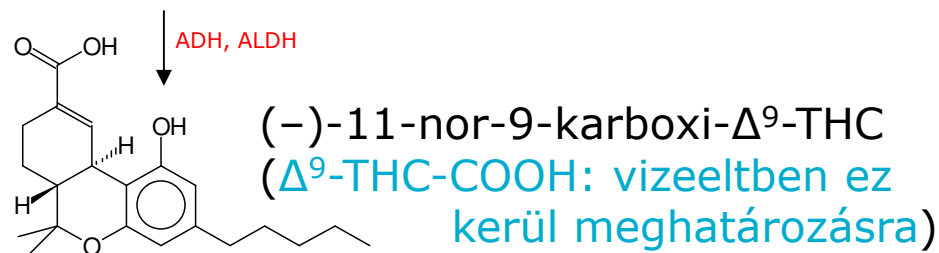
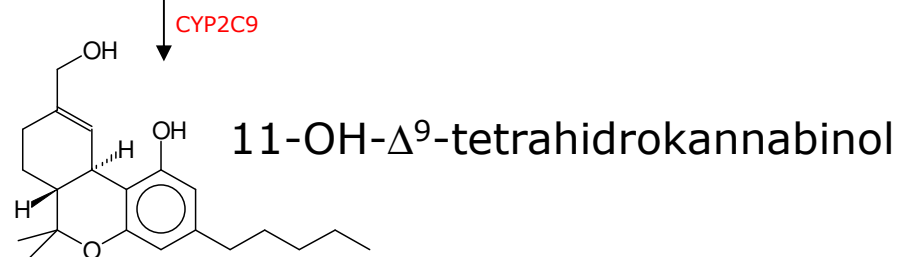


Kokain és BECG extrakciós problémái



Cannabis

Dekarboxileződés
hő hatására az előanyagból
(Δ^9 -THCA-A)



Megerősítő vizsgálat vérben, vizeletben:
GC-MS/MS, ill. HPLC-DAD

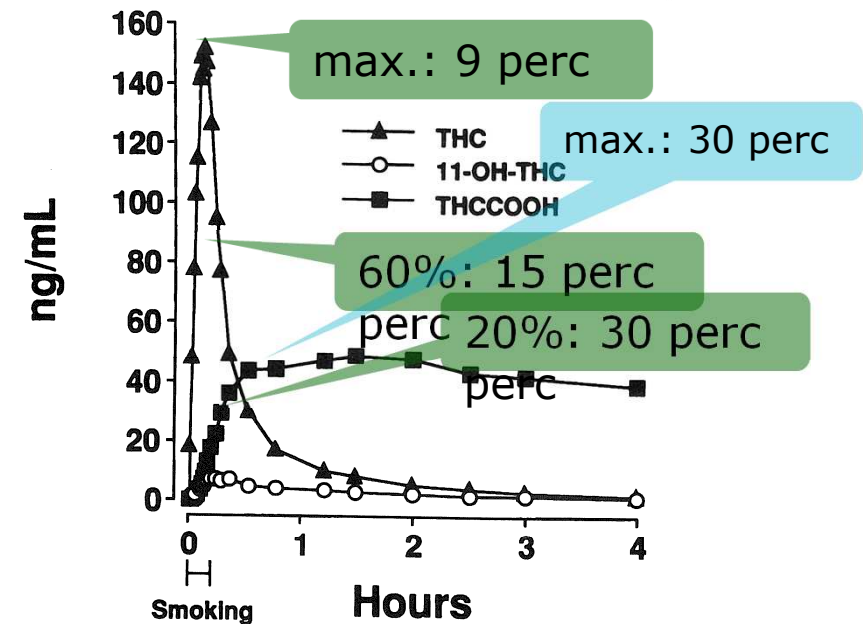
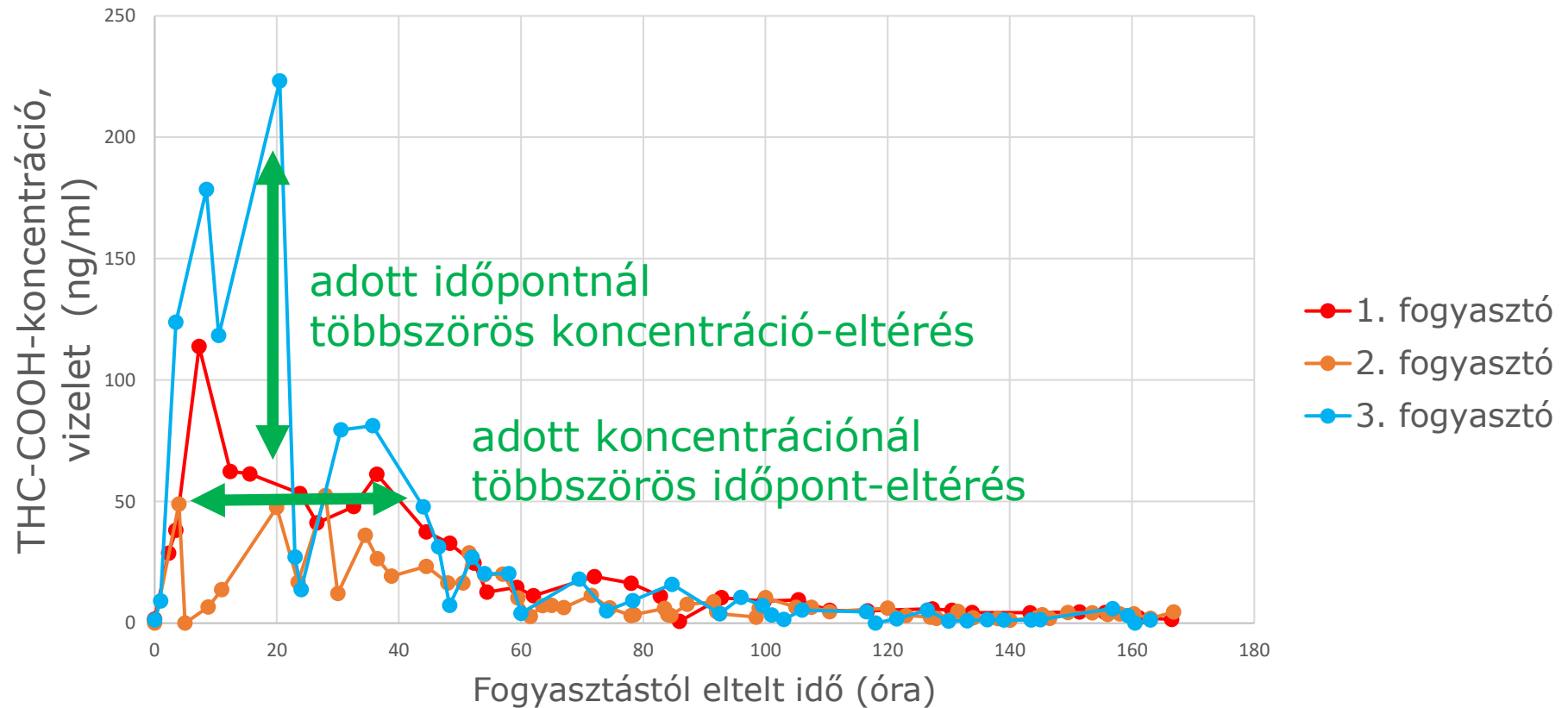


Figure 2. Mean plasma levels of THC, 11-OH-THC, and THCCOOH during and after smoking a single 3.55% THC marijuana cigarette.

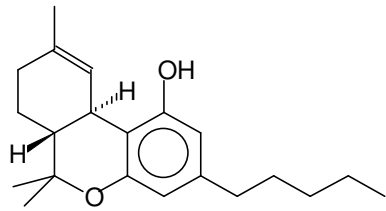
A konjugált forma aránya: **1,3-4,5**



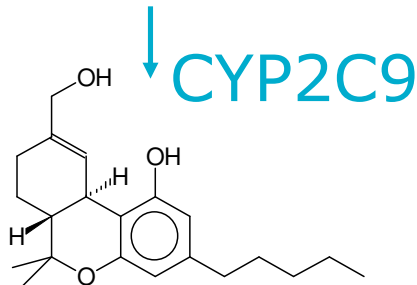
THC-COOH-szintek (ellenőrzött dózis)



Genetikai háttér

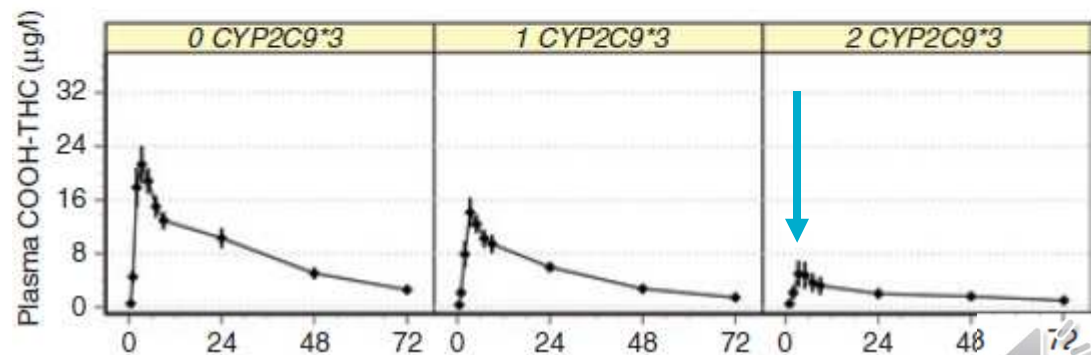
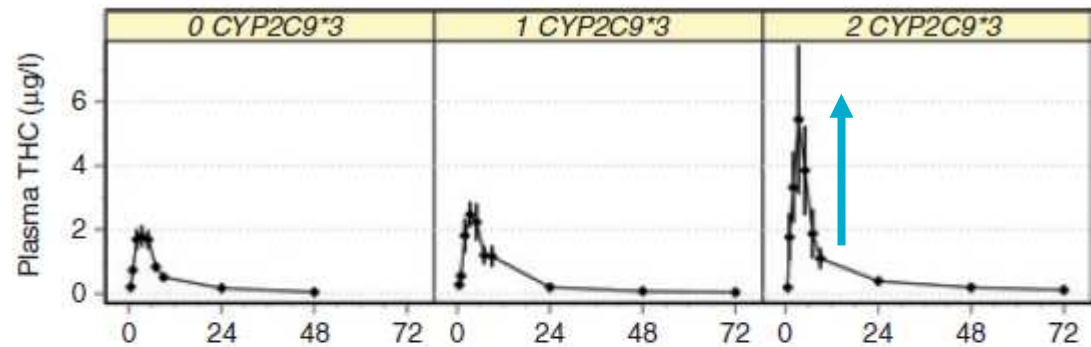


Δ^9 -tetrahidrokannabinol (Δ^9 -THC)



11-OH- Δ^9 -tetrahidrokannabinol

*1(2)*1(2): normál metabolizmus
*3*3: csökkent metabolizmus –
erősebb hatás



A kannabisz passzív inhalációja

- Elterjedt védekezési mód: **a THC-COOH a mások** által zárt térben, nagy mennyiségben szívott **marihuánás cigaretta** kifújt, illetve az égő végeken keletkező, majd a vizsgált személy által **passzív módon** (újból) belélegzett **füstjéből** származik.
- **Kísérletek** (zárt tér, „füstölő-készülék”):
 1. *Cone (1987., 1990.)*
 2. *Röhrich (2010.)*
 3. *Cone (2015.)*



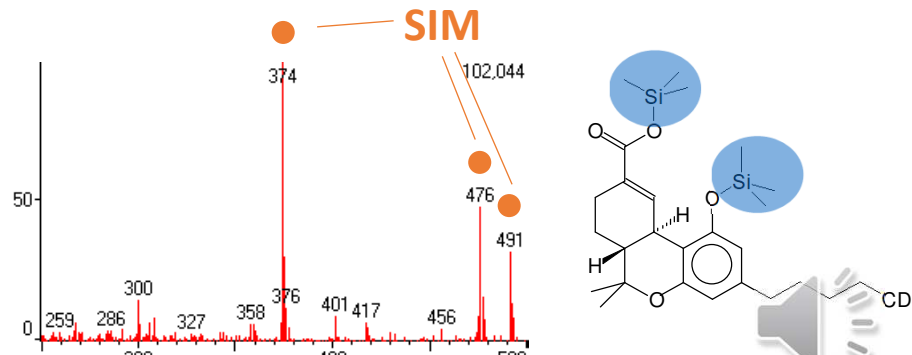
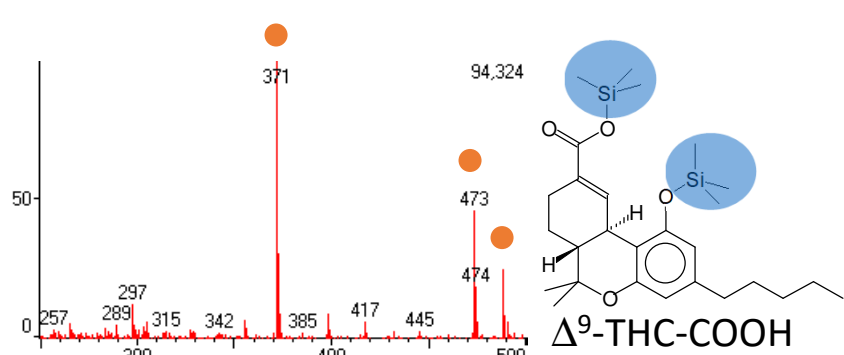
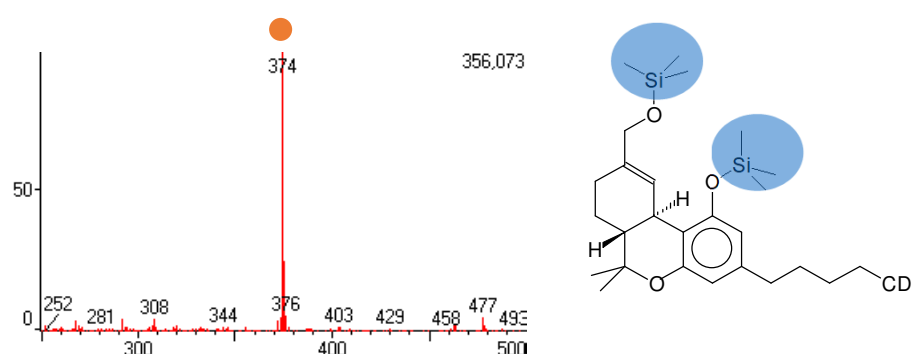
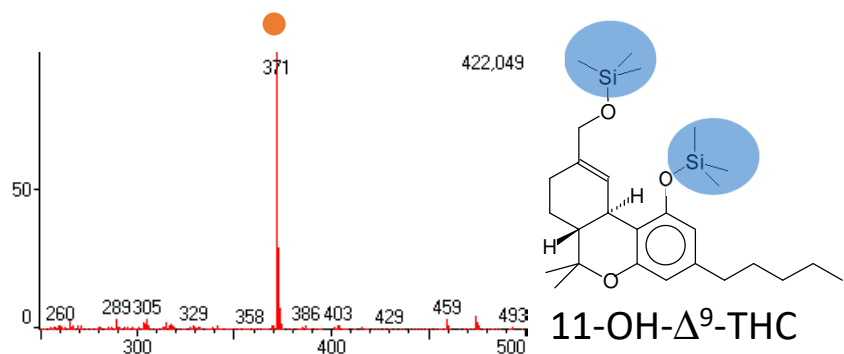
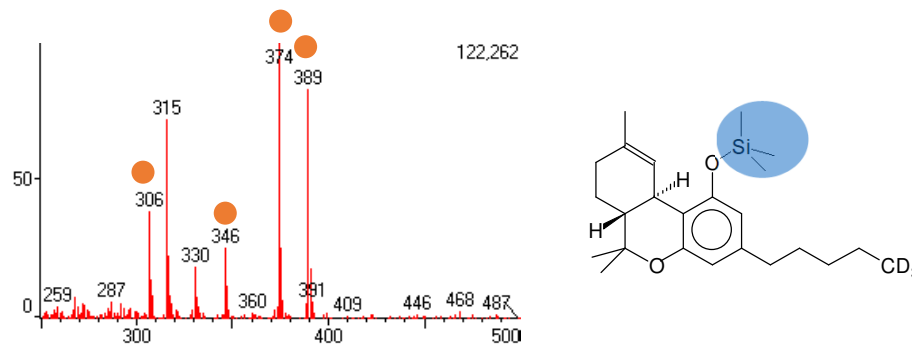
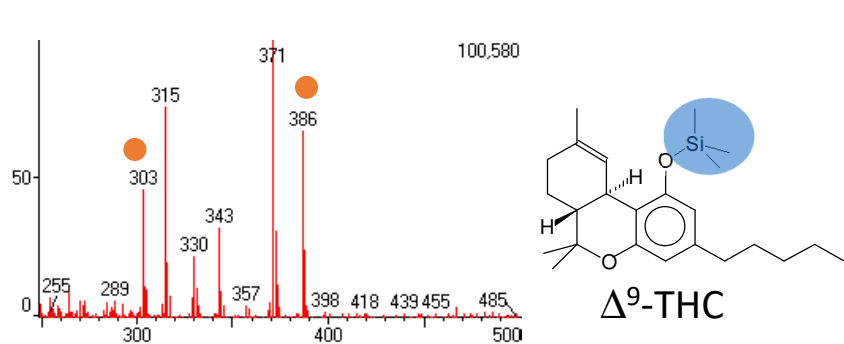
A kannabisz passzív inhalációja

Kísérlet	Cigarettek száma	THC-tartalom (cig. tömeg)	Szoba térfogata	Időtartam	THC-COOH csúcskoncentráció a vizeletben
1.	iiiiiii (2x)	2,8% (0,9 g)	12,6 m ³	1 óra/nap, 6 napig	15-35 ng/ml
2.	8-25 😊	-	200 m ³	3 óra	2,6-7,8 ng/ml
3.	6 😊	5,3% (0,9 g)	26 m ³	1 óra	6,8-20,1 ng/ml
3.	6 😊	11,3% (0,9 g)	26 m ³	1 óra	5,5-57,5 ng/ml

A passzív inhaláció „kiszűrésére” ún. *cut off* érték alkalmazását javasolják: **15 ng/ml** (SHAMSHA) vagy **20 ng/ml** (GTFCh).



Főbb tetrahidrokannabinoidok meghatározása vérben - GC-MS-vizsgálat



SIM („selective ion monitoring“)

SCAN

GC-MS/MS készülék



Shimadzu GCMS-QP8050

- Ütközési gáz: Ar
- Lehetséges elemzési módok:
 - „Multiple Reaction Monitoring (MRM)
 - Product Ion Scan
 - Precursor Ion Scan
 - Neutral Loss Scan
 - Q1 és Q3 Scan
 - Q1 és Q3 SIM
- Átmenetek száma: <math>< 800/\text{sec}</math> (MRM)
- Pásztázási sebesség: <math>< 20\,000\text{ Da}/\text{sec}</math> (Q3 Scan)

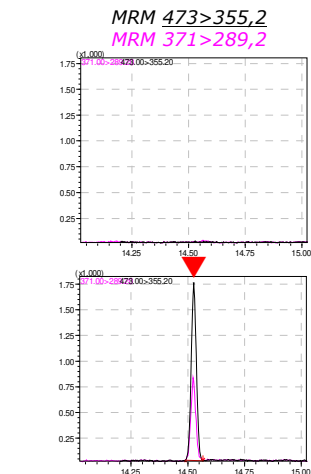
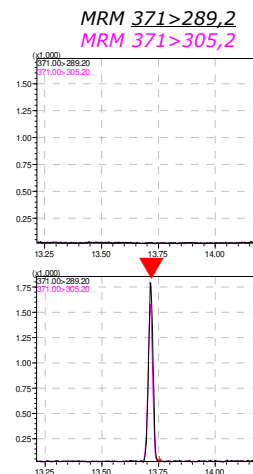
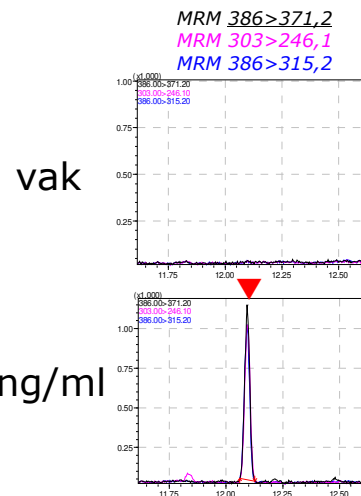
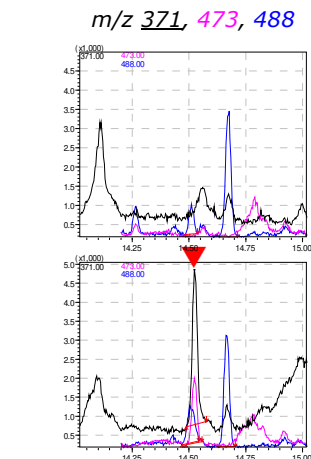
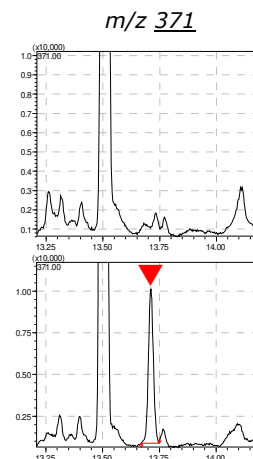
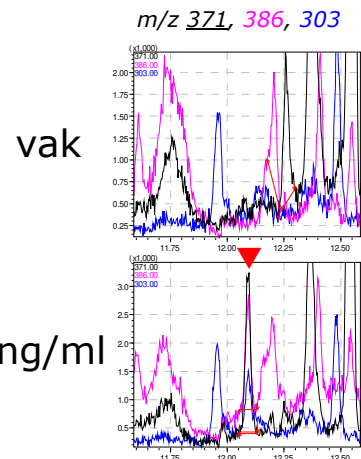


Kannabinoidok meghatározása vérplazmában

Δ^9 -THC

11-OH- Δ^9 -THC

Δ^9 -THC-COOH



SIM

MRM



„Biofű / Herbál / Szintifű” (AB-CHMINACA)



ADB-FUBINACA – „Facebook-tabletta“



EMCDDA - Alert

Substances

15 non-fatal intoxications associated with tablets containing ADB-FUBINACA in Hungary, 8 May 2015

The Hungarian National Focal Point has informed us that 15 persons were hospitalised between Monday and Thursday this week at the Toxicology Department of the Péterfy Hospital in Budapest after consuming tablets called 'Facebook' or 'Like'. The users either swallowed the tablets or crushed them and then sniffed the powder. All patients had the same symptoms: drowsiness, respiratory deprivation, CO2 retention, hypotonia, hypotheria, vomiting, synus tachycardia, wide pupils, extrapyramidal movement disorder, hyperkinesis, acustic and visual hallucinations, agitation and mixed symptoms. Two of the patients needed treatment in intensive care.

The Hungarian Institution for Forensic Sciences laboratory has analysed one tablet seized by the National Investigation Office on Wednesday and found it to contain ADB-FUBINACA. The tablet has a square shape and is light blue with the letter "f" on both sides (picture attached to this email). In addition, 10 biological samples taken from the patients were analysed by the Forensic Laboratory of the SOTE University and ADB-FUBINACA was detected in each sample. In two cases other psychoactive substances were identified as well (still to be analysed).

(Last Update: 08/05/2015)

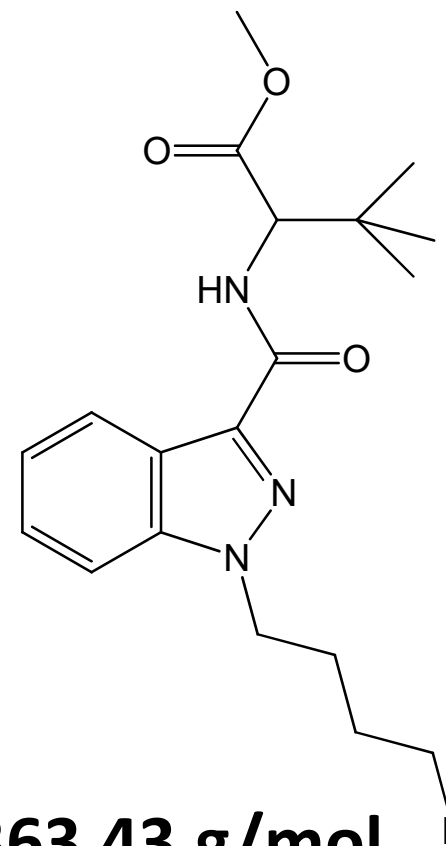


Szintetikus kannabinoidok

Megerősítő vizsgálat vérben, vizeletben:
enzimes hidrolízis (vizelet) - SLE - UHPLC-MS/MS

4F-MDMB-BINACA

- Először 2018. november-decemberben számoltak be róla Franciaországból, Angliából és Hollandiából

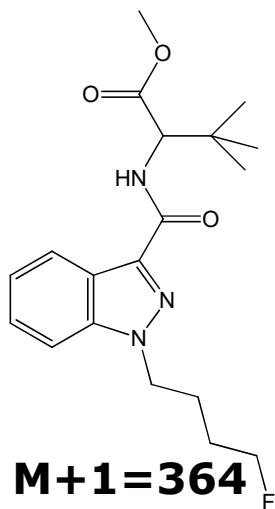


Mw= 363,43 g/mol



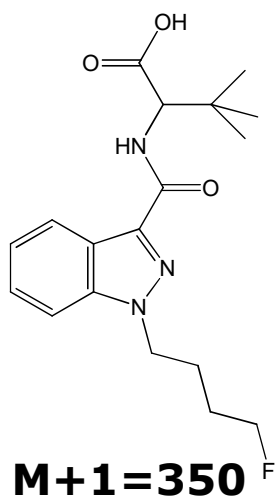
4F-MDMB-BINACA és metabolitja

MRM-átmenetek



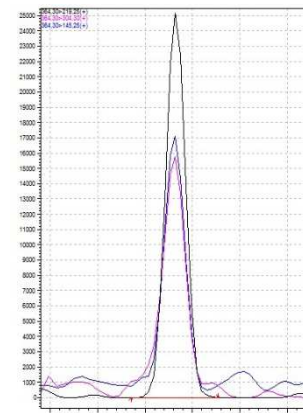
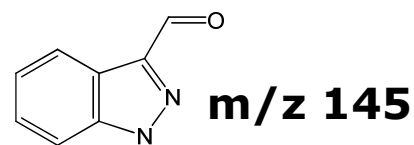
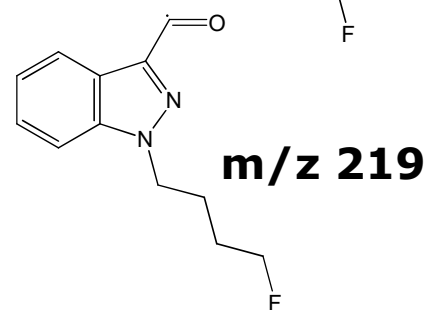
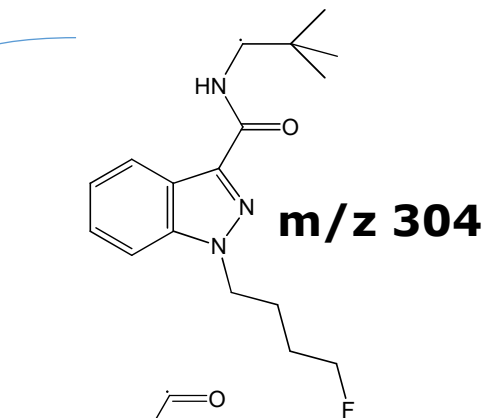
4F-MDMB-BINACA

364,30 > 219,25
364,30 > 304,30
364,30 > 145,25

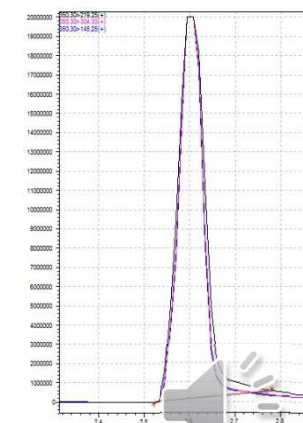


4F-MDMB-BINACA-karbonsav

350,30 > 219,25
350,30 > 304,30
350,30 > 145,25

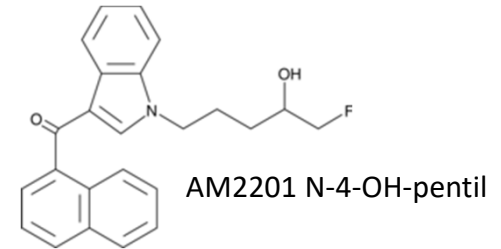
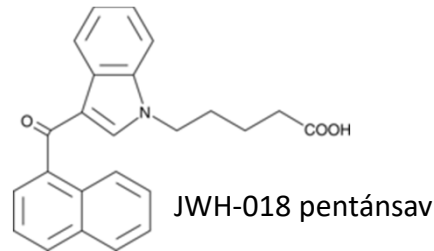
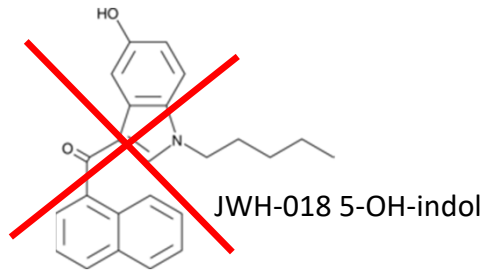
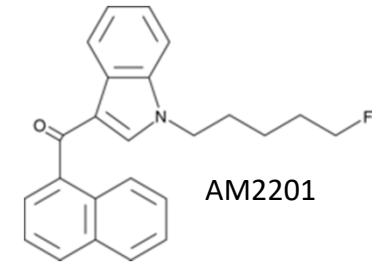
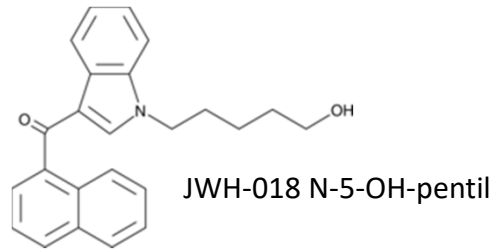
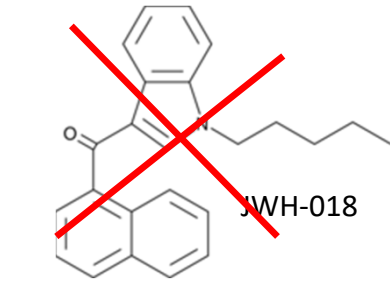


~0,9%



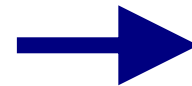
100%

Szintetikus kannabinoidok vérben



Pozitivitás

- JWH-018 N-5-OH-pentil
- JWH-018 N-pentánsav
- AM2201 N-4-OH-pentil
- AM2201



AM2201
fogyasztás
(UPSZ)

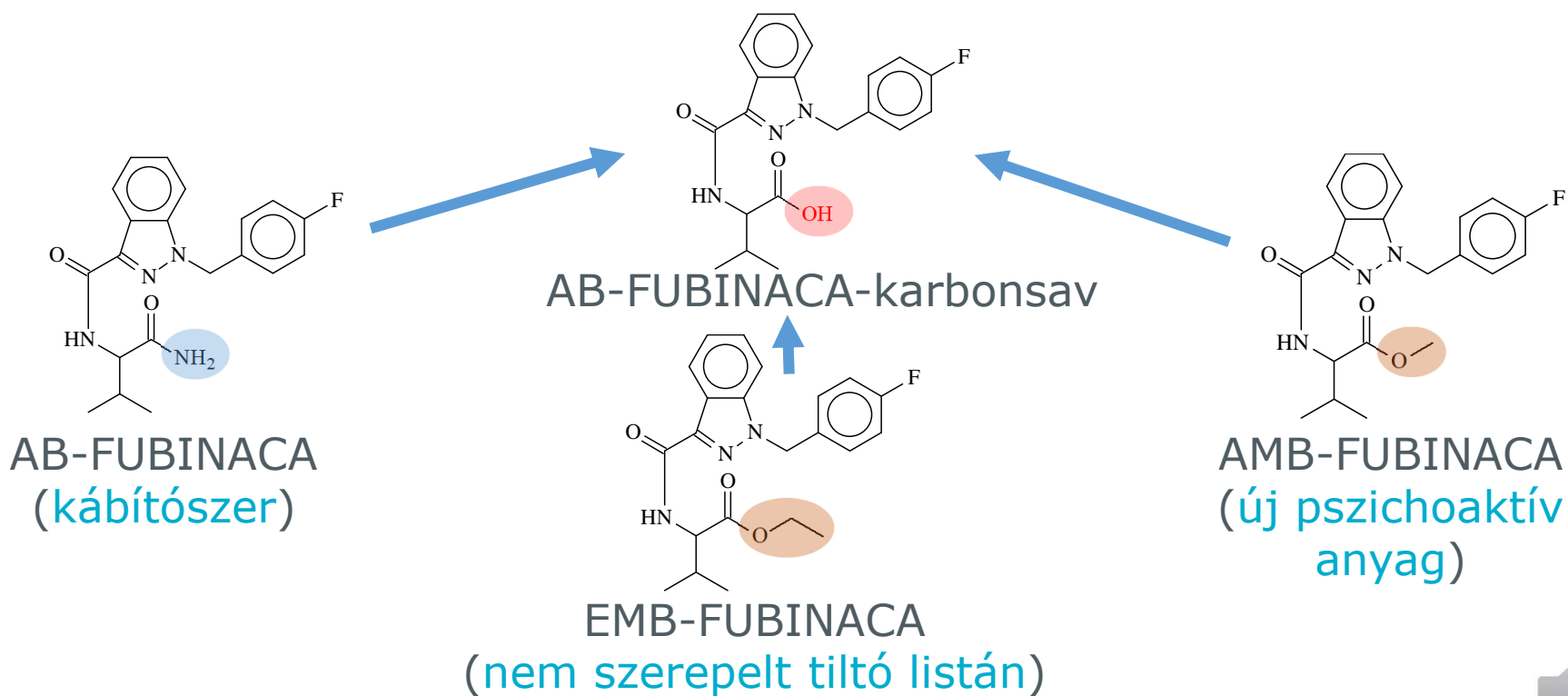


(Dobos Adrienn)

Vizsgálati eredmények értelmezése

Jogi besorolás nehézségei:

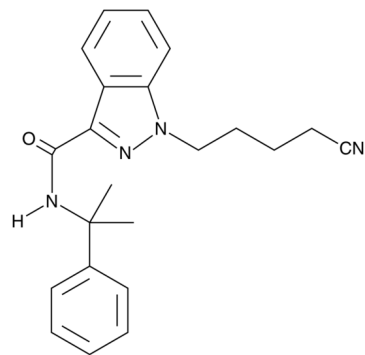
Pl. a 55/2014 (XII.30.) EMMI rendelet 2017. május 5-i módosítása előtt előfordulhatott az alábbi bizonytalanság:



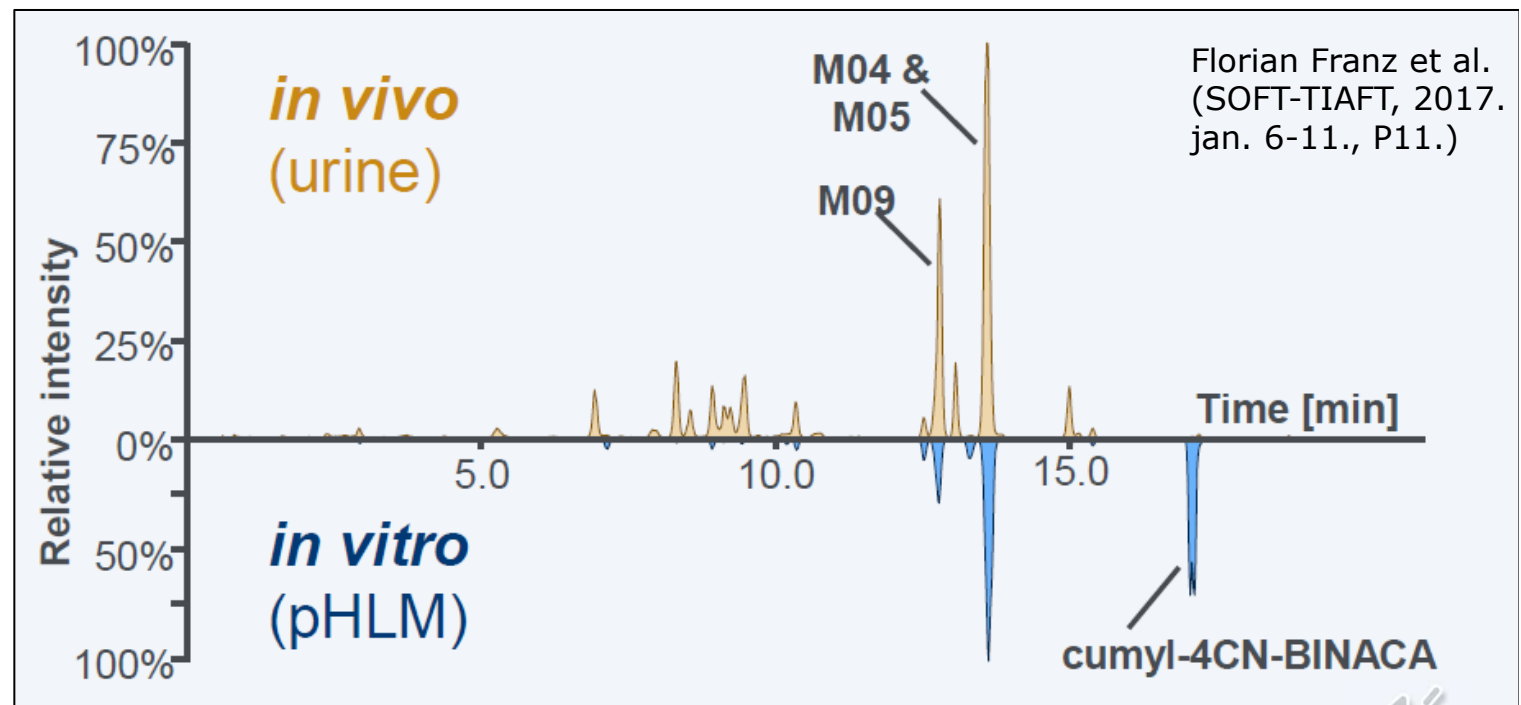
(Dobos Adrienn)

In vitro modellkísérletek

- Emberi máj mikroszóma (pHLM) és S9 frakció, ill. primer májsejtek (PHH)
- 2-3 metabolit egyezték meg: **azonosítás**



CUMYL-
4CN-BINACA

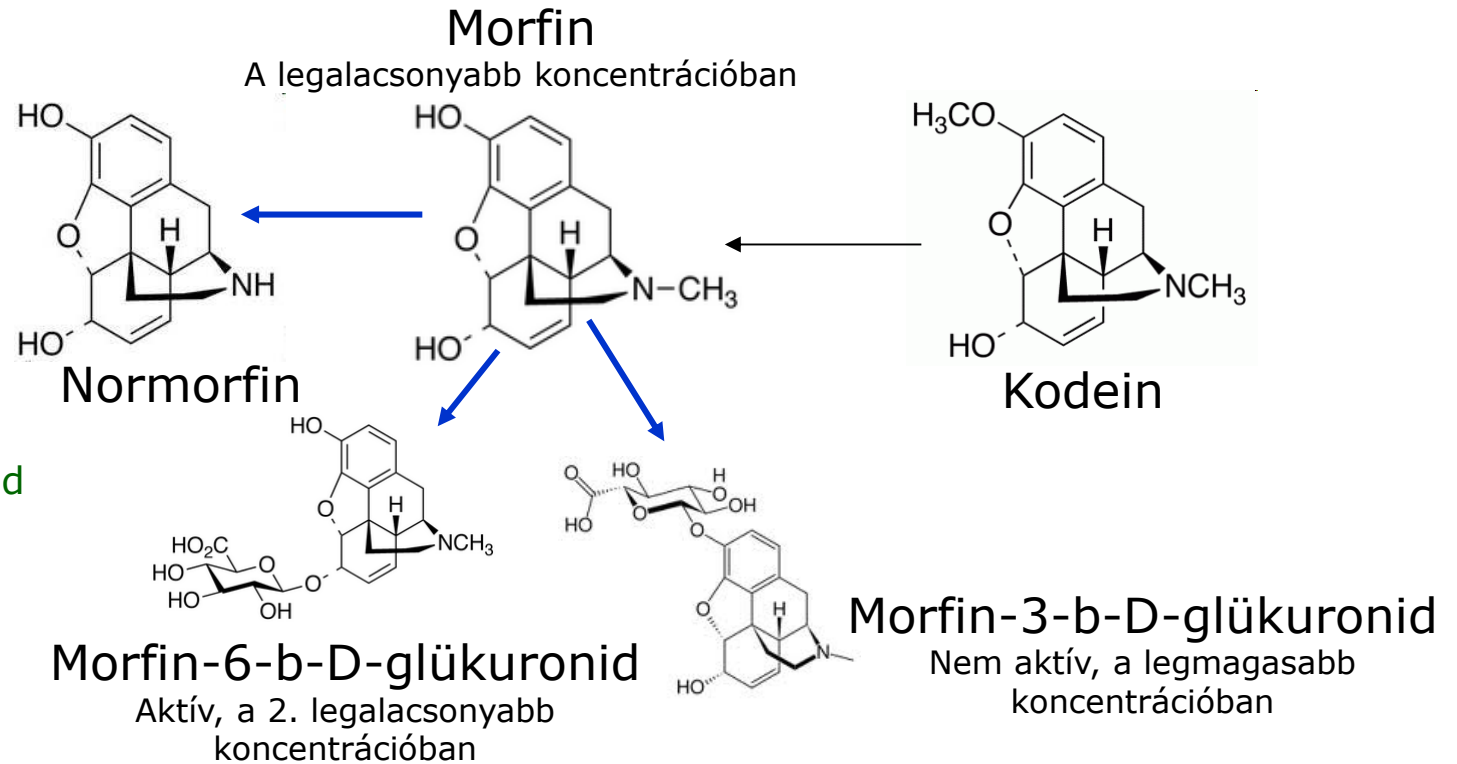


Kimutatható ópíátok morfin, ill. heroin-fogyasztás után

Morfin

Egyéb:

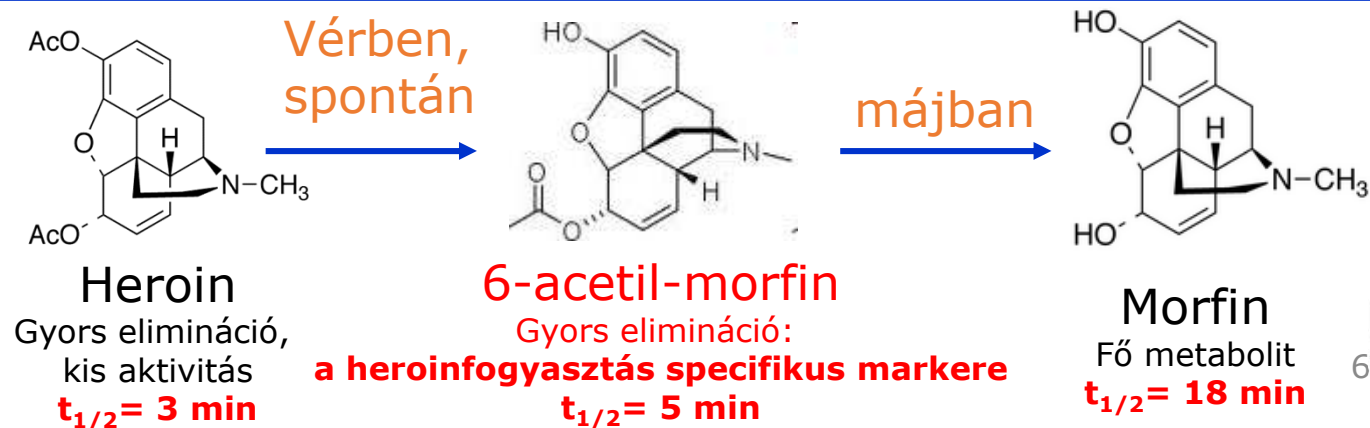
- morfin-3-éter-szulfát
- morfin-3,6-diglükuronid



Heroin

Egyéb:

- 6-acetilkodein

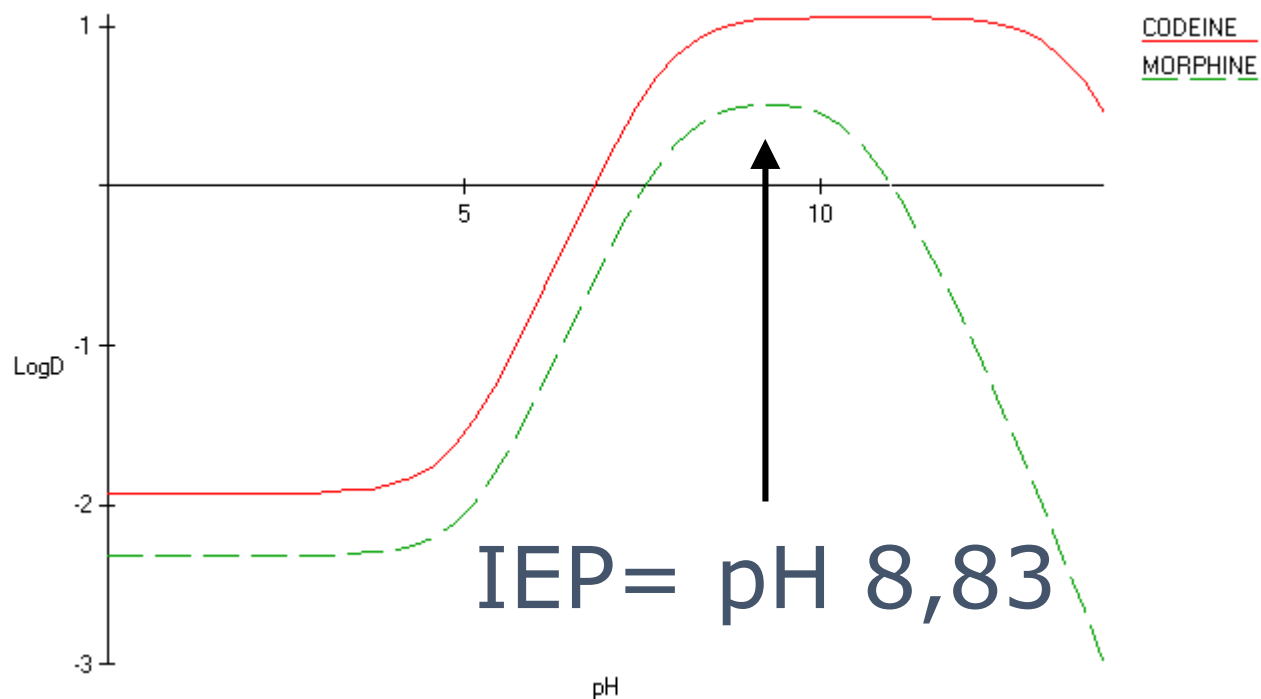


Exkréció - heroin

- **Vizelettel a dózis 45 %-a ürül 40 órán belül**
 - 4 % morfin
 - 40 % morfin-3-glükuronid
 - 1 % 6-acetil-morfin
 - 0,1 % heroin

Ópiátok extrakciós problémái

Megerősítő vizsgálat vérben, vizeletben:
enzimes hidrolízis (víz.), SPE (HCX), HPLC-MS



„Poppy seed defence”

- A morfin kimutatható a **heroinfogasztás** után, sok esetben a 6-AM viszont nem
- Védekezés: a morfin jelenléte **mákos ételektől** származik
- Frissen szüretelt mákszem: 50-220 $\mu\text{g/g}$ morfin.
- Ajánlott határérték étkezési mákszem morfintartalmára: **4 $\mu\text{g/g}$ morfin** (2014/662/EU)
- Javasolt *cut off* értékek: 300-2000 ng/ml (6-AM: 10 ng/ml)

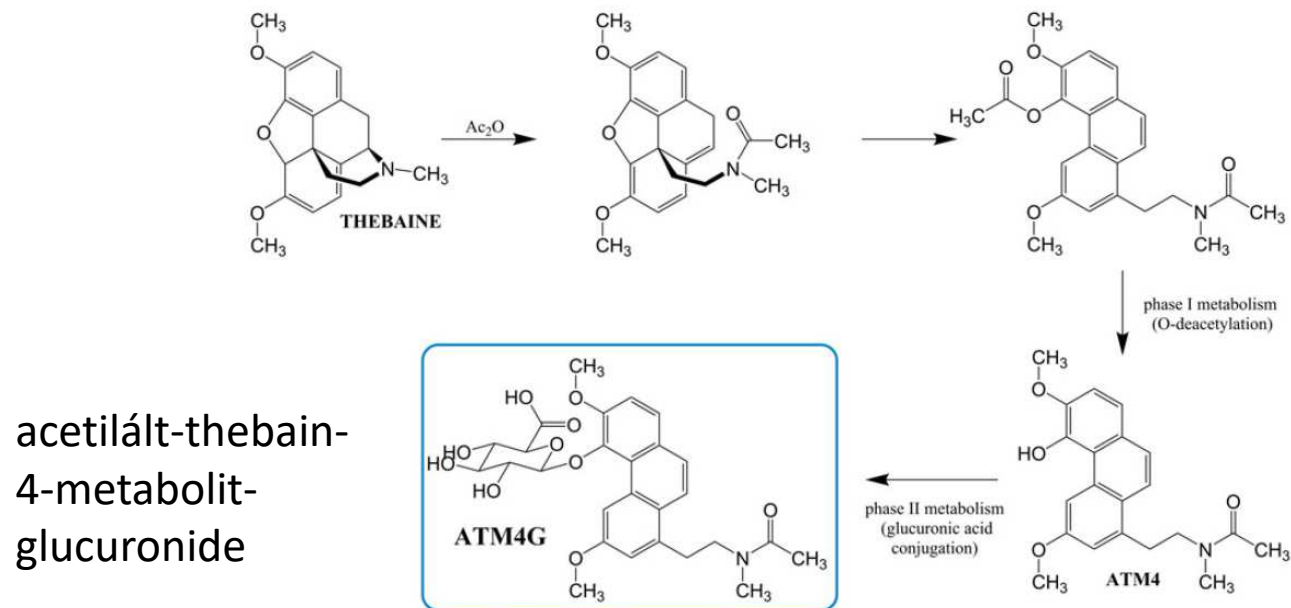
„Poppy seed defence”

Heroin-dózis [mg, i.v.]	A vizeletben kialakuló összmorfin csúcskoncentrációja* [ng/ml]	Referencia
70	116 000	Elliot et al., 1971.
10	11 000-29 000	Samano et al., 2015.
-	11 200-920 000	Moriya et al., 1999.
3-12	1 800-29 000	Jenkins et al., 2001.

Elfogyasztott mák [g]	A mák morfin-tartalma [µg/g]	Morfin-dózis [mg, p.o.]	A vizeletben kialakuló összmorfin csúcskoncentrációja [ng/ml]	Referencia
25	0,6-4,4	0,11	12-220	Maas et al., 2017.
15	220	3,2	260-4 200	Samano et al., 2015.
45	350	15,7	2 400-7 500	Smith et al., 2014.
12-52	0,6-150	1,8-7,7	1 900-10 000	Thevis et al., 2003.
150-180	90	2,2-16,2	1 700-3 100	Mátyus, 2012. (PhD értekezés)

Alternatív heroin-markerek

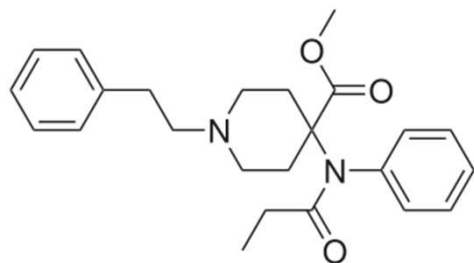
- A **thebain** általában jelen van az utcai heroinban
- **ATM4G** mint kiegészítő marker a **6-AM** (és 6-AC) mellett (többször került kimutatásra)



Moszkva, Dubrovka Színház

2002. október 23-26.

- Túszerdrama (40 csecsen terrorista, 912 ember, 50 óra)
- 26-án a szellőzőrendszeren át „kábító gázt” vetettek be, ezután megrohamozták a színházat, a kábult terroristákat lelőtték
- 130 civil és a 40 terrorista életét veszttette; tökéletes terrorellenes akció, felkészületlen mentés
- **Remifentanil:** *200x morfin*
- **Carfentanil:** *10 000x morfin*



Fentanilok

- 1962: **fentanil** felfedezése (*Paul Janssen*):
50-100x morfin
- Fő terápiás alkalmazás: transzdermális tapasz
- Illegális előállítás (1979, **USA**), „*China White*”
 - *Alfa-metil-fentanil* (1980): 20+
 - *3-Metil-fentanil*
- Bőrön, tüdőn át felszívódik
- Könnyű szintézis, sok változat (1998: *Siegfried-módszer* az interneten: *N-fenetil-4-piperidon*)
- A modern fentanil-krízis szakaszai (**USA**):
 - 2006 – Mexikó
 - 2014-től – Kína (**halálesetek 79%-kal nőttek**)



Fentanilok-Európa

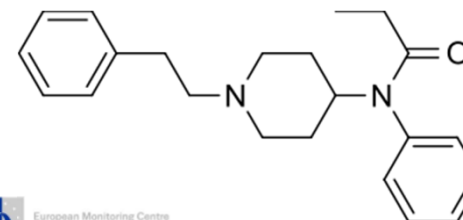
- 1990': para-fluor-fentanil tartalmú tabletták
- 2001: zavar a heroin-ellátásban (Talibán, Afganisztán)
- 2012-től: nem gyógyászati **fentanil** és **3-metilfentanil** mint heroin-helyettesítő (EMCDDA)
 - K-Európa
 - *Észtország: 2005-2013: 1100 t*
- 2012 óta **34 új fentanil-származék** jelent meg (EDND adatbázis)

Mérgezési hullám (főleg Svédországban, 3 év alatt több tucat haláleset):

- **Acetilfentanil** (Svédo. stb., 2015 - 22 t)
- **Akriloil-fentanil** (Svédo., 2016 - 23 t)
- **Carfentanil** (Észto., Litvánia, Svédo., UK stb., 2016-17 - 53 t)
- **Furanilfentanil** (Svédo., 2016 - 9 t)
- **4-Klór-izobutirfentanil** (Svédo., 2016 - 3 t)
- **4-Fluor-izobutirfentanil** (Svédo., 2016 - 11 t)
- **Ciklopropil-fentanil** (Svédo., 2017 - 22 t)
- **Metoxiacetil-fentanil** (Svédo., 2016-17 - 6 t)



Fentanilok



Receptor binding affinity of opioids in guinea pig whole brain membrane preparation

Compound	Function	MOP	DOP K _i (nM)	KOP	Reference
morphine	agonist	1.8	90	137	a
fentanyl	agonist	1.2	180	290	a
carfentanil	agonist	0.024	3.3	43	a
naloxone	antagonist	1.8	23	18	b

(Ujváry István nyomán)

EU EARLY WARNING SYSTEM ALERT

Date:	25/09/2017	RCS ID:	EU-EWS-RCS-AL-2017-0005
Issued by:	EMCDDA	Transmitted by:	Rita Jorge
Recipients:	National Early Warning System Correspondents (National Focal Points)		
Subject:	Deaths associated with methoxyacetylfentanyl — Sweden, December 2016–June 2017		

1. Information

In the past few years there has been a large increase in the availability of new opioids in Europe. This includes derivatives of the narcotic analgesic fentanyl, known as 'fentanils'. Since the first reported detection of a fentanil in 2012, a total of 24 new fentanils have been reported to the EMCDDA. The majority of these have been reported since the beginning of 2016, including 6 in the last 9 months. New fentanils are sold and used as substitutes for illicit opioids and prescription opioids, sometimes without the knowledge of the users. Several fentanils have been found in, or sold as, heroin, benzodiazepines or cocaine in Europe. An increasing number of serious harms, including deaths, have been caused by these substances.

The subject of this alert is **methoxyacetylfentanyl** (2-methoxy-N-phenyl-N-[1-(2-phenylethyl)piperidin-4-yl]acetamide), a fentanil which has recently been detected in deaths in Sweden.

Methoxyacetylfentanyl is a μ -opioid receptor agonist which acts as a **narcotic analgesic** [1–4]. Its *in vitro* pharmacological profile is similar to that of fentanyl. The effects of such opioids include euphoria, relaxation, analgesia, sedation, bradycardia (slowing of the heart), hypothermia and respiratory depression (slowing down of breathing). Methoxyacetylfentanyl is also likely to have an abuse liability and dependence potential.

Methoxyacetylfentanyl was **formally notified** in December 2016 on behalf of Slovenia. The notification was related to a test purchase made on the internet and shipped from China. In total, 21 seizures of methoxyacetylfentanyl have been reported to the EMCDDA by 2 countries: Sweden (20 seizures) and the United Kingdom (1 seizure). The seizures comprise both police and customs cases. All seizures took place in 2017, with the most recent events for which a date is known occurring in July 2017. The substance has been seized as a powder (approximately 50 g), as a liquid (270 mL) and in tablet form (75 tablets). In addition, collected samples have been reported by the United Kingdom (purchase on the surface web) and France (purchase on the darknet). In the latter case, the substance was being sold as 'fentanyl'. The substance was controlled in Sweden in January 2017 [5].

Sweden has reported **6 deaths with confirmed exposure** to methoxyacetylfentanyl that occurred between December 2016 and June 2017. A range of other substances were detected in most of the deaths. These included benzodiazepines, pregabalin and anti-depressants (typically selective serotonin reuptake inhibitors). Other opioids (tramadol and oxycodone) were detected in 1 case. Where known, many of the individuals were found dead. In at least 5 cases, methoxyacetylfentanyl caused or contributed to the death.

Fentanilok-Magyarország

- 2015: **ocfentanil** lefoglalás és *haláleset*
- 2016: **furanilfentanil** lefoglalás
- 2017: **metoxiacetil-fentanil** lefoglalás és *haláleset*
- 2017: **fentanil** lefoglalás*
- 2018: **ciklopropil-fentanil** lefoglalás
- 2018: **benzoil-fentanil** és **metoxiacetil-fentanil** lefoglalás



Az NSZKK Kábítószervizsgáló Szakértői Intézete és a Semmelweis Egyetem adatai alapján

*Hamis OXYCODON tablettának tűntek.



7. Összefoglalás

- **Új designer drogokkal** összefüggő kihívások
- Rohamosan **halmozódó tapasztalat** (azonosítás, *in silico/in vitro/in vivo*/ metabolizmus, farmakokinetika)
- **Technológiai fejlesztések**
 - (pl. nagyfelbontású tömegspektrometria), **jó minőségű standardok** (új mintatípusok, új kérdések: *pl. krónikus alkoholfogyasztás markerei a hajban, post mortem redistribúció stb.*)
- A nagyszámú minta (zömmel vizelet) nagy lehetőséget jelent a tapasztalatszerzésre, alkalmazott kutatásra



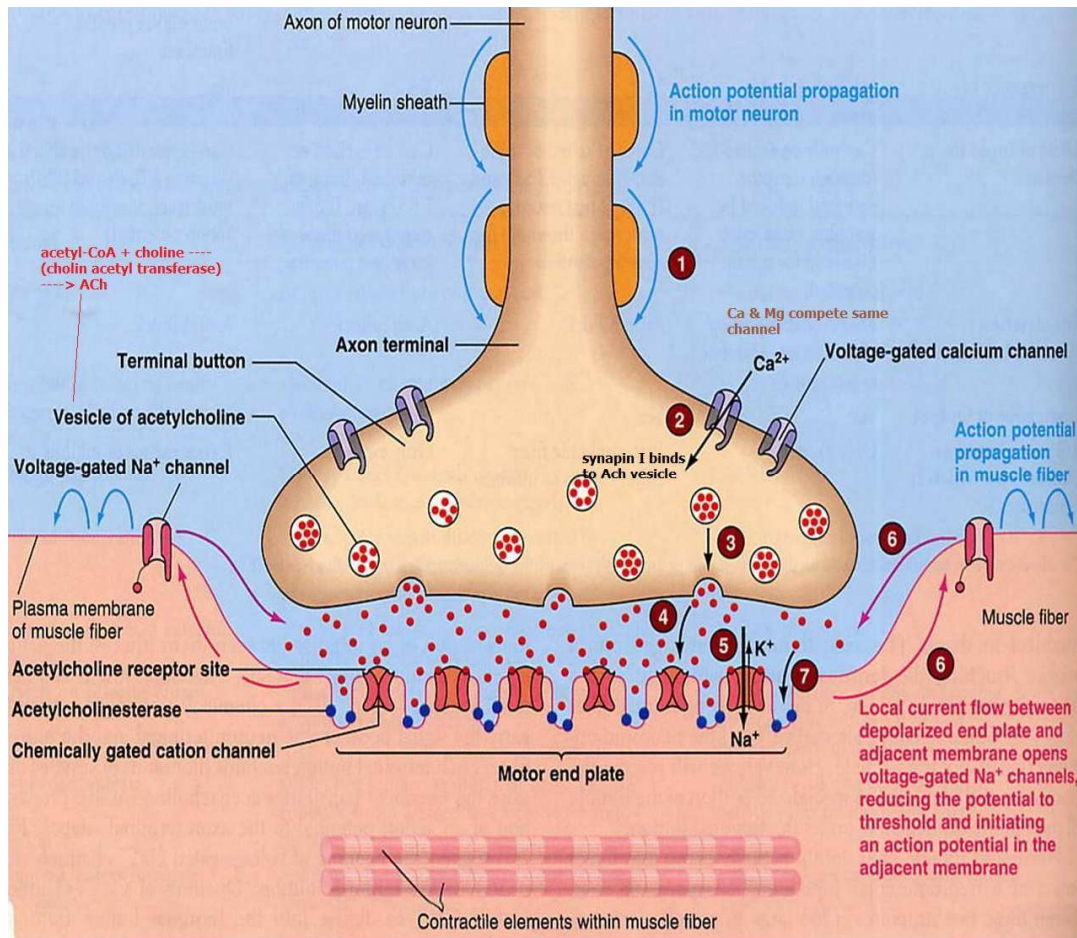


NSZKK
NEMZETI SZAKÉRTŐI
ÉS KUTATÓ KÖZPONT

**Köszönöm a megtisztelő
figyelmet!**



Neuromuszkuláris kapcsolat (nikotinos AChR)



AChE gátlók:

- Növényvédőszerek
 - Ortofoszforsavak (*Unifosz-diklórfosz*, mevinfosz)
 - Tiofoszforsavak (paration, fenitroion, diazinon)
 - Dtiofoszforsavak (*Bi58-dimetoát*, malation, forát)
 - Karbamátok (karbofurán, metomil)
- Harci gázok
 - G sorozat: sarin, soman, tabun, cyclosarin
 - V sorozat: VX, VR, VC
- Gyógyszerek (Alzheimer kór és myasthenia gravis: kolinerg rendszer serkentése)

ACh release gátlói: botulotoxin

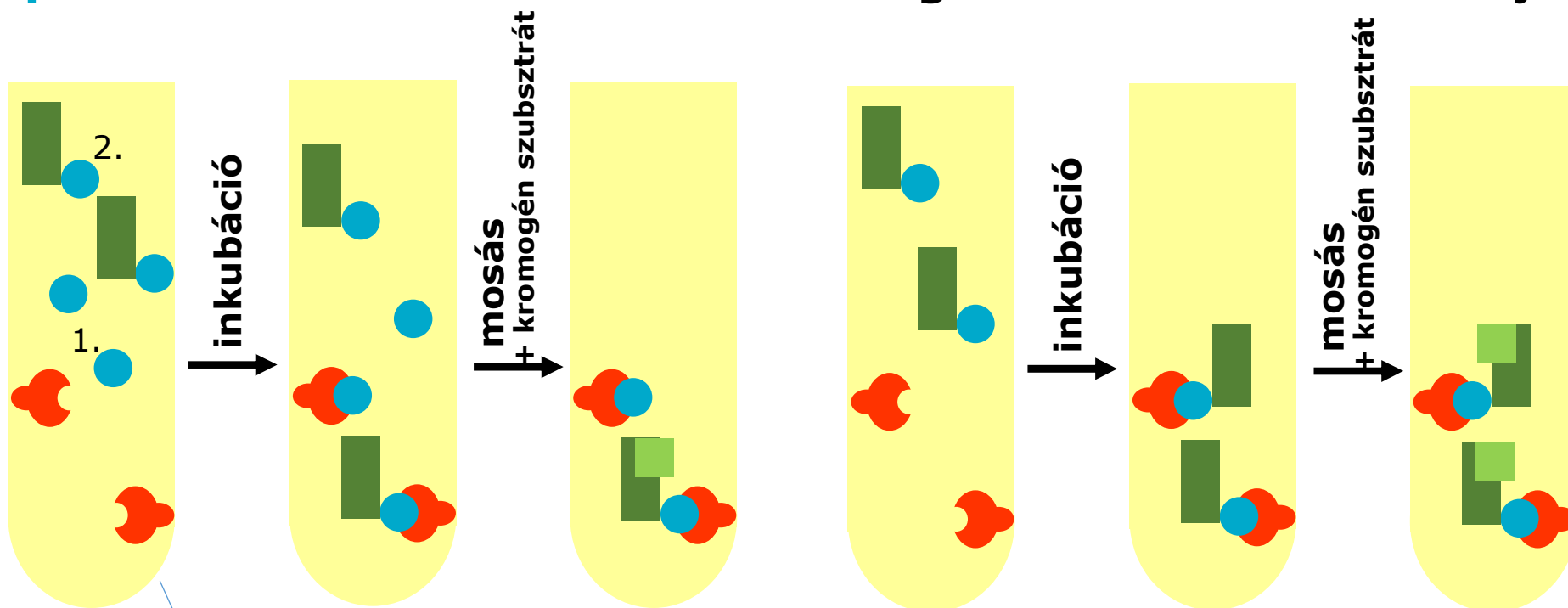
Az ELISA vizsgálat elve

„Enzyme Linked Immunosorbent Assay”

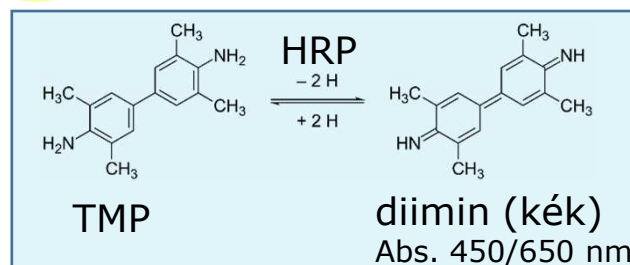
Kompetitív protokol: az abszorbancia fordítottan arányos a koncentrációval

pozitív minta

negatív minta: intenzívebb jel



Immobilizálva a plate falára



- antigén
- ⊕ antitest
- enzimhez kapcsolt antigén
- szubsztrát