

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Odber, spracovanie a analýza vzoriek vlasov a nechtov

Bakalárska práca

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2019/2020

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Zuzana Minarechová**  
Osobní číslo: **C17104**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**  
Téma práce: **Odber, spracovanie a analýza vzoriek vlasov a nechtov**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Zásady pro vypracování

1. Prevedte literámu rešerš zameranú na odber, spracovanie a následnú analýzu vzoriek vlasov a nechtov. Zamerajte sa hlavne na analyty pochádzajúce z liečiv, omamných a psychotropných látok, ale aj na analyty pochádzajúce zo životného prostredia.
2. Závěry kriticky zhodnotte.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**  
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Petra Bajerová, Ph.D.**  
Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **20. prosince 2019**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **3. července 2020**

L.S.

---

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.**  
děkan

---

**prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2020

Prehlasujem:

Túto prácu som vypracovala samostatne. Všetky literárne pramene a informácie, ktoré som v práci využila, sú uvedené v zozname použitej literatúry.

Bola som oboznámená s tým, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Sb., o práve autorskom, o právach súvisiacich s právom autorským a o zmene niektorých zákonov (autorský zákon), v znení neskorších predpisov, najmä so skutočnosťou, že Univerzita Pardubice má právo na uzatvorenie licenčnej zmluvy o použití tejto práce ako školského diela podľa § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tým, že pokiaľ dôjde k použitiu tejto práce mnou alebo bude poskytnutá licencia o použití inému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávnená odo mňa požadovať primeraný príspevok na úhradu nákladov, ktoré na vytvorenie diela vynaložila, a to podľa okolností až do ich skutočnej výšky.

Beriem na vedomie, že v súlade s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o zmene a doplnení ďalších zákonov (zákon o vysokých školách), v znení neskorších predpisov, a smernicou Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidlá pre odovzdávanie, zverejňovanie a formálnu úpravu záverečných prác, v znení neskorších dodatkov, bude práca zverejnená prostredníctvom Digitálnej knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubiciach dňa 12. 6. 2020

Zuzana Minarechová

## **POĎAKOVANIE**

Ďakujem vedúcej tejto bakalárskej práce, doc. Ing. Petre Bajerovej, Ph.D., za ochotu a nasmerovanie, ktoré mi dala pri výbere témy, tiež za ústretovosť a cenné rady pri konzultáciách. Vďačná som aj svojej rodine, ktorá ma v priebehu celého štúdia podporovala.

## **ANOTÁCIA**

V úvodnej časti tejto bakalárskej práce je popísaná anatómia kože a jej derivátov s cestami inkorporácie substancií do vlasov a nechtov. Práca je zameraná na ich analýzu za účelom stanovenia látok pochádzajúcich zo životného prostredia, drog a liečiv. Popísané sú kroky odberu vzoriek, ich dekontaminácie a jednotlivých preanalytických postupov. Pozornosť je venovaná tiež segmentálnej analýze odhaľujúcej čas požitia sledovaných substancií.

## **KLÚČOVÉ SLOVÁ**

Analýza, vlasy, nechty, metabolity drog a liečiv, extrakcia, chromatografia

## **TITLE**

Collection, processing and analysis of samples of hair and nails

## **ANNOTATION**

In the initial part of this bachelor thesis is described anatomy of skin and its derivatives with ways of incorporation of substances to hair and nails. Thesis is aimed at their analysis for the purpose of determining substances originating in environment, drugs and pharmaceuticals. Steps of sample collection, decontamination and analytical pretreatment are described. Attention is also paid to segmental analysis showing time of ingestion of controlled substances.

## **KEYWORDS**

Analysis, hair, nails, drug and pharmaceutical metabolites, extraction, chromatography

## **OBSAH**

Zoznam ilustrácií a grafov .....	10
Zoznam tabuliek .....	11
Zoznam skratiek a značiek.....	12
0 Úvod.....	14
1 Koža a kožné orgány.....	15
1.1 Funkcie a stavba kože .....	15
1.2 Deriváty pokožky .....	16
1.2.1 Chlpy.....	16
1.2.2 Nechty.....	17
1.2.3 Kožné žľazy .....	17
2 Význam analýzy vlasov a nechtov.....	18
3 Mechanizmus zabudovávania substancií do vlasov a nechtov .....	19
4 Odber vzoriek vlasov a nechtov.....	20
5 Analýza vlasov so zameraním na látky pochádzajúce zo životného prostredia .....	21
5.1 Odber a spracovanie vzoriek vlasov .....	21
5.2 Výsledky prvkovej analýzy vlasov .....	22
6 Analýza vlasov so zameraním na drogy .....	24
6.1 Analýza s využitím kvapalinovej extrakcie .....	24
6.1.1 Odber vzoriek a ich následná dekontaminácia .....	24
6.1.2 Extrakcia sledovaných látok zo vzoriek .....	25
6.1.3 Analýza extraktov .....	25
6.1.3.1 Imunoanalytické metódy.....	25
6.1.3.2 Plynová chromatografia .....	26
6.1.3.3 Kvapalinová chromatografia.....	26
6.2 Analýza s využitím extrakcie tuhou fázou .....	27
6.2.1 Analýzy podľa skupín analytov .....	27

7	Analýza vlasov so zameraním na liečivá.....	29
7.1	Analýza s využitím vysokorozlišovacej hmotnostnej spektrometrie.....	29
7.1.1	Preanalytické úpravy vzoriek pre vysokorozlišovacu hmotnostnú spektrometriu .....	29
7.1.2	Výsledky analýzy využívajúcej vysokorozlišovacu hmotnostnú spektrometriu ...	29
7.2	Analýza s využitím tandemovej hmotnostnej spektrometrie .....	30
7.2.1	Preanalytické úpravy vzoriek pre tandemovú hmotnostnú spektrometriu.....	30
7.2.2	Výsledky analýzy využívajúcej tandemovú hmotnostnú spektrometriu .....	30
7.3	Analýza sledujúca vplyv pigmentácie na obsah analytov .....	31
7.3.1	Preanalytické úpravy vzoriek.....	31
7.3.2	Výsledky analýzy.....	31
8	Segmentálna analýza vlasov .....	33
8.1	Odber a spracovanie vzorky vlasov pre segmentálnu analýzu.....	33
8.2	Výsledky segmentálnej analýzy vlasov .....	34
9	Analýza nechtov so zameraním na látky pochádzajúce zo životného prostredia .....	35
9.1	Príprava vzoriek nechtov.....	35
9.2	Výsledky prvkovej analýzy nechtov .....	35
10	Analýza nechtov so zameraním na drogy .....	36
10.1	Príprava vzoriek nechtov pre analýzu drog .....	36
10.2	Výsledky analýzy nechtov so zameraním na drogy .....	37
11	Analýza nechtov so zameraním na liečivá.....	38
11.1	Príprava vzoriek nechtov pre analýzu liečiv .....	38
11.2	Výsledky analýzy nechtov so zameraním na liečivá.....	39
12	Segmentálna analýza nechtov .....	40
12.1	Príprava vzoriek nechtov pre segmentálnu analýzu .....	40
12.2	Výsledky segmentálnej analýzy nechtov.....	41
13	Zhrnutie analýz .....	42



14	Záver .....	44
15	Použitá literatúra .....	45

## **ZOZNAM ILUSTRÁCIÍ A GRAFOV**

<b>Obrázok 1:</b> Stavba kože a vlasu .....	16
<b>Obrázok 2:</b> Stavba nechtu .....	17
<b>Obrázok 3:</b> Rozsegmentovanie analyzovaného nechtu .....	40
<b>Grafy 1–5:</b> Obsah stanovovaných prvkov vo vzorkách vlasov .....	23

## ZOZNAM TABULIEK

<b>Tabuľka 1:</b> Výsledky analýzy zameranej na stanovenie drog vo vlasoch pomocou LLE .....	26
<b>Tabuľka 2:</b> Výsledky analýzy zameranej na stanovenie drog vo vlasoch pomocou SPE.....	28
<b>Tabuľka 3:</b> Výsledky analýzy zameranej na stanovenie liečiv vo vlasoch pomocou LC-HRMS .....	30
<b>Tabuľka 4:</b> Výsledky analýzy zameranej na stanovenie liečiv vo vlasoch pomocou LC-MS/MS .....	31
<b>Tabuľka 5:</b> Záznam užívaných liečiv u sledovanej osoby .....	34
<b>Tabuľka 6:</b> Výsledky segmentálnej analýzy vlasov.....	34
<b>Tabuľka 7:</b> Výsledky prvkovej analýzy nechtov .....	35
<b>Tabuľka 8:</b> Výsledky analýzy zameranej na stanovenie drog v nechtoch .....	37
<b>Tabuľka 9:</b> Výsledky analýzy zameranej na stanovenie liečiv v nechtoch (N. Zéland).....	39
<b>Tabuľka 10:</b> Výsledky analýzy zameranej na stanovenie liečiv v nechtoch (Belgicko) .....	39
<b>Tabuľka 11:</b> Výsledky segmentálnej analýzy nechtov .....	41
<b>Tabuľka 12:</b> Zhrnutie analýz vlasov .....	42
<b>Tabuľka 13:</b> Zhrnutie analýz nechtov .....	43

## ZOZNAM SKRATIEK A ZNAČIEK

6-AM	6-acetylmorfín (6-acetylmorphine)
AQI	Index kvality ovzdušia (Air Quality Index)
CBD	Kanabidiol (Cannabidiol)
CBN	Kanabinol (Cannabinol)
DI	Priame vnesenie (Direct Immersion)
ELISA	Enzýmová imunoanalýza (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)
GC-MS	Plynová chromatografia s hmotnostnou spektrometriou (Gas Chromatography-Mass Spectrometry)
HPLC-ED	Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia s elektrochemickou detekciou (High-Performance Liquid Chromatography-Electrochemical Detection)
HS	Headspace
ICP-MS	Indukčne viazaná plazma s hmotnostnou spektrometriou (Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry)
LC-HRMS	Kvapalinová chromatografia s vysokorozlišovacou hmotnostnou spektrometriou (Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry)
LC-MS/MS	Kvapalinová chromatografia s tandemovou hmotnostnou spektrometriou (Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry)
LLE	Kvapalinová extrakcia (Liquid-Liquid Extraction)
LOD	Limit detekcie (Limit of Detection)
LOQ	Limit kvantifikácie (Limit of Quantification)
RIA	Rádioimunoanalýza (Radioimmunoassay)
SDS	Dodecylsírán sodný (Sodium Dodecyl Sulfate)
SP(M)E	(Mikro)extrakcia tuhou fázou (Solid-Phase (Micro)extraction)
THC	Tetrahydrokanabinol (Tetrahydrocannabinol)

UHPLC	Ultra-vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (Ultra-High-Performance Liquid Chromatography)
UHPLC-QQQ-MS	Ultra-vysokoúčinná kvapalinová chromatografia s trojitým kvadrupólom a hmotnostnou spektrometriou (Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Coupled to Triple-Quadrupole Mass Spectrometry)

## 0 ÚVOD

Analýza biologických materiálov je neoddeliteľnou súčasťou nielen medicíny, ale aj forezných vied. Popri štandardných materiáloch, ako je krv, moč, či mozgomiechový mok, majú v dnešnej dobe svoje uplatnenie aj vlasy a nechty. Poskytujú informácie o užívaní drog, liečiv, dopingu, či životnom prostredí, v akom sa daná osoba pohybovala v uplynulom období v rozmedzí niekoľkých mesiacov. Medzi hlavné výhody patrí tiež nenáročný odber vzorky a jej jednoduché skladovanie.

Vlasy a nechty môžu poskytovať doplňujúce informácie o požívaní omamných látok, ktoré už nemožno detegovať v telesných tekutinách a tak potvrdiť alebo vyvrátiť, či bola daná osoba pod ich vplyvom napríklad pri rôznych trestných činoch. Pomocou segmentálnej analýzy a poznatkov o rýchlosti rastu vlasov a nechtov je možné určiť aj konkrétne časové rozmedzie, v ktorom bola daná látka požívaná.

Citlivé analytické metódy odhaľujú už prvé užitie drogy, či liečiva, pričom limity detekcie daných analytov sa pohybujú v rádoch pg/mg vzorky. Vďaka analýze metabolitov drog a liečiv možno s istotou hovoriť o pozití sledovanej látky, teda je vylúčená kontaminácia z vonkajšieho prostredia. Látkam pochádzajúcim zo životného prostredia sa venuje prvková analýza, ktorá sleduje hladinu ťažkých kovov v týchto biologických materiáloch. Tie môžu meniť štruktúru a farbu tkanív, spôsobovať zdravotné komplikácie a v krajnom prípade až viesť k smrti.

Nakoľko sú keratínové matrice komplexným biologickým materiálom, samotnej analýze musí predchádzať rada krokov za účelom očistenia vzoriek od vonkajšej kontaminácie, ktorá by negatívne ovplyvňovala výsledky. Nevyhnutná je tiež extrakcia vybraných látok s cieľom zníženia interferencie a zakoncentrovania analytov. V tejto práci sú uvedené experimenty zahrňujúce vo svojich analýzach rozmanité postupy pri dekontaminácii a extrakcii s využitím moderných inštrumentálnych metód.

# 1 KOŽA A KOŽNÉ ORGÁNY

## 1.1 Funkcie a stavba kože

Koža je rozsiahly orgán pokrývajúci organizmus, ktorý je svojou štruktúrou prispôsobený pohybu a tvarovým zmenám. Vytvára efektívnu ochranu pred fyzikálnym a chemickým poškodením, ďalej bráni preniknutiu mikroorganizmov do tela. Zastáva tiež funkciu termoregulácie, nakoľko nevedie dobre teplo a samotnú reguláciu zabezpečuje aktivitou potných žliaz, prípadne zmenou intenzity prúdenia krvi v cievnom riečisku. Kožu možno považovať vďaka prítomnosti potných a mazových žliaz aj za exkretčný orgán, teda je súčasťou látkovej výmeny [1].

Koža u dospelého človeka dosahuje rozmer takmer 2 m<sup>2</sup>, čo predstavuje približne 3 kg, avšak pri zvýšenom obsahu tuku môže dosahovať hmotnosť až 20 kg. Hrúbka činí 0,5–4 mm, v závislosti od oblasti tela. Najtenšia je na očnom viečku a naopak, najhrubšia je na chrbte. Koža pozostáva z dvoch hlavných vrstiev: pokožky a zamše [1].

Pokožka (epidermis) je vrchná vrstva tvorená vrstevnatým dlaždicovým epitelom, teda viacerými vrstvami plochých buniek, ktoré tvoria zárodočnú vrstvu. Tá sa po mitotickom množení diferencuje smerom k povrchu a vytvára rohovú vrstvu, ktorá zabezpečuje bariérovú funkciu. Pokožka neobsahuje cievy, no sú v nej uložené voľné nervové zakončenia, ktorými možno vnímať bolesť. Okrem toho z nej vznikajú aj ďalšie útvary, ako sú chlpy, nechty a kožné žľazy [2].

Zamša (dermis) pozostáva z väzivového tkaniva pretkaného kapilármi, ktoré vyživujú pokožku. Elastické vlákna obsiahnuté v tejto vrstve sú orientované podľa mechanického zaťaženia danej oblasti tela. Zamša obsahuje tiež množstvo voľných nervových zakončení, hmatových teliesok a termoreceptorov. Do vlasových folikulov ústia mazové žľazy. Pod touto vrstvou sa nachádza podkožné väzivo pozostávajúce z kolagénových a elastických vláken, je schopné uchovať v bunkách mnoho tukových kvapôčok [2].

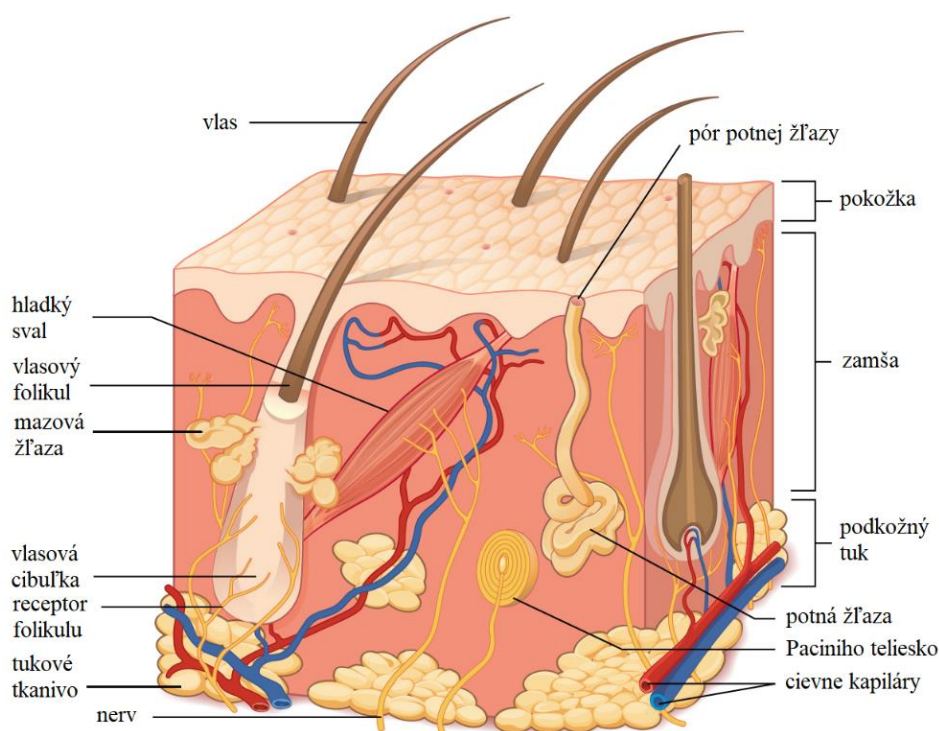
## 1.2 Deriváty pokožky

Medzi deriváty pokožky patria chlpy (vlasy), nechty a kožné žľazy [3].

### 1.2.1 Chlpy

Chlpy, vlasý aj fúzy majú rovnaké zloženie. Sú to cyklicky vyrastajúce útvary tvorené keratínom. Rastú z vlasových folikulov, ktoré sú vychlípeninami pokožky. Tie sú v priebehu rastu rozšírené do vlasovej cibulky. Na spodnej strane je umiestnená dermálna papila, ktorá obsahuje kapiláry a tak zabezpečuje výživu vlasu. Nedostatočné prekrvenie spôsobuje odumretie folikulu. Koreň vlasu je tvorený bunkami pokožky pokrývajúcimi dermálnu papilu. Tu vzniká vlasový stvol, ktorý vyrastá na povrch kože [3].

Bunky epitelu sa nepretržite množia, čím vznikajú ich špecifické druhy. Vo vlasoch sú produkované elementy s obsahom vakuol a keratínu bunkami stredovej oblasti koreňa, čo vytvára dreň vlasu. Okolo nej sa tvorí kôra vlasu pozostávajúca z nahusto uložených častíc. Na jej povrchu sa nachádza vlasová kutikula tvorená plochými, silne keratinizovanými bunkami, ktoré svojím usporiadaním pripomínajú strešné škridle. Anatómia kože a vlasu je znázornená na obrázku 1 [3].

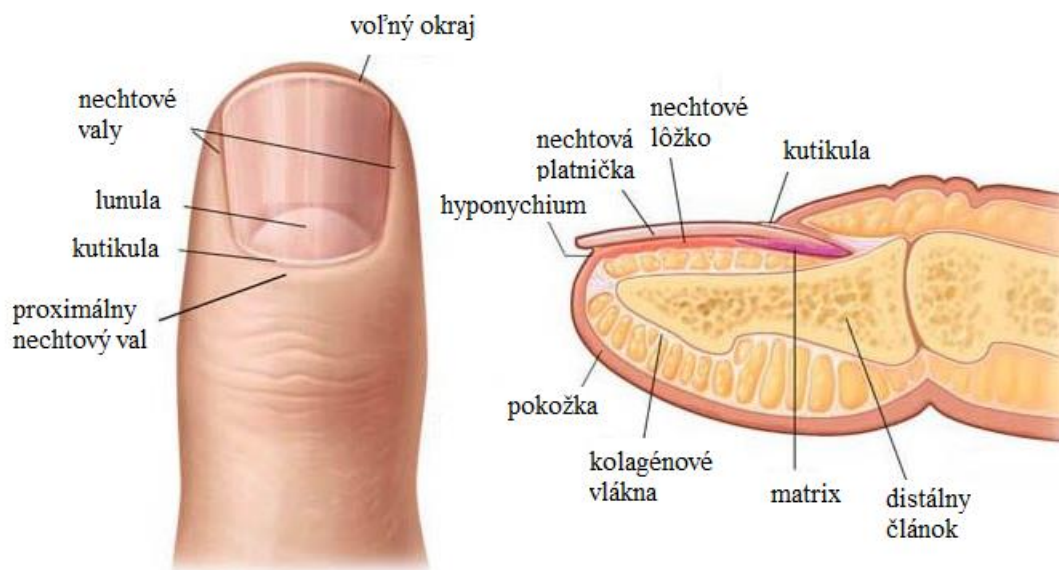


Obrázok 1: Stavba kože a vlasu [4]



### 1.2.2 Nechty

Necht je plošný útvar na chrbtovej strane koncových článkov prstov. V nechtovom vale je skrytý koreň nechtu [3]. Eponychium (kutikula) predstavuje plochý kúsok pokožky na proximálnej strane viditeľnej časti nechtu [1]. Nechtové lôžko je väzivo pod miestom spojenia platničky nechtu s podložkou. Epitel tejto platničky vyrastá z nechtového matrixu, ktorý obsahuje cievy, čo spôsobuje ružové zafarbenie. Časť prečnievajúca cez okraj prstu sa nazýva voľný okraj nechtu. Má biele sfarbenie. Bunky matrixu sa delia, posúvajú distálnym smerom a tvoria proximálnu časť nechtovej platničky. Tá sa následne posúva po nechtovom lôžku ku koncovému okraju. Nechtová platnička je takmer transparentná, takže spolu s tenkým epitelom nechtového lôžka informujú o hladine kyslíku v krvi, nakoľko ním presvitá sfarbenie krvi v dermálnych cievach. Stavba nechtu je znázornená na obrázku 2 [3].



Obrázok 2: Stavba nechtu [5]

### 1.2.3 Kožné žľazy

Mazové žľazy sú uložené v pokožke takmer na celom tele, najviac ich obsahuje pokožka tváre a úplne absentujú na dlaniach a chodidlách. Maz obsahuje zmes triacylglycerolov, voskov, cholesterolu a jeho esterov. Má jemne antibakteriálne a antimykotické účinky [3].

Potné žľazy sú v koži hojne zastúpené. Ich výlučok obsahuje z veľkej časti vodu a chlorid sodný, ďalej močovinu, amoniak a kyselinu močovú. Po transporte potu na povrch kože sa odparuje, čím zabezpečuje chladenie organizmu [3].

## 2 VÝZNAM ANALÝZY VLASOV A NECHTOV

Vo vlasoch a nechtoch sa ukladajú liečivá, chemikálie a biologický materiál, ktorý možno identifikovať a stanoviť. Výhodami tejto analýzy je najmä ľahký odber vzoriek, požadované malé množstvo a jednoduché uchovávanie týchto tkanív pri laboratórnej teplote. Dlhý vlas poskytuje informácie o minulých 5 až 7 rokoch, pričom nesmie byť farbený, odfarbovaný, ani trvalo ondulovaný, nakoľko tieto úpravy znižujú obsah liečiv a toxínov. Najlepšie využitie v rámci analýzy nechtov má necht palca na nohe, nakoľko je najmenej vystavený vonkajšej kontaminácii a vďaka pomalému rastu možno retrospektívne analyzovať jeho obsah za posledných 12 mesiacov [6].

Analýza vlasov a nechtov môže odhaliť napríklad doping, či užívanie drog vďaka prítomnosti ich metabolitov, ktoré by sa neobjavili pri vonkajšom vystavení organizmu týmto látkam. Niektoré toxické látky spôsobujú viditeľné zmeny v štruktúre vlasov a nechtov, ako napríklad arzén a tálium, ktoré zapríčiňujú vznik priečných bielych čiar na nechtoch známych ako Meesove prúžky. Ďalej je to meď, ktorá môže sfarbiť vlasy dozelená a kobalt domodra [6, 7].

Analýzou vlasov možno potvrdiť tiež prítomnosť toxínov a ich metabolitov, nakoľko má expozícia týmto látkam rôzne účinky na organizmus. Pomocou biomarkerov, ktoré poskytujú informácie o bunčných, či molekulárnych zmenách v tkanivách, je možné potvrdiť toto spojenie. Biomarkery zobrazujú tiež mieru súčasnej, či uplynulej expozície, ktorá môže pochádzať zo stravy, životného prostredia alebo z pracoviska [8].

Nechty možno ďalej využiť ako biologický materiál pri detekcii a kvantifikácii steroidov, ktorá je nevyhnutná pre objasnenie pôvodu mnohých porúch spojených s endokrinným systémom. Nakoľko nechty pozostávajú z mŕtvych keratínových buniek, látky zabudované do matrixu už ďalej nie sú metabolizované. Stávajú sa tak materiálom vhodným pri diagnóze chronických ochorení, keďže poskytujú informácie o produkcii steroidov za dlhšie časové obdobie [9].

### **3 MECHANIZMUS ZABUDOVÁVANIA SUBSTANCIÍ DO VLASOV A NECHTOV**

Do vlasov sú látky prítomné v systémovom obehu zabudované pasívnou difúziou, pomocou ktorej sú privádzané do vlasového folikulu, teda musia preniknúť cez plazmatickú membránu. Tá vykazuje nízku permeabilitu pre polárne molekuly. Len neionizované molekuly rozpustné v tukoch tak dokážu difundovať membránou [10]. Nepriamou cestou sú látky do vlasov začleňované prostredníctvom potu a kožného mazu, ktoré presakujú k vlasovému koreňu. Vďaka inkorporácii substancií do vlasov v priebehu ich rastu je možné popri kvalitatívnej a kvantitatívnej analýze určiť aj približný čas užitia danej látky [11]. Ďalšou cestou zabudovania látok do vlasov je ich interakcia s melanínom. V priebehu vzniku melanínového zrnka dochádza k zmene koncentračného gradientu pre substancie s vysokou afinitou k tomuto pigmentu a ich vťahnutie do melanocyty je intenzívnejšie. Nakoľko tmavé vlasy obsahujú viac melanínu ako svetlé, bude v nich koncentrácia týchto substancií vyššia. Jedná sa napríklad o anabolické steroidy, či drogy [10, 12].

Inkorporácia látok do nechtov prebieha počas tvorby nechtového tela prostredníctvom krvného riečiska. Pasívnou difúziou prestupujú látky z kapilár do nechtového matrixu v priebehu keratinizácie. Po zabudovaní zložky do matrixu nedochádza k jej ďalšiemu metabolizovaniu, nakoľko sú nechty tvorené mŕtvymi keratínovými bunkami. Substancia je tak detekovateľná až po dosiahnutí voľného okraja, čo môže trvať 10–18 týždňov. K rýchlejšiemu zabudovaniu látok, ako sú drogy, dochádza prostredníctvom potu. Tieto substancie sú vylučované potnými kanálkami v závislosti na ich molekulárnej hmotnosti a hydrofilite. V nechtoch sú tak detekovateľné v priebehu 8 až 24 hodín. Kontaminácia z vonkajšieho prostredia sa vyskytuje najmä v distálnych častiach nechtu [7, 13].

## 4 ODBER VZORIEK VLASOV A NECHTOV

Vzorky vlasov boli odoberané z temena hlavy, strihané boli čo možno najbližšie k povrchu kože [14]. V tejto oblasti vlasy rastú rovnakou rýchlosťou, teda sa nachádzajú v podobných rastových fázach. Pre segmentálnu analýzu je dôležitá aj orientácia jednotlivých vlasov, teda aby boli všetky proximálne konce zviazané na jednej strane [12, 15]. V niektorých postupoch je výhodou vlasy spevniť plastovou páskou [16]. V závislosti na type štúdie sú vzorky odoberané buď jednorazovo alebo v určitých časových intervaloch [17]. Pred samotnou analýzou je potrebné vlasy zbaviť vonkajšej kontaminácie, ktorá môže pochádzať z potu, prípravkov na starostlivosť o vlasy, či životného prostredia (napr. prach, peľ). Za týmto účelom sa preplachujú rôznymi detergentmi a následne sušia. Vlasy môžu byť tiež rozstrihané na menšie fragmenty kvôli zväčšeniu povrchu a teda zefektívneniu extrakcie. Vzorky boli uschované v obáľkach, hliníkových fóliách, či plastových vrecúškach pri laboratórnej teplote až do doby analýzy [12].

Vzorky nechtov boli odoberané odstrihnutím ich voľných okrajov manikúrovými nožičkami. Nehty rúk a nôh boli odoberané zvlášť, nakoľko v nich dochádza k rozdielnej inkorporácii vzhľadom k iným rýchlostiam rastu [18]. Celé nehty je možné odobrať len pri pitvách, respektíve je výhodou tak urobiť ešte pred ich započatím. Tieto vzorky sa využívajú pri segmentálnej analýze, teda za účelom stanovenia času požívania sledovaných substancií [19]. Vzorky nechtov sú rovnako ako vlasy dekontaminované detergentmi, sušené, nastrihané na menšie segmenty a skladované do doby analýzy pri laboratórnej teplote [20].

## **5 ANALÝZA VLASOV SO ZAMERANÍM NA LÁTKY POCHÁDZAJÚCE ZO ŽIVOTNÉHO PROSTREDIA**

Látky prítomné v ovzduší sa ukladajú do povrchu vlasov. Znečistené ovzdušie možno charakterizovať ako zmes veľmi malých pevných častíc a kvapôčok roztokov rozpustených vo vzduchu. Okrem prírodných zdrojov znečistenia, ako je erupcia sopiek, zvyšuje obsah týchto elementov najmä ľudská činnosť – cestný prach, staveniská, či banská činnosť. Táto kontaminácia je tvorená najmä síranmi, dusičnanmi, uhličitými a kovmi, ako je olovo, kadmium, nikel a meď [16, 21].

Ovzdušie, pôda a voda znečistené ťažkými kovmi predstavujú zdravotné riziko z hľadiska toxicity týchto prvkov. Zvýšený obsah medi v ľudskom tele môže viesť k poškodeniu pečene a obličiek [22]. Akumulácia železa v tkanivách spôsobuje cirhózu, diabetes mellitus a osteoporózu [23].

Priemernú sumu plôch všetkých vlasov jednej osoby možno rádovo udávať v metroch štvorcových, čím vzniká pomerne veľký a nepravidelný povrch s líšiacim sa zložením v priebehu dĺžky vlasu. Tak je uľahčená výmena látok medzi vlasmi a prostredím. Zachytávanie a ukladanie nečistôt ovplyvňuje aj prítomnosť kožného mazu na vlasoch [16].

### **5.1 Odber a spracovanie vzoriek vlasov**

Pre túto analýzu boli použité vlasy dĺžky 25 cm, hmotnosť prameňa činila 1 g. Fixované boli umelohmotnou páskou vo vzdialenosti 5 mm od koreňového konca. Pred testovaním boli tieto vzorky riadne umyté klasickým šampónom, prepláchnuté vodou a sušené pri teplote 60 °C po dobu 30 minút. Niektoré vzorky boli vopred namáčané v emulzii pripomínajúcej ľudský kožný maz – zmes kyseliny olejovej a termálnej vody obsahujúcej 4,5 % minerálov. Časť vzoriek vlasov bola vystavená znečistenému vzduchu v meste Baoding, Čína, teda bola zavesená vo voľnom priestranstve po dobu troch dní. AQI<sup>a</sup> sa v týchto dňoch pohyboval v rozmedzí 189–223. Pre porovnanie, v Pardubiciach býva tento index do hodnoty 50. Ďalšie vzorky boli ponechané v tmavom prostredí a použité ako kontrola [16, 25].

Táto analýza je zameraná na meď, zinok, hliník, železo a bárium prítomné vo vzorkách vlasov, ktoré možno stanoviť nasledujúcim postupom:

---

<sup>a</sup> AQI (air quality index) je index kvality ovzdušia, ktorý vyjadruje koncentráciu viacerých znečisťujúcich látok v ovzduší a s tým spojené zdravotné riziká [24].

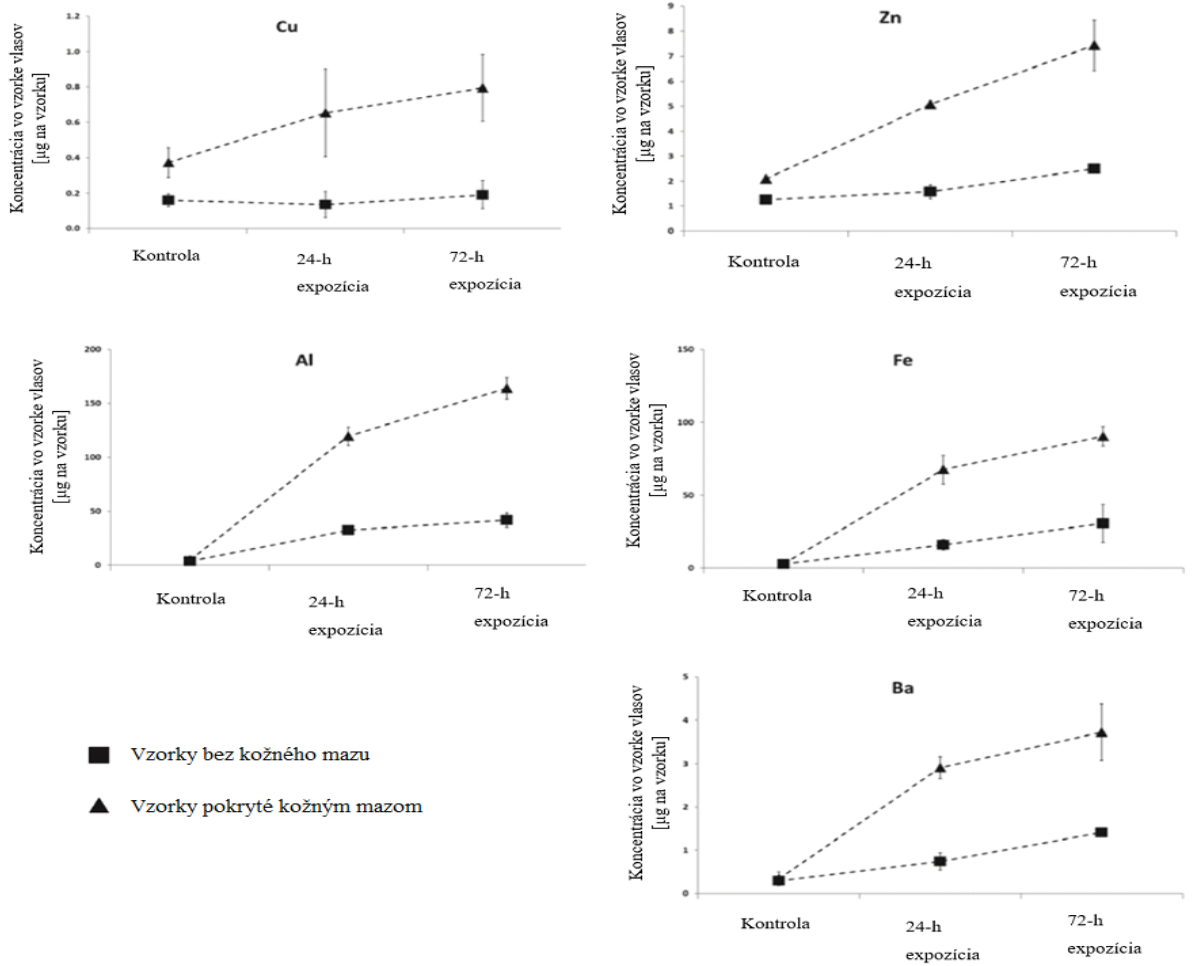
Vzorky vlasov boli individuálne máčané do sklenej banky s 50 ml 2% vodného roztoku Triton X 100<sup>b</sup> a následne vložené do ultrazvukového kúpeľa na 1 hodinu. Výsledná tekutina bola zakoncentrovaná na objem 5 ml vyparovaním pri teplote 120 °C. Po pridaní 10 ml 65% kyseliny dusičnej bola zmes znovu zahrievaná pri 110 °C po dobu 5 hodín. Po vychladnutí bol roztok doplnený deionizovanou vodou na objem 50 ml, prefiltrovaný a takto pripravená vzorka bola analyzovaná pomocou hmotnostného spektrometru s indukčne viazanou plazmou [16].

## 5.2 Výsledky prvkovej analýzy vlasov

Vzorky boli analyzované po 24 a 72 hodinovej expozícii znečistenému ovzdušiu. Namerané hodnoty v exponovaných vlasoch boli porovnané s kontrolnými vzorkami. Analýza ukázala, že vlasy pokryté kožným mazom obsahovali približne trikrát vyššie hodnoty stanovovaných kovov ako vlasy bez neho, nakoľko jeho prítomnosť zvyšuje adhezivitu. Množstvo aplikovaného syntetického mazu (50–800 mg/g) bolo oproti prirodzenému (50–200 µg/g) vyššie za účelom zviditeľnenia jeho vplyvu. Výsledky sú znázornené v nasledujúcich grafoch 1–5, z ktorých vyplýva, že okrem množstva aplikovaného mazu vplýva na usádzanie množstva prvkov do vlasov aj doba ich expozície znečistenému prostrediu, pričom k najintenzívnejšej inkorporácii dochádza v priebehu prvého dňa [16].

---

<sup>b</sup> Triton X 100 je derivát polyetylén glykolu používaný ako neiónová povrchovo aktívna látka [26].



**Grafy 1–5:** Obsah stanovovaných prvkov vo vzorkách vlasov [16]

## **6 ANALÝZA VLASOV SO ZAMERANÍM NA DROGY**

Forenzné vedy rutinne využívajú analýzu biologických materiálov za účelom odhalenia požívania drog pri úmrtiach, či otravách. Popri krvi, či moči ako matriciach v týchto analýzach rastie význam vzoriek vlasov [15]. Testovanie vlasov za účelom dôkazu požívania drog predstavuje spoľahlivú metódu. Táto analýza poskytuje chronologické informácie o užívaní nelegálnych drog, čo býva často spojené s trestnými činmi [27]. Analýza vlasov s týmto zameraním má uplatnenie aj pri pitvách, kde poskytuje doplnkové informácie k stanoveniam z krvi, či iných tkanív. Krvný rozbor poskytuje informácie o stave zosnulého v rozsahu krátkeho časového úseku pred smrťou. Ak je doplnený o analýzu vlasov, môže byť potvrdené požívanie drog v týždňoch až mesiacoch pred úmrtím [28].

### **6.1 Analýza s využitím kvapalinovej extrakcie**

Extrakcia je nevyhnutným krokom analýzy zahŕňajúcim izoláciu analytov z pôvodnej matrice, pričom je potrebná znalosť jej fyziológie. Vlasové vlákno pozostáva z veľkej časti z keratínu, za pigmentáciu zodpovedá melanín s hydrofóbnou a kyslou podstatou, čo zapríčiňuje afinitu vlasov k drogám a liečivám. Ďalšou úlohou extrakcie je zakoncentrovanie stanovovaných látok a zabezpečenie kompatibility vzorky s nasledujúcou analytickou metódou. Popri kvapalinovej extrakcii (LLE) je využívaná tiež extrakcia tuhou fázou (SPE) [15, 29]. V súčasnej dobe je snaha o nahradenie toxických reagensov, zníženie spotreby chemikálií a celkové zefektívnenie kvapalinovej extrakcie [30].

#### **6.1.1 Odber vzoriek a ich následná dekontaminácia**

Vzorky môžu byť odoberané z rôznych častí tela, avšak najvýhodnejšia je zadná časť hlavy, nakoľko je väčšina vlasov v rovnakej rastovej fáze a sú najmenej ovplyvnené vekom a pohlavím. Pre túto analýzu boli vlasy odstrihnuté čo najbližšie pri povrchu hlavy. Požadované množstvo vzorky bolo 200 mg [12].

Na povrchu vlasov sa ukladajú rôzne látky (pot, lak na vlasy, nečistoty z prostredia), ktoré by v prípade nedostatočného odstránenia mohli prekážať v analýze. Externe viazané prímеси boli odstraňované preplachovaním detergentmi (šampón), surfaktantami, fosfátovým pufrom alebo organickými roztokmi (acetón, metanol, hexán). Vo vlasovej analýze boli sledované najmä metabolity drog, teda je vylúčené, aby ich prítomnosť bola spôsobená vonkajšou kontamináciou [12].



## 6.1.2 Extrakcia sledovaných látok zo vzoriek

Vzorky vlasov bolo potrebné pred samotnou analýzou rozpustiť spôsobom, ktorý by sledované látky nijako neporušil. Vzorky boli rozstrihané na drobné úseky, či rozdrvené v guľovom mlyne. Pre ich rozpustenie bolo možné využiť tieto techniky [12]:

- Inkubácia v kyslom alebo alkalickom roztoku s následnou kvapalinovou extrakciou.
- Inkubácia v organickom roztoku (metanol s/bez kyseliny chlorovodíkovej), kvapalinová extrakcia.
- Rozpustenie v enzymatickom roztoku, kvapalinová extrakcia.

Chemicky nestabilné drogy (napríklad kokaín) nemohli byť extrahované alkalickými roztokmi, nakoľko by dochádzalo k hydrolýze. Na extrakciu 6-acetylmorfínu (6-AM) a kokaínu z vlasov bola využitá metóda kyslej hydrolýzy. Vzorky boli inkubované po dobu 30 minút v 0,6 mol/l roztoku kyseliny chlorovodíkovej pri teplote 120 °C. V prípade inkubácie v organickom roztoku boli vlasy rozkladané v ultrazvukovom kúpeli v priebehu niekoľkých hodín pri teplote 45 °C použitím metanolu alebo etanolu. Po odparení časti rozpúšťadla za účelom zakoncentrovania bolo možné vzorku ihneď analyzovať plynovým chromatografom. Touto metódou boli analyzované metabolity nestabilných drog, ako napríklad 6-AM vo vlasoch osôb závislých na heroíne. Vlasy ľudí závislých na heroíne a kokaíne bolo možné analyzovať pomocou roztokov enzýmov pronázy, arylsulfatázy, proteínázy K, či glukuronidázy. Mechanizmus ich pôsobenia spočíva v reakcii s proteínom keratín bez zmeny koncentrácie drog a ich metabolitov. Táto metóda však môže poskytnúť falošné výsledky pri ELISA analýze [12].

## 6.1.3 Analýza extraktov

### 6.1.3.1 Imunoanalytické metódy

Imunoanalytické metódy sa využívajú na preukázanie prítomnosti drog, respektíve ich skupín a metabolitov. Proces extrakcie by mal byť kompatibilný s predbežnými orientačnými skúškami, aby nedochádzalo k reakcii medzi použitými chemikáliami a vzorkou. V prípade využitia hydrolytických procesov je nutná neutralizácia. Pred samotnou analýzou bolo potrebné šetrne odstrániť maticu – vlasový proteín. Použitím metódy ELISA bolo možné dokázať prítomnosť metadónu, benzodiazepínu, opiátov, metamfetamínu a amfetamínu s vysokou citlivosťou, teda boli analyzované vlasy osôb závislých na heroíne, kokaíne, marihuane, metamfetamíne a amfetamíne [12].

### 6.1.3.2 Plynová chromatografia

Plynová chromatografia separuje zmes na jednotlivé zložky na základe ich rozdeľovania medzi stacionárnu a mobilnú fázu, ktorou je plyn. Tie sú následne rozpoznávané detektorom. Najčastejšie je využívaný hmotnostný spektrometer, ktorý rozdeľuje elementy podľa pomeru ich hmotnosti a náboja. Využitím tejto kombinácie (GC-MS) bolo možné detegovať napríklad amfetamín, kokaín, metadón, morfín či kanabinoidy [12].

Pre stanovenie kanabinoidov (tetrahydrokanabinol – THC, kanabinol – CBN a kanabidiol – CBD) bol použitý roztok 1 mol/l hydroxidu sodného, v ktorom bola vzorka ponechaná pri teplote 95 °C po dobu 10 minút. Následne bola vzorka extrahovaná *N*-hexánetylacetátom a derivatizovaná *N,O*-bis(trimetylsilyl)trifluoracetamidom, ktorý derivatizuje hydroxylové skupiny na druhých zlúčeninách so stabilnejšími trimetylsilylovými. Látky sú tak prchavejšie ako pôvodné zlúčeniny a môžu byť analyzované pomocou plynového chromatografu s hmotnostným spektrometrom. Limity detekcie (LOD) pre THC, CBD a CBN boli 6, 5 a 2 pg/mg vzorky [12, 31].

### 6.1.3.3 Kvapalinová chromatografia

Kvapalinová chromatografia predstavuje separačnú metódu založenú na delení látok medzi stacionárnu fázu a kvapalnú mobilnú fázu. Ide o vysoko citlivú metódu, ktorá v spojení s tandemovou hmotnostnou spektrometriou (LC-MS/MS) zaznamenáva aj stopové množstvo drog už po prvom požití. Po extrakcii nie je potrebná derivatizácia vzorky [12].

Kokaín spolu s jeho metabolitmi bolo možné stanoviť po inkubácii vzorky vlasov v roztoku 0,1 mol/l kyseliny chlorovodíkovej. Po extrakcii s metanolom bol extrakt nadávkovaný do chromatografu. Túto metódu bolo možné použiť aj pre detekciu morfínu a 6-acetylmorfínu, pričom limit detekcie bol 10 pg/mg, pre kokaín a benzoylekgonín, ako jeho metabolit, bola táto hranica 1 pg/mg. Vybrané látky spolu s ich limitmi detekcie sú uvedené v tabuľke 1 [12, 32].

**Tabuľka 1:** Výsledky analýzy zameranej na stanovenie drog vo vlasoch pomocou LLE [12]

Látka	Analytická metóda	LOD [pg/mg]
THC	GC-MS	6
CBD	GC-MS	5
CBN	GC-MS	2
Morfín	LC-MS/MS	10
6-acetylmorfín	LC-MS/MS	10
Kokaín	LC-MS/MS	1
Benzoylekgonín	LC-MS/MS	1

## 6.2 Analýza s využitím extrakcie tuhou fázou

Pred samotnou analýzou chemických a biochemických materiálov je nutné ich spracovanie, nakoľko sú vzorky častokrát nekompatibilné s analytickými prístrojmi, matrice sú príliš komplexné, teda ďalšie zložky by mohli interferovať, či sledovaný analyt je prítomný v nízkej koncentrácii. Extrakcia tuhou fázou (SPE) využíva kolónky s tuhým sorbentom, cez ktoré je prelievaná kvapalná vzorka s väčším objemom. Sorbent na svojom povrchu zadržiava sledované látky, ktoré sú po ukončení extrakcie vymyté malým množstvom vhodného činidla [33, 34]. Za účelom zníženia potrebného množstva vzorky a spotreby roztokov bola vyvinutá mikroextrakčná technika, ktorá predstavuje sorpčne-desorpčnú metódu na zakoncentrovanie analytov na stacionárnej fáze pokrývajúcej kremenné vlákno, nepoužíva rozpúšťadlá a postačujúce množstvo vzorky je rádovo v mikrolitroch [33, 35]. Technika headspace v spojení s mikroextrakciou tuhou fázou (HS-SPME) môže byť využitá napríklad pre analýzu kanabinoïdov vo vlasoch. Jej princípom je extrakcia analytov prostredníctvom sorpcie z headspace, teda plynného priestoru nad vzorkou, pomocou stacionárnej fázy nanesej na vlákne. Pri využití priamej mikroextrakcie tuhou fázou (DI-SPME) dochádza k sorpcii ponorením vlákna do roztoku. Vlákno je v oboch prípadoch následne vložené do vstrekovacieho ventilu chromatografu za účelom termálnej desorpcie analytov [35–38].

### 6.2.1 Analýzy podľa skupín analytov

Vzorka vlasov bola vždy medzi dekontamináciou a extrakciou nastrihaná na 1–3 mm segmenty, prípadne rozomletá v guľovom mlyne pre zabezpečenie čo možno najväčšieho povrchu. Príprava vzorky bola zakončená extrakciou tuhou fázou. Samotná analýza prebiehala v plynovom chromatografe s hmotnostným spektrometrom [39].

Pre analýzu amfetamínov (amfetamín, metamfetamín a 3,4-metylendioxyamfetamín) bolo potrebné vzorku vlasov dekontaminovať pomocou dichlórmetánu. 25 mg takto predpripravenej vzorky bolo ponechaných v zmesi metanolu a kyseliny trifluóroctovej pri teplote 25 °C v priebehu noci.

Kanabinoïdy (tetrahydrokanabinol, kanabidiol a kanabinol) boli extrahované z vlasov po dekontaminácii vodou, petroléterom a metanolom. Extrakcia 50 mg vzorky prebiehala v 4 ml metanolu 5 hodín.

Pri analýze kokaínu bolo 50 mg vzorky vlasov dekontaminovaných vodou, benzínom a dichlórmetánom. Vzorka bola extrahovaná 4 ml metanolu pri teplote 50 °C po dobu 5 hodín. Vzorky určené na analýzu opiátov tvoriacich širokú skupinu látok (morfín, 6-monoacetylmorfín, norkodeín a heroín) bolo potrebné dekontaminovať prepláchnutím

vodou, benzínom a dichlórmetánom. 50 mg vzorky bolo extrahovaných 4 ml metanolu pri teplote 50 °C po dobu 5 hodín [39].

Hydrofilný metanol pri extrakcii prenikal do vlasu, čo viedlo k jeho nadutiu a uvoľneniu látok difúziou, ďalej k rozpusteniu neutrálnych a lipofilných látok. V prípade prítomnosti daných analytov vo vysokých koncentráciách bolo možné ich analyzovať priamo pomocou plynového chromatografu s hmotnostným spektrometrom, avšak pre zníženie interferencie látkami z matrice bola analýza doplnená extrakciou tuhou fázou. Výsledky analýzy s limitmi detekcie sú zaznamenané v tabuľke 2 [39].

**Tabuľka 2:** Výsledky analýzy zameranej na stanovenie drog vo vlasoch pomocou SPE [39]

<b>Skupina látok</b>	<b>Dekontaminácia</b>	<b>LOD [pg/mg]</b>
Amfetamíny	Dichlórmetán	30
Kanabinoidy	Voda, petroléter, metanol	10
Kokáin	Voda, benzín, dichlórmetán	10
Opiáty	Voda, benzín, dichlórmetán	20

## 7 ANALÝZA VLASOV SO ZAMERANÍM NA LIEČIVÁ

Úlohou modernej forenznej a klinickej toxikológie je rozoznávať a detegovať veľké množstvo látok, pričom sú si v niektorých prípadoch štruktúrne podobné. Analýza vlasov je užitočným nástrojom aj pri retrospektívnom sledovaní množstva užívaných liečiv, pričom je pre pacientov nebezpečné ako vynechávanie, tak nadmerné užívanie liekov. Využitie chromatografie s hmotnostnou spektrometriou predstavuje inštrumentálnu metódu poskytujúcu dostatočne rozsiahle výsledky analýzy napriek malému množstvu predúprav vzoriek [40, 41].

### 7.1 Analýza s využitím vysokorozlišovacej hmotnostnej spektrometrie

Vysokorozlišovaciu hmotnostnú spektrometriu (HRMS) možno s výhodou využiť pri analýze vlasov, kde hlavnými analytmi sú metabolity liečiv. Pre túto analýzu je postačujúca jediná predchádzajúca extrakcia, čo patrí medzi jej významné prednosti [40].

#### 7.1.1 Preamalytické úpravy vzoriek pre vysokorozlišovaciu hmotnostnú spektrometriu

Vzorky vlasov boli odstrihnuté čo možno najbližšie pri povrchu hlavy v prameňoch vážiacich aspoň 30 mg. Tie boli následne trikrát premyté 1 ml roztoku tween 80 (0,1 % V/V neiónového surfaktantu v destilovanej vode), dvakrát prepláchnuté 0,5 ml destilovanej vody, raz 0,2 ml acetónu za účelom odstránenia mastnoty, usušené a nastrihané na menšie úseky. K 30 mg každej vzorky bolo pridaných 10 µl zmesi deuterizovaných interných štandardov<sup>c</sup> (1 µg/ml). Takto pripravená zmes bola po pridaní 300 µl metanolu ponechaná v ultrazvukovom kúpeli pri 40 °C v priebehu noci, čím došlo k uvoľneniu lipofilných aj hydrofilných analytov z keratínovej matrice. 100 µl supernatantu bolo odpipetovaných do mikroskúmavky pre následnú analýzu [40].

#### 7.1.2 Výsledky analýzy využívajúcej vysokorozlišovaciu hmotnostnú spektrometriu

10 µl supernatantu bolo nadávkovaných do kvapalinového chromatografu s využitím vysokorozlišovacej hmotnostnej spektrometrie (LC-HRMS). Táto metóda umožnila zredukovať šum pozadia, čo poskytlo dostatočnú citlivosť. Analýza odhalila prítomnosť

---

<sup>c</sup> Interný štandard bol zložený z nasledujúcich látok: amfetamín-d5, fentanyl-d5, metamfetamín-d5, 3,4-methylendioxyamfetamín-d5, 3,4-methylen-dioxy-N-metyl-amfetamín-d5, benzoylekgonín-d3, kokaín-d3, kokaetylén-d3, metadón-d9, morfín-d3, norketamín-d4, ketamín-d4, O-6-monoacetylmorfín-d3, alprazolam-d5 a zolpidem-d6 [40].

veľkého počtu metabolitov drog a liečiv. Najznámejšie sú spolu s ich limitmi detekcie zaznamenané v tabuľke 3 [40].

**Tabuľka 3:** Výsledky analýzy zameranej na stanovenie liečiv vo vlasoch pomocou LC-HRMS [40]

Látka	LOD [pg/mg]	Látka	LOD [pg/mg]
Alprazolam	5	Kodeín	5
Bromazepam	10	Lorazepam	10
Diazepam	5	Midazolam	5
Fentanyl	10	Oxazepam	10
Karbamazepin	5		

## 7.2 Analýza s využitím tandemovej hmotnostnej spektrometrie

Kolektív autorov z Nórska a Talianska vypracoval štúdiu využívajúcu tandemovú hmotnostnú spektrometriu (MS/MS) zameranú na analýzu drog a liečiv užitých pred smrťou. Tento postmortálny výskum odhalil, že v 47 prípadoch z 55 nebola dokázaná prítomnosť sledovaných látok v krvi, kým vo vlasoch boli detekovateľné. Iba v dvoch prípadoch bol stanovený obsah benzodiazepínov v krvi za súčasnej absencie vo vlasoch [28].

### 7.2.1 Preanalytické úpravy vzoriek pre tandemovú hmotnostnú spektrometriu

Pre túto analýzu boli odobrané pramene vlasov čo možno najbližšie pri temene hlavy s dĺžkou 3 cm. Každá vzorka predstavovala 20 mg vlasov premytých dichlórmetánom a následne metanolom. Po vysušení pod prúdom dusíka boli vlasy rozstrihané na 1–2 mm segmenty. Ako interný štandard bol použitý halazepam s koncentráciou 100 ng/ml a objemom 20 µl, ďalej bolo pridaných 700 µl metanolu. Takto upravená vzorka bola ponechaná v ultrazvukovom kúpeli po dobu dvoch hodín, následne bolo 5 µl roztoku nadávkovaných do kvapalinového chromatografu s tandemovým hmotnostným spektrometrom (LC-MS/MS) [28].

### 7.2.2 Výsledky analýzy využívajúcej tandemovú hmotnostnú spektrometriu

Z dôvodu vysokého počtu analytov boli tieto látky rozdelené do štyroch skupín, teda každá vzorka bola analyzovaná celkom štyrikrát. Skupiny liečiv sú nasledovné: benzodiazepíny (diazepam, klonazepam), z-hypnotiká (zolpidem, zopiklón), antidepresíva (fluoxetín, venlafaxín) a antipsychotiká (haloperidol, risperidon). Najčastejšie zaznamenanou látkou bol diazepam a klonazepam. Nakoľko vo viacerých prípadoch bola zaznamenaná prítomnosť antidepresív a antipsychotík vo vlasoch bez dôkazu prítomnosti látok týchto skupín v krvi,

analýza vlasov poskytuje dôležité doplňujúce informácie. V prípade dôkazu prítomnosti istej substancie vo vlasoch bez jej potvrdenia v krvi ide o ojedinelé užívanie liečiva s jej obsahom. Negatívne výsledky analýzy vlasov s pozitívnym nálezom v krvi značia o toxickom až letálnom účinku danej látky. Sledované analyty s limitmi detekcie sú zhrnuté v tabuľke 4 [28].

**Tabuľka 4:** Výsledky analýzy zameranej na stanovenie liečiv vo vlasoch pomocou LC-MS/MS [28]

Látka	LOD [pg/mg]	Látka	LOD [pg/mg]
Diazepam	1,5	Risperidon	3,7
Fluoxetín	2,8	Venlafaxín	9,1
Haloperidol	1,6	Zolpidem	0,3
Klonazepam	3,0	Zopiklón	43,4

### 7.3 Analýza sledujúca vplyv pigmentácie na obsah analytov

#### 7.3.1 Preamalytické úpravy vzoriek

Vzorky vlasov boli odobrané dobrovoľníkovi z Ázie vo veku 50 rokov, ktorý mal čierne, ale aj šedivé vlasy a požil tabletu s obsahom 10 mg tartrátu zolpidemu a po 12 hodinách 50 mg hydrochloridu metoxyfenamínu. Tesne pred jeho podaním bol vytrhnutý čierny aj šedivý vlas spolu s korenkom. Všetky vzorky boli odoberané v priebehu nasledujúcich 35 dní v týchto intervaloch: 12 h, 24 h, 36 h, 48 h, 72 h, 7 dní, 14 dní a 35 dní od podania zolpidemu. Jednotlivé vlasy boli nastrihané na 1 mm segmenty, počnúc korenkom. Jednotlivé úseky boli rozomleté a extrahované 200 µl 50 mmol/l borátového pufru (pH 8,4) s obsahom 100 pg/ml zolpidemu-d6 a 500 pg/ml 3-metoxymetamfetamínu ako internými štandardmi. Táto zmes bola ponechaná v ultrazvukovom kúpeli po dobu 30 minút, po čom nasledovala kvapalinová extrakcia 1 ml zmesi chloroformu a izopropanolu (3:1 V/V). Organická vrstva bola odobraná a po pridaní 20 µl roztoku kyseliny chlorovodíkovej a etanolu (1:20 V/V) bola vysušená pod prúdom dusíka. Po rozpustení v 100 µl 10% metanolu bola takto pripravená vzorka centrifugovaná pri 7 000 × g po dobu 10 minút, následne bolo 10 µl použitých na analýzu pomocou LC-MS/MS [42].

#### 7.3.2 Výsledky analýzy

Táto analýza sledovala zabudovanie daných liečiv do vlasov ovplyvnené ich pigmentáciou. Čierne aj šedivé vlasy boli testované jednotlivo, pričom medzi nimi neboli nijaké výrazné hmotnostné rozdiely. Zolpidem aj metoxyfenamín boli zaznamenané vo všetkých vzorkách s výnimkou segmentu poskytujúceho informáciu o prvých 12 hodinách, nakoľko bol

metoxyfenamín podaný až po tomto časovom úseku. Výsledky analýzy ukázali, že koncentrácie sledovaných látok sú v čiernych vlasoch, teda takých, ktoré obsahujú viac melanínu, mnohonásobne vyššie. Celkové množstvo stanovené v čiernom vlase bolo 36,5–132 pg pre zolpidem a 229–464 pg pre metoxyfenamín. V šedivých vlasoch boli tieto hladiny nasledovné: 0,9–6,2 pg a 46,6–60,6 pg. Melanín tak jasne ovplyvňuje inkorporáciu látok do vlasov [42].



## 8 SEGMENTÁLNA ANALÝZA VLASOV

Pre určenie doby užívania drog, či liečiv sa v praxi využíva analytický postup, pri ktorom sú odobrané vzorky vlasov nastrihané na úseky dlhé 0,4 mm, čo zodpovedá približne dĺžke rastu vlasu za jeden deň [43]. Pomocou segmentálnej analýzy tak možno stanoviť aj to, či daná osoba požila sledované látky raz alebo šlo o chronické užívanie. V ideálnom prípade je pri jednorazovom užití daná substancia detegovaná len v odpovedajúcom vlasovom segmente a vo zvyšných je výsledok negatívny. Nakoľko je však rýchlosť rastu vlasov nepravidelná, niektoré látky môžu byť zaznamenané aj vo vedľajších segmentoch. V tomto prípade musí byť koncentrácia sledovaného analytu v danom úseku aspoň trojnásobne vyššia ako v susedných. Množstvo drog, či liečiv, ktoré sa uloží vo vlasoch, ovplyvňujú ich fyzikálnochemické vlastnosti (lipofilita a bazicita sledovaných látok), či vlasová pigmentácia (obsah melanínu vo vlasoch) [17].

### 8.1 Odber a spracovanie vzorky vlasov pre segmentálnu analýzu

Vzorka bola odobraná žene, ktorá bola liečená na rakovinu mozgu. Detaily liečby sú zaznamenané v tabuľke 5. Prameň vlasov mal hrúbku ceruzky a dĺžku 10 cm, bol rozstrihaný do segmentov po 2 cm. Priemerná rýchlosť rastu bola určená na 1 cm/mesiac. Segmenty vlasov vážiace 10 mg boli premyté izopropanolom a dvakrát vodou, následne vysušené pri laboratórnej teplote. Na kvapalinovú extrakciu bolo použitých 500  $\mu$ l zmesi metanolu, acetonitrilu (8%) a mravčanu amónneho (2 mmol/l) v objemovom pomere 1:1:2, boli pridané tieto interné štandardy: mianserin-d3 pre citalopram, morfín-d6 pre morfín, dibenzepín pre metoklopramid a sumatriptán, oxazepam-d5 pre oxazepam, paracetamol-d4 pre paracetamol, amitriptylín-d6 pre sertralín, tramadol-C13-d3 pre tramadol a zopiklón-d8 pre zopiklón. Vlasy boli následne rozdrvené, celá vzorka bola centrifugovaná po dobu 3 minút pri  $3\,500 \times g$  a inkubovaná pri  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 18 hodín. Centrifugácia bola zopakovaná a po filtrácii bol filtrát odparený pod prúdom dusíka pri teplote  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  a následne rozpustený v 100  $\mu$ l extrakčného média a 100  $\mu$ l vody [44].

**Tabuľka 5:** Záznam užívaných liečiv u sledovanej osoby [44]

Segment	Dĺžka [cm]	Časové rozpätie	Užívané liečivá
S1	0–2	2.10.–2.12. 2014	Morfín (neznáma dávka 1–2 krát) Metoklopramid (10 mg dvakrát v jeden deň) Oxazepam (75 mg v štyroch dávkach) Paracetamol (1000 mg denne v dňoch 15.10.–30.10. a 20.11.–1.12.) Sumatriptan (100 mg trikrát) Tramadol (100–400 mg v dvoch dávkach) Zopiklón (7,5 mg denne v dňoch 31.10.–30.11.)
S2	2–4	2.8.–1.10. 2014	Bez liečiv
S3	4–6	2.6.–1.8. 2014	Bez liečiv

## 8.2 Výsledky segmentálnej analýzy vlasov

Takto pripravené vzorky boli analyzované pomocou ultra-vysokoúčinného kvapalinového chromatografu s tandemovým hmotnostným spektrometrom (UHPLC-MS/MS). Množstvo dávkované do chromatografu bolo 10 µl. Najvyšší obsah sledovaných látok bol podľa očakávaní zaznamenaný v proximálnom segmente. Prítomnosť analytov aj v ďalších segmentoch mohla byť zapríčinená difúziou skrze pot, či nerovnomerným rastom vlasov. Bola analyzovaná aj vodná frakcia po dekontaminácii za účelom stanovenia obsahu sledovaných analytov vymytých z vlasov. Ich množstvo bolo nižšie ako 10 % z množstva detegovaného vo vlasoch. Obsah daných látok v jednotlivých segmentoch a limity kvantifikácie (LOQ) sú zaznamenané v tabuľke 6 [44].

**Tabuľka 6:** Výsledky segmentálnej analýzy vlasov [44]

Látka	Koncentrácie [pg/mg]			LOQ [pg/mg]
	S1 (0–2 cm)	S2 (2–4 cm)	S3 (4–6 cm)	
Metoklopramid	210	5	Nedetegované	1
Morfín	11	Nedetegované	Nedetegované	5
Oxazepam	7	Nedetegované	Nedetegované	5
Paracetamol	2 700	Nedetegované	Nedetegované	100
Sumatriptan	19	<LOQ	<LOQ	5
Tramadol	390	51	41	10
<i>O</i> -demetyltramadol	98	<LOQ	Nedetegované	5
Zopiklón	1 700	Nedetegované	Nedetegované	5

## 9 ANALÝZA NECHTOV SO ZAMERANÍM NA LÁTKY POCHÁDZAJÚCE ZO ŽIVOTNÉHO PROSTREDIA

Nechty predstavujú biologický materiál vhodný na analýzu stopových prvkov, ktoré odzrkadľujú dlhodobé vystavenie organizmu týmto látkam. Vzhľadom k menšej miere kontaminácie z vonkajšieho prostredia sú nechty na nohách preferovanejšie ako nechty rúk. Vďaka ich pomalšiemu rastu možno popísať aj dlhší časový úsek tejto expozície [20].

Ťažké kovy a polokovy, ktorým je táto kapitola venovaná, vstupujú do ľudského tela tromi hlavnými cestami: inhaláciou, vstrebávaním cez kožu a požívaním. Okrem prvkov ako zinok, kadmium, či olovo má veľký význam aj arzén, nakoľko je toxický už v nízkych koncentráciách [45, 46].

### 9.1 Príprava vzoriek nechtov

Vzorky nechtov boli odobrané zdravým dobrovoľníkom bez predošlej liečby, či expozícii týmto prvkom v práci. Na dekontamináciu bola použitá horúca voda a acetón. 20 mg nechtov bolo vylúhovaných v 200 µl čistej kyseliny dusičnej pri teplote 70 °C po dobu 1 hodiny. Po vychladnutí bolo 100 µl tohto roztoku zriedených so 100 µl kyseliny dusičnej (2%) a 3 800 µl zmesi kyseliny dusičnej (1%), butanolu (0,5%), tritonu (0,01%), india a ródia (1 µg/kg). V takto pripravených vzorkách bolo stanovovaných 23 prvkov, spomedzi ktorých boli vybrané tieto: Al, Zn, Cr, Cu, Pb, Ba a As [47].

### 9.2 Výsledky prvkovej analýzy nechtov

Pre analýzu stopových prvkov v nechtoch bola použitá metóda indukčne viazanej plazmy s hmotnostným spektrometrom (ICP-MS). Limity detekcie sa pohybovali v rozmedzí 0,2 pg/mg až 140 pg/mg vzorky. U žien, ktoré pravidelne používali laky, sa v nechtoch objavili vyššie koncentrácie hliníku, striebra a bizmutu. Obsah vybraných prvkov v nechtoch a LOD je zhrnutý v tabuľke 7 [47].

Tabuľka 7: Výsledky prvkovej analýzy nechtov [47]

Prvok	Stredná hodnota obsahu [pg/mg]	LOD [pg/mg]
Arzén	86	10
Bárium	560	1
Chróm	1 140	60
Hliník	10 700	20

Prvok	Stredná hodnota obsahu [pg/mg]	LOD [pg/mg]
Meď	3,60	10,0
Olovo	0,46	0,3
Zinok	83,00	10,0

## 10 ANALÝZA NECHTOV SO ZAMERANÍM NA DROGY

Vďaka pomalému rastu nechtov poskytujú tieto kožné útvary informácie o užívaní liečiv, či drog aj po dlhej dobe. Medzi hlavné výhody tejto analýzy patrí okrem zobrazenia širšieho časového úseku v rozpätí mesiacov až rokov tiež jednoduchý odber, transport a skladovanie pri laboratórnej teplote. Avšak, nakoľko sú koncentrácie daných látok pomerne nízke, musia sa voliť citlivejšie analytické metódy. Taktiež príprava vzorky zohráva veľkú úlohu. Oproti analýze vlasov má táto metóda nasledovné výhody: je možné ju využiť v priebehu chemoterapie, keď nie je možné previesť vlasovú analýzu, ďalej táto metóda nie je ovplyvňovaná melanínom, na rozdiel od vlasovej pigmentácie [48]. Analýza nechtov poskytuje informácie nielen o opakovanom užívaní drog, ale aj o jedinej dávke. Vďaka poznatkom o fyziológii nechtov a procesoch zabudovávania xenobiótík možno túto techniku využiť vo forenzej aj klinickej toxikológii [49].

### 10.1 Príprava vzoriek nechtov pre analýzu drog

Pre túto analýzu boli využité nechty rúk aj nôh. Prečnievajúce časti nechtov boli odstrihnuté a uchovávané v tmavom prostredí pri laboratórnej teplote. Samotnej analýze predchádzala dekontaminácia vhodnou zmesou činidiel (napríklad voda, metanol alebo acetón) s využitím ultrazvukového kúpeľa, hydrolýza a extrakcia [50].

Kokaín spolu s jeho metabolitmi bolo možné analyzovať po nastrihaní nechtov na menšie kúsky, dekontaminácii a extrakcii metanolom pri teplote 40 °C po dobu 16 hodín, po čom bola využitá extrakcia tuhou fázou.

Pri stanovovaní kanabinoídeov bola vzorka dekontaminovaná v ultrazvukovom kúpeli s dodecylsíránom sodným (SDS), vodou a metanolom. Nasledovala alkalická hydrolýza 1 mol/l roztokom hydroxidu sodného a extrakcia s etylacetátom.

Obsah morfínu bolo možné stanoviť po dekontaminácii v ultrazvukovom kúpeli s použitím SDS, vody a metanolu, následnej hydrolýze v roztoku hydroxidu sodného s koncentráciou 1 mol/l a kvapalinovej extrakcii so zmesou obsahujúcou dichlórmetán, dichlóretán a heptán [50].

Pre analýzu amfetamínu, metamfetamínu a norketamínu bol na dekontamináciu použitý metanol a voda. Po mechanickom rozdrvení 20 mg vzorky nasledovala extrakcia metanolom pri teplote 50 °C po dobu 1 hodiny v ultrazvukovom kúpeli [51].

Vzorku za účelom analýzy etylglukuronidu bolo potrebné najskôr premyť roztokmi hexánu, dichlórmetánu a metanolu. 5–50 mg takto prečistenej vzorky vlasov bolo rozomletých

a extrahovaných vodou pri teplote 40 °C po dobu 2 hodín. Po ultrazvukovom kúpeli pri laboratórnej teplote v priebehu noci bola využitá extrakcia tuhou fázou [52].

## 10.2 Výsledky analýzy nechtov so zameraním na drogy

Vzorky nechtov boli po príslušnej príprave analyzované týmito metódami: kvapalinová chromatografia s tandemovou hmotnostnou spektrometriou (LC-MS/MS), plynová chromatografia s hmotnostnou spektrometriou (GC-MS), rádioimunoanalýza (RIA) a vysokoúčinná kvapalinová chromatografia s elektrochemickou detekciou (HPLC-ED). Výsledky analýzy, teda použité metódy pre príslušné látky spolu s limitmi detekcie sú zaznamenané v tabuľke 8 [50–52].

**Tabuľka 8:** Výsledky analýzy zameranej na stanovenie drog v nechtach [50–52]

Látka	Analytická metóda	LOD [pg/mg]
Kokaín (+metabolity)	GC-MS	250
Kanabinoidy (THC, CBD, CBN)	RIA, GC-MS	<100
Morfín	RIA, HPLC-ED	50
Amfetamín, metamfetamín, ketamín	GC-MS	12–24
Etylglukuronid	LC-MS/MS	2

## **11 ANALÝZA NECHTOV SO ZAMERANÍM NA LIEČIVÁ**

Analýza liečiv a ich metabolitov zabudovaných v nechtoch má svoje miesto aj vo forenznej vede. Prítomnosť týchto látok môže potvrdiť zneužitie hypnotík, či sedatív na zmenu správania obetí [53]. Nakoľko krv alebo moč poskytujú informácie o pomerne krátkom časovom úseku, je výhodnejšie pre túto analýzu využiť nechty, z ktorých možno získať záznam o uplynulých mesiacoch [54, 14].

### **11.1 Príprava vzoriek nechtov pre analýzu liečiv**

Tím vedcov z Nového Zélandu previedol analýzu nechtov, ktoré boli odobrané pacientom užívajúcim určité liečivá. Po ich nastrihaní na 1–2 mm dieliky boli v skúmavkách zaliate 5 ml destilovanej vody. Po 5–10 minútach bola voda dekantovaná a dekontaminácia pokračovala pridaním 3 ml etanolu. Zmes bola vortexovaná po dobu 5–10 minút a celý proces bol dvakrát zopakovaný. Vzorky boli následne sušené pri teplote 45 °C 2 hodiny. Ako extrakčné činidlo boli použité 3 ml roztoku kyseliny trifluóroctovej a metanolu s interným štandardom prazepamom (15 ng) v pomere 1:50. Do takto pripraveného roztoku v skúmavke bolo pridaných 50 mg vzorky nechtov. Skúmavka bola utesnená teflónovou čiapočkou a ponechaná 16–18 hodín extrahovať pri laboratórnej teplote. Vzorka bola krátko vortexovaná s následnou centrifugáciou (2 700 otáčok/min, 10 minút). Extrahovaná kvapalina bola odpipetovaná do skúmavky, kde bola pri 38 °C sušená 110 minút. Sušina bola následne rozpustená vo fosfátovom pufri (pH 7,2) s objemom 500 µl a 10 minút vortexovaná. Po pridaní 3 ml dichlórmetánu bola zmes vortexovaná ďalšie 4 minúty a centrifugovaná (2 700 otáčok/min, 10 min), po čom bola odstránená vrchná vrstva. Vrstva s dichlórmetánom bola 35 minút odparovaná a zvyšok bol rozmiešaný v 100 µl mobilnej fázy a vortexovaný 5 minút [18].

Podobnému experimentu sa venoval aj tím vedcov z Belgicka, ktorý vypracoval štúdiu o rozdielnych postupoch pre dekontamináciu vzoriek a extrakciu jednotlivých analytov z matric. Sledované vzorky nechtov boli odobrané pacientom, ktorí užívali sedatíva predpísané lekármi [48].

Vzorky, v ktorých bol stanovovaný obsah alprazolamu, klobazamu, klonazepamu, diazepam, lorazepam, midazolamu, oxazepam, temazepam, triazolamu a zopiklónu boli dekontaminované vodou a trojitým prepláchnutím etanolom. Nechty boli následne nastrihané na menšie segmenty a extrahované zmesou kyseliny trifluóroctovej a metanolu (1:50) pri laboratórnej teplote po dobu 16–18 hodín [18].

Zolpidem bol analyzovaný po premytí nechtov vodou, dvakrát metanolom, 25 mg vzorky bolo nastrihaných. Extrakcia prebehla v 0,3 mol/l roztoku NaOH pri 80 °C a trvala 40 minút [55].

Posledným analytom bol klozapín. Vzorka bola dekontaminovaná dvojnásobným premytím vodou a acetónom. Po jej rozdrvení bolo 5 mg extrahovaných zmesou acetonitrilu a octanu amónneho (7:3) pri laboratórnej teplote po dobu 1 hodiny v ultrazvukovom kúpeli [56].

## 11.2 Výsledky analýzy nechtov so zameraním na liečivá

Vzorky pripravené vyššie uvedenými postupmi boli vložené do autosampleru pre kvapalinový chromatograf s tandemovým hmotnostným spektrometrom. Obsah sledovaných látok bol určený pomocou kalibračných rád zostavených z očakávaných liečiv/interných štandardov, ktorých hodnoty koncentrácií sa pohybovali v rozmedzí od 0,06 pg/mg do 300, prípadne 3 000 pg/mg matrice. Analyzované látky spolu s ich limitmi detekcie sú uvedené v tabuľke 9 a 10. Pri analýze bolo zaznamenané, že nedochádza k rovnomernému zabudovávaniu látok do nechtov rúk a nôh. Celkovo boli nájdené najvyššie koncentrácie látok *N*-desmetyl klobazam a oxazepam. V nechtoch rúk boli nájdené najvyššie koncentrácie alprazolamu a temazepamu, v nohách to bol tiež temazepam a nordiazepam [18, 55, 56].

**Tabuľka 9:** Výsledky analýzy zameranej na stanovenie liečiv v nechtoch (N. Zéland) [18]

Tím z Nového Zélandu			
Látka	LOD [pg/mg]	Látka	LOD [pg/mg]
Alprazolam	0,06	Lorazepam	0,12
Klobazam	0,06	Midazolam	0,01
<i>N</i> -desmetyl klobazam	0,60	Oxazepam	0,60
Klonazepam	0,12	Temazepam	6,00
7-aminoklonazepam	0,60	Triazolam	0,06
Diazepam	0,12	Zopiklón	0,02
Nordiazepam	0,12	<i>N</i> -desmetyl zopiklón	0,06

**Tabuľka 10:** Výsledky analýzy zameranej na stanovenie liečiv v nechtoch (Belgicko) [18, 55, 56]

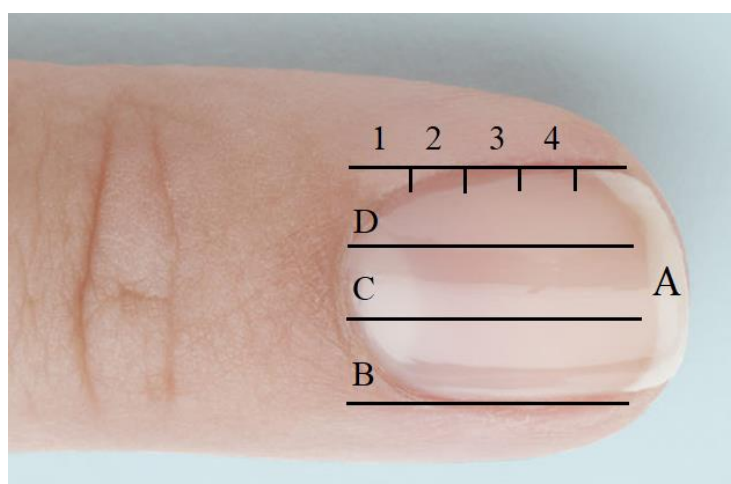
Tím z Belgicka		
Látka	Extrakcia	LOD [pg/mg]
Alprazolam, klobazam, klonazepam, diazepam, lorazepam, midazolam, oxazepam, temazepam, triazolamu, zopiklón	Kys. trifluóroctová s metanolom	0,06–6,00
Zolpidem	NaOH	0,03
Klozapín	Acetonitril s octanom amónnym	50,00

## 12 SEGMENTÁLNA ANALÝZA NECHTOV

Na segmentálnu analýzu sú potrebné celé nechty, teda vzorky, ktoré boli odoberané pri pitve, respektíve pred jej započatím. Na analýzu bola využitá ultra-vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (UHPLC), ktorá má uplatnenie tiež v identifikácii a kvantifikácii analytov v rôznych biologických materiáloch. UHPLC poskytuje výhody chromatografickej separácie používajúc kratšie kolóny, vyššiu prietokovú rýchlosť s väčšou rozlišovacou schopnosťou a citlivosťou [57, 19].

### 12.1 Príprava vzoriek nechtov pre segmentálnu analýzu

Vzorka bola odobraná 24-ročnému mužovi, ktorý trpel hraničnou poruchou osobnosti. Zosnulý bol závislý na viacerých drogách. Vzorky boli odobrané aj dobrovoľníkom, ktorí nepožívali nijaké drogy za účelom analýzy vplyvu matrice. Celé nechty boli rozstrihané do nasledovných segmentov: voľný okraj (A), pás nechtovej platničky pozostávajúci z celej dĺžky nechtu, avšak iba jeho spodná časť dotýkajúca sa nechtového lôžka (B), pás nechtovej platničky bez dolnej časti, ktorá bola v konštantnom kontakte s nechtovým lôžkom (C) a úsek kompletnej nechtovej platničky (D). Toto rozdelenie je znázornené na obrázku 3 [19].



**Obrázok 3:** Rozsegmentovanie analyzovaného nechtu [58]

Na analýzu bolo odobraných vždy 20 mg vzorky, ktorá bola rozstrihaná na drobné časti a prepláchnutá 10 ml vody a dvakrát 10 ml acetónu za účelom dekontaminácie. Vzorky boli vysušené pri laboratórnej teplote a následne rozomleté na guľovom mlyne. Na extrakciu bolo použitých 500 µl zmesi metanolu, acetonitrilu a vodného roztoku mravčanu amónneho



v pomere 1:1:2. Bolo pridaných tiež 5 µl interného štandardu<sup>d</sup> (1 ng/µl). Vzorky boli premiešavané pri 800 otáčkach za minútu po dobu 18 hodín pri teplote 40 °C. Následne bol supernatant odobraný do ampulky a uschovaný, k tuhému zvyšku vzorky bolo pridaných ďalších 500 µl extrakčnej zmesi, obsah bol spracovaný rovnako ako pri prvej extrakcii. Oba supernatanty boli zmiešané a prefiltrované do novej ampulky [19].

## 12.2 Výsledky segmentálnej analýzy nechtov

Pripravená vzorka bola analyzovaná pomocou kvapalinového chromatografu v spojení s hmotnostným spektrometrom s trojitým kvadrupólom (UHPLC-QQQ-MS). Segmentálna analýza odhalila konštantné užívanie heroínu, kokaínu, klonazepamu, benzodiazepínov, doxepínu, tramadolu a zolpidemu. Koncentrácia 6-monoacetylmorfínu a tramadolu postupne vzrastala, kým koncentrácia klonazepamu klesala. Ďalšie analyty spolu s ich obsahom vo vybraných segmentoch sú zaznamenané v tabuľke 11 [19].

**Tabuľka 11:** Výsledky segmentálnej analýzy nechtov [19]

Látka	Koncentrácia v segmentoch [pg/mg]			
	D1 (0–2 mm)	D2 (2–4 mm)	D3 (4–6 mm)	D4 (6–8 mm)
6-monoacetylmorfín	26	57	144	1 680
Benzoylkgonín	115	123	117	169
Klonazepam	138	79	74	56
Kodeín	557	456	587	1 180
Diazepam	364	434	410	380
Doxepín	155	209	159	257
Morfín	6 680	5 850	5 030	13 010
Tramadol	102	127	258	341
Zolpidem	16	18	17	17

<sup>d</sup> Interný štandard pozostával z týchto látok: 6-monoacetylmorfín-d3, alfa-hydroxyalprazolam-d5, alprazolam-d5, 7-aminoflunitrazepam-d7, amfetamín-d5, benzoylkgonín-d5, buprenorfín-d4, klonazepam-d4, kokaín-d3, kokaetylén-d3, kodeín-d3, diazepam-d5, dihydrokodeín-d3, 2-etylidén-1,5-dimetyl-3,3-difenylpyrolidín-d3, flunitrazepam-d7, fentanyl-d5, ketamín-d4, lorazepam-d4, metamfetamín-d5, 3,4-metyléndioxyamfetamín-d5, 3,4-metyléndioxy-N-etylamfetamín-d6, 3,4-metyléndioxy-N-metylamfetamín-d5, metadón-d9, metylekgonín-d3, morfín-d3, nordazepam-d5, norbuprenorfín-d3, norkokaín-d3, nortilidín-d3, oxazepam-d5, oxykodón-d3, tilidín-d6, tamazepam-d5 a tramadol-d3 [19].

### 13 ZHRNUTIE ANALÝZ

Analýza keratínových matric, ako sú vlasy a nechty, dosahuje značný význam najmä vo forenzej toxikológii. Nechty sú považované za vhodnú alternatívu k vlasom, ktorých odber je jednoduchší oproti spôsobu získavania vzorky nechtov, ktorú tvorí len ich voľný okraj, ak nejde o postmortálnu analýzu [59]. Vďaka moderným analytickým postupom a citlivým inštrumentálnym metódam možno detegovať metabolity drog a liečivá už vo veľmi nízkych koncentráciách. Zhrnutie analýz, teda sledované analyty, metódy extrakcie, analytické metódy a limity detekcie spolu so zdrojmi sú uvedené v tabuľke 12 a 13.

**Tabuľka 12:** Zhrnutie analýz vlasov

Analyt	Extrakcia	Analytická metóda	LOD [pg/mg]	Zdroj
Al, Ba, Cu, Fe, Zn	-	ICP-MS	-	[16]
6-acetylmorfín	metanol	LC-MS/MS	10,0	[12]
Amfetamín, metamfetamín	zmes metanolu a kys. trifluóroctovej/SPE	GC-MS	30,0	[39]
Benzoyllegonín	metanol	LC-MS/MS	1,0	[12]
Kanabinoidy (THC, CBD, CBN)	metanol/SPE	GC-MS	10,0	[39]
Kokaín	metanol	LC-MS/MS	1,0	[12]
Kokaín	metanol/SPE	GC-MS	10,0	[39]
Morfín	metanol	LC-MS/MS	10,0	[12]
Opiáty (morfín, heroín)	metanol/SPE	GC-MS	20,0	[39]
Alprazolam	metanol	LC-HRMS	5,0	[40]
Bromazepam	metanol	LC-HRMS	10,0	[40]
Diazepam	metanol	LC-HRMS	5,0	[40]
Diazepam	-	LC-MS/MS	1,5	[28]
Fentanyl	metanol	LC-HRMS	10,0	[40]
Fluoxetín	-	LC-MS/MS	2,8	[28]
Haloperidol	-	LC-MS/MS	1,6	[28]
Karbamazepin	metanol	LC-HRMS	5,0	[40]
Klonazepam	-	LC-MS/MS	3,0	[28]
Kodeín	metanol	LC-HRMS	5,0	[40]
Lorazepam	metanol	LC-HRMS	10,0	[40]
Midazolam	metanol	LC-HRMS	5,0	[40]
Oxazepam	metanol	LC-HRMS	10,0	[40]
Risperidon	-	LC-MS/MS	3,7	[28]
Venlafaxín	-	LC-MS/MS	9,1	[28]
Zolpidem	-	LC-MS/MS	0,3	[28]
Zopiklón	-	LC-MS/MS	43,4	[28]

**Tabuľka 13:** Zhrnutie analýz nechtov

Analyt	Extrakcia	Analytická metóda	LOD [pg/mg]	Zdroj
Al	-	ICP-MS	20,00	[47]
As, Cu, Zn	-	ICP-MS	10,00	[47]
Ba	-	ICP-MS	1,00	[47]
Cr	-	ICP-MS	60,00	[47]
Pb	-	ICP-MS	0,30	[47]
Amfetamín, metamfetamín, ketamín	metanol	GC-MS	12–24	[51]
Etylglukuronid	voda/SPE	LC-MS/MS	2,00	[52]
Kanabinoidy (THC, CBD, CBN)	etylacetát	RIA, GC-MS	<100	[50]
Kokaín + metabolity	metanol/SPE	GC-MS	250,00	[50]
Morfin	zmes dichlórmétánu, dichlóretánu a heptánu	RIA, HPLC-ED	50,00	[50]
Alprazolam	zmes kys. trifluóroctovej a metanolu	LC-MS/MS	0,06	[18]
7-aminoklonazepam	zmes kys. trifluóroctovej a metanolu	LC-MS/MS	0,60	[18]
Diazepam	zmes kys. trifluóroctovej a metanolu	LC-MS/MS	0,12	[18]
Klobazam	zmes kys. trifluóroctovej a metanolu	LC-MS/MS	0,06	[18]
Klonazepam	zmes kys. trifluóroctovej a metanolu	LC-MS/MS	0,12	[18]
Klozapín	zmes acetonitrilu s octanom amónnym	LC-MS/MS	50,00	[56]
Lorazepam	zmes kys. trifluóroctovej a metanolu	LC-MS/MS	0,12	[18]
Midazolam	zmes kys. trifluóroctovej a metanolu	LC-MS/MS	0,01	[18]
N-desmetyl klobazam	zmes kys. trifluóroctovej a metanolu	LC-MS/MS	0,60	[18]
N-desmetyl zopiklón	zmes kys. trifluóroctovej a metanolu	LC-MS/MS	0,06	[18]
Nordiazepam	zmes kys. trifluóroctovej a metanolu	LC-MS/MS	0,12	[18]
Oxazepam	zmes kys. trifluóroctovej a metanolu	LC-MS/MS	0,60	[18]
Temazepam	zmes kys. trifluóroctovej a metanolu	LC-MS/MS	6,00	[18]
Triazolam	zmes kys. trifluóroctovej a metanolu	LC-MS/MS	0,06	[18]
Zolpidem	NaOH	LC-MS/MS	0,03	[55]
Zopiklón	zmes kys. trifluóroctovej a metanolu	LC-MS/MS	0,02	[18]

## 14 ZÁVER

Táto bakalárska práca je spracovaná formou rešerše o odbere vzoriek vlasov a nechtov, ich spracovaní a analýze. Približuje tiež anatómiu kože, nakoľko sú vlasy a nechty jej derivátmi, vysvetľuje inkorporáciu substancií a pojednáva o význame ich analýz, ktoré sú hlavným predmetom tejto práce.

Práca pojednáva o vlasoch a nechtoch ako o keratínových matriciach, ktoré nesú informácie o užívaných liečivách, či drogách, ale aj o životnom prostredí, v ktorom sa daná osoba pohybuje. Z neho sú látky zabudovávané do vlasov a nechtov, pričom dochádza k viditeľným zmenám v ich štruktúre. Pomalý rast vlasov a nechtov je možné využiť pre retrospektívnu analýzu aj v rozsahu mesiacov, čo má uplatnenie vo forenzných vedách pri objasňovaní trestných činov, postmortálnej analýze, ale aj v medicíne, kde možno týmto spôsobom sledovať pacienta, či dodržiava liečbu nariadenú lekárom. Nakoľko sú väčšinou analyzované metabolity požívaných látok, je možné vylúčiť kontamináciu z vonkajšieho prostredia a v prípade ich stanovenia vo vzorke ide o potvrdenie požívania daných substancií. Vďaka kontinuálnemu rastu vlasov a nechtov je možné previesť aj segmentálnu analýzu, ktorá poskytuje informácie o dobe užívania drog, či liečiv. Tento biologický materiál vyniká tiež jednoduchým odberom a nenáročným skladovaním pri laboratórnej teplote.

Pri jednotlivých krokoch experimentov bola využitá široká škála analytických metód. Dôležitú úlohu má extrakcia, v priebehu ktorej dochádza k uvoľneniu sledovanej látky z matrice, jej zakoncentrovaniu a prevedeniu na formu kompatibilnú s inštrumentálnou metódou zvolenou na jej detekciu. V tejto práci je využívaná najmä plynová a kvapalinová chromatografia s rôznymi typmi detektorov (napr. hmotnostný spektrometer, tandemový hmotnostný spektrometer, elektrochemický detektor). Tieto metódy poskytujú limity detekcie rádovo v pg/mg vzorky.

## 15 POUŽITÁ LITERATÚRA

- [1] ČIHÁK, Radomír. *Anatomie 3*. 2. dopl. vyd. Praha: Grada Publishing, 2004. ISBN 80-247-1132-X.
- [2] DYLEVSKÝ, Ivan. *Funkční anatomie*. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-3240-4.
- [3] JUNQUEIRA, Luiz Carlos Uchoa, José CARNEIRO a Robert O. KELLEY. *Základy histologie*. Jinočany: H & H, 1997. ISBN 80-857-8737-7.
- [4] 501\_Structure\_of\_the\_skin.jpg. In: *Anatomy & Physiology* [online]. Houston: OpenStax, 2013 [cit. 2020-03-06]. Dostupné z: [https://philschatz.com/anatomy-book/resources/501\\_Structure\\_of\\_the\\_skin.jpg](https://philschatz.com/anatomy-book/resources/501_Structure_of_the_skin.jpg)
- [5] Video #40 - Anatomia nechtov. In: *WEXA Design* [online]. Bratislava: WEXA, 2003 [cit. 2020-03-07]. Dostupné z: <https://www.wexa.sk/sk-detail-609705-video-40-anatomia-nechtov.html>
- [6] DANIEL, C Ralph, Bianca Maria PIRACCINI a Antonella TOSTI. The nail and hair in forensic science. *Journal of the American Academy of Dermatology* [online]. 2004, **50**(2), 258-261 [cit. 2019-10-10]. DOI: 10.1016/j.jaad.2003.06.008. ISSN 01909622. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0190962203032766>
- [7] GHEDDAR, Laurie, Jean-Sebastien RAUL a Pascal KINTZ. First identification of a diuretic, hydrochlorothiazide, in hair: Application to a doping case and interpretation of the results. *Drug Testing and Analysis* [online]. 2019, **11**(1), 157-161 [cit. 2020-02-19]. DOI: 10.1002/dta.2445. ISSN 19427603. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/dta.2445>
- [8] MUPUNGA, Innocent, Christo D. IZAAKS, Leshweni Jeremiah SHAI a David KATERERE. Aflatoxin biomarkers in hair may facilitate long-term exposure studies. *Journal of Applied Toxicology* [online]. 2017, **37**(4), 395-399 [cit. 2020-03-07]. DOI: 10.1002/jat.3422. ISSN 0260437X. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jat.3422>
- [9] HIGASHI, Tatsuya, Kenichiro YAMAGATA, Yuina KATO, Yu OGAWA, Kaori TAKANO, Yutaro NAKAAZE, Takashi IRIYAMA, Jun Zhe MIN a Shoujiro OGAWA. Methods for determination of fingernail steroids by LC/MS/MS and differences in their contents between right and left hands. *Steroids* [online]. 2016, **109**, 60-65 [cit. 2020-03-08]. DOI: 10.1016/j.steroids.2016.02.013. ISSN 0039128X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039128X16000441>
- [10] GAILLARD, Yvan a Gilbert PÉPIN. Testing hair for pharmaceuticals. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* [online]. 1999, **733**(1-2),

- 231-246 [cit. 2019-11-15]. DOI: 10.1016/S0378-4347(99)00263-7. ISSN 03784347.  
Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378434799002637>
- [11] SHIMA, Noriaki, Keiko SASAKI, Tooru KAMATA, Shuntaro MATSUTA, Misato WADA, Hidenao KAKEHASHI, Shihoko NAKANO, Hiroe KAMATA, Hiroshi NISHIOKA, Takako SATO, Hitoshi TSUCHIHASHI, Akihiro MIKI a Munehiro KATAGI. Incorporation of Zolpidem into Hair and Its Distribution after a Single Administration. *Drug Metabolism and Disposition* [online]. 2017, **45**(3), 286-293 [cit. 2019-10-15]. DOI: 10.1124/dmd.116.074211. ISSN 0090-9556. Dostupné z: <http://dmd.aspetjournals.org/lookup/doi/10.1124/dmd.116.074211>
- [12] USMAN, Muhammad, Abid NASEER, Yawar BAIG, Tahir JAMSHAD, Muhammad SHAHWAR a Shazia KHURSHUID. Forensic toxicological analysis of hair: a review. *Egyptian Journal of Forensic Sciences* [online]. 2019, **9**(1) [cit. 2019-10-16]. DOI: 10.1186/s41935-019-0119-5. ISSN 2090-5939. Dostupné z: <https://ejfs.springeropen.com/articles/10.1186/s41935-019-0119-5>
- [13] GROVER, Chander a Shikha BANSAL. The nail as an investigative tool in medicine: What a dermatologist ought to know. *Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology* [online]. 2017, **83**(6) [cit. 2020-03-21]. DOI: 10.4103/ijdv.IJDVL\_1050\_16. ISSN 0378-6323. Dostupné z: <http://www.ijdv.com/text.asp?2017/83/6/635/215937>
- [14] CAPPELLE, Delphine, Mireille DE DONCKER, Celine GYS, Kamelia KRYSIAK, Steven DE KEUKELEIRE, Walid MAHO, Cleo CRUNELLE, Gert DOM, Adrian COVACI, Alexander VAN NUJIS a Hugo NEELS. A straightforward, validated liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry method for the simultaneous detection of nine drugs of abuse and their metabolites in hair and nails. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2017, **960**, 101-109 [cit. 2019-11-07]. DOI: 10.1016/j.aca.2017.01.022. ISSN 00032670. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267017301010>
- [15] FERREIRA, Carla, Cathy PAULINO a Alexandre QUINTAS. Extraction Procedures for Hair Forensic Toxicological Analysis: A Mini-Review. *Chemical Research in Toxicology* [online]. 2019, **32**(12), 2367-2381 [cit. 2020-03-19]. DOI: 10.1021/acs.chemrestox.9b00301. ISSN 0893-228X. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.chemrestox.9b00301>
- [16] GALLIANO, A., Chengda YE, F. SU, C. WANG, Y. WANG, C. LIU, Aditi WAGLE, Maxime GUERIN, Frederic FLAMENT a A. STEEL. Particulate matter adheres to human hair exposed to severe aerial pollution: consequences for certain hair surface

- properties. *International Journal of Cosmetic Science* [online]. 2017, **39**(6), 610-616 [cit. 2020-03-09]. DOI: 10.1111/ics.12416. ISSN 01425463. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/ics.12416>
- [17] WANG, Xin, Sys Stybe JOHANSEN, Marie Katrine Klose NIELSEN a Kristian LINNET. Hair analysis in toxicological investigation of drug-facilitated crimes in Denmark over a 8-year period. *Forensic Science International* [online]. 2018, **285**, e1-e12 [cit. 2019-11-30]. DOI: 10.1016/j.forsciint.2018.01.021. ISSN 03790738. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0379073818300355>
- [18] IRVING, Rachel a Stuart DICKSON. The detection of sedatives in hair and nail samples using tandem LC–MS–MS. *Forensic Science International* [online]. 2007, **166**(1), 58-67 [cit. 2019-11-21]. DOI: 10.1016/j.forsciint.2006.03.027. ISSN 03790738. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037907380600199X>
- [19] KRUMBIEGEL, Franziska, Martin HASTEDT, Lena WESTENDORF, André NIEBEL, Maximilian METHLING, Maria Kristina PARR a Michael TSOKOS. The use of nails as an alternative matrix for the long-term detection of previous drug intake: validation of sensitive UHPLC-MS/MS methods for the quantification of 76 substances and comparison of analytical results for drugs in nail and hair samples. *Forensic Science, Medicine, and Pathology* [online]. 2016, **12**(4), 416-434 [cit. 2020-03-12]. DOI: 10.1007/s12024-016-9801-1. ISSN 1547-769X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12024-016-9801-1>
- [20] BATISTA, Bruno Lemos, Jairo Lisboa RODRIGUES, Juliana Andrade NUNES, Luciano TORMEN, Adilson Jose CURTIUS a Fernando BARBOSA JR. Simultaneous determination of Cd, Cu, Mn, Ni, Pb and Zn in nail samples by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) after tetramethylammonium hydroxide solubilization at room temperature: Comparison with ETAAS. *Talanta* [online]. 2008, **76**(3), 575-579 [cit. 2019-10-28]. DOI: 10.1016/j.talanta.2008.03.046. ISSN 00399140. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914008002440>
- [21] KIM, Ki-Hyun, Ehsanul KABIR a Shamin KABIR. A review on the human health impact of airborne particulate matter. *Environment International* [online]. 2015, **74**, 136-143 [cit. 2019-11-29]. DOI: 10.1016/j.envint.2014.10.005. ISSN 01604120. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0160412014002992>
- [22] ZAHRA, Naseem. Perilous effects of heavy metals contamination on human health. *Pakistan Journal of Analytical & Environmental Chemistry* [online]. 2017, **18**(1), 1-17

- [cit. 2019-11-30]. DOI: 10.21743/pjaec/2017.06.01. ISSN 1996918X. Dostupné z: <http://pjaec.pk/index.php/pjaec/article/view/280>
- [23] GUGGENBUHL, Pascal, Pierre BRISSOT a Olivier LORÉAL. Haemochromatosis: The bone and the joint. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* [online]. 2011, **25**(5), 649-664 [cit. 2019-11-30]. DOI: 10.1016/j.berh.2011.10.014. ISSN 15216942. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1521694211000891>
- [24] HU, Jianlin, Qi YING, Yungang WANG a Hongliang ZHANG. Characterizing multi-pollutant air pollution in China: Comparison of three air quality indices. *Environment International* [online]. 2015, **84**, 17-25 [cit. 2019-11-29]. DOI: 10.1016/j.envint.2015.06.014. ISSN 01604120. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0160412015300052>
- [25] Pardubice air quality and weather daily forecast. *AirVisual* [online]. Goldach: IQAir, 2020 [cit. 2020-03-08]. Dostupné z: <https://www.airvisual.com/czech-republic/pardubicky/pardubice>
- [26] National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. *Triton X-100*. [Online] [Datum: 21. November 2019.] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Triton-X-100>
- [27] SHIMA, Noriaki, Keiko SASAKI, Tohru KAMATA, Akihiro MIKI a Munehiro KATAGI. Hair Testing for Drugs in the Field of Forensics. *YAKUGAKU ZASSHI* [online]. 2019, **139**(5), 705-713 [cit. 2020-03-19]. DOI: 10.1248/yakushi.18-00166-4. ISSN 0031-6903. Dostupné z: [https://www.jstage.jst.go.jp/article/yakushi/139/5/139\\_18-00166-4/\\_article/-char/ja/](https://www.jstage.jst.go.jp/article/yakushi/139/5/139_18-00166-4/_article/-char/ja/)
- [28] HØISETH, Gudrun, Marianne ARNESTAD, Ritva KARINEN, Luca MORINI, Sidsel ROGDE, Cristina SEMPIO, Vigdis VINDENES a Åse Marit Leere ØIESTAD. Is Hair Analysis Useful in Postmortem Cases? *Journal of Analytical Toxicology* [online]. 2018, **42**(1), 49-54 [cit. 2020-03-10]. DOI: 10.1093/jat/bkx077. ISSN 0146-4760. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jat/article/42/1/49/4158178>
- [29] BAZREGAR, Mohammad, Maryam RAJABI, Yadollah YAMINI, Zahra SAFFARZADEH a Alireza ASGHARI. Tandem dispersive liquid-liquid microextraction as an efficient method for determination of basic drugs in complicated matrices. *Journal of Chromatography A* [online]. 2016, **1429**, 13-21 [cit. 2020-02-19]. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.11.087. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967315017513>



- [30] AN, Jiwoo, María TRUJILLO-RODRÍGUEZ, Verónica PINO a Jared ANDERSON. Non-conventional solvents in liquid phase microextraction and aqueous biphasic systems. *Journal of Chromatography A* [online]. 2017, **1500**, 1-23 [cit. 2020-02-19]. DOI: 10.1016/j.chroma.2017.04.012. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967317305496>
- [31] SCHUMMER, Claude, Olivier DELHOMME, Brice APPENZELLER, Robert WENNIG a Maurice MILLET. Comparison of MTBSTFA and BSTFA in derivatization reactions of polar compounds prior to GC/MS analysis. *Talanta* [online]. 2009, **77**(4), 1473-1482 [cit. 2020-04-10]. DOI: 10.1016/j.talanta.2008.09.043. ISSN 00399140. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914008006966>
- [32] National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. *Benzoylecgonine*. [Online] [Datum: 21. november 2019.] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/O-Benzoylecgonine>.
- [33] OCAÑA-GONZÁLEZ, Juan Antonio, Rut FERNÁNDEZ-TORRES, Miguel Ángel BELLO-LÓPEZ a María RAMOS-PAYÁN. New developments in microextraction techniques in bioanalysis. A review. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2016, **905**, 8-23 [cit. 2020-02-19]. DOI: 10.1016/j.aca.2015.10.041. ISSN 00032670. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267015013203>
- [34] Ex\_praktika.doc - spf\_fe.pdf. *Web.natur.cuni.cz* [online]. Praha, 2020 [cit. 2020-04-13]. Dostupné z: [https://web.natur.cuni.cz/~analchem/pprakt/spf\\_fe.pdf](https://web.natur.cuni.cz/~analchem/pprakt/spf_fe.pdf)
- [35] Untitled Page:. *Is.mendelu.cz* [online]. Brno, 2019 [cit. 2020-04-13]. Dostupné z: [https://is.mendelu.cz/eknihovna/opory/zobraz\\_cast.pl?cast=52968](https://is.mendelu.cz/eknihovna/opory/zobraz_cast.pl?cast=52968)
- [36] PROCHÁZKOVÁ, Dana. Mikroextrakce na tuhou fázi a stanovení obsahu analytů. *Chemické Listy*. 2002, **96**, 829-833. ISSN 1213-7103.
- [37] GORYNSKI, Krzysztof. A critical review of solid-phase microextraction applied in drugs of abuse determinations and potential applications for targeted doping testing. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2019, **112**, 135-146 [cit. 2020-02-19]. DOI: 10.1016/j.trac.2018.12.029. ISSN 01659936. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993618305338>
- [38] KIM, Joonyeong, Joungmo CHO, Michelli SCHMITZ a Zeki Y. AL-SAIGH. Quantitative chemical analysis of volatile compounds via headspace-solid phase microextraction (HS-SPME) coupled with inverse gas chromatography (IGC). *Forensic Chemistry* [online]. 2018, **11**, 7-14 [cit. 2020-03-15]. DOI: 10.1016/j.forc.2018.08.005.

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2468170918300183>

- [39] VOGLIARDI, Susanna, Marianna TUCCI, Giulia STOCCHERO, Santo Davide FERRARA a Donata FAVRETTO. Sample preparation methods for determination of drugs of abuse in hair samples: A review. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2015, **857**, 1-27 [cit. 2020-02-22]. DOI: 10.1016/j.aca.2014.06.053. ISSN 00032670. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267014008241>
- [40] ODOARDI, Sara, Valeria VALENTINI, Nadia DE GIOVANNI, Vincenzo Lorenzo PASCALI a Sabina STRANO-ROSSI. High-throughput screening for drugs of abuse and pharmaceutical drugs in hair by liquid-chromatography-high resolution mass spectrometry (LC-HRMS). *Microchemical Journal* [online]. 2017, **133**, 302-310 [cit. 2019-11-07]. DOI: 10.1016/j.microc.2017.03.050. ISSN 0026265X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0026265X17301625>
- [41] FERRARI, Anna, Carlo BARALDI, Manuela LICATA, Daniele VANDELLI, Filippo MARCHESI, Federica PALAZZOLI, Patrizia VERRI, Cecilia RUSTICHELLI, Enrico GIULIANI a Enrico SILINGARDI. Hair analysis for detection of triptans occasionally used or overused by migraine patients—a pilot study. *European Journal of Clinical Pharmacology* [online]. 2016, **72**(9), 1075-1081 [cit. 2020-03-10]. DOI: 10.1007/s00228-016-2074-5. ISSN 0031-6970. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00228-016-2074-5>
- [42] SHIMA, Noriaki, Atsushi NITTA, Tooru KAMATA, Keiko SASKI, Shuntaro MATSUTA, Akari ISHIKAWA, Ryutaro ASAI, Misato WADA, Hidenao KAKEHASHI, Shihoko NAKANO, Hiroe KAMATA, Takako SATO, Hitoshi TSUCHIHASHI, Akihiro MIKI a Munehiro KATAGI. Incorporation of zolpidem and methoxyphenamine into white hair strands after single administrations: Influence of hair pigmentation on drug incorporation. *Forensic Science International* [online]. 2019, **301**, 67-75 [cit. 2019-10-13]. DOI: 10.1016/j.forsciint.2019.05.013. ISSN 03790738. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0379073819301896>
- [43] KUWAYAMA, Kenji, Hajime MIYAGUCHI, Yuko Togawa IWATA, Tatsuyuki KANAMORI, Kenji TSUJIKAWA, Tadashi YAMAMURO, Hiroki SEGAWA a Hiroyuki INOUE. Different localizations of drugs simultaneously administered in a strand of hair by micro-segmental analysis. *Drug Testing and Analysis* [online]. 2018, **10**(4), 750-760 [cit. 2019-11-30]. DOI: 10.1002/dta.2259. ISSN 19427603. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/dta.2259>

- [44] WANG, Xin, Sys Stybe JOHANSEN, Marie Katrine Klose NIELSEN a Kristian LINNET. Segmental Hair Analysis—Interpretation of the Time of Drug Intake in Two Patients Undergoing Drug Treatment. *Journal of Forensic Sciences* [online]. 2018, **64**(3), 950-955 [cit. 2019-11-07]. DOI: 10.1111/1556-4029.13947. ISSN 0022-1198. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/1556-4029.13947>
- [45] WONGSASULUK, Pokkate, Srilert CHOTPANTARAT, Wattasit SIRIWONG a Mark ROBSON. Using hair and fingernails in binary logistic regression for bio-monitoring of heavy metals/metalloid in groundwater in intensively agricultural areas, Thailand. *Environmental Research* [online]. 2018, **162**, 106-118 [cit. 2019-10-28]. DOI: 10.1016/j.envres.2017.11.024. ISSN 00139351. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0013935117316158>
- [46] HURA, Carmen, Iliana PALAMARU a Bogdan Andrei HURA. *Assessment of some heavy metals in the maternal body, risk in cancer disease*. Montrouge: John Libbey Eurotext, 2002. ISBN 2-7420-0429-7. ISSN 1257-2535.
- [47] GOULLE, Jean-Pierre, Elodie SAUSSEREAU, Loic MAHIEU, Daniel BOUIGE, S. GROENWONT, Michael GUERBET a Christian LACROIX. Application of Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Multielement Analysis in Fingernail and Toenail as a Biomarker of Metal Exposure. *Journal of Analytical Toxicology* [online]. 2009, **33**(2), 92-98 [cit. 2019-10-28]. DOI: 10.1093/jat/33.2.92. ISSN 0146-4760. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jat/article-lookup/doi/10.1093/jat/33.2.92>
- [48] CAPPELLE, Delphine, Michel YEGLES, Hugo NEELS, Alexander L. N. VAN NUIJS, Mireille DE DONCKER, Kristof MAUDENS, Adrian COVACI a Cleo Lina CRUNELLE. Nail analysis for the detection of drugs of abuse and pharmaceuticals: a review. *Forensic Toxicology* [online]. 2015, **33**(1), 12-36 [cit. 2020-03-12]. DOI: 10.1007/s11419-014-0258-1. ISSN 1860-8965. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11419-014-0258-1>
- [49] BAUMGARTNER, Markus. Nails: an adequate alternative matrix in forensic toxicology for drug analysis? *Bioanalysis* [online]. 2014, **6**(17), 2189-2191 [cit. 2019-10-23]. DOI: 10.4155/bio.14.165. ISSN 1757-6180. Dostupné z: <http://www.future-science.com/doi/10.4155/bio.14.165>
- [50] MADEJ, Katarzyna Anna. Analysis of meconium, nails and tears for determination of medicines and drugs of abuse. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2010, **29**(3), 246-259 [cit. 2019-10-23]. DOI: 10.1016/j.trac.2010.01.005. ISSN 01659936. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993610000129>

- [51] KIM, Jin Young, Jae Chul CHEONG, Jae Il LEE, Ju Hee SON a Moon Kyo IN. Rapid and Simple GC-MS Method for Determination of Psychotropic Phenylalkylamine Derivatives in Nails Using Micro-Pulverized Extraction\*. *Journal of Forensic Sciences* [online]. 2012, **57**(1), 228-233 [cit. 2020-03-12]. DOI: 10.1111/j.1556-4029.2011.01913.x. ISSN 00221198. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1556-4029.2011.01913.x>
- [52] JONES, Joseph, Mary JONES, Charles PLATE, Douglas LEWIS, Michael FENDRICH, Lisa BERGER a Daniel FUHRMANN. Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Assay to Detect Ethyl Glucuronide in Human Fingernail: Comparison to Hair and Gender Differences. *American Journal of Analytical Chemistry* [online]. 2012, **03**(01), 83-91 [cit. 2020-03-12]. DOI: 10.4236/ajac.2012.31012. ISSN 2156-8251. Dostupné z: <http://www.scirp.org/journal/doi.aspx?DOI=10.4236/ajac.2012.31012>
- [53] KINTZ, Pascal, Marion VILLAIN a Vincent CIRIMELE. Chemical Abuse in the Elderly: Evidence From Hair Analysis. *Therapeutic Drug Monitoring* [online]. 2008, **30**(2), 207-211 [cit. 2019-10-23]. DOI: 10.1097/FTD.0b013e31816bac44. ISSN 0163-4356. Dostupné z: <http://journals.lww.com/00007691-200804000-00012>
- [54] CAPPELLE, Delphine, Steven DE KEUKELEIRE, Hugo NEELS, Frederic BEEN, Mireille DE DONCKER, Geert DOM, Cleo Lina CRUNELLE, Adrian COVACI a Alexander VAN NUIJS. Keratinous matrices for the assessment of drugs of abuse consumption: A correlation study between hair and nails. *Drug Testing and Analysis* [online]. 2018, **10**(7), 1110-1118 [cit. 2019-11-07]. DOI: 10.1002/dta.2356. ISSN 19427603. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/dta.2356>
- [55] HANG, Chen, Xiang PING a Shen MIN. Long-term follow-up analysis of zolpidem in fingernails after a single oral dose. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2013, **405**(23), 7281-7289 [cit. 2020-03-12]. DOI: 10.1007/s00216-013-7188-3. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-013-7188-3>
- [56] CHEN, Hang, Ping XIANG, Qi-ran SUN a Min SHEN. Comparison of clozapine in nail and hair of psychiatric patients determined with LC-MS/MS. *Acta pharmaceutica Sinica* [online]. Shanghai, 2012, **47**(9), 1193-1199 [cit. 2020-03-12]. ISSN 0513-4870. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23227550/>
- [57] RATHOD, Ravsaheb, Suraj CHAUDHARI, Amod PATIL a Atul SHIRKHEDKAR. Ultra-high performance liquid chromatography-MS/MS (UHPLC-MS/MS) in practice: analysis of drugs and pharmaceutical formulations. *Future Journal of Pharmaceutical*

*Sciences* [online]. 2019, **5**(1) [cit. 2020-03-02]. DOI: 10.1186/s43094-019-0007-8. ISSN 2314-7253. Dostupné z: <https://fjps.springeropen.com/articles/10.1186/s43094-019-0007-8>

- [58] Keep Natural Nails Strong with These Nail Treatment Products - Nailpro. In: *NAILPRO* [online]. Los Angeles: Morin, 2018 [cit. 2020-03-05]. Dostupné z: <https://www.nailpro.com/wp-content/uploads/2018/08/strong-nails.jpg>
- [59] MADRY, Milena, Andrea STEUER, Cédric HYSEK, Matthias LIECHTI, Markus BAUMGARTNER a Thomas KRAEMER. Evaluation of drug incorporation into hair segments and nails by enantiomeric analysis following controlled single MDMA intakes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2016, **408**(2), 545-556 [cit. 2020-04-11]. DOI: 10.1007/s00216-015-9130-3. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-015-9130-3>