

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2021

Kristýna Štajnarová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Stanovení významných látek ve vlasech
Bakalářská práce

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

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

Jméno a příjmení: **Kristýna Štajnarová**
Osobní číslo: **C17129**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**
Téma práce: **Stanovení významných látek ve vlasech**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Provedte literární rešerši zabývající se složením a stavbou vlasů, dále se věnujte odběru a zpracování vzorků vlasů pro následnou analýzu biologicky aktivních a toxikologicky významných látek.

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

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Tomáš Bajer, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

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

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

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

V Pardubicích dne 28. února 2020

PROHLÁŠENÍ

Práci s názvem Stanovení významných látek ve vlasech jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne.....

Kristýna Štajnarová

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych tímto chtěla poděkovat Ing. Tomáši Bajerovi, Ph.D. za rady a odborné konzultace v průběhu zpracování této bakalářské práce. Dále bych poděkovala mému snoubenci, rodině a kamarádům za jejich podporu po celou dobu studia.

ANOTACE

Předmětem první části bakalářské práce jsou lidské vlasy, kdy je zmiňována jejich stavba a chemické složení. Druhá část se zabývá stanovením drog, prvků a hormonů v lidských vlasech za pomoci separačních a imunochemických metod.

KLÍČOVÁ SLOVA

analýza vlasů, forenzní analýza, vlasy, drogy, hormony, prvky

TITLE

Determination of important substances in hair

ANNOTATION

The first part of this bachelor thesis is focused on description and chemical composition of human hair. The second part describes the determination of drugs, elements and hormones in human hair using separation and immunochemical determination.

KEYWORDS

hair analysis, forensic analysis, human hair, drugs, hormones, elements

OBSAH

ÚVOD.....	14
1. LIDSKÝ VLAS	15
1.1 Fáze růstu	16
1.2 Stavba vlasu	16
1.3 Tvar vlasů.....	17
1.4 Pigmentace vlasů.....	18
1.5 Chemické složení vlasu.....	19
1.5.1 Bílkoviny	19
1.5.2 Lipidy.....	19
1.5.3 Stopové prvky	20
1.6 Vypadávání vlasů.....	20
1.6.1 Diagnostický postup	21
2. VLASY VE FORENZNÍ BIOLOGII	23
2.1 Forenzní věda	23
2.2 Předpoklady pro správné vyšetření	23
2.3 Mikroskopie vlasů.....	23
3. DROGY	24
3.1 Klasifikace drog a jejich vlastnosti	24
3.1.1 Kanabinoidy.....	25
3.1.2 Opiáty.....	27
3.1.3 Stimulanty.....	28
3.1.4 Halucinogeny	30
3.2 Metody analýz.....	31
3.2.1 Příprava vzorku k analýze.....	31
3.2.2 Imunochemické metody.....	31
3.2.3 Chromatografické metody	32

3.3	Uplatnění v praxi.....	38
4.	CHEMICKÁ ANALÝZA PRVKŮ	42
4.1	Toxické prvky (Abiogenní prvky)	42
4.2	Stopové prvky (Mikroprvky)	44
4.3	Metody analýz.....	44
4.3.1	Spektrometrie.....	44
4.4	Uplatnění v praxi.....	46
5.	HORMONY	49
5.1	Kortizol	49
5.2	Testosteron	49
5.3	Metody stanovení	50
5.4	Aplikace	50
	ZÁVĚR	52
6.	BIBLIOGRAFIE.....	53

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1 - Lidský vlas pod mikroskopem [2]	15
Obrázek 2 - Stavba lidského vlasu [3]	17
Obrázek 3 - Druhy vlasů [4]	18
Obrázek 4 - Androgenetická alopecie [10]	20
Obrázek 5 - Alopecia areata [10]	21
Obrázek 6 - Strukturní vzorec THC	26
Obrázek 7 - Strukturní vzorec CBD	26
Obrázek 8 - Strukturní vzorec CBN	27
Obrázek 9 - Strukturní vzorec CBC	27
Obrázek 10 - Strukturní vzorec morfinu	28
Obrázek 11 - Strukturní vzorec extáze	28
Obrázek 12 - strukturní vzorec metamfetaminu	29
Obrázek 13 - Strukturní vzorec kokainu	30
Obrázek 14 - Strukturní vzorec LSD	30
Obrázek 15 - Jednotlivé typy ELISA	32
Obrázek 16 - Plynový chromatograf	33
Obrázek 17 - Schéma HPLC [69]	36
Obrázek 18 - Schéma atomového absorpčního spektrometru	45
Obrázek 19 - Strukturní vzorec Kortizolu	49
Obrázek 20 - Strukturní vzorec Testosteronu	50
Tabulka 1 - Informace o drogách [15]	25
Tabulka 2 - Přehled analýz drog	41
Tabulka 3 - Přehled analýz prvků ve vzorcích vlasů	48
Tabulka 4 - Přehled analýz hormonů	51

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

AAS	atomová absorpční spektrometrie
AES	atomová emisní spektrometrie
AFS	atomová fluorescenční spektrometrie
Ag	stříbro
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome
Al	hliník
As	arsen
Au	zlato
B	bor
Ca	vápník
CBC	kanabichromen
CBD	kanabidiol
CBN	kanabinol
CO-	aldehydická skupina
Cu	měď
DAD	detektor s diodovým polem
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
Fe	železo
FLU	fluorescenční detektor
GC	plynová chromatografie
Hg	rtuť
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie

I	jod
ICP/MS	indukčně vázaná plazmatická hmotnostní spektrometrie
IMS	spektrometrie iontové pohyblivosti
K	draslík
LLC	kapalinová chromatografie
LLE	extrakce z kapaliny do kapaliny
LSD	diethylamid kyseliny lysergové
MDA	3, 4 – methyendioxyamfetamin
MDEA	methyldiethanolamin
MDMA	3, 4 – methyendioxymethamfetamin (extáze)
METH	metamfetamin
Mg	hořčík
Mn	mangan
Mo	molybden
MS	hmotnostní spektrometrie
Na	sodík
NH-	aminoskupina
P	fosfor
Pb	olovo
PC	papírová chromatografie
Sb	antimon
Se	selen
SPE	extrakce tuhou fází
Sr	stroncium

THC	tetrahydrokanabinol
Ti	titan
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
V	vanad
W	wolfram
Zn	zinek

ÚVOD

Z lidských vlasů je možné získat mnoho informací, které jsou například ve forenzní chemii velmi významné při řešení kriminalistických případů. Mohou nám pomoci identifikovat pachatele nebo oběti. Forenzní analytici se nejčastěji zabývají skladbou DNA vlasu k rozlišení věku, pohlaví nebo rasového původu.

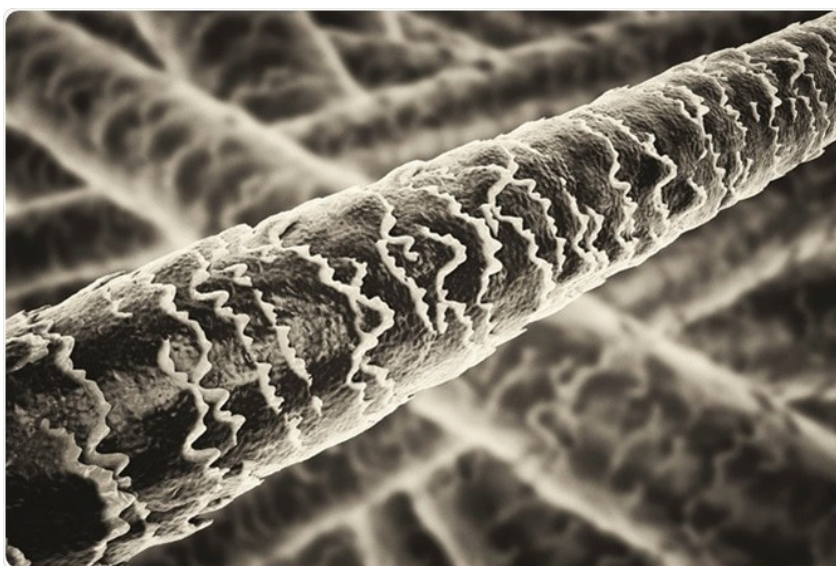
Analýza vlasů se také používá pro stanovení návykových látek-drog. V této práci byly popsány drogy, které jsou v dnešní době hojně zneužívány. Pro stanovení omamných látek ve vlasech lze využít různých metod od imunologických (ELISA) až po chemické (chromatografie plynová a kapalinová), přičemž jednotlivé metody předchází proces přípravy vzorku. Tím se rozumí extrakce tuhou fází nebo extrakce z kapaliny do kapaliny.

Ve vlasech je možné také stanovovat těžké neboli toxické kovy (kovové prvky) a mikroprvky. V závislosti na jejich množství mají toxické prvky účinek na správné fungování lidského organismu. Jsou-li hladiny těchto prvků nevhodné, může docházet k metabolickým poruchám. Mikroprvky mají pro náš organismus také důležitou roli, hlavně při enzymatických procesech. Množství těchto prvků lze zjistit pomocí spektrálních metod, mezi které patří například atomová absorpční a atomová fluorescenční spektrometrie, indukčně vázaná plazmatická hmotnostní spektrometrie a emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem.

Dalším důvodem chemické analýzy vlasů je hormonální nerovnováha steroidních hormonů. V závislosti na ní dochází k poškození vlasových kořínek a následnému vypadávání vlasů. Množství hormonů lze stanovit vhodným detektorem pro kapalinovou nebo plynovou chromatografii.

1. LIDSKÝ VLAS

Lidský vlas (obrázek 1) patří do rohových derivátů epidermis. Tyto deriváty pocházejí z buněk matrixu. Jedná se o keratinové útvary, které vyrůstají nepravidelně z vchlípenin epidermis, nazývaných jako vlasové folikuly. Vlasy začínají růst během nitroděložního vývoje, kdy začíná vyrůstat primární ochlupení. Celkem rozlišujeme tři druhy ochlupení, mezi které patří primární, sekundární a terciální. Primární ochlupení známé jako lanugo je složeno z jemných chloupků. Lanugo narůstá v době fetálního vývoje mezi 4. a 6. měsícem, maximálně je vyvinuta v 7. a 8. fetálním měsíci, kdy pokrývá skoro celé tělo. Před narozením se lanugo uvolňuje do plodové vody, kdy část odpadlého lanuga plod spolýká. Někdy se před narozením objevují silnější sekundární chloupky. Toto sekundární ochlupení se objevuje v postnatálním období, kdy se dělí na chloupky (pili) a vlasy (capilli). Pro chloupky platí, že jsou téměř na celém těle, kdežto vlasy pokrývají pouze hlavu. Řasy neboli cilia vyrůstají z okrajů očí víček a patří k ochranným prvkům oka. Obočí (supercillium) se vyskytuje nad horním okrajem očníce. Poloha a tvar obočí ovlivňuje výraz obličeje. V době puberty se začíná objevovat terciální ochlupení. Toto ochlupení je tvořeno silnějšími, delšími a tmavšími chlupy. Růst tohoto ochlupení souvisí s činností žláz s vnitřní sekrecí a závisí na přítomnosti testosteronu. Terciální ochlupení začíná na typických místech a poté na zbytku těla. U mužů se objevuje okolo 25. roku života nad bradavkami, na břicho a končetinách. U žen se objevuje méně než u mužů. Můžeme je nalézt v dolních části stehen a na bérkách. Mezi lokální terciální ochlupení se řadí chlupy v podpaží, chlupy v krajině stydké, vousy a chlupy v nose. [1]



Obrázek 1- Lidský vlas pod mikroskopem [2]

1.1 Fáze růstu

Každý vlas vzniká z jednoho folikulu, který neustále vlas vytváří. Vlasy nám vyrostou denně asi o 0,30 až 0,45 mm. Každý den nám může vypadat až 90 vlasů, u starších osob to může být více. Tvorba vlasů probíhá ve třech fázích: anagenní (růstová fáze), katagenní (přechodná fáze mezi růstem a vypadávání) a telogenní fáze (fáze vypadávání). Trvání těchto fází se liší podle typu a délky vlasu. [1; 2; 3]

- **Anagenní fáze:** Trvá asi 3 až 6 let, kdy se v této fázi nachází 80 až 90 % všech vlasů. Vlas roste jak do délky, tak i do šířky. Průměrná rychlost růstu je asi 1,25 cm za měsíc. [1; 2; 3]

- **Katagenní fáze:** Patří mezi přechodovou fází mezi růstem a vypadáváním. Trvá obvykle 2 až 4 týdny a je v ní méně než 1 % vlasů. V této fázi dochází k odstranění starého vlasu tak, aby byl vlasový folikul připraven na nový začátek růstového cyklu. [1; 2; 3]

- **Telogenní fáze:** Je to fáze vypadávání vlasů. Při telogenní fázi dochází k zániku folikulu, vlas je zkracován a vypuzován směrem k pokožce. Může nám vypadnout při mytí nebo česání. [1; 2; 3]

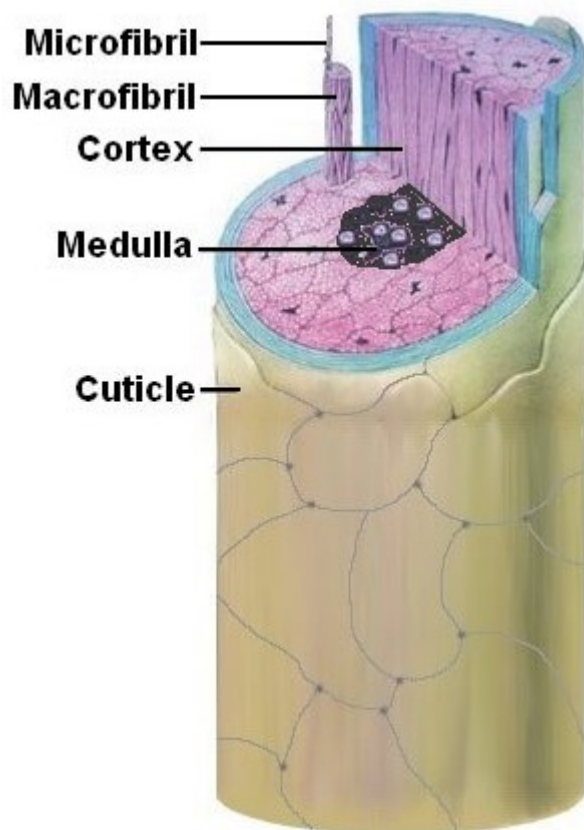
1.2 Stavba vlasu

Vlas se skládá z několika komponent, mezi které řadíme korovou vrstvu, kutikulu vlasu a dřev vlasu (obrázek 2)

- **Korová vrstva (substantia corticalis):** Je to vrstva, která je složena z hustých a silně keratinových buněk, které mají vřetenovitý tvar. Tyto buňky obsahují melanosomy, které jsou zodpovědné za barvu vlasů. Povrch korové vrstvy chrání kutikula. [1; 2]

- **Kutikula vlasu (cuticula pili):** Tvoří obal, chrání vlas před poškozením z vnějšku. Je to velmi pevná vrstva, která se skládá z buněk šupinového tvaru. Čím více můžeme rozeznat vrstev, tím je vlas delší. Vrstev může být až 8 a buňky v ní jsou tvořeny z keratinu. Tyto buňky jsou k sobě spojeny tmelem, který obsahuje aminokyseliny a lipidy. [1; 2]

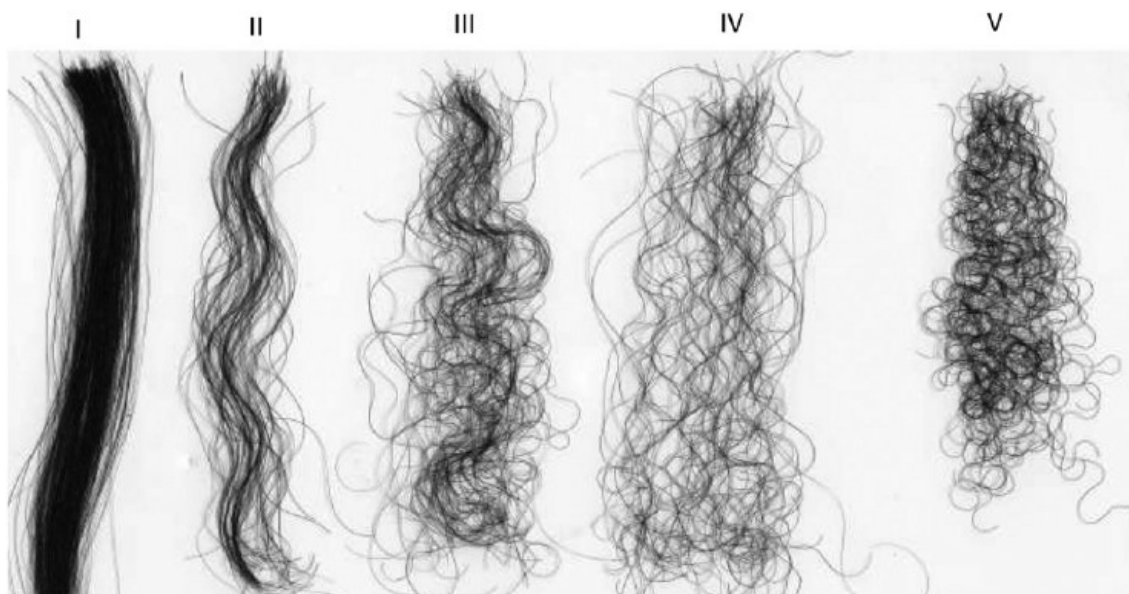
- **Dřev vlasu (medulla pili):** Je tvořena keratinovými buňkami s vysokým obsahem lipidů. Nachází se uprostřed vlasového stvolu. Hlavní funkce je vyživovací, ale ovlivňuje také lesk vlasů a obsahuje pigment. Medulla ve vlasu může a nemusí být přítomna. Velmi dobře je vyvinuta u vousů. [1; 2]



Obrázek 2 - Stavba lidského vlasu [3]

1.3 Tvar vlasů

Podle tvaru rozpoznáváme vlasy na rovné^I (capilli lissotrichi), vlnité^{II} (capilli kymotrichi) a kudrnaté^{III} (capilli ulotrichi) (obrázek 3). Capilli lissotrichi jsou na průřezu kulaté, vyrůstají z rovných vlasových pochev a mohou být dlouhé. Capilli kymotrichi mají průměr lehce oválný, stejně jako vlasy rovné vyrůstají z vlasových pochev a dorůstají do značné délky. Vlasy, které jsou na průřezu silně oválné až ledvinovité a vyrůstají ze zahnutých vlasových pochev, označujeme jako vlasy kudrnaté. V evropských zemích je většina lidí s rovnými a vlnitými vlasy, kdežto u černošské populace převládají vlasy kudrnaté. Mezi typy vlasů neevropské populace patří vlasy pepřovité^{IV} a spirálovité^V (obrázek 3). Vlasy pepřovité neboli fil-fil mají stejný tvar jako vlasy kudrnaté, ledvinovitý průřez a vyrůstají ze zahnutých vlasových pochev v trsech a chomáčcích. Ze zahnutých pochev vyrůstají také vlasy typu spirálovitých. Mají oválný průřez, ale místo dřeně mají dutinu. [1]



Obrázek 3 - Druhy vlasů [4]

1.4 Pigmentace vlasů

Odlišnost barvy lidských vlasů se objevuje v domorodých populacích mimo Evropu, severní Afriku, Střední východ a střední Asii. Zbarvení lidských vlasů závisí obzvláště na charakteru, množství a rozmístění pigmentu. Je to způsobeno množstvím a typem melaninu, který je vzniká v melanocytech. Melanocyty produkují černý (eumelanin – tvořený kulatými homogenními zrny) nebo žlutý (pheomelanin – světlejší forma melaninu) pigment. Spojením těchto pigmentů jsou vytvářena různá zbarvení. Zrna žlutého pigmentu mají elipsovitý tvar a jsou menší než zrna černého pigmentu. Červená barva vlasů je tvořena erytromelaninem, který zahrnuje železo. Mezi jednotlivci se tvar, velikost zrn a také jejich hustota a rozmístění liší. [5]

Pigmentaci vlasů můžeme měnit pomocí chemických nebo fyzikálních faktorů. Změna barvy může být způsobena systémovým onemocněním nebo některými farmaceutickými přípravky. Nejvíce se jedná o šedivění během vývoje syndromu získané imunitní nedostatečnosti (AIDS) nebo při kardiovaskulárních onemocněních. [5]

Spektrofotometricky nebo pohledem můžeme klasifikovat barvu vlasů ve srovnání s barevným vzorníkem. Jednou z často užívaných vzorkovnic je u nás Fischer-Sallerova, která obsahuje 30 vzorků umělých vlasů, 24 druhů od nejsvětlejších až po nejtmaší a 6 druhů zbarvení rutilních vlasů. [6]

Rutilismus neboli zrzavost je zapříčiněno omezenou syntézou tmavohnědého eumelaninu. Z 1 až 2 % je rutilismus ve středoevropské populaci [1]

1.5 Chemické složení vlasu

Lidský vlas obsahuje 65 až 95 % bílkovin, celková vlhkost může dosahovat až 32 %. Zbylé sloučeniny tvoří 1 až 9 %. Mezi tyto sloučeniny patří strukturní a volné lipidy, pigment a stopové prvky. [7]

1.5.1 Bílkoviny

Bílkoviny neboli proteiny jsou kondenzované polymery aminokyselin. Jejich poměr je závislý na vlhkosti vlasu. Hlavní složkou vlasu je keratin. Keratin (stavební bílkovina) je produkován keratinocyty, které se stále dělí, což způsobuje obnovu vlasů a jejich derivátů. Tato bílkovina je nerozpustná ve vodě a odolná vůči proteolytickým enzymům. Hlavní složka keratinu je aminokyselina cystein, která tvoří disulfidické můstky. Ty dodávají keratinu pevnost. Kromě disulfidických můstků obsahuje i peptidové vazby, CO- a NH- tvořící vodíkové můstky. [8]

Panenské vlasy označujeme jako ty, které nepodstoupily žádné chemické úpravy. Poskytují informace o přirozeném výskytu aminokyselin ve vlasech. V lidských vlasech bylo zjištěno 22 druhů aminokyselin (glycin, alanin, valin, leucin, lysin, cystein, cystin, isoleucin, fenylalanin, tyrosin, arginin, ornitin, histidin, citrulin, serin, methionin, prolin, tryptofan, threonin, kyselina cysteová, kyselina glutamová, kyselina asparagová). Obsahy aminokyselin se ve vlasech lidí liší. Nejvíce je geneticky ovlivněn obsah cystinu. U mužů bylo nalezeno více cystinu než u žen, ale s věkem nebyla nalezena žádná souvislost. [8]

1.5.2 Lipidy

Lipidy můžeme klasifikovat na povrchové nebo vnitřní, volné nebo vázané a dále podle chemické funkční skupiny nebo typu. Volné a vázané lipidy jsou lipidy komplexu buněčné membrány. Volné lipidy nejsou kovalentně vázané na vlasové bílkoviny, ale jsou uvnitř, na kutikule a na kůře. Jsou pokládány za důležité složky pro ochranu vlasových vláken. Vázané lipidy jsou vázané kovalentně na vlasový protein a není možné je odstranit extrakcí s rozpouštědly. Lipidy vnitřní a povrchové obsahují n3 – nenasycené mastné kyseliny. Vnitřní na rozdíl od povrchových vnikly do struktury vlasu z vnějšího prostředí nebo byly do struktury vlasu zabudovány během růstu. Z chemického hlediska je rozdělujeme do čtyř skupin. První je

skupina A, do které patří voskové estery, triglyceridy a mastné kyseliny. Jako další jsou skupiny B (cholesterol, ceramidy), C (uhlovodíky) a D (kyselina 18-methyl-eikosanová). [8]

1.5.3 Stopové prvky

Podíl stopových prvků ve vlasech je nepatrný (méně než 1 %). Je obtížné určit, zda je prvek z cizího zdroje nebo je součástí vláken. Stopové prvky jsou přítomny v lidských tkáních v koncentracích menších než 50 ppm. Mezi prvky, které se vyskytují ve vlasech patří Cu, Na, Zn, K, B, Sr, Al, Mg, Ca, Pb, Ti, W, Sb, I, P, Mn, Fe, Ag, Se, Mo, V, As, Au a Hg. Některé prvky mohou být esenciální nebo toxické. [8]

Skutečný původ těchto prvků je spojen s řadou zdrojů. Velká část stopových prvků může pocházet z potravy. Další zdroje mohou být voda, která je hlavně zdroj vápníku a hořčíku, strava, znečištěné ovzduší či metabolické odchylky organismu.

Barvené vlasy obsahují značné koncentrace kovů. Vlasové preparáty (např. barvy na vlasy) totiž obsahují zinek, selen, draslík, sodík, hořčík a olovo. [8; 9]

1.6 Vypadávání vlasů

Vypadávání vlasů dělíme do dvou forem. První forma neboli difúzní alopecie, je nejčastější formou vypadávání vlasů. Difúzní alopecii dělíme na androgenetickou, anagenní, akutní telogenní efluvium, chronickou difúzní a difúzní formu alopecia areata. [10]

Androgenetická alopecie (obrázek 4): Výpad vlasů nastane po přechodu vlasových folikulů do telogenní fáze. V další etapě se zkracuje anagenní fáze a vlasy, které vyrostou, jsou kratší a tenčí.



Obrázek 4 - Androgenetická alopecie [10]

Anagenní alopecie: U tohoto typu dochází k poškození anagenního folikulu. Vývoj je spojen s výrazným a rychlým výpadem. Může dojít až k totální alopecii.

Akutní telogenní effluvium: Důvod vypadávání je porucha regulačních mechanismů aktivity vlasového folikulu se zkrácením telogenní fáze a následným zvýšením telogenního výpadu.

Chronická difúzní alopecie: Charakteristický je pozvolný průběh a prořidnutí bez predilekce. Často nejasná příčina.

Difúzní forma alopecia areata: Je to vzácná forma vypadávání, která je známá náhlou ztrátou vlasů. Není patrná příčina. Druhou formou vypadávání je ložisková alopecie. Ložisková alopecie se skládá ze 4 forem.

Alopecia areata (obrázek 5): Etiologie neznámá, spíše genetická nebo autoimunitní mechanismy a emoční vlivy. Vlasový stvol se ztenčuje, zánět poškodí vlasový folikul a urychlí se telogenní fáze.



Obrázek 5 - Alopecia areata [10]

Trichotillomanie: Obvykle u dětí asi ve věku 11 až 15 let. Výrazný výpad vlasů, ložiska rychle zarůstají terminálními vlasy.

Jizvící alopecie: Primární je zánik folikulů a přítomnost jizvení. V typických příkladech se jedná o chronický a pomalý proces.

Syfilitická alopecie: Výpad vlasů je způsoben přímým toxickým poškozením vlasového folikulu, zánětlivou reakcí na treponemové antigeny. [10]

1.6.1 Diagnostický postup

- **Anamnéza:** Nejdříve se zaměřujeme na začátek a vývoj onemocnění. Dále zkoumáme subjektivní potíže, jako jsou svědění a pálení nebo bolest.
- **Klinické vyšetření:** Při klinickém vyšetření posuzujeme diagnózu jizvící alopecie. Diagnóze napomáhají známky zánětu, přítomnost jizev, atrofie, růst vlasů v trsech a další. Klasifikujeme i charakter jizvení.

- Dermatoskopické vyšetření: K vyšetření používáme ruční nebo digitální dermatoskop. Hodnotíme červené tečky.
- Fotodokumentace: Velmi výhodné je si onemocnění fotograficky dokumentovat.
- Trichogram a trakční test: Můžeme zjistit výpad anagenních vlasů.
- Histopatologické a imunofluorescenční vyšetření: Histopatologický nález stanoví charakter převažujícího infiltrátu. Podle dalších histologických znaků, klinických a dermatoskopických znaků. [11]

2. VLASY VE FORENZNÍ BIOLOGII

2.1 Forenzní věda

Ve forenzní vědě se využívá chemie, biologie a fyzika. Pro forenzní analýzu jsou vlasy jedním z nejdůležitějších zdrojů. Pomocí vlasů mohou vědci zjistit věk, pohlaví a rasový původ. Vlasy také slouží jako zdroj DNA pro analýzu. Protože lidem vypadá až sto vlasů denně, tak jsou vhodným důkazem kontaktu mezi obětí a pachatelem. Dávají informace, které například mohou pomoci k identifikaci podezřelé osoby nebo oběti. Významnou roli mají u průkazu násilných zločinů, u kterých je pravděpodobné, že došlo k fyzickému kontaktu. Například sexuální napadení nebo vražda. Jsou i zločiny, kde se nejedná o lidský kontakt. Mezi ně se řadí ozbrojená loupež, kdy se na řadě oděvů nebo jiných předmětů mohou naleznout vlasy. [2; 12]

2.2 Předpoklady pro správné vyšetření

Jako nejzásadnější je správná volba biologických vzorků k analýzám. Musí jich být dostatečné množství a velikost. Vzorky musí být správně označeny, odběr vzorku a použité roztoky musí být zapsány v protokolech. Nádoby pro vyšetření musí být čisté a inertní, aby nedocházelo ke kontaminaci. Jednotlivé vlasové vzorky jsou skladovány od doby odběru až po analýzu tak, aby nedošlo k rozkladu labilních analytů. [13]

2.3 Mikroskopie vlasů

Pomocí světelné mikroskopie se běžně provádí vyšetření lidských vlasů. Účelem mikroskopování je zjistit, zda se jeden nebo více jedinců mohlo dostat do vzájemného kontaktu nebo do kontaktu s objektem. Srovnávací mikroskop je složen ze dvou světelných mikroskopů spojených optickým můstkem, který umožňuje současné prohlížení neznámých vlasů a známých vlasů. Používá se zvětšení 40x až 400x. Vyšetření vlasů má mnoho různých kroků, z nichž prvním krokem je určit, jestli se jedná o člověka nebo zvíře. Pokud se jedná o zvíře, tak ho laborant může dále identifikovat. Jsou-li vlasy od člověka, může analýza rozlišit jednotlivce od skupiny. [13; 14]

3. DROGY

Stanovení drogových látek je velmi častým případem chemické analýzy vlasů, vydrží v nich totiž poměrně dlouhou dobu. Vlasové vzorky jsou vhodné pro testování drog nezávisle na způsobu podání, ať už orálně, nasálně, nitroděložně nebo inhalací.

3.1 Klasifikace drog a jejich vlastnosti

Obecně je zneužívaných látek celá řada, v této práci bude věnována pozornost hlavně drogovým látkám (tabulka 1), které mají spojitost s analýzou vlasů.

Vlasy jsou vystaveny různým vlivům z okolí, tudíž mohou vzniknout falešně pozitivní výsledky. Například, když vedle nás někdo kouří marihuanu, droga se může dostat na povrch vlasů a způsobit tak špatný výsledek analýzy. Aby k tomu nedošlo, je potřeba vlasy před analýzou dostatečně promýt.

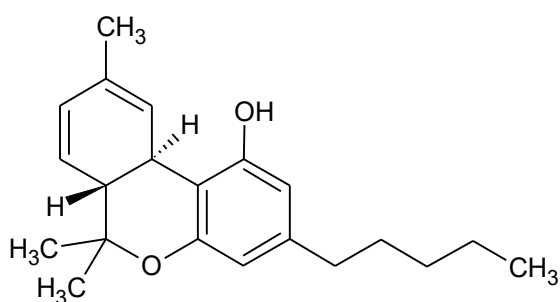
Tabulka 1 - Informace o drogách [15]

Skupiny drog	Druh drogy	Vzhled	Způsob užívání
Kanabinoidy	Marihuana	květové palice, sušené listy	ústně
Opiáty	Morfin	ampule, roztok	injekčně, kouřením, požitím
	Metamfetamin	bílý prášek, roztok	šňupání, injekčně
Stimulanty	Kokain	bílý prášek, tablety, hořká chuť, roztok	šňupání, injekčně, speciální je aplikace na genitálie při pohlavním styku
	Extáze	barevné tablety	ústně
Halucinogeny	LSD	ve formě papírků nasáklých čirou tekutinou, barevné tablety	ústně, injekčně jen výjimečně

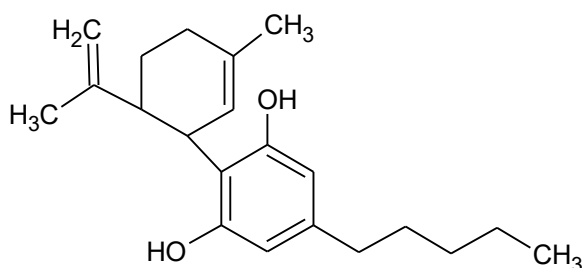
3.1.1 Kanabinoidy

K roku 2018 byly nejčastěji analyzované látky ve vlasech sloučeniny pocházející z konopí (například marihuana nebo hašiš). Tyto látky mají nízkou psychickou závislost a žádnou fyzickou závislost. Konopné drogy se kouří, anebo se užívají ústně. Jako zdroj je u nás nejvíce známé konopí seté (*Cannabis sativa*). V dnešní době je konopí rostlina i jako lék. Marihuana je usušený okvětní lístek z rostliny konopí. Platí, že čím více je květů, tím je vyšší potence marihuany. Naopak se vzrůstajícím podílem listů se potence snižuje. Neoplozené samičí květy obsahují největší množství kanabinoidů. Nízký obsah kanabinoidů mají spodní listy. Květy se

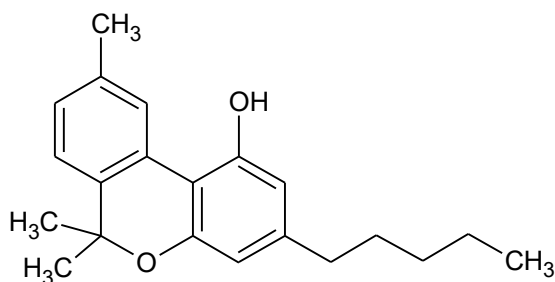
usuší, rozdrtí a zbaví se zbylých stonků a možných semínek. V téhle formě je drť připravena pro konzumaci anebo pro další úpravu. Kanabinoidy mohou způsobit halucinace, zvýraznění chuti k jídlu, zmatenost, záchvaty smíchu, sucho v ústech, zvýšení krevního tlaku a bušení srdce, dále euforické stavy, které jsou spojené s pocitem lehkomyšlnosti a radosti. Nevyzpytatelně mohou nastat stavy nepříjemné, mezi ně můžeme řadit závratě, halucinace nebo zvracení. Dlouhodobé používání poškozuje paměť a látky vznikající při kouření jsou karcinogenní. Nejznámější složkou konopí je THC (obrázek 6), jehož obsah v marihuaně je 2 až 8 %. Jeho obsah v cigaretě marihuany je 2 až 10 %. Běžně pod jednu cigaretu spadá až 30 mg THC. Další významné kanabinoidy jsou kanabidiol (CBD, obrázek 7), kanabinol (CBN, obrázek 8) a kanabichromen (CBC, obrázek 9). [13; 16]



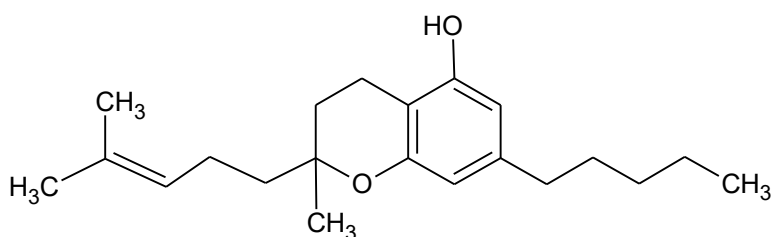
Obrázek 6 - Strukturní vzorec THC



Obrázek 7 - Strukturní vzorec CBD



Obrázek 8 - Strukturní vzorec CBN

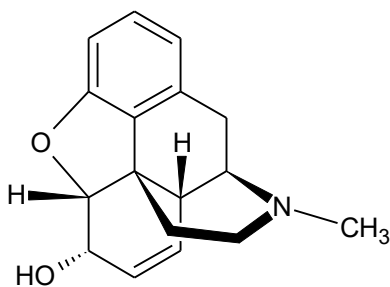


Obrázek 9 - Strukturní vzorec CBC

3.1.2 Opiáty

Morfin

Morfin (obrázek 10) je řazen do opioidní skupiny analgetik. Morfin je ve formě ampule a jeho psychická a fyzická závislost je velice vysoká. Způsob užití morfinu je buď požitím, kouřením nebo injekčně (nitrosvalově, podkožně, nitrožilně). Morfin je výchozí látkou pro výrobu heroinu a dalších drog. Je ve velkém rozsahu používán pro léčbu akutní a dlouhodobé silné nemoci. Volně můžeme morfin nalézt v máku a jako surovinu následně použít pro výrobu dalších opioidů jako jsou například kodein, ethylmorfin, hydromorfin a diamorfin (známý jako heroin). Morfin jako lék je dobře rozpustný ve vodě a v tucích se moc dobře nerozpouští. Jeho metabolismus u člověka probíhá nikoli jen v játrech ale také i v ledvinách a mozku. Metabolity morfinu se vylučují hlavně žlučí a močí. Díky jeho vysoké polaritě nejsou způsobilé projít hematoencefalickou bariérou. Mezi nežádoucí účinky můžeme řadit útlum dechového centra, ospalost a změny nálad. Způsobuje nauzeu a neplodnost u žen. [17]

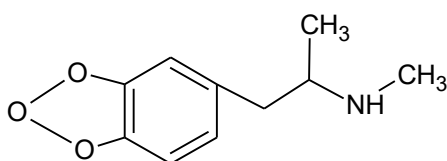


Obrázek 10 - Strukturní vzorec morfinu

3.1.3 Stimulanty

Extáze

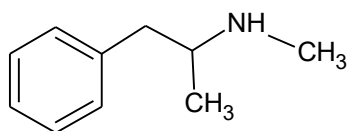
Syntetický a psychoaktivní derivát amfetaminu. Extáze neboli 3, 4- methylenedioxy methamphetamine (MDMA) je ve formě barevných tablet, jejich užití je ústní a způsobuje příjemné pocity, pocity štěstí, stavy relaxace. Způsobuje psychické, zdravotní a neurokognitivní problémy. MDMA (obrázek 11) nám může způsobit dlouhodobé poškození serotonergního systému. Centrální nervová soustava je hlavním místem účinku. Extáze vytlačuje serotonin, stimuluje jeho syntézu, inhibuje degradaci a snižuje zpětné vychytávání. Mezi nejvíce ohrožující potíže způsobené MDMA patří hypertermie a přehřátí organismu. Po hypertermii může dojít k úmrtí. Nežádoucí účinky jsou urychlení srdeční akce, vzestup krevního tlaku, selhání jater až smrt. Více častým případem je toxický zánět jater, někdy bez subjektivních příznaků. Při častějším užívání extáze dochází také k poškození imunitního systému. [18; 19]



Obrázek 11 - Strukturní vzorec extáze

Metamfetamin

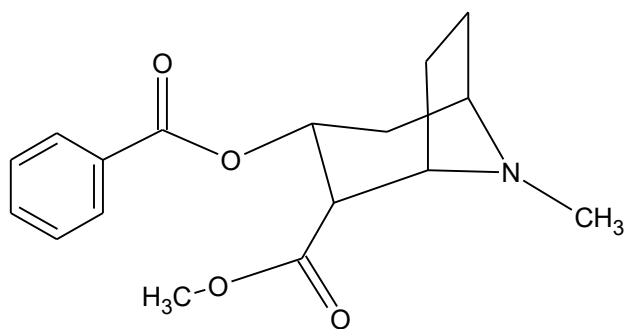
Metamfetamin (METH, obrázek 12) známý jako pervitin, patří do skupiny amfetaminového typu. Byl řazen do omamných látek, později do psychotropních. Ihned po užití drogy pocítujeme euforii, hypersexualitu, sníženou úzkost a zvýšenou energii. Účinky metamfetaminu mohou trvat až několik hodin. Zneužívání drogy může vést také k negativním důsledkům pro člověka, mezi které patří akutní toxicita, neurologické poškození, změněné behaviorální a kognitivní funkce. Jedinci, kteří užívají METH, mohou být agresivní a zažívat agitaci, tachykardii, hypertenzi a hypertermii. Při větším užití drogy, může způsobit závažnější poškození, a to život ohrožující hypertermii nad 41 °C, selhání ledvin a jater. Také srdeční arytmie a záchvaty až mrtvici. Chronické zneužívání přispívá k depresi, agresivitě, psychóze, poruchám nálad a sociální izolaci. [20; 21]



Obrázek 12 - strukturní vzorec metamfetaminu

Kokain

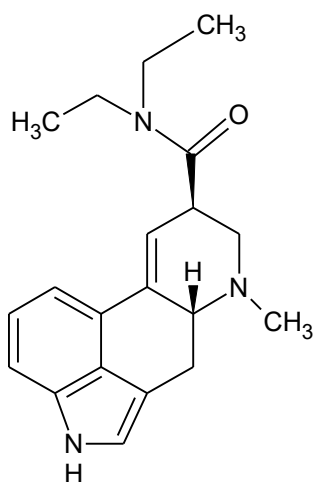
Droga kokain (obrázek 13) je vyrobená z listů rostliny koky z Jižní Ameriky. Jedná se o bílý prášek, tablety nebo roztok. Pro syntézu je výchozí látkou aminokyselina arginin. Ve formě Cocainum chloratum nebo hydrochloricum se využívá ve medicíně. Na místě podání závisí rychlost nástupu. Účinky kokainu jsou velmi krátké, asi po 30 minutách odezní. V moči kokain nalezneme asi jen 3 až 6 hodin po podání a metabolity kokainu lze zachytit do 3 dnů. Na mozek působí tak, že zvyšuje hladinu dopaminu. Dochází k hromadění velkého množství signálu mezi nervovými buňkami tím, že kokain brání recyklaci dopaminu. Tato droga se řadí mezi stimulanty a vyvolává vysokou psychickou závislost, při delším užívání se objevují stavy úzkosti, panické ataky a psychotické epizody. Dlouhodobé užívání kokainu poškozuje kardiovaskulární systém, zvyšuje se riziko mozkových a srdečních příhod. Při dlouhodobém šňupání dochází k poškození nosní sliznice, což může vést k jejímu odumření. Charakteristické bývají halucinace tělové, při nichž má člověk pocit, že po něm leze hmyz. Člověk závislý na kokainu, může mít pocit, že ho někdo sleduje a stát se tak agresivním pro své okolí. [18; 22]



Obrázek 13 - Strukturní vzorec kokainu

3.1.4 Halucinogeny

Diethylamid kyseliny lysergové, neboli LSD (obrázek 14) je polysyntetická sloučenina a patří do skupiny halucinogenů. Při nástupu účinků dochází k mírnému chvění a neschopnosti ovládat pohyby. Výjimečně dochází k nevolnostem a pocitům zvracení. Pseudohalucinace se vyskytují u nižších dávek. Při vyšších dávkách může docházet k intenzivnějším halucinatorních stavů. Tyto stavy nelze ovlivnit vůlí. Dále mohou být způsobeny poruchy myšlení a paměti. K opakovaným účinkům můžeme řadit pocity vzhledu do sama sebe a rozšířené vědomí. Říká se, že po LSD je sexuální prožitek mnohem intenzivnější. Užívání drogy způsobuje rozšířené zornice, ztráta orientace, úzkostí nebo radostí. Na LSD nevzniká závislost a má hodně nízkou toxicitu. Byla stanovena letální dávka 14 mg, což je o 800 až 1600krát větší než dávka pro užití. [18; 20; 23]



Obrázek 14 - Strukturní vzorec LSD

3.2 Metody analýz

Pro stanovení analytů ve vlasech lze použít různé metody, od imunochemických (např. ELISA), po chemické (plynová chromatografie, kapalinová chromatografie). Jednotlivým metodám předchází proces přípravy vzorku (různé metody extrakce).

3.2.1 Příprava vzorku k analýze

Vlasy k analýze se stříhají těsně u kůže v týlní části hlavy. Většinou se stříhají v délce 3 až 4 centimetry od kůže. Pokud jsou vlasy barvené, měly by se nechat odrůst po dobu tří měsíců. Jako dostatečné množství vlasů se bere asi 300 až 400 mg vzorku. [24]

3.2.1.1 Extrakce tuhou fází

Extrakce tuhou fází (SPE) je separační metoda, při které dochází k zachycení zkoumaných látek na povrchu pevného sorbentu (většinou silikagel a jeho modifikace). Požadované složky se ze sorbentu vymyjí pomocí rozpouštědel. SPE se používá pro odstranění rušivých složek matrice, k izolaci stopových látek, anebo pro změnu rozpouštědla vzorku. [25; 26]

3.2.1.2 Extrakce z kapaliny do kapaliny

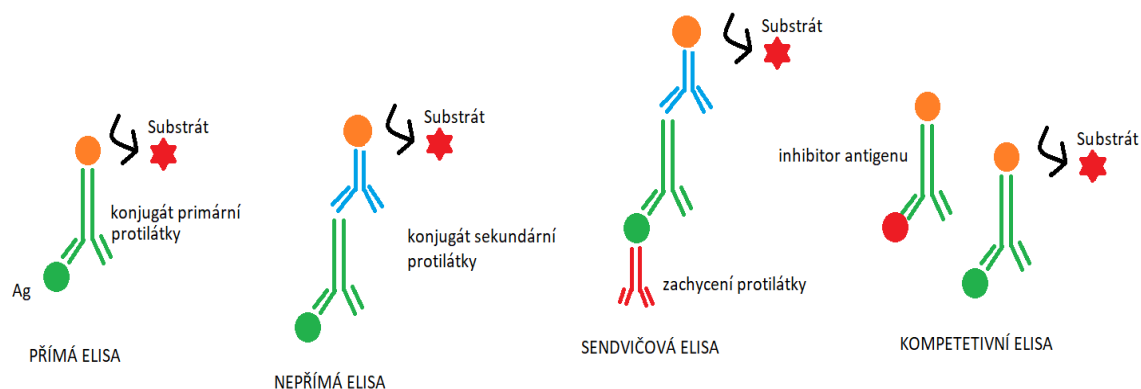
Extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE) je separační metoda, kdy se v soustavě ustanovuje fázová rovnováha. Tato soustava obsahuje dvě fáze. V první fázi je vodný roztok, ze kterého se složka převede do druhé fáze (organická). Druhou fází bývá nejčastěji rozpouštědlo, které se nemísí s vodou. Mezi nejpoužívanější patří benzen, chloroform, butanol, atd. Nejjednodušší způsob extrakce je vytřepání v dělicí nálevce. LLE se využívá hlavně pro netěkavé organické látky. [25; 26; 27]

3.2.2 Imunochemické metody

3.2.2.1 Imunoanalytická metoda ELISA

Imunoanalytická metoda ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) byla zpočátku navržena pro objevení kanabinoidů v krvi, séru a moči. Postupem času byla metoda upravena a validována pro analýzu v lidských vlasech. [28]

ELISA patří mezi heterogenní imunologické metody. Požívá se k detekci specifických protilátek a rozpustných antigenů. Má několik typů, protože struktura a vlastnosti látek, které mají být měřeny, nejsou stejné. Mezi typy ELISA řadíme přímou, nepřímou, sendvičovou a kompetitivní (obrázek 15). [29]



Obrázek 15 - Jednotlivé typy ELISA

Metoda přímá je nejvhodnější pro stanovení množství antigenů s vysokou molekulovou hmotností. Ke stanovení se používá mikrotitrační destička, kdy v ní dochází k reakci antigenu (imobilizován na pevném povrchu) s protilátkou (značená enzymem). Konjugovaná primární protilátka pak reaguje s příslušným substrátem za vzniku měřitelné barevné změny. V nepřímé metodě se k primární protilátce přidává protilátka sekundární, která je značená enzymem. V metodě sendvičové se používají dvě protilátky, které jsou specifické pro dva různé epitopy jednoho antigenu. Jedna protilátka je zachycená na pevném povrchu a zachycuje antigen. Přidá se protilátka značená enzymem, která detekuje tento antigen (mezi protilátkami). V kompetitivní metodě je antigen znehybňován na povrchu jamek. Zkoumaný vzorek se nejdříve smíchá s protilátkou a pak je vložen do jamky. Pak se vzorek vymyje a přidá se sekundární protilátka značená enzymem. [29]

3.2.3 Chromatografické metody

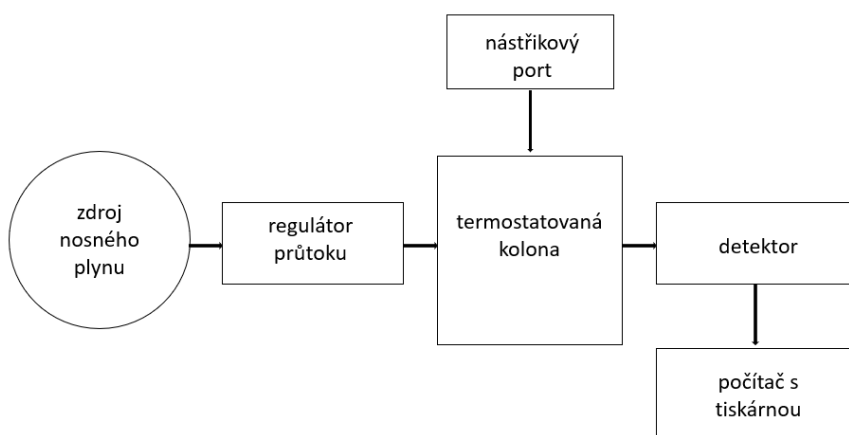
Obecně chromatografii řadíme do separačních metod. Při chromatografii se distribuují složky směsi mezi pohyblivou (mobilní) a nepohyblivou (stacionární) fází. Jako stacionární fází můžeme vzít pevnou látku nebo kapalinu, která je zakotvená na nosiči. Mobilní fáze může být kapalina nebo plyn. Složky směsi s větší afinitou ke stacionární fází se v proudu mobilní fáze zpožďují za pohyblivějšími složkami, které mají větší afinitu k fázi mobilní. Díky tomu dochází k jejich dělení. Chromatografické metody dělíme podle způsobu provedení na sloupcovou chromatografii a v plošném uspořádání. Dále podle skupenství, kam patří chromatografie plynová a kapalinová. Podle fyzikálně chemického principu dělíme chromatografii na rozdělovací, adsorpční, gelovou, iontově výměnnou a afinitní.

Chromatografii ve spojení s vhodným detektorem můžeme využít k identifikaci látek v dělené směsi nebo ke stanovení množství jednotlivých složek. [30]

3.2.3.1 Plynová chromatografie

Metoda plynové chromatografie (GC) se používá hlavně v analýze těkavých látek. Je to velmi citlivá a účinná metoda, která pracuje s malým množstvím vzorku. Principem je rozdělení složek mezi dvě fáze, (mobilní a stacionární). Od ostatních forem chromatografie se liší v tom, že mobilní fáze je plyn (dusík, helium, vodík). Stacionární fáze může být ve formě pevné fáze nebo jako vysokovroucí kapalina ukotvená na pevném nosiči. Jako pevnou stacionární fází můžeme použít aktivní uhlí, silikagel nebo oxid křemičitý apod. Jako kapalné stacionární fáze se používají polyestery, polysiloxany nebo polyethylenglykoly. [24, 25]

K analýze se využívá plynový chromatograf (obrázek 16), který se skládá z několika částí. Pomocí injekční stříkačky se vstříkne vzorek do nástřikové komory. Komora je vyhřívána a páry vzorku jsou pomocí nosného plynu odnášeny do kolony. V koloně, která je naplněna stacionární fází, neustále proudí nosný plyn (mobilní fáze). Uvnitř nastává separace směsi na složky. Jednotlivé složky vzorku vystupují z kolony postupně (v poměru svých sorpčních sil). Z kolony nejdříve vystupují složky, které se sorbují málo a mají nejkratší eluční čas. Pak vystoupí složky silně sorbované. Látky jsou unášeny až do detektoru, kde se eviduje signál. Tento signál je přímo úměrný změnám koncentrace v nosném plynu, který vystupuje z kolony. [25; 27]



Obrázek 16 - Plynový chromatograf

Chromatografické kolony jsou náplňové nebo kapilární. Náplňové mohou být trubice ze skla nebo nerezové oceli o průměru 3 až 8 mm a délce 1 až 5 m. Trubice jsou plněné adsorbentem (silikagel, oxid křemičitý), syntetickým makromolekulárním adsorbentem nebo

nosičem (pokrytý kapalnou stacionární fází, například nepolární a povrchové inaktivní křemičitany).

Kapilární kolony (délka v desítkách metrů) mají vnitřní povrch pokrytý tenkým filmem zakotvené stacionární fáze. Kolony jsou vytvořené například z taveného křemene. V současné době se v plynové chromatografii téměř výhradně používají kapilární kolony.

Aby byla separace úspěšná, musí kapalina stacionární fáze splňovat tyto parametry:

- dobré rozpouštědlo pro separované látky
- různá rozpustnost složek vzorku
- stálá teplota
- nízká těkavost
- s analyzovanou látkou nesmí reagovat

Úlohou detektoru je převést výsledky na registrovatelnou formu. Signál, který vyjde z detektoru je registrován zapisovačem a získáme tak chromatografický záznam. Tento záznam se nazývá chromatogram, je ve formě píků pro vyhodnocení analýzy. V plynové chromatografii využíváme několik druhů detektoru, např.:

- tepelně vodivostní detektor
- plamenový ionizační detektor
- detektor elektronového záchytu
- hmotnostní spektrometr

[25; 27; 31]

3.2.3.2 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie (LLC) je separační metoda, která využívá dělení látek mezi dvěma fázemi, z nichž jedna je mobilní (pohyblivá) a druhá stacionární (nepohyblivá). Jelikož se nemusí převádět vzorek na plyn, je LLC vhodná i pro separaci netěkavých a tepelně nestálých sloučenin. Oproti plynové chromatografii má velký vliv na rozdělení složek nejen jejich interakce se stacionární fází, ale i použitá mobilní fáze. Jako základ separace látek LLC lze považovat různou afinitu složek vzorku k mobilní a stacionární fází. Čím větší afinitu látka vykazuje k stacionární fází, tím více je chromatografickým systémem její pohyb zbrzděn.

Podle toho, jak je uspořádaná stacionární fáze, rozlišujeme vysokotlakou kapalinovou chromatografii (HPLC) a tenkovrstvou (TLC) či papírovou (PC) kapalinovou chromatografii.

V tenkovrstvé chromatografii (TLC) je mobilní fáze kapalina a stacionární je vrstva pevného sorbentu, který je nanesen na nepropustné podložce.

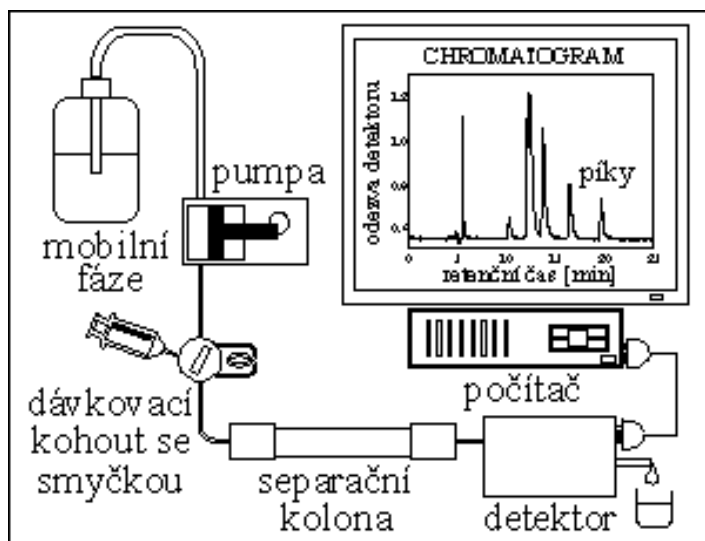
Chromatografie na tenké vrstvě používá obvyklé principy kapalinové adsorpční chromatografie. Je jiná pouze v uspořádání stacionární fáze do tenké vrstvy v tzv. chromatografické desce. Chromatografická deska je skleněná, hliníková nebo z plastu a je na ní navrstven sorbent. Jako sorbent se používá silikagel, oxid hlinitý, celuloza nebo polyamid. Mobilní fázi mohou být různé druhy rozpouštědel například butanol, methanol, ethanol, kyselina octová a další.

V chromatografii papírové (PC) je mobilní fáze opět kapalina a stacionární je filtrační papír vysoké čistoty a definované porozity. K PC se používá čistý celulózový papír. Mobilní fáze zaručuje rychlý průtok a dokonalou separaci. Nesmí obsahovat nečistoty, které by mohly nějak detekci ohrozit. [32; 33; 34]

3.2.3.3 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) je souhrn metod odlišných mechanismů se společným použitím kapalné mobilní fáze, vysokotlaké techniky a účinných kolon. HPLC můžeme rozdělit na systém kapalina – tuhá látka a kapalina – kapalina.

Při prostupu vzorku kolonou se vytvářejí rovnovážné stavy na základě různých interakcí mezi vzorkem a mobilní fází, vzorkem a stacionární fází a také mezi mobilní a stacionární fází. Mezi interakce řadíme hydrofobní, elektrostatické, interakce dipól-dipól, vodíkové vazby a další. V HPLC se používá kapalinový chromatograf, který je tvořen zásobníky s mobilní fází, vysokotlakým čerpadlem, dávkovačem, kolonou a detektorem (obrázek 17).



Obrázek 17 - Schéma HPLC [69]

Toto čerpadlo musí udržovat stálý bezpulzní tok mobilní fáze o malé rychlosti (0,1 – 10 ml/min.) za vysokého tlaku (až 40 MPa). Kolony jsou ocelové nebo skleněné trubice naplněné stacionární fází. Nejčastěji jsou vytvořené z borosilikátového tvrzeného skla. Délka kolon se pohybuje mezi 5 až 50 cm s vnitřním průměrem o 2 až 4 mm.

Detektory by měly mít vysokou citlivost, reprodukovatelnost a linearitu odezvy. Odezvy by měly být nezávislé na změně složení mobilní fáze při gradientové eluci. Mezi nejvíce užívané detektory patří spektrofotometrické, fluorimetrické, refraktometrické, hmotnostní a elektrochemické. [25; 27]

3.2.3.4 Hmotnostní spektrometrie

Cílem spojení chromatografie s hmotnostními spektrometry je identifikace sloučenin a stanovení jejich koncentrací během jedné analýzy. [35]

Princip hmotnostní spektrometrie (MS) je založený na interakci nabitých částic s elektrickým nebo magnetickým polem ve vakuu. Všechny druhy hmotnostních spektrometrů se skládají ze tří základních částí, mezi které patří iontový zdroj, analyzátor a detektor částic.

Iontové zdroje můžeme dělit do dvou skupin na tzv. tvrdé a měkké. V iontovém zdroji jsou z jednotlivých separovaných složek vzorku produkovány ionty, které jsou dále vedeny do hmotnostního analyzátoru.

V hmotnostním analyzátoru dochází za vakua k separaci iontů v poměru hmotnosti ku náboji (m/z). Všechny analyzátory využívají statické, dynamické elektrické nebo magnetické pole. Můžeme je řadit do několika skupin, kdy první skupina zahrnuje skenující analyzátory a typickým příkladem je kvadrupólový analyzátor. Druhá skupina má analyzátory s transmisí všech iontů současně do letové trubice, kde dojde k separaci. Další analyzátory zachycují ionty v cele, v pasti nebo v elektrostatické iontové pasti.

Detektor zaznamenává ionty, které byly vybrány analyzátozem. Vzniklý signál je převeden do digitálního formátu. Podle schopnosti záznamu iontů lze dělit detektory do skupin. Do první skupiny jsou ionty zaznamenávány bez ohledu na velikost m/z . Jsou založené na přímém měření elektrického proudu, který vznikl při srážce iontu s dynodou. Tento elektrický proud je zesilován násobiči, kdy se obvykle používají elektronové nebo kontinuálně dynodové elektronové násobiče. V další skupině jsou detektory, které zaznamenávají ionty i ve vztahu k velikosti m/z . [36]

3.3 Uplatnění v praxi

Kanabinoidy

Shah a kol. [37] vypsali přehled bioanalytických metod pro vyhodnocení kanabinoidů v lidských vlasech. Samotná analýza drog ve vlasech je brána jako doplnění k analýzám slin, krevních testů a rozboru moči. Zaměřili se na metodu ELISA, GC-MS a HPLC-MS/MS.

Vlasy vzorků byly dekontaminovány a pak následovalo rozmělnění trávením. Nejdříve byly použity extrakční metody, jako je kapalina-kapalina nebo extrakce v pevné fázi. Nakonec byl vzorek koncentrován a kvantifikován pomocí analytických metod.

Nejdříve použili metodu ELISA. Tato metoda je velice důležitá a často používaná v kombinaci s GC-MS. ELISA se používá jako předběžný test pro screening THC, je to snadný způsob, jak rychle stanovit pozitivní výsledky.

Metoda GC-MS je standartní technika pro stanovení drog, zejména THC a jeho metabolitů ve vlasech. Má však určité nevýhody. Vzorek před nadávkováním na kolonu musí projít derivatizací s cílem zvýšit těkavost stanovovaných látek. Tento krok je ale časově náročný a komplikuje tak celý proces.

HPLC-MS/MS je standartní pro separaci a detekci širokého spektra drog ve vlasových matricích. Tato metoda má vyšší použitelnost než GC-MS, protože nevyžaduje derivatizaci. [37]

Morfin

Studie **Khajuria a kol.** [38] se prováděla s cílem odhalit hladiny morfinu akumulovaného v lidských vlasech po určitou dobu. Vzorky vlasů byly odebírány od 40 uživatelů morfinu v různých časových intervalech. Byly odebrány v den přijetí osoby do střediska, pak po 45 dnech a nakonec po 90 -ti dnech po datu přijetí. Po každém odebrání vzorku, byly vlasy vyčištěny a štěpeny, následovala extrakce a jeho kvantifikace pomocí GC-MS.

Ve všech analyzovaných vzorcích byl prokázán morfin, a to i 90 dnů po požití. Průměrná koncentrace morfinu se pohybovala kolem 1,33 ng/mg a mez detekce byla 0,1 ng/mg. Podle výsledku usoudili, že pokud se morfin včlení do vlasu, zůstane tam po dobu tří měsíců.

Boojaria a kol. [39] stanovovali morfin ve vlasech pomocí metody HPLC za použití detektoru s diodovým polem (DAD). V této studii byla syntetizována nová magnetická

nanočástice modifikovaná silanovým povrchem a použita jako nový adsorbent při extrakci tuhou fází.

Ve srovnání s adsorbenty SPE mají silanem modifikované magnetické nanočástice vyšší povrchové plochy, dobrou citlivost a velkou adsorpční plochu. Výsledky studie ukázaly, že metoda je vhodná pro rychlou extrakci a stanovení morfinu ve vlasech.

Extáze

Eunyoung a kol. [40] studovali prevalenci a věkovou distribuci MDMA a 3,4 methylenedioxyamfetaminu (MDA) ve vzorcích vlasů pomocí GC-MS. Vzorky vlasů byly odebrány od 791 osob ve věku od 20 až 62 let, podezřelých z užívání návykových drog.

Studie ukázala, že zneužívání MDMA a MDA bylo hlavně mezi mladými osobami (hlavně muži). Vlasovou analýzu srovnávali s analýzou moči. Zjistili, že relativní procenta z pozitivního testování vlasovou analýzou byly vyšší než ty, které byly pozitivně testovány pomocí moči.

Keller a kol. [41] vyvinuli metodu, která je založená na spektrometrii iontové mobility pro rychlé vyšetření MDMA a MDEA (3,4 methylenedioxy-N-ethylamfetamin). Výsledky metody pak potvrdili analýzou GC-MS. Autoři dokázali vytvořit metodu rychlou, jednoduchou a citlivou pro detekci drog v lidských vlasech. Výhodou IMS je velmi krátká doba analýzy (5 až 8 sekund), detekční limity jsou v rozsahu nanogramů až pikogramů. Pomocí IMS můžeme analyzovat pevné a práškové vzorky v roztoku.

Metamfetamin

Shu a kol. [42] popisovali novou metodu HPLC-MS/MS pro stanovení enantiomerního složení metamfetaminu. Pro stanovení účinnosti byly výsledky porovnány metodou GC-MS. Vzorky vlasu byly promyty, práškovány, inkubovány a podrobeny extrakci tuhou fází. Extrakty byly derivatizovány a výsledná směs byla analyzována pomocí HPLC-MS/MS. Po vyhodnocení bylo zjištěno, že tato metoda je velmi přesná a umožňuje stanovení enantiomerní kompozice metamfetaminu bez nutnosti kvantifikace každého enantiomeru. Je vhodná pro další zkoumání dříve stanovených případů pozitivních na metamfetamin a představuje výborný nástroj pro vyhodnocení dlouhodobé expozice drog.

Kokain

Studie **Felliho a kol.** [43] se zabývala tím, jak dlouho zůstane kokain ve vlasech po skončení užívání. Upravené vzorky vlasů byly podrobeny extrakci z kapaliny do kapaliny a extrakt byl analyzován pomocí CG-MS.

Výsledky analýzy ukazují, že koncentrace kokainu se po dobu třech měsíců výrazně snížila. Bylo zjištěno, že kokain klesá na 32% původní úrovně asi po třech měsících od přerušování užívání. Další několik měsíců trvá, než droga zcela vymizí.

Cílem studie **Mercolini a kol.** [44] byl vývoj metody HPLC spojené s fluorescenční detekcí pro stanovení kokainu ve vlasech. Kokain je fluorescenční, metoda HPLC-FLU nemá nákladné instrumentace, je jednoduchá a citlivá. Metoda je citlivější než například HPLC s MS, DAD, GC-MS. Dokáže stanovit nižší množství kokainu ve vlasech, než je úřední omezení (0,5 ng/mg).

LSD

Ve studii od **Jank a kol.** [45] byla stanovena a validována citlivá metoda pro stanovení LSD a jeho metabolitu 2-oxo-3-hydroxy-LSD. Vzorky byly analyzovány pomocí metody HPLC-MS/MS.

Výsledky ukazovaly, že metoda má dobrou selektivitu a citlivost pro obě látky. Kromě toho tato metoda byla použita pro autentické vzorky z právních případů. Lze je tedy použít pro rutinní analýzu pro zdokumentování LSD v klinické a forenzní toxikologii.

Tabulka 2 - Přehled analýz drog

Skupiny drog	Drogy	Úprava vzorku před analýzou	Zdroj
Kanabinoidy	THC	omyty metanolem, acetonem-rozdrcení- extrakce SPE -detekce ELISA	[46]
		promytí metylenchloridem-přidání deionizované vody, zahřátí, odstředění- extrakce LLE -odpaření-detekce GC-MS	[47]
		extrakce SPE -zahřátí, ochlazení- extrakce LLE -odstředění-detekce HPLC-MS/MS	[48]
Opiáty	Morfin	promyty v metanolu, fosfátovém pufru-sonifikace- extrakce SPE -detekce GC-MS	[38]
		vzorky vlasů byly promyty dichlormetanem, acetonem a metanolem- extrakce SPE -detekce HPLC-DAD	[39]
Stimulanty	Extáze	promyty destilovanou vodou a metanolem-inkubovány v metanolu obsahující 1 % HCl- extrakce SPE -detekce GC-MS	[40]
		promyty dodecylsulfátem sodným, pak destilovanou vodou a metanolem-ultrasonifikace, vysušení, rozdrcení vzorku- extrakce SPE -rozklad v roztoku NaOH pomocí ultrazvuku-detekce ISM	[41]
		Promyty acetonem-rozmělnění-inkubace s HCl-odstředění- extrakce SPE -detekce GC-MS, HPLC-MS	[42]
Stimulanty	Kokain	promyty metanolem-hydrolyza vlasů pomocí HCl-po zahřátí roztok upraven za použití KOH- extrakce LLE -detekce GC-MS	[43]
		promyty metanolem-odstředěno, odfiltrováno-ostříhány na 1 mm-inkubace s HCl-byl přidán fosfátový pufr a KOH-vortexováno, odstředěno- extrakce SPE -detekce HPLC-FLU	[44]
Halucinogeny	LSD	promyty metanolem, destilovanou vodou a opět metanolem-vzorek nastříhán + metanol- extrakce LLE -detekce HPLC-MS/MS	[45]

4. CHEMICKÁ ANALÝZA PRVKŮ

Těžké (toxické = abiogenní) kovy jsou kovové prvky, které mají poměrně vysokou hustotu ve srovnání s vodou. Mají vysoké atomové číslo a vysoké atomové hmotnosti. V posledních letech velice vzrostl ekologický a celosvětový problém v oblasti veřejného zdraví spojené s kontaminací životního prostředí těžkými kovy. Tyto kovy mohou pronikat do našeho organismu a hromadit se v něm. Mezi zdroje těžkých kovů můžeme řadit geogenní, průmyslové, zemědělské farmaceutické, domácí odpadní vody a atmosférické zdroje. Abiogenní prvky mají v závislosti na jejich množství účinek na správné fungování lidského organismu. Pokud máme v těle nadměrné množství těchto prvků, může dojít k metabolickým poruchám. Mezi toxické prvky řadíme například arsen, rtuť, kadmium a olovo. [49]

Mikroprvky, mezi které řadíme například zinek a měď, jsou pro organismus také velmi důležité, ale opět v menším množství. Mají mnoho důležitých funkcí a jsou součástí různých enzymových procesů, bez kterých bychom nemohli žít. Navíc některé prvky odevzdávají nebo přijímají elektrony v redoxních reakcích, kdy tyto reakce mají význam pro generování a využití metabolické energie. [50]

Rozdíl mezi těmito prvky je ten, že těžké kovy jsou často toxické při velmi nízkých koncentracích. [50]

4.1 Toxické prvky (Abiogenní prvky)

Arsen

Tento polokov je ocelově šedý, křehký a krystalický. Řadí se mezi nejstarší anorganické jedy a existuje nejméně ve čtyřech modifikacích. Mezi nejznámější můžeme řadit arsen žlutý a šedý, jeho sloučeniny se někdy používají jako mořidla, insekticidní prostředky, slitiny a barvy. V běžném okolním prostředí se často setkáváme s nízkou hladinou expozicí arsenem, ve vyšších dávkách může arsen poškodit organismus. Arsen v našem těle způsobuje vyšší rizika rakoviny kůže, močového měchýře, plic a jater. Může ale také způsobit dermatologické změny na pokožce, ekzémy a alergie. [20; 51; 52]

Rtuť

Rtuť se vyskytuje v různých fyzikálních a chemických formách. Je to jediný kov, který je v tekuté formě za normálních podmínek. Je vysoce toxická a slouží jako součást do slitin. Rtuť a její sloučeniny, které tvoří s ostatními kovy, amalgámy, jsou používány především v průmyslové výrobě, elektrických a elektronických aplikacích. Inhalační otravy rtuť jsou velmi vysoké, absorbuje se asi 80 %. Průjmem, sliněním nebo kovovou pachutí v ústech se projevuje akutní inhalační otrava. Chronická způsobuje nechutenství, nefritidu a neurologické poruchy. V gastrointestinálním traktu se rtuť vstřebává zřídka (asi 0,01 %). Tudíž perorálně je téměř netoxická. Organické sloučeniny jsou možné lidské karcinogeny. [20; 53]

Olovo

Patří mezi těžké kovy s nízkou teplotou tání. Olovo a jeho sloučeniny jsou nebezpečné jedy a jejich otravy jsou známé od středověku. Prvek je spojován s negativním působením na nervovou soustavu, poruchami chování, které bylo prokázáno při malých dávkách především u dětí. V krvi se anorganické sloučeniny olova přenášejí na povrchu erytrocytů a ukládají se v játrech a ledvinách. Může poškodit i nervový systém, má vysoký toxický akutní a chronický vliv na životní prostředí. [20; 54]

Kadmium

Patří do skupiny těžkých kovů s nízkou teplotou tání a chemicky se podobá zinku. Vyskytuje se jako dvojmocný kationt a s organickými sloučeninami tvoří komplex. Pro buňky je kadmium toxické a významný je toxický účinek na myokard. Už asi 10 mg kadmia způsobuje zvracení, poruchy trávicího systému až poškození jater. Páry kovového kadmia způsobují inhalační otravu. Vysoká koncentrace kadmia v prachu nebo v párách kovů může přivodit těžké podráždění dýchacího ústrojí. Kadmium a jeho soli jsou nebezpečné, protože blokují sulfhydrylové skupiny enzymů a biologických makromolekul. Také inhibují sekreci inzulínu a vstupují do metabolismu cukrů. Některé sloučeniny kadmia mohou být karcinogeny. [20; 54]

4.2 Stopové prvky (Mikroprvky)

Měď

Měď je biogenní prvek a jeho koncentrace ve vlasech je u dětí (0 až 15 let) 2,7 až 152 mg/kg a u dospělých (nad 16 let) 3,6 až 177 mg/kg. Je důležitá pro celou řadu procesů v našem organismu. Lidské tělo má asi 80 až 100 mg mědi. Tlumí některé typy bolestí (artritida) a podporuje zdravý růst a tvorbu kostí. Podporuje krevní srážlivost, redukuje hladinu histaminu a tím zmenšuje alergické reakce. Při jejím nedostatku se projevuje anémie a u chronického nedostatku dochází k neurologickým poruchám a poruše plodnosti. Kojenci mají zpomalený růst a horší schopnost přijímat potravu. Nadbytek způsobí bolest žaludku, hlavy a svalů. [20; 55; 56]

Zinek

Zinek je mikrobiogenní prvek, který funguje jako aktivátor pro enzymy. Prostřednictvím enzymů reguluje biochemické procesy v těle (např. dělení buněk, vstřebávání makronutrientů). Jeho fyziologické množství ve vlasech u dětí do 15 let je 10,5 až 450 mg/kg a u dospělých nad 16 let je rozmezí od 20,1 až 313 mg/kg. Jako prvek, který podporuje růst je zastoupen ve svalech, kostech a játrech. Hladiny zinku je třeba udržovat při chřipkách, rýmě, nachlazení, viróz a různých epidemiích. Účinkuje jako antioxidant a působí preventivně proti rakovině. Vysoký nadbytek zinku ruší vstřebávání železa a mědi. Vyvolává nevolnosti, zvracení, bolesti v dutině břišní a horečku. Nedostatek zinku nám může způsobit zpomalený růst nebo kožní poruchy. [20; 55; 57]

4.3 Metody analýz

Ke stanovení prvků ve vlasech se využívají spektrální metody, jako jsou atomová absorpční spektrometrie, atomová fluorescenční spektrometrie, indukčně vázaná plazmatická hmotnostní spektrometrie a emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem.

4.3.1 Spektrometrie

Spektrometrie je obor, který se zabývá měřením a vyhodnocováním elektromagnetického záření, emitovaného hmotou nebo interagujícího s hmotou. Podstatou je sledování interakce elektromagnetického záření se zkoumanou látkou s cílem pozorovaných jevů pro důkaz látky, studium její struktury nebo stanovení její koncentrace. Interakce můžeme rozdělit do dvou hlavních skupin, kdy v první skupině jsou interakce, při kterých dochází k výměně energie mezi

zkoumanou látkou a zářením. Ve druhém případě látka ovlivňuje určitým způsobem vlastnosti procházejícího záření, aniž by došlo k výměně energie.

Základem pro rozdělení je, jestli dochází k absorpci nebo k emisi záření látkou nebo k dalšímu možnému jevu s absorpcí nebo emisí spojenému. A dalším kritériem je, zda dochází při absorpci nebo emisi záření ke změnám energie atomů nebo celých molekul.

V atomové spektrometrii se ve většině případů převádí vhodným způsobem zkoumaná sloučenina do plynného atomárního stavu a zaznamenáváme emitované nebo absorbované záření, které odpovídá změně energetického stavu vnějších elektronů v atomech látky. Další způsob je posuzování spektrometrických metod na základě oblasti vlnových délek zkoumaného emitovaného nebo absorbovaného záření. [58]

4.3.1.1 Atomová absorpční a fluorescenční spektrometrie

Atomová absorpční spektrometrie (AAS) patří mezi optické metody. Využívá měření absorpce elektromagnetického záření volnými atomy prvků. Atom je převeden do vyššího energetického stavu při absorpci elektromagnetického záření. Energie může být po absorpci opět vyzářena ve formě fotonu (atomová fluorescenční spektrometrie (AFS)). Metoda AFS je v praxi méně využívaná než AAS, protože je náročnější na vybavení.

Mezi hlavní části atomového absorpčního spektrometru patří zdroj záření, atomizátor, monochromátor, detektor (obrázek 18), zařízení pro záznam a vyhodnocení výsledků.



Obrázek 18- Schéma atomového absorpčního spektrometru

Principem spektrometru je, že ze zdroje záření vychází záření jednotlivých emisních čar prvku. Tyto čáry prochází absorpčním prostředím. V tomto prostředí (atomizátor) volné atomy prvku absorbují určité vlnové délky dopadajícího záření. Následuje monochromátor, který izoluje vybranou čáru (rezonanční) a ostatní čáry neprochází štěrbinou. V detektoru je detekováno zeslabení toku původního záření (výsledný záznam je většinou v jednotkách absorpance).

Spektrometr pro měření atomové fluorescence, by měl být podobný absorpčnímu spektrometru. V praxi ale nejsou běžné, přístroj musí mít výbornou světelnost optických částí

(monochromátory pro AAS nejsou běžné, nahrazují je filtry) a měření fluorescence se provádí kolmo na směr primárního paprsku. [59; 58]

4.3.1.2 Indukčně vázaná plazmatická hmotnostní spektrometrie

Indukčně vázaná plazmatická hmotnostní spektrometrie (ICP-MS) patří mezi výkonné techniky pro stopové multielementové a izotopové analýzy. Metoda ICP-MS je vysoce citlivá a je schopna stanovit složení izotopů. Má dobrou přesnost, dlouhý lineární dynamický rozsah, jednoduché a jednoznačné spektrum (protože hmotnostní spektra prvků jsou nezaměnitelná). Jako další vlastnost má nízké detekční limity a může provádět rychlou izotopovou analýzu. Ale má i řadu omezení, kdy je důležité dodržovat nízkou koncentraci rozpuštěných pevných látek.

Při ICP-MS je vzorek zmlženo, zavedeno do argonového plazmatu, kde je odpařeno rozpouštědlo. Molekuly se rozpadají, vznikají pozitivně nabitě ionty a vstupují do kvadrupólového hmotnostního analyzátoru. Ionty se v analyzátoru od sebe oddělí. Po průchodu analyzátoru se ionty dostanou do detektoru a ten vyšle výsledný signál.

ICP-MS se používá pro analýzu vody a potravin, geochemických, environmentálních a biologických vzorků. [60]

4.4 Uplatnění v praxi

Samanta a kol. [52] se ve své studii zaměřili na oblast v Indii postiženou arsenem. V důsledku zvýšené konzumace arsenu obsaženého v pitné vodě a v potravinách byl zvýšený vznik nemocí (rakovina kůže, močového měchýře, jater, atd..). Díky analýze arsenu ve vlasech a nehtech pomocí metody ICP-MS monitorovali znečištění prostředí arsenem. A kromě arsenu byly stanovovány i jiné prvky, například olovo, selen, rtuť, kadmium, mangan, zinek, železo, měď a nikl.

Vlasy a nehty jsou dobrými indikátory těchto prvků, kterým byli testovaní lidé vystaveni za posledních 2 až 18 měsíců. Studie prokázala, že přítomnost některých prvků ovlivňuje hladinu arsenu. Například nižší hladiny selenu a zinku zvyšují toxicitu arsenu.

Cizdziel a kol. [61] stanovovali rtuť v lidských vlasech a ve zvířecí srsti pomocí analytické metody AAS, vzorek se před analýzou nemusel nijak upravovat. Zjistili, že přesnost byla pod 5 % a celková doba analýzy vzorku byla pod 10 minut. Jejich studie prokázala, že AAS analyzátor, které jsou založené na spalování, jsou vhodné pro monitorování Hg v lidských

vlasech a v srsti od zvířat. AAS je cenově dostupná a přesná technika pro měření celkové koncentrace Hg ve vlasech a zvířecí srsti.

Zhou a kol. [62] ve své studii stanovovali arsen, kadmium a olovo ve vzorcích vlasů a ve vzorcích potravin pomocí metody AFS a ICP-MS. Celkem testovali 384 vzorků vlasů a 445 vzorků potravin z 11 měst v Číně. Koncentrace prvků v různých potravinách byly nižší než národní maximální povolené úrovně kontaminujících látek. Průměrné koncentrace prvků ve vlasech byly 0,23 (As), 0,062 (Cd) a 2,45 mg/kg (Pb). Výsledky studie ukazují, že vlasy mužů jsou náchylnější k expozici arsenu a ženy jsou více náchylné ke kadmiu. Ve věkové skupině 51 až 65 let byly koncentrace všech prvků vyšší než ve věku 13 až 50 let. Lidé z venkovských oblastí měli v průměru vyšší koncentrace všech stanovovaných prvků ve vlasech než lidé z městských oblastí.

Forte a kol. [63] posuzovali, zda vlasy mohou být spolehlivým ukazatelem různých změn. Pomocí ICP-AES stanovovali Cu, Zn a další prvky ve vlasových vzorcích od 81 pacientů, kteří trpěli Parkinsonovou chorobou. Výsledky studie ukázaly, že pacienti mají výrazný nedostatek železa, odchylky u mědi a zinku nebyly významné. Celkově studie ukázala, že vlasy jsou pouze částečným biomarkerem nerovnováhy ve studovaných kovech.

Tabulka 3 - Přehled analýz prvků ve vzorcích vlasů

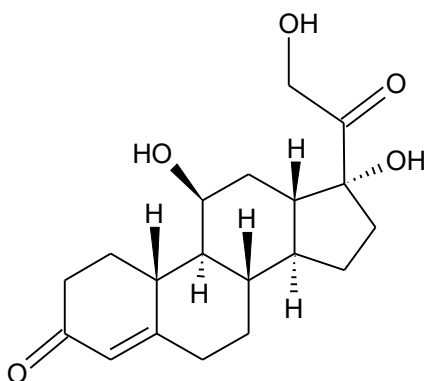
Skupiny	Prvek	Úprava vzorku před analýzou	Zdroj
Toxické prvky	Arsen	opláchnutí destilovanou vodou a acetonem-vysušení-přidání směsi HNO ₃ a H ₂ O ₂ -centrifugace-filtrace-detekce ICP-MS, AFS	[52; 64]
	Rtuť	omytí acetonem-detekce AAS	[61]
	Olovo	omytí destilovanou vodou a acetonem-vysušení-přidání směsi HNO ₃ a H ₂ O ₂ -centrifugace-filtrace detekce ICP-MS	[52; 64]
	Kadmium	promyty acetonem, deionizovanou vodou-vysušení-přidání směsi HNO ₃ a H ₂ O ₂ -odpaření-přidání deionizované vody-detekce ICP-MS	[62]
Stopové prvky	Měď	promytí ethyletherem + aceton-promytí EDTA pak vodou-vysušení-přidání směsi HNO ₃ a H ₂ O ₂ -mineralizace-detekce ICP-AES	[63]
	Zinek	promytí vzorku směsí ethylether + aceton-promytí EDTA pak vodou-vysušení vzorku-přidání směsi HNO ₃ a H ₂ O ₂ kvůli mineralizaci (rozkladu)-detekce ICP-AES, ICP-MS	[52; 63]

5. HORMONY

Vypadávání vlasů může způsobit mnoho faktorů, mezi které řadíme i například hormonální nerovnováhu. V mnoha analýzách bylo provedeno stanovení steroidních hormonů z důvodu výzkumu souvisejícího se stresem k získání retrospektivního indexu integrované dlouhodobé sekrece hormonů. Mezi steroidní hormony řadíme například kortizol a testosteron. [64]

5.1 Kortizol

Patří do skupiny glukokortikoidů, které patří do steroidních hormonů a je produkován kůrou nadledvin. Kortizol (Obrázek 19) se podílí nejvíce v metabolismu sacharidů a zvyšuje tvorbu zásobního sacharidu v játrech. Také snižuje vychytávání glukózy ve svalech a tukových tkáních. Kortizol má katabolické účinky na pojivo a na kosti. K dalším účinkům patří zvyšování počtu bílých krvinek, k tlumení imunitních a zánětlivých reakcí. Při nedostatku kortizolu se zvyšuje sekrece kortikotropinu a adrenokortikotropního hormonu, dochází k hypoglykémii. Naopak při nadbytku se sekrece těchto hormonů snižuje a může docházet k hyperglykémii. [64]

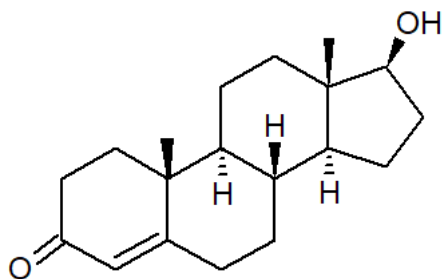


Obrázek 19- Strukturní vzorec Kortizolu

5.2 Testosteron

Je to steroidní hormon, který se řadí do skupiny androgenů. Hormon vzniká v Leydigových buňkách ve varlatech a v buňkách nadledvinek. Testosteron (obrázek 20) se projevuje v pubertě růstem penisu a šourku, ochlupení a vývojem svalů. Testosteron je zneužívám při sportovním doping. Sportovci využívají tento hormon pro růst hmotnosti svalů, což způsobuje mnoho rizik, jako jsou ruptura šlach, mentální změny a poškození jater. Dále slouží k vyvolání libida

a erekce, kdy na libido působí testosteron i u žen. U žen se v nevelké míře hormon tvoří v kůře nadledvin a ve vaječnicích. [64]



Obrázek 20 - Strukturní vzorec Testosteronu

5.3 Metody stanovení

Ke stanovení hormonů se využívají metody kapalinové a plynové chromatografie ve spojení s vhodným detektorem, v případě plynové chromatografie je ještě nutná derivatizace jednotlivých analytů vhodným organickým činidlem kvůli zvýšení těkavosti. Principy jednotlivých metod analýz jsou popsány v kapitole 3.2.

5.4 Aplikace

Kortizol

Cílem **studie Raul a kol.** [65] bylo vyvinout novou metodu pro stanovení kortizolu a kortizonu ve vlasech, a to s cílem odhalení dopingu sportovců v přípravném období. Metoda obsahovala extrakci, purifikaci, separaci a detekci glukokortikoidů. Purifikace byla prováděna pomocí SPE, na extrakci byl využit diethylether, separace a detekce pomocí HPLC-MS. Touto metodou vědci analyzovali 44 vzorků vlasů. Průměr koncentrace kortizolu ve vlasech byl 18 pg/mg. Výsledky nijak neovlivnily barvené vlasy, vliv pohlaví byl možný, ale nebyl prokázán.

Gao a kol. [66] měli za cíl vyvinout metodu založenou na HPLC s flourescenčním detektorem (FLU) pro identifikaci kortizolu ve vzorcích lidských vlasů a zaměřenou distribuci kortizolu každého 1 cm segmentu podél vlasové šlachy. Ve vzorcích se koncentrace kortizolu pohybovala od 3,28 až do 24,83 pg/mg. Znatelně klesl hormon o 1 cm segmentu podél vlasové šlachy (asi o 13 %). Studie ukázala, že kortizol v 1 cm segmentu vlasu vydrží až měsíc.

Testosteron

Deshmukh a kol. [67] měli za cíl vyvinout metodu, která je schopná detekovat testosteron a epitestosteron ve vzorcích lidských vlasů. Využili metodu LC-MS/MS. Pro analýzu bylo použito 75 vzorků vlasů, které byly odebrané od dobrovolníků ve věkovém rozmezí 18 až 55 let. Výsledné hladiny hormonů měly lineární korelaci a byly srovnatelné s fyziologickými hodnotami. Metoda je citlivá, specifická, rychlá a spolehlivá.

Cílem **Choi a kol.** [68] bylo rychle a citlivě stanovit testosteron ve vlasech pomocí metody GC-MS, kdy nejdříve byl vzorek derivatizován pomocí směsi činidel flophemesyl-TMS. Metoda měla dobrou opakovatelnost a reprodukovatelnost. Detekce čtyř steroidů (dihydrotestosteron, dehydroepiandrosteron, testosteron, pregnenolon) se pohybovaly v koncentračním rozmezí 0,12 až 8,45 ng/g. Koncentrace se lišily ve vlasových vzorcích žen a mužů. Ostatní hormony (progesteron, etiocholanolon, androsteron, androstendion) nebyly detekovány.

Tabulka 4 - Přehled analýz hormonů

Hormon	Úprava vzorku před analýzou	Zdroj
Kortizol	opláchnutí methylenchloridem-rozdrcení vzorku na prášek-inkubace v Soerensově roztoku- extrakce SPE -odstředění, opláchnutí acetondeionizovanou vodou, nakonec v hexanu-vysušení-odpaření-resuspendace pomocí NaOH- extrakce LLE -detekce HPLC-MS	[65]
	omytí methanolem-sušení v dusíku-rozmělnění, inkubace s HCl nebo NaOH-odstředění, extrakce LLE -vysušení- extrakce SPE -detekce HPLC-FLU	[66]
Testosteron	dekontaminace dichlormethanem-inkubace s NaOH-neutralizace pomocí HCl- extrakce LLE -detekce HPLC-MS/ MS	[67]
	alkalické štěpení, extrakce LLE -konverze na směsné deriváty-detekce GC-MS	[68]

ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce je zpracování rešerše, která se zabývá složením a stavbou vlasů, dále se věnuje odběru a zpracování vlasů pro následnou analýzu biologicky aktivních a toxicky významných látek.

Drogově návykové látky působí na naši centrální nervovou soustavu a tím způsobují vznik závislosti. Ovlivňují tak fungování našeho těla z fyzického, anebo psychického hlediska. Vlastní stanovení návykových látek je prováděno za pomoci imunochemických a instrumentálních metod. Pro identifikaci se používá proces přípravy vzorku s následnou analýzou, nejčastěji za použití kapalinové a plynové chromatografie.

Prvky jsou charakteristickou součástí živého a neživého světa. Můžeme je rozdělit do tří skupin, v první jsou prvky nezbytné pro život, dále prvky neutrální, bez kterých metabolismus může normálně fungovat. Nakonec prvky toxické, které nepříznivě ovlivňují organismus. Škodlivý účinek chemických prvků je ovlivněn mnoha faktory, přesto nejdůležitější jsou koncentrace prvku v těle a doba expozice. Velká schopnost těla je eliminovat škodlivé prvky, na nichž se podílí ledviny, játra a trávicí trakt.

Pomocí spektrálních metod můžeme stanovit množství těchto prvků ve vzorcích vlasů.

Hormony řídí činnosti různých orgánů a jsou součástí všech metabolických dějů. Nesou důležité informace, které nám vyvolají změny v celém organismu. Hormony můžeme detekovat z vlasů pomocí chromatografie za použití vhodné chromatografické metody.

6. BIBLIOGRAFIE

- [1] ČIHÁK, Radomír. *Anatomie 3*. Třetí, upravené a doplněné vydání. Praha: Grada, 2013. ISBN 978-80-247-5636-3.
- [2] *News Medical Life Sciences: Hair Analysis in Forensic Science* [online]. Menchester: AZONetwork UK Ltd., 2019 [cit. 2020-03-19].
- [3] TAYLOR, Paul. Bacis Hair Structure: Hair Follicle And Hair Shaft Function Explained. In: *Hair Growth SOS* [online]. [cit. 2020-03-23].
- [4] MCMULLEN, Roger I., Guojin ZHANG a Timothy GILLECE. Quantifying hair shape and hair damage induced during reshaping of hair. In: *Research gate* [online]. New York: Journal of cosmetic science, 2015 [cit. 2020-03-23].
- [5] JABLONSKI, NG a G CHAPLIN. The colours of humanity: the evolution of pigmentation in the human lineage. *Philosophical transactions of the Royal Society of London*. 2017, **372**
- [6] ARENBERGER, Petr a Helena MICHALÍKOVÁ. *Klinická trichologie: nemoci vlasů a nové trendy v jejich léčbě*. 2002. Praha: Maxdorf, 2002. ISBN 80-859-1287-2.
- [7] VÁVROVÁ, Jaroslava. *Vitaminy a stopové prvky 2007*. Pardubice: SEKK, 2007. ISBN 978-80-254-1171-1.
- [8] ROBBINS, Clarence R. Chemical and Physical Behavior of Human Hair. *Chemical Composition of Different Hair Types* [online]. , 105 [cit. 2020-02-21]. ISSN 978-3-642-25610-3.
- [9] SMART, K. E., a kol. Copper and calcium uptake in colored hair. *International Journal of Cosmetic Science* [online]. 2010, **32**(2), 161-162 [cit. 2020-02-28]. ISSN 01425463.
- [10] MICHALÍKOVÁ, H. *Diagnostika a léčba nadměrného vypadávání vlasů: Med. praxi*. 2006, **3**(1), 33-36.

- [11] ŘÍČAŘ, J. Česko-slovenská dermatologie. *Nejčastější primární jizvící alopecie*. 2012, (3), 83-91. ISSN 0009-0514.
- [12] CLARIDGE, Jack. Hair and Fibres in Forensics. *Explore forensics* [online]. 2016 [cit. 2020-03-19].
- [13] BALÍKOVÁ, Marie. *Forenzní a klinická toxikologie: laboratorní toxikologická vyšetření*. Praha: Galén, 2004. ISBN 80-726-2284-6.
- [14] DEEDRICK, Douglas W. Hairs, Fibres, Crime and Evidence. *Forensic Science Communications* [online]. 2000, 2(3) [cit. 2020-03-20]. ISSN 1528-8005.
- [15] Prev-Centrum. In: *Pre-Centrum* [online]. Praha: Pre-Centrum, 2017 [cit. 2020-03-23]. Dostupné z: <http://www.pre-centrum.cz>
- [16] MIOVSKÝ, Michal. *Konopí a konopné drogy: adiktologické kompendium*. 2011. Praha: Grada, 2008. ISBN 978-80-247-0865-2.
- [17] CHRISTRUP, L. L. Morphine metabolites. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* [online]. 1997, 41(1), 116-122 [cit. 2020-02-28]. ISSN 00015172.
- [18] KALINA, Kamil. *Drogy a drogové závislosti: mezioborový přístup*. Praha: Úřad vlády České republiky, 2003. Monografie (Úřad vlády České republiky). ISBN 80-867-3405-6.
- [19] MEAD, Jessica a Andrew PARROTT. Mephedrone and MDMA: A comparative review. *Brain Research* [online]. 2020, 1735 [cit. 2020-03-23]. ISSN 00068993.
- [20] PROKEŠ, Jaroslav. *Základy toxikologie: obecná toxikologie a ekotoxikologie*. Praha: Galén, 2005. ISBN 80-726-2301-X.
- [21] KRASNOVA, Irina N. a Jean Lud CADET. Methamphetamine toxicity and messengers of death. *Brain Research Reviews* [online]. 2009, 60(2), 379-407 [cit. 2020-03-03]. ISSN 01650173.
- [22] NIDA. Cocaine. *National Institute on Drug Abuse* [online]. 2018, , 1-5 [cit. 2020-03-22].

- [23] RÖHRICH, J., S. ZÖRNTLEIN a J. BECKER. Analysis of LSD in human body fluids and hair samples applying ImmunElute columns. *Forensic Science International* [online]. 2000, **107**(1-3), 181-190 [cit. 2020-03-26]. ISSN 03790738.
- [24] ORLÍK, Jaroslav. *Tajemství vlasů: jak na tom jsme?*. Havířov: Info Press, 2010. ISBN 80-903-7463-8.
- [25] JANČÁŘOVÁ, Irena a Luděk JANČÁŘ. *Analytická chemie*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2003. ISBN 80-715-7647-6.
- [26] PERTILE, Eva a Vladimír ČABLÍK. *Instrumentální metody analýzy*. Ostrava: VŠB - Technická univerzita Ostrava, 2006. ISBN 80-248-1049-2.
- [27] KARLÍČEK, Rolf. *Analytická chemie pro farmaceuty*. 4., nezměn. vyd. Praha: Karolinum, 2013. ISBN 978-80-246-2202-6.
- [28] HUESTIS, Marilyn A., Richard A. GUSTAFSON, Eric T. MOOLCHAN et al. Cannabinoid concentrations in hair from documented cannabis users. *Forensic Science International* [online]. 2007, **169**(2-3), 129-136 [cit. 2020-02-28]. ISSN 03790738.
- [29] AYDIN, Suleyman. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides* [online]. 2015, **72**, 4-15 [cit. 2020-04-30]. ISSN 01969781.
- [30] POOLE, CF a SK POOLE. *Chromatography Today*. 5. USA, 1991. ISBN 9780444884923.
- [31] BARTLE, Keith D. a Peter MYERS. History of gas chromatography. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2002, **21**(9-10), 547-557 [cit. 2020-02-28]. ISSN 01659936.
- [32] JANČÁŘOVÁ, Irena a Luděk JANČÁŘ. *Analytická chemie*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2003.
- [33] BRYDWELL, William Craig. *Modern Methods for Lipid Analysis by Liquid Chromatography*. New York: Taylor&Francis Group, 2005. ISBN 9781420014549.

- [34] Liquid Chromatography. *Chemistry LibreTexts* [online]. San Diego: MindTouch, 2020 [cit. 2020-12-11].
- [35] JOHNSEN, Lea G., Peter B. SKOU, Bekzod KHAKIMOV a Rasmus BRO. Gas chromatography – mass spectrometry data processing made easy. *Journal of Chromatography A* [online]. 2017, **1503**, 57-64 [cit. 2020-10-24]. ISSN 00219673.
- [36] FRIEDECKÝ, Bedřich a Karel LEMR. *Úvod do hmotnostní spektrometrie.: Klinická biochemie a metabolismus*. 2012, (203, 152-157. ISSN 1210-7921.
- [37] SAHAH, Iltaf, a kol. A review of bioanalytical techniques for evaluation of cannabis (Marijuana, weed, Hashish) in human hair. *BCM Chemistry* [online]. **13**(1), 106 [cit. 2020-05-01].
- [38] DUYDU, Yalcin. Determination of Morphine in Human Hair by GC/MS Method. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 1998, (23), 131-136 [cit. 2020-02-28].
- [39] BOOJARIA, Ali, Mahboubeh MASROURNIA, Hamideh GHORBANI, Abdolho. Silane modified magnetic nanoparticles as a novel adsorbent for determination of morphine at trace levels in human hair samples by high-performance liquid chromatography with diode array detection. *Forensic Science, Medicine, and Pathology* [online]. 2015, **11**(4), 497-503 [cit. 2020-05-01]. ISSN 1547-769X.
- [40] HAN, Eunyoung, a kol. The prevalence of MDMA/MDA in both hair and urine in drug users. *Forensic Science International* [online]. 2005, **152**(1), 73-77 [cit. 2020-03-22]. ISSN 03790738.
- [41] KELLER, Thomas, a kol. Detection of designer drugs in human hair by ion mobility spectrometry (IMS). *Forensic Science International* [online]. 1998, **94**(1-2), 55-63 [cit. 2020-05-05]. ISSN 03790738.
- [42] SHU, Irene, a kol. Determination of methamphetamine enantiomer composition in human hair by non-chiral liquid chromatography–tandem mass spectrometry method. *Journal of Chromatography B* [online]. 2016, **1028**, 145-152 [cit. 2020-03-03]. ISSN 15700232.

- [43] FELLI, M., S. MARTELLO, R. MARSILI a M. CHIAROTTI. Disappearance of cocaine from human hair after abstinence. *Forensic Science International* [online]. 2005, **154**(2-3), 96-98 [cit. 2020-03-22]. ISSN 03790738.
- [44] MERCOLINI, Laura, a kol. Quantitative analysis of cocaine in human hair by HPLC with fluorescence detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2008, **48**(2), 456-461 [cit. 2020-05-07]. ISSN 07317085.
- [45] JANG, Moonhee, Jihyun KIM, Inhoi HAN a Wonkyung YANG. Simultaneous determination of LSD and 2-oxo-3-hydroxy LSD in hair and urine by LC–MS/MS and its application to forensic cases. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2015, **115**, 138-143 [cit. 2020-05-08]. ISSN 07317085.
- [46] COULTER, Cynthia, James TUYAY, Margaux TARUC a Christine MOORE. Semi-quantitative analysis of drugs of abuse, including tetrahydrocannabinol in hair using aqueous extraction and immunoassay. *Forensic Science International* [online]. 2010, **196**(1-3), 70-73 [cit. 2020-11-08]. ISSN 03790738.
- [47] MOORE, C., S. RANA, C. COULTER, F. FEYERHERM a H. PREST. Application of Two-Dimensional Gas Chromatography with Electron Capture Chemical Ionization Mass Spectrometry to the Detection of 11-nor-9-Tetrahydrocannabinol-9-carboxylic Acid (THC-COOH) in Hair. *Journal of Analytical Toxicology* [online]. 2006, **30**(3), 171-177 [cit. 2020-11-08]. ISSN 0146-4760.
- [48] MÍGUEZ-FRAMIL, Martha, a kol. An improved method for the determination of Δ^9 -tetrahydrocannabinol, cannabinal and cannabidiol in hair by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Microchemical Journal* [online]. 2014, **117**, 7-17 [cit. 2020-11-08]. ISSN 0026265X.
- [49] Effect to Heavy Metals on the Human Body. *UKDiss.com* [online]. [cit. 2020-10-31].
- [50] FALAH, S. Al-Fartusie a N. Mohssan SAJA. Essential Trace Elements and Their Vital Roles in Human Body. *Indian Journal of Advances in Chemical Science* [online]. **5**(3), 127-136 [cit. 2020-10-31].

- [51] ADRIANO, Domy C. Arsenic. *Trace Elements in Terrestrial Environments* [online]. New York, NY: Springer New York, 2001, , 219-261 [cit. 2020-02-28]. ISBN 978-1-4684-9505-8.
- [52] SAMANTA, Gautam, Ramesh SHARMA, Tarit ROYCHOWDHURY a Dipankar CHAKRABORTI. Arsenic and other elements in hair, nails, and skin-scales of arsenic victims in West Bengal, India. *Science of The Total Environment* [online]. 2004, **326**(1-3), 33-47 [cit. 2020-02-26]. ISSN 00489697.
- [53] LINDQVIST, OLIVER a HENNING RODHE. Atmospheric mercury-a review. *Tellus B* [online]. 1985, **37**(3), 136-159 [cit. 2020-02-26]. ISSN 02806509.
- [54] KRIŠTOFOVÁ, Dana. *Kovy a životní prostředí: environmentálně nebezpečné složky elektrodpadu*. Ostrava: Vysoká škola báňská - Technická univerzita, 2005. ISBN 80-248-0740-8.
- [55] MANDŽUKOVÁ, Jarmila. *Léčivá síla vitaminů, minerálů a dalších látek: praktický domácí rádce*. Benešov: Start, 2005. ISBN 80-862-3136-4.
- [56] *Datový standard MZ ČR - verze 4: Webové služby pro distribuci číselníků datového standardu, DTD a schemat* [online]. [cit. 2020-12-06].
- [57] *Laboratorní příručka Laboratoře krevního centra s.r.o.* [online]. [cit. 2020-12-06].
- [58] NĚMCOVÁ, Irena, Petr RYCHLOVSKÝ a Ludmila ČERMÁKOVÁ. *Spektrometrické analytické metody*. 2. vyd. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0776-X.
- [59] SAHIN, Deniz. Atomic Spectroscopy. KHAN, Maaz, Gustavo MORARI DO NASCIMENTO a Marwa EL-AZAZY, ed. *Modern Spectroscopic Techniques and Applications* [online]. IntechOpen, 2020 [cit. 2020-05-17]. ISBN 978-1-78985-205-9.
- [60] SINGH, Ashok K. Experimental Methodologies for the Characterization of Nanoparticles. *Engineered Nanoparticles* [online]. Elsevier, 2016, , 125-170 [cit. 2020-05-12]. ISBN 9780128014066.

- [61] CIZDZIEL, J. Determination of total mercury in human hair and animal fur by combustion atomic absorption spectrometry. *Talanta* [online]. 2004, **64**(4), 918-921 [cit. 2020-05-12]. ISSN 00399140.
- [62] ZHOU, Tong, a kol. Concentrations of arsenic, cadmium and lead in human hair and typical foods in eleven Chinese cities. *Environmental Toxicology and Pharmacology* [online]. 2016, **48**, 150-156 [cit. 2020-05-12]. ISSN 13826689.
- [63] FORTE, Giovanni, a kol. Calcium, copper, iron, magnesium, silicon and zinc content of hair in Parkinson's disease. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* [online]. 2005, **19**(2-3), 195-201 [cit. 2020-05-13]. ISSN 0946672X.
- [64] SCHREIBER, Vratislav. *Hormony a lidská mysl*. Praha: Triton, 2004. ISBN 80-725-4433-0.
- [65] RAUL, Jean-Sébastien, Vincent CIRIMELE, Bertrand LUDES a Pascal KINTZ. Detection of physiological concentrations of cortisol and cortisone in human hair. *Clinical Biochemistry* [online]. 2004, **37**(12), 1105-1111 [cit. 2020-05-17]. ISSN 00099120.
- [66] GAO, Wei, . HPLC-FLU detection of cortisol distribution in human hair. *Clinical Biochemistry* [online]. 2010, **43**(7-8), 677-682 [cit. 2020-05-18]. ISSN 00099120.
- [67] DESHMUKH, Nawed I.K., James BARKER, Andrea PETROCZI a Declan P. NAUGHTON. Detection of testosterone and epitestosterone in human hair using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2012, **67-68**, 154-158 [cit. 2020-05-19]. ISSN 07317085.
- [68] CHOI, Man Ho a Bong Chul CHUNG. GC-MS determination of steroids related to androgen biosynthesis in human hair with pentafluorophenyldimethylsilyl–trimethylsilyl derivatisation. *The Analyst* [online]. **124**(9), 1297-1300 [cit. 2020-05-19]. ISSN 00032654.
- [69] COUFAL, PH.D., prof. RNDr. Pavel. *HPLC chromatografie* [online]. In: . Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy [cit. 2020-10-25].