



ДАРИНКА
ЃОРГИЕВА
АЦКОВА

Токсиколошки и клиничко-токсиколошки анализи: протоколи за лабораториска работа

Даринка Ѓоргиева Ацкова

**ТОКСИКОЛОШКИ И КЛИНИЧКО-ТОКСИКОЛОШКИ
АНАЛИЗИ: ПРОТОКОЛИ ЗА ЛАБОРАТОРИСКА
РАБОТА**

Штип, 2019

Даринка Ѓоргиева Ацкова
**ТОКСИКОЛОШКИ И КЛИНИЧКО-ТОКСИКОЛОШКИ АНАЛИЗИ:
ПРОТОКОЛИ ЗА ЛАБОРАТОРИСКА РАБОТА**

Автор:

Доц. д-р Даринка Ѓоргиева Ацкова

НАСЛОВ НА ПУБЛИКАЦИЈАТА

ТОКСИКОЛОШКИ И КЛИНИЧКО-ТОКСИКОЛОШКИ АНАЛИЗИ: ПРОТОКОЛИ ЗА
ЛАБОРАТОРИСКА РАБОТА

Рецензенти:

Доц. д-р Катарина Смилков
Доц. д-р Марија Дарковска-Серафимовска

Лектор:

Д-р Васка Ташова

Техничко уредување:

Даринка Ѓоргиева Ацкова

Издавач:

Универзитет „Гоце Делчев“ - Штип

Објавено во е-библиотека:

<https://e-lib.ugd.edu.mk>

CIP - Каталогизација во публикација
Национална и универзитетска библиотека "Св. Климент Охридски", Скопје

616-099-074(076.5)

ЃОРГИЕВА Ацкова, Даринка
Токсиколошки и клиничко-токсиколошки анализи [Електронски извор]
: протоколи за лабораториска работа / Даринка Ѓоргиева Ацкова. - Штип :
Универзитет "Гоце Делчев", Факултет за медицински науки, 2019

Начин на пристап (URL): <http://e-lib.ugd.edu.mk/844>. - Текст во PDF формат, содржи 60 стр., илустр. -
Наслов преземен од екранот. - Опис на изворот на ден 06.09.2019. - Библиографија: стр. 58-59

ISBN 978-608-244-651-6

а) Токсикологија - Лабораториски анализи - Практикуми COBISS.MK-ID 111016202

УНИВЕРЗИТЕТ „ГОЦЕ ДЕЛЧЕВ“ – ШТИП

ФАКУЛТЕТ ЗА МЕДИЦИНСКИ НАУКИ



Доц. д-р Даринка Ѓоргиева Ацкова

**ТОКСИКОЛОШКИ И КЛИНИЧКО-ТОКСИКОЛОШКИ
АНАЛИЗИ: ПРОТОКОЛИ ЗА ЛАБОРАТОРИСКА
РАБОТА**

Штип, 2019

ПРЕДГОВОР

Овој практикум претставува збир од протоколи и препораки за изведување на експериментална лабораториска работа по предметот Клиничко-токсиколошки анализи за студентите на Факултетот за медицински науки, стручни студии-медицински лаборант и дел од истоимениот предмет на студиска програма од интегрираните студии по фармација. Во еден свој дел претставува преработено, дополнето и адаптирано издание на практикумот „Токсиколошка хемија“ издаден во 2014 год., од истиот автор, при што во ова издание се внесени дополнувања, подобрувања и согледувања кои ќе им ја приближат, олеснат и направат разбирлива и интересна за работа клиничко-лабораториската анализа на студентите.

СОДРЖИНА

1. ВОВЕД.....	9
1.1. Практични аспекти на аналитичко-токсиколошките анализи.....	10
1.2. Клинички аспекти на аналитичко-токсиколошките анализи.....	12
1.3. Обезбедување квалитет на извршените токсиколошки анализи.....	19
1.4. Бележење и објавување резултати.....	20
2. КВАЛИТАТИВЕН СКРИНИНГ ИЛИ КВАНТИТАТИВНА АНАЛИЗА.....	22
2.1. Токсиколошки скрининг.....	23
3. БИОЛОШКИ МАТЕРИЈАЛИ КОИ СЕ КОРИСТАТ ВО КЛИНИЧКО-ТОКСИКОЛОШКИТЕ АНАЛИЗИ.....	29
4. ПРОТОКОЛИ ЗА ДЕТЕКЦИЈА И ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА ИЗБРАНИ ГРУПИ ОТРОВИ.....	33
4.1. Квалитативна анализа на избрани отрови со обоени тестови.....	33
5. КВАЛИТАТИВНА И КВАНТИТАТИВНА АНАЛИЗА НА ИЗБРАНИ ОТРОВИ СО СПЕКТРОФОТОМЕТРИСКИ МЕТОДИ.....	39
5.1. Спектрофотометриско определување на фенол со 4-аминоантипирин.....	39
5.2. Спектрофотометриско определување на ацетилсалицилна киселина.....	42
5.3. Спектрофотометриско определување на метали (Cu^{2+} , Ni^{2+}).....	46
5.4. Спектрофотометриско определување на нитрити во вода (метод на Griess).....	49
6. КВАЛИТАТИВНА НА ИЗБРАНИ ОТРОВИ СО ТЕНКОСЛОЈНА ХРОМАТОГРАФИЈА (TLC).....	52
6.1. TLC за идентификација на аналгетици.....	52
6.2. Квалитативно определување на алкалоиди во урина со тенкослојна хроматографија.....	54
7. ДЕТЕКЦИЈА НА ТОКСИЧНИ СУПСТАНЦИИ СО НЕУТРАЛНИ, СЛАБО КИСЕЛИ ИЛИ КИСЕЛИ СВОЈСТВА СО МИКРОКРИСТАЛОСКОПСКИ МЕТОД.....	56
8. ПРЕЛИМИНАРНА ЕКСПРЕСНА АНАЛИЗА НА БИОЛОШКИ ТЕЧНОСТИ (КРВ, УРИНА) ЗА ДЕТЕКЦИЈА НА ПРИСУСТВО НА БАРБИТУРАТИ, БЕНЗОДИАЗЕПИНИ, ДЕРИВАТИ НА САЛИЦИЛНА КИСЕЛИНА И ФЕНОТИАЗИНИ.....	57
9. ЛИТЕРАТУРА.....	58

1. ВОВЕД

Токсикологијата е научна дисциплина која ги проучува штетните ефекти на супстанциите врз живите организми и последиците од тие ефекти. Поимот токсичност го опишува степенот на токсично дејство на супстанциите. Токсичноста зависи од комбинираниот ефект на различни фактори како што се дозата, начинот на изложување, времетраењето на изложувањето, видот и структурата на хемискиот агенс (отров) и индивидуални човечки фактори. Во токсикологијата труењата (акутни и хронични) се дефинираат како хемиски предизвикани оштетувања на ткивата и органите или нарушувања на функциите на биолошките системи под дејство на хемиски агенси.

Токсиколошката анализа вклучува детекција, идентификација и квантификација на токсиколошки важни супстанции и интерпретација на добиените резултати. Со цел да се добијат точни резултати, мора да се применуваат стандарди за квалитет. Затоа, постојат лабораториски упатства за работа наменети да служат како основа врз која може да се развијат соодветни работни протоколи и методологии. За некои специфични работни упатства, треба да се земе предвид и постоењето на националните или меѓународните закони и прописи.

Постоечките упатства се однесуваат на анализа на хемиски агенси (и/или нивни метаболити), како супстанции кои предизвикуваат зависност, лекови, етанол, метали, пестициди и на други токсиколошки релевантни супстанции во поширока смисла, главно во биолошки примероци (телесни течности, ткива и сл.) или примероци од животната средина вклучувајќи:

- анализа на лекови и/или други синтетски супстанции во биолошки материјал;
- анализа на примероци од работната средина - Професионална токсикологија;
- откривање на отрови и нивното значење во одредувањето на причините за смрт;
- квалитативна и/или квантитативна анализа на супстанции кои предизвикуваат зависност во биолошки материјал или друг форензички материјал;
- злоупотреба на супстанции во врска со спортски активности (допинг);
- токсиколошки анализи на отрови од животната средина.

Во прилог на квалитативните и квантитативните анализи, составен дел на токсиколошките анализи е и толкувањето на аналитичките резултати.

Основата на клиничко-токсиколошките анализи ја сочинуваат три значајни сегменти, кои заедно се важен дел од токсиколошката наука:

- Клиничка токсикологија, која ги проучува сите аспекти од поставување на дијагноза при разни видови на труења со испитување на симптомите, како и анализа на биолошкиот материјал од пациентите за евентуалното присуство на лекови и други хемиски средства;
- Следење (мониторинг, определување) на терапевтските концентрации на лековите во биолошките матрикси (Therapeutic Drug Monitoring, TDM), кое често се применува за време на третман на пациентите со лекови кои имаат мала

терапевтска ширина со цел несаканите ефекти врз здравјето на луѓето да се сведат на минимум;

- Следење на појавата на интраутерина експозиција (*in utero exposure*) на лекови и последиците кои се јавуваат врз плодот. Научните сознанија за механизмот, начинот на дејствување на лековите и последиците кои тие ги предизвикуваат врз плодот, скоро во целост се разјаснети во раните 90-ти години од минатиот век. Анализите на присуството на лекови во биолошки материјал земен од мајката и од новороденчето, денес се изведуваат рутински во болниците и клиниките. Главната цел на изведување на овие тестови е проценката на изложеноста на новороденчињата на лекови за време на бременоста, со цел да се преземат соодветни мерки за заштита на нивното здравје.

Сите овие сегменти се еднакво значајни за здравјето на луѓето и при вршење на испитувањата во секој од овие сегменти се употребуваат едни исти аналитички техники и протоколи за работа со соодветна модификација според потребата.

1.1. Практични аспекти на аналитичко-токсиколошките анализи

Денешниот живот не може да се замисли без секојдневна употреба на хемикалии. Тие во облик на лекови се користат за терапија, во облик на пестициди се користат во агрономијата, во индустријата се основа на сите хемиски синтети и производство, во домаќинствата средствата за чистење овозможуваат поквалитетен живот, а секојдневно сме во контакт со безброј супстанции присутни во средствата за нега, хигиена, медицинската и декоративната козметика. Покрај ова, опкружени сме и со безброј отрови од природно потекло, како што се растителни (отровни растенија и печурки), животински (отровни змии, пајаци и други животни) и морски (отровни риби). Како последица на секојдневното изложување, секојдневно се случуваат голем број акутни и хронични труења кои веќе придобиваат размер на модерна епидемија, па така и според податоците на СЗО, труењата заземаат трето место меѓу најчестите причинители на смртност во светот веднаш после кардиоваскуларните и малигните заболувања.

Примероци за анализа и заштитни мерки во лабораторија

Соодветниот избор, собирањето и доставувањето на примероците за токсиколошките анализи се од огромно значење за добивањето на прецизни и точни резултати, како и за нивното последователно толкување во донесувањето на решение. Потребно е лабораторијата да има развиено и обезбедено детални насоки и инструкции за работа за сите лабораториски служби. Во ваквите упатства треба да бидат наведени:

- видот и минималните количини на примероци потребни за да се извршат потребните анализи;
- Секогаш кога е можно, волуменот на собраниот примерок треба да биде доволен за да се обезбеди сигурност дека има доволно остаток за повторување на анализата, ако има потреба;
- Упатствата треба да содржат и специфични сегменти за видот и големината на садовите за земање на примероци, доколку е можно и за видот и количината на стабилизатор или конзерванс кои треба да се додадат на примероците од биолошки течности;
- Потребни се и инструкции за означување на одделните садови за примероци, а треба да се наведат и прифатливи услови за пакување и транспорт;

- Исто така, треба да има и упатства за јасно означување (пример, со јасни етикети „инфективно“ за заразен биолошки материјал, итн.);
- Примероците добиени во лабораторијата мора да бидат соодветно идентификувани и да се чуваат на безбеден начин, така што интегритетот на примероците да биде заштитен;
- Каде што е потребно, прифатено е да има затворен синџир на постапки кои треба да се следат при пренесување на примероци од една до друга локација.

Лабораториските постапки треба да минимизираат каква било можност за погрешно означување на примерокот или контаминација на истиот. Сите примероци мора да се чуваат на безбеден начин на соодветна температура и заштитени од светлина за време на складирањето. По првичната анализа, остатокот или дупликатот примерок мора да се чуваат под соодветни услови за определен период на време (во зависност од анализата, видот на примерокот и целта на анализата) за да се овозможи повторна анализа, ако е потребно.

Многу од тестовите кои се прават при класичните токсиколошки анализи користат екстремно токсични хемикалии. Некои ризици се евидентни сами по себе и бараат соодветни заштитни мерки и почитување на правилата за чување и ракување со опасни хемикалии. Лабораторискиот персонал треба да биде информиран за превентивните мерки и посебно со регулативите и мерките во случај на работа со потенцијално инфективен биолошки материјал. Исто така потребно е да постојат пишани упатства и мерки за справување со изложување на биолошки токсични материјали, органски растворувачи и други ризични или потенцијално опасни супстанции.

Апаратура, инструменти, реагенси и стандардни супстанции

Клиничко-токсиколошките анализи може да се вршат во специјализирани токсиколошки лаборатории или во посебни делови на клиничко-биохемиските лаборатории кон болниците. Во секој случај лабораториските капацитети за токсиколошки анализи треба да исполнуваат дадени стандарди:

- Пристапот до лабораторијата треба да биде ограничен само на овластени лица;
- Лабораториската опрема мора да овозможи работа според прифатени научни стандарди;
- Лабораториските капацитети и постапки мора да овозможат безбедно ракување со потенцијално инфективни и/или токсични биолошки примероци на вработените, а да го оневозможат пристапот до примероците на неовластени лица;
- Лабораториските постапки мора да овозможат соодветно откривање, идентификација и квантификација на одделни супстанции;
- Потребно е редовно снабдување со хемикалии, реагенси, стандарди и есенцијални консумативи (хроматографски колони, филтери, детекциски ламби, инјектори, полначи за колони...), соодветно манипулирање со инструментите и водење сметка за одржување на соодветни работни услови (температура, влажност, прашина...);

- Во лабораторијата да се направи референтна колекција или библиотека на најразлични супстанции и референтни стандарди без да се чека да се појави индивидуален случај на труење со потреба од анализа.

Во денешно време во зависност од стандардните протоколи за анализа, најшироко прифатени техники и инструментација за вршење на клиничко-токсиколошки анализи се TLC (тенкослојна хроматографија), GC (гасна хроматографија), HPLC (високо перформансна течна хроматографија), масена спектрометрија (MS), спектрофотометриски методи (на пример, UV/VIS, IR и AAS) и имунолошките методи како на пример, радиоимуно тестови (RIA), ензимски имунолошки техники (EMIT) меѓу кои приматот го држи ELISA и флуоресцентно-поларизирачките имунотестови (FPIA).

1.2. Клинички аспекти на аналитичко-токсиколошките анализи

Клиничка токсикологија

Клиничката токсикологија се занимава со третирање на труењата кај поединци и нејзината примарна улога е лекување на пациентот. Бројот на супстанции, кои може да бидат потенцијални причинители на труење е огромен и во идеални услови болничките лаборатории би требало да имаат можности да ги идентифицираат и по потреба квантифицираат бројните хемиски супстанции како што се фармацевтските препарати, илегалните супстанции, гасовити отрови, растворувачи, пестициди, токсични метали и други индустриски отрови во различни биолошки матрикси. Но, во пракса, мал е бројот на лаборатории, кои може да изведат ваква сеопфатна токсиколошка анализа. Болничките лаборатории во најголемиот број на случаи се ориентирани кон испитување на супстанциите кои најчесто се причинители на труење. Во развиените земји, болничките клинички лаборатории се опремени за вршење на основните токсиколошки испитувања, а во специфични случаи се темелат и на резултатите од испитувањата кои се прават во централните специјализирани клинички лаборатории. Во итните случаи, кога состојбата на пациентот е критична, а симптомите не се доволно јасно диференцирани за да се постави дијагноза, резултатите од токсиколошките испитувања, може да бидат од есенцијално значење за животот на пациентот. Затоа, добро обучениот аналитичар има многу важна улога во третирањето на пациентите со труење и за една веродостојна анализа потребно е разбирање на клиничките аспекти и дијагнозата и терапијата од негова страна, како и поседување на основни познавања од ургентната медицина и интензивната нега, фармакологијата и токсикологијата, механизмите на елиминација и метаболизмот на отровите, како и добра комуникација со клиничарите/доктори.

Резултатите од токсиколошките испитувања, мора да бидат готови во рок од 1-2 часа од приемот на пациентот. Во идеален случај, потребно е да се изврши идентификација и квантитативно определување на токсичната супстанција. Во случај квантитативното определување да не може да се изврши, квалитативниот резултат заедно со определување на симптомите карактеристични за идентификуваниот токсин, претставуваат важен податок, врз кој може да се темели лекувањето на пациентот. При поставување на дијагнозата на труењето од важно значење е тесната соработка помеѓу клиничките токсиколози и аналитичкиот токсиколог. Симптомите на труење, заедно со целокупната клиничка слика, како и претходната медицинска историја на пациентот се драгоцен информации кои упатуваат на евентуалниот можен причинител на труењето, а како резултат на тоа и препорачуваат кое токсиколошко испитување треба прво да се изведе. Соработката помеѓу клиничкиот токсиколог и аналитичкиот токсиколог, треба да продолжи и во случај да се добијат негативни резултати при почетните испитувања. Во тој случај, испитувањата треба да се прошират. Улогата на лабораторискиот аналитичар е значајна и при толкување (интерпретација) на позитивниот резултат. Лабораториите кои вршат аналитички

токсиколошки анализи во случаи на акутни и хронични труења, често вршат и испитувања и во областа на злоупотреба на дроги и илегални супстанции. Овие испитувања, може да се движат од дијагностички тестови за идентификација на лаксативи и диуретици, до рутинско испитување на примероци урина од пациенти кои се лекуваат од зависност од употреба на дроги и поминуваат низ програма на рехабилитација. Во овој случај, во урината, освен дрогите кои се користеле, се следи и присуството на пропишаните лекови кои се користат во терапијата на одвикнувањето од зависностите.

Причини за хоспитализација на пациентите со клиничка слика на труење

Лошите социјални и економски услови, како и менталните нарушувања, честопати се причина за обид за самоубиство на поединци, кое се врши најчесто со предозирање со лекови. Ова е една од најчестите причини за потребата од брза хоспитализација на затруените.

Злосторничките труења со лекови се значително поретки, но и на жртвите на овој вид на труења после хоспитализацијата им се вршат токсиколошки испитувања.

Пациентите кои внеле дрога или лекови без нивна волја (под присила), во случаи на сексуална злоупотреба и др., исто така се хоспитализираат. Меѓутоа во овие случаи, жртвата контактира со медицинските центри најчесто неколку дена по настанот, така што внесените дроги (супстанции) како: γ -хидрокси маслена киселина (GHB), флунитразепам или алкохол, можеби повеќе и не може да се детектираат во нивниот организам.

Труењата кај децата се главно случајни, меѓутоа иако ретки, децата може да бидат жртви и на намерни труења од страна на родителите, старателите и др. Случајните труења кај децата, најчесто се случуваат во домашни услови. Децата имаат лесен пристап до фармацевтските производи, средствата за чистење (дезинфекциски средства, детергенти...), пестициди, алкохолни пијалаци и козметички препарати. Во случај на случајни труења кај децата, возрасните често пати поради паника и збунетост, може погрешно да ги протолкуваат симптомите на труења, што може да доведе и до несоодветна и ненавремена реакција (хоспитализација).

Причина за случајни акутни или хронични труења и кај возрасните и децата во домаќинствата, може да бидат и труењата со јалероден моноксид, кои се предизвикани од неисправни инсталации (печки за греење) во домаќинствата.

Работните места (професионални труења), може да претставуваат уште еден причинител на случајни труења, при што вредноста на аналитичките резултати од болничката лабораторија, може да бидат од есенцијално значење за поставување на точна дијагноза и терапија, а резултатите од анализите може да влијаат и врз исходот на евентуалните судски случаи.

Труења предизвикани од повеќе фактори како што се: продолжен ефект на пропишаните лекови, прекумерна употреба на лекови, интеракција помеѓу пропишаните лекови, грешка во пропишувањето или издавањето на лековите итн., претставуваат посебен стручен предизвик за токсикологот аналитичар.

Добиените резултати од токсиколошките анализи, се значајни за лекарот, кој треба да одбере терапија за пациентот која не е контраиндицирана со внесениот отров.

Дијагноза на акутните труења

Кога постои сомневање за акутно труење, лекарот мора да праша низа прашања при поставување на дијагнозата. Во случај пациентот да е во кома, околностите во кои е најден пациентот, присуството на празни шишенца, таблети или други предмети, може да бидат многу важни. Претходната историја на пациентот (вклучувајќи употреба на препишани лекови за терапија или историја за какви било психијатриски нарушувања и болести), професијата и занимањето може исто така да дадат релевантни податоци кои ќе дадат индикации за видот на труењето. Лекарскиот преглед на пациентот може да даде индикација за присутниот отров (табела 1).

Табела 1: Акутно труење: поврзаност на клинички симптоми и вид на отров

Симптоми	Отров кој може да ги предизвика
ЦНС	
Атаксиа	Бромиди, етанол, карбамазепин, седативи и хипнотици
Кома	Алкохоли, седативи и хипнотици, опиоиди
Конвулзии	Трициклични антидепресанти, стрихнин, теофилин
Респираторен тракт	
Респираторна депресија	Алкохоли, седативи и хипнотици, опиоиди, транквилизатори
Белодробен едем	Аспирин, хербициди, опиоиди, органски растворувачи
Кардиоваскуларен систем	
Тахикардија	Антихолинергици, симпатикомиметици
Брадикардија	β-блокери, дигоксин, опиоиди
Хипертензија	Антихолинергици, симпатикомиметици
Хипотензија	Етанол, седативи и хипнотици, опиоиди, транквилизатори
Аритмии	β-блокатори, дигоксин, цијаниди, фенотиазини, трициклични антидепресанти, теофилин
Очи	
Миоза	Карбамати, опиоиди, ОФС, фенотиазини
Мидријаза	Амфетамин, атропин, кокаин, трициклични антидепресанти
Телесна температура	
Хипертермија	Аспирин, динитрофенол, прокаинамид, хинидин
Хипотермија	СО, етанол, седативи и хипнотици, опиоиди, фенотиазини
Кожа, коса и нокти	
Акни	Бромиди, органохлорни пестициди
Паѓање на косата	Талиум
Гастроинтестинален тракт	
Хиперсаливација	Холинестеразни инхибитори, стрихнин
Сувост на устата	Атропин, опиоиди, трициклични антидепресанти
Констипација	Олово, опиоиди, талиум...
Дијареа	Арсен, холинестеразни инхибитори, лаксативи
Крварења	Аспирин, киселини/бази, кумаринови антикоагуланти
Оштетување на црн дроб	Аманита-токсини, ССl ₄ , парацетамол, фосфор (бел)
Урогенитален тракт	
Уринарна ретенција	Атропин, опиоиди, трициклични антидепресанти
Инконтиненција	Карбамати, ОФ-пестициди
Бубрези	Аманита-токсини, Cd, Hg, ССl ₄ , етилен гликол, парацетамол

Третман на акутни труења

Кога постои сомневање за акутно труење, уште пред дијагнозата да биде потврдена, секогаш треба да се преземат основни заштитни, помошни и симптоматски мерки за одржување на пациентот во живот. Ако отровот е инхалиран, пациентот треба најпрво да биде отстранет од загадената околина. При контаминација на кожата,

прво се отстранува контаминираната облека и се врши испирање на површината најчесто само со вода. Кај возрасни пациенти, ако отровот е внесен *per os* за да се намали ризикот од апсорпција на отровот се прави аспирација и испирање на желудник. Во ваков случај, кај деца соодветно е да се предизвика повраќање со давање на сируп од ипекакуана. Апсорпцијата на евентуални остатоци од отровот после гастричната лаважа може да биде намалена со давање на поголема доза од активен јаглен (*Carbo medicinalis*). Повеќекратното давање на активен јаглен претставува и ефикасен начин за зголемување на елиминацијата на одредени отрови. Меѓутоа, во случај кога е даден антидот, активен јаглен не треба да се администрира.

Истовремено кај повеќето од пациентите се преземаат и помошни мерки за третирање на труењето како што е апликација на лекови за одржување на виталните функции како *i.v.* администрација на диазепам или други антиконвулзиви, или пак антиаритмици како што е лидокаинот. Треба да се има предвид дека сите овие лекови ќе се детектираат при токсиколошките анализи изведени подоцна, затоа нивната администрација треба задолжително да биде означена во барањето за анализа.

Некогаш е индицирана и примената на специјални терапевтски процедури, како што е антидотската терапија или активната (засилена) елиминација.

Антидоти (или протективни агенси)

Употребата на антидоти е ограничена само на мал број отрови (табела 2) Постојат контрадикции за примена на некои од нив, како при труење со цијаниди, додека другите се и самите потенцијално токсични и треба да се употребуваат со внимание, па затоа вообичаено се чека на резултатот од анализата за да се администрира можниот антидот.

Табела 2: Антидоти што се користат при третирање на акутни труења

Антидот	Индикација
Ацетилцистеин	Парацетамол
Атропин	Карбамати, органофосфорни соединенија (ОФС)
Дефероксамин	Al, Fe
Димеркапрол	Sb, As, Bi, Cd, Pb, Hg
Етанол	Етилен гликол, метанол
Fab-моноклонални фрагменти	Дигоксин
Флумазенил	Бензодиазепини
Метионин	Парацетамол
Метиленско сино	Оксидациски агенси: хлорати, нитрити и др.
Налоксон	Опиоиди (кодеин, петидин, морфин)
Оксими	ОФС
Кислород	СО, цијаниди
Физостигмин	Атропин
Фитоменадион (вит. К)	Кумарински антикоагуланси
Калиум	Теофилин, бариум
Протамин сулфат	Хепарин
Пиридоксин (вит. В ₆)	Изонијазид
Na-EDTA	Pb, Zn и др.

Терапија на активна елиминација

Постојат четири начина за постигнување на засилена елиминација на отровот од организмот и тоа:

а) повеќекратно давање активен јаглен *per os*;

- б) засилена диуреза со промена на уринарното рН;
- в) перитонеална дијализа и хемодијализа;
- г) хемоперфузија.

Засилена системска елиминација на соединенија како што се барбитурати, карбамазепин, хинин (и делумно салицилната киселина и нејзини деривати) можно е да се постигне со перорално давање на активен јаглен во интервали од 4-6 часа додека не се појави клиничкото подобрување. За да се намали времето на минување и реадсорпцијата на отровот активниот јаглен вообичаено се дава заедно со лаксативи. Помошта од форсираната диуреза е во зголемување на уринарната елиминација на отровот преку зголемување на волуменот на урината излачена за единица време. Ова се постигнува со *i.v.* администрација на соодветни течности. Форсираната диуреза скоро секогаш се комбинира со промена на уринарното рН. Бубрежната елиминација на супстанцииите кои се слаби киселини како хлорфенокси-хербицидите или пак салицилатите може да се зголеми со *i.v.* администрација на NaHCO_3 . Алкализацијата на урината и само по себе е ефективна мерка за намалување на ризикот од компликации како резултат на зголемениот волумен на течности кои настануваат при ретенција на течности во случаи на церебрален и/или белодробен едем или пак електролитен дисбаланс. Во тек на целиот овој период неопходно е мониторирање на уринарното рН на пациентот. Дијализата и хемодијализата го отстрануваат отровот директно од циркулацијата. При хемодијализа, крвта минува низ мембрана која е во контакт со водената фаза во вештачки бубрег. Кај перитонеалната дијализа течноста која се аплицира на пациентот се дренира од перитонеалната празнина. Во постапката на хемоперфузија, крвта се дренира низ адсорбирачки материјал (обложен активен јаглен или компатибилна смола). Хемодијализата е постапка од избор за супстанции кои се лесно растворливи во вода како што е етанол, а хемоперфузијата за липофилни отрови како што се барбитуратите со кратко дејство (имаат висок афинитет кон адсорбирачките материјали).

Главни лабораториски наоди во клиничката токсикологија

Пациентите кај кои нема сомневање за видот на труењето, можат да бидат лекувани успешно само со користење на резултатите од основните клиничко-биохемиски тестови направени од биохемиските и хематолошките лаборатории, но токсиколошките анализи играат недвосмислена улога кога дијагнозата е под сомнеж, или пак во прашање е и ползата од применетата терапија (форсирана диуреза и сл.).

Практичниот аспект на важноста на клиничко-токсиколошката лабораторија вклучува повеќе фази почнувајќи од преданалитичка (анализа на пропратен материјал, симптоми и историја на болеста) преку аналитичка и постаналитичка фаза во која се вклучува и интерпретацијата на резултатите (табела 3).

Табела 3: Опис на чекорите за анализа во различните фази од анализата

Чекори за анализа	Опис
Пред-аналитичка фаза	1. Добивање на детални информации за пристапот, условите при кои настанало труењето и резултатите од биохемиските и хематолошките испитувања
	2. Добивање на медицинска историја за пациентот, утврдување на манипулациите со соодветниот примерок и избор на анализите кои се приоритет да се направат
Аналитичка фаза	3. Изведување на анализите
Пост-аналитичка фаза	4. Интерпретација на резултатите и дискусија со докторот-клиничар после прегледот на пациентот
	5. Ако има потреба, се вршат дополнителни анализи на оригиналните примероци или на примероци подоцна земени од пациентот

Од големиот број на клиничко-лабораториски тестови кои можат да помогнат за поставување на дијагноза на акутното труење најчесто користени за таа намена се:

А) Биохемиски тестови

- Глукоза во крвта / Гликемија;
- Електролити, гасови во крв и рН на урина;
- Плазмен осмолалитет;
- Определување на активноста на ензимите во плазмата;
- Определување на холинестеразната активност.

Б) Хематолошки тестови

- Протромбинско време;
- Карбоксихемоглобин (CoHb) и метхемоглобин (MetHb);
- Хематокрит (волумен на еритроцитна фракција);
- Број на леукоцити.

Примерокот за анализа треба да биде пропратен со соодветна документација и пример за формулар за аналитичко-токсиколошко барање е даден во табела 4. Доколку резултатите од тестовите имаат суштинско влијание врз клиничкиот наод и изборот на терапијата, тогаш резултатите мора да се добијат за кратко време по приемот на примерокот. Позитивниот резултат не може секогаш веднаш да го потврди труењето, во некои случаи присуството на повеќе од еден отров ја комплицира анализата и потребни се дополнителни анализи на различни примероци земени од пациентот, затоа многу е важно да се увидат предностите и недостатоците на направените тестови и да се усогласат резултатите од тестовите со мислењата на аналитичарот и докторот токсиколог. Во секој случај, подобро е да не се издадат резултати отколку да дојде до погрешно и нерелевантно интерпретирање на резултатите. Вообичаено постојат и стандардизирани формулари (т.н. токсиколошки прашалник) каде се запишуваат резултатите од анализите (табела 5).

Табела 4. Пример за формулар за аналитичко-токсиколошко барање

АНАЛИТИЧКО-ТОКСИКОЛОШКО БАРАЊЕ			Датум и час на прием
До _____ (име на лабораторија, адреса, телефон) Специјално барање _____			
Доктор _____ Телефон _____ Болница _____ Датум _____ Печат _____			Време на изложување на отровот
			Лекови кои се препишани или употребувани во претходна терапија
Пациент _____ Датум на раѓање/пол _____ Важни податоци _____			Лекови/отрови за кои постои сомнение дека се внесени
Вид на примерок за анализа	Датум	Час	Клинички податоци
Крв (антикоагуланс?)			
Урина			Потребни испитувања
Желудочна содржина			
Друг примерок			Приоритет

Табела 5. Пример за формулар за токсиколошки прашалник

ТОКСИКОЛОШКИ ПРАШАЛНИК	КВАЛИТАТИВНИ АНАЛИЗИ		
	Супстанца	Лаб. број	Тест
Пациент _____	1. Салицилати		
Болница _____	2. Фенотиазини		
Доктор _____	3. Имипрамин		
Потребни испитувања _____	4. Парацетамол		
Приоритет _____	5. 3-хлоро соединенија		
ПРИМЕРОК ЗА АНАЛИЗА	6. Хлорати, хлорити и др.		
Вид _____	7. Паракват		
Лаб. број _____	8. Други пестициди		
Дата и час на земање _____	9. Метанол		
СУПСТАНЦИЈА ЗА АНАЛИЗА	10. Етанол		
Примерок _____	11. Железо		
Лаб. број _____	12. Олово		
Концентрација _____			
Аналитичар _____	Датум _____	Час _____	

1.3. Обезбедување квалитет на извршените токсиколошки анализи

- Обезбедување на идентитетот на примероците

Сите аликвоти и екстракти за анализа мора да бидат соодветно означени за да се обезбеди интегритетот на добиените аналитички резултати. Секаде каде што е потребно, патот на примерокот низ лабораторијата мора да биде документиран од страна на затворен синџир на процедури.

- Методи

Во лабораторијата мора да постојат јасни, пишани инструкции за сите методи, процедури и техники кои се користат во истата (стандардни оперативни процедури). Методите треба да содржат доволно информации, така што квалификуваниот персонал да може да ги следи детално после краток период на обука. Какви било промени во методите или постапките мора да бидат јасно документирани, наведувајќи ги причините за промените. Сите постапки и секоја промена мора да бидат одобрени од страна на одговорниот на лабораторијата или други овластени службени лица.

- Детекција

Примарната цел на квалитативната анализа е да се откријат супстанции од токсиколошко значење во примерокот. Во зависност од причината за анализа, се преземаат различни аналитички стратегии. Ако токсиколошките анализи се наменети да се открие еден отров, или група отрови, ќе се применат специјално дизајнирани аналитички постапки (насочени токсиколошки анализи). Секогаш кога е можно, треба да се применат најмалку два различни методи за анализа, од кои секој користи различни физички или хемиски принцип за да се овозможи недвосмислено откривање и потврдување на супстанцијата од интерес. Ако анализата е потребна за да се открие или да се исклучи широк спектар отрови без специфична насока („генерално непознат отров“), соодветна е примената на комплексната аналитичка стратегија за систематски токсиколошки анализи (Systematic Toxicological Identification Procedure – STIP). Нејзината цел е да се откријат сите супстанции од токсиколошко значење, а во позитивните случаи да се идентификуваат недвосмислено со исклучување на сите други супстанции. За таа цел, треба да се изведат голем број аналитички постапки паралелно или во низа и врз основа на мноштво аналитички принципи. Резултатите од секој тест треба да се проверат според соодветните бази на податоци и автентични стандарди за да се види кои супстанции ќе се квалификуваат за одговорот кој се бара, а потоа резултатите од сите тестови треба да се споредат за да се види колку супстанции остануваат кои се во согласност со аналитичкиот одговори. На крајот, резултатите треба да водат само кон еден кандидат.

Во исто време со примерокот вообичаено е да се анализираат познато позитивни или негативни проби. Негативната проба (слепа проба) помага за обезбедување сигурност дека не се добиени грешно позитивни резултати (пример од контаминирани реагенси или стакларија). Сомнително позитивните проби треба да бидат повторно анализирани со употреба на нов стаклен прибор за да се исклучи контаминација.

- Квантификација

Квантитативна анализа главно се изведува само во оние случаи каде што може да се очекува значајно толкување на резултатите. Квантификацијата идеално треба да биде изведена на точно одреден дел на примерокот (аликвотна проба) различен од оној што се користел за скрининг и/или квалитативна анализа.

- Калибрација

Секогаш кога е можно, треба да бидат вклучени внатрешни стандарди во примероците, бидејќи нивната употреба минимизира грешки поради адсорпција кон површини, загуби за време на екстракција, загуби за време на испарување на растворувачот, загуби поради дериватизација и нерепродуцибилност и сл. Внатрешните стандарди кои се употребуваат треба да бидат хомолог на супстанцијата за анализа (на лекот или други релевантни соединенија кои се анализираат). Ако тоа не е можно, треба да биде избрано соединение кое поседува слични физичко-хемиски својства. Хроматографските својства на внатрешниот стандард треба да бидат такви што да се елуира во близина на примерокот за анализа, но да останува целосно разделен од секоја друга супстанција која може да биде присутна. Секогаш кога е можно, внатрешниот стандард треба да биде подготвен во воден раствор и да се измеша темелно со примерокот пред анализата.

- Валидација

Сите методи кои се користат за анализа мора да бидат валидирани (потврдени) со користење на истата основна матрица која ќе се користи рутински (на пример, воден раствор, крв, серум, ткиво), кон која се додадени познати количини на аналитот и се поминува низ целата аналитичка постапка. Сепак, критериумите за валидација, исто така, ќе зависат од целите на анализата (ова може да значи на пример, дека многу ниската граница на детекција на методот не мора да биде од вистинска важност за испитувања на причина за смрт од труење кога би биле присутни високи концентрации од испитуваниот аналит). Критериумите кои треба да бидат валидирани се: точност, прецизност, повторливост (проверки на различни концентрации), опсег на калибрација, селективност, детекција, соодветна квантификациска граница и, ако е возможно, робусноста на методот, како и времето и трошоците за анализа.

Реагенсите кои се користат мора да бидат проверени со процедури за обезбедување на квалитетот. Повторени анализи треба да се вршат секогаш кога е можно.

- Обезбедување квалитет (QA) и контрола на квалитет (QC)

Се препорачува лабораториите да имаат своја внатрешна контрола на квалитетот и програма за обезбедување на квалитетот, но, исто така, и да учествуваат во надворешно осигурување на квалитетот и програми за тестирање секогаш кога е можно.

1.4. Бележење и објавување резултати

- Документирање на резултатите

Вообичаено е секој примерок при прием во лабораторијата да се означи со уникатен идентификациски број кој секогаш ќе се користи за означување при сите анализи кои ќе се изведуваат со него.

Резултатите од сите анализи треба да бидат целосно документирани. Овој писмен запис треба да ги содржи сите информации потребни за идентификација на определениот случај и неговиот извор (заедно со дополнителни информации за карактеристичните околности на случајот), листа на анализирани примероци, супстанции или групи на супстанции кои се испитувани, треба да ги содржи сите резултати од тестовите и методите кои се користат и мора да има потпис на лицето

кое ја презема одговорноста за неговата содржина. Оваа информација треба да биде лесно достапна.

За да се добијат веродостојни и релевантни резултати при изведување на токсиколошките анализи, треба да се применуваат принципите на добрата лабораториска пракса.

Сите резултати од токсиколошките анализи се заведуваат во крајниот извештај кој треба што побрзо да се достави до клиничарот. Овој тип на формулар, аналитички токсиколошки извештај е претставен во табела 6.

Табела 6. Пример за формулар за аналитички токсиколошки извештај

АНАЛИТИЧКИ ТОКСИКОЛОШКИ ИЗВЕШТАЈ						
Од _____ (лабораторија, адреса, телефон) _____ Печат Датум						
Пациент _____ Возраст/год. на раѓање _____ Референтен број _____ _____						
Примерок	Лаб. број	Датум	Време	Резултат	Концентрација	Метод
Аналитичар: Датум: Потпис и печат						

2. КВАЛИТАТИВЕН СКРИНИНГ ИЛИ КВАНТИТАТИВНА АНАЛИЗА

Лабораториите во зависност од видот на опремата со која располагаат, како и со степенот на обученост на аналитичкиот кадар, имаат воспоставено сопствена политика во однос на видот и бројот на испитувањата кои се вршат во нив. Кога лабораториите не се доволно опремени, во нив може да се изведуваат ограничен вид и број на квалитативни скрининг испитувања кои се индицирани од клиничките симптоми на пациентот. Специјализираните токсиколошки лаборатории пак, можат да изведат систематска и сеопфатна токсиколошка анализа за секој поединечен случај на труење. Изведувањето на комплетните токсиколошки анализи е долготрајно и скапо. Изведувањето на токсиколошки испитувања, врз база на клиничката слика и околностите на труење е прилично несигурно. Подолу се прикажани случаите кога може да се употреби само квалитативен скрининг и оние во кои треба да се направи и квантитативна анализа.

Квалитативен скрининг при труење се прави со цел:

- Да се направи разлика помеѓу очигледна интоксикација и труење;
- Кога недостасуваат информации за медицинската историја на пациентот;
- Кога клиничката слика е несигурна и нетипична (на пр. грчеви);
- Кога постои веројатност дека клиничката слика е предизвикана од фармаколошка група на лекови, а не од само еден лек (пр. лаксативи, диуретици и др.);
- Во случаи на интоксикација предизвикана од повеќе супстанции земени истовремено (наркотици, алкохол);
- Труења при кои веднаш не се јавува јасна клиничка слика (парацетамол);
- Кога не постојат сигурни или селективни квантитативни методи за анализа (растителни препарати);
- За форензички цели;
- По налог на клиничкиот токсиколог.

Индикации за изведување на квантитативна анализа

- Кога видот и времетраењето на лекувањето зависат од концентрацијата на отровот (на пр. дозирање на антидоти при труење со парацетамол или талиум);
- Кога прогнозата на лекувањето зависи од концентрацијата на отровот во плазмата (паракват);
- За да се направи разлика меѓу терапевтската и токсичната ингестија на лекот;
- Во случаи на интоксикација предизвикана од повеќе агенси (на пр. истовремена интоксикација со метанол и етанол);
- Во случаи кога се врши токсиколошки мониторинг (на пр. определување на концентрација на алуминиум во крв);
- Во случаи кога се вршат токсикокинетички пресметки.

И двата вида токсиколошки тестови (квалитативни и квантитативни) се прават и за истражувачки цели, статистички, едукативни, превентивни и за да се определи ефикасноста на лекувањето.

2.1. Токсиколошки скрининг

Шемите на токсиколошкиот скрининг, може да се поделат на: ограничени (кратки), насочени или специфични и екстензивни (проширени). Постојат повеќе групи на методи кои се користат, но најчестата класификација на методите за една токсиколошка анализа е следнава:

1. Физичко испитување на примерок;
2. Обоени тестови за анализа на ксенобиотици (отрови);
3. Хроматографски техники за анализа;
4. Имунолошки техники за анализа.

➤ Физичко испитување на примерок

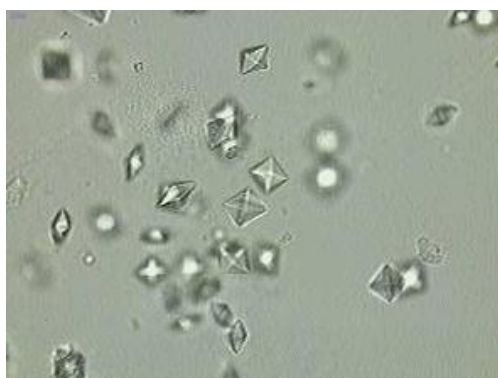
Физичкото испитување на примероците може значително да придонесе за брза детекција на отровот којшто го предизвикал труењето. Така на пример, високата концентрација на некои лекови или нивни метаболити може да ја промени бојата на урината (табела 7). Десфероксаминот ја обојува урината црвено, додека метиленското сино и дава сина боја. Некои отрови со силен мирис како што се камфор и метилсалицилат во голем дел се излучуваат непроменети во урината и лесно се идентификуваат според карактеристичниот мирис (табела 8). Заматената урина упатува на патолошки промени (присуство на крв, микроорганизми, епителни клетки) или пак присуство на карбонати, фосфати или урати во аморфна или микрокристална форма. Хроничната терапија со сулфонамиди доведува до создавање на жолти или зелено-кафеави кристали во неутрална или алкална урина. При предозирање со фенитоин или примидон исто така се формираат кристали во урината. Ингестијата на етилен гликол доведува до формирање на карактеристични безбојни кристали од калциум оксалат при неутрално рН на урината. Овие промени забележани при физичко испитување на примерок урина не треба да се игнорираат, дури и ако не се директно поврзани со труење.

Табела 7. Отрови-причинители за промена на бојата на урината

Боја	Можна причина за труење
Кафеава или црна	Нитробензен, феноли
Жолта или портокалова	Флуоресцеин, фенолфталеин, нитрофурантоин, Сена
Темноцрвена или кафеава	Алоин, фенотиазини, фенитоин, фенолфталеин, варфарин, десфероксамин
Сина или зелена	Амитриптилин, индометацин, феноли, метиленско сино

Табела 8. Карактеристични миризби од примероците сврзани со определени труења

Мирис	Можна причина за труење
Горчливи бадеми	Џијаниди
Овошје	Алкохоли (и етанол), естери
Лук	Арсен, фосфор
Бензин	Нафтени дестилати (растворувачи во пестицидни формулации)
Фенол	Дезинфициенси, феноли
Тутун	Никотин
Боја за чевли, горчлив бадем	Нитробензен
Сладникав мирис	Хлороформ и други халогени јаглеводороди



Слика 1. Кристали од калциум оксалат утврдени при физичко испитување (микроскопски преглед) во примерок урина после ингестија на етилен гликол

➤ Обоени тестови за квалитативна анализа на ксенобиотици (отрови)

Обоените тестови претставуваат важен дел од токсиколошките анализи бидејќи во најголем дел се специфични и резултатите се добиваат за многу кратко време. Голем број на лекови и многу други отрови кои се присутни во примерокот за анализа во доволна концентрација и во отсуство на интерферирачки супстанции даваат карактеристични обојувања со соодветни реагенси.

Недостатоците на обоените тестови се однесуваат на тоа што во примерокот може да се содржат и други соединенија со слични функционални групи како и отровот, други метаболити или онечистувања, субјективноста при толкувањето на бојата, варирање на интензитетот на обојувањето, нестабилност на бојата во текот на анализата и сл. Обоените тестови се изведуваат во стаклени епрувети или во порцелански плочи со вдлабнати бунарчиња и униформна позадина која овозможува лесно споредување, дури и кога се аплицира мало количество на примерок (слика 2).



Слика 2. Пример за обоен тест (во епрувета)

При изведување на обоени тестови, задолжително со тест-примерокот се анализираат и контролни проби:

а) слепа проба - соодветна проба за која се знае дека не ја содржи супстанцијата од интерес (ако тестот се изведува со урина, тогаш урина се користи за контролна проба, а во другите случаи се користи дестилирана вода).

б) позитивна контролна проба - која содржи соодветна концентрација од анализираната супстанција.

Овие тестови најчесто се изведуваат на урина како примерок (на пример, докажување на аспирин), но може и во други примероци како што се желудочна содржина и во остатоците најдени на местото на труење (на пример определување на хлорати, оксидирачки агенси, феро- и фери јони).

➤ Токсиколошки скрининг со помош на хроматографски техники

А) Тенкослојна хроматографија (TLC)

Основниот принцип на TLC е движење со помош на капиларните сили на течна фаза (обично органски растворувач) низ тенка, униформирани стационарна фаза (обично SiO_2 , силика гел) нанесена врз цврст или полуцврст носач вообичаено стакло, алуминиумски или пластични плочи. Компонентите од примерокот се разделуваат со распределба меѓу мобилна и стационарна фаза.

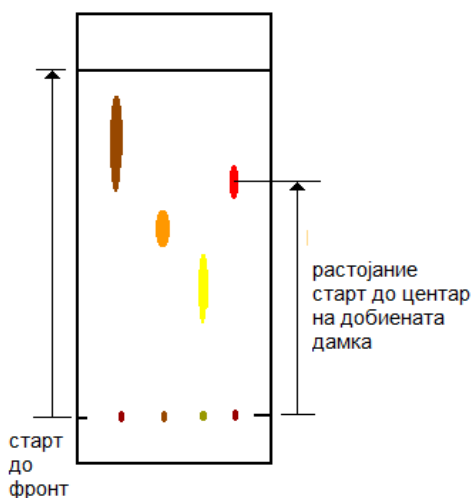
Техниката на тенкослојна хроматографија (TLC) најчесто се користи за анализа на присуство на ксенобиотици во примероци од урина и желудочна содржина. Примероците на желудочна содржина се прочистуваат пред екстракција со органски растворувачи. Доколку содржат диспергирани честички, тие се отстрануваат од желудочната содржина со центрифугирање или филтрирање. По извршената екстракција, се врши повторно прочистување на екстрактот со реекстракција со органски растворувач при што се отстрануваат и масите присутни во примерокот, а кои може да интерферираат при анализата. TLC на компоненти екстрахирани од урина, желудочна содржина или други биолошки материјали е основна квалитативна (скрининг) техника за присутни лекови (но и други отрови) во материјалот за анализа, која истовремено може да служи и како семиквантитативна техника, на пример, при определување на кумаринови антикоагуланси.

Разработени се многу TLC методи, кои користат различни стационарни и мобилни фази. Најчесто користена мобилна фаза е смесата хлороформ-метанол (9:1 v/v), иако во некои држави употребата на хлороформот е заменета со употреба на помалку токсичниот дихлорметан. Често користена мобилна фаза е и ЕМА, етилацетат:метанол:ацетон. При извршување на токсиколошките анализи, препорачливо е да се користат минимум две различни мобилни фази, со цел да се изврши подобра сепарација на компонентите. Најчесто користена стационарна фаза е силикагелот (силициум оксид – SiO₂), нанесен како адсорбент на плочи со димензии 20cm x 20cm или помали, кој е обложен со слој на флуоресцентен индикатор. За токсиколошки скрининг се употребуваат и комерцијални китови (пример, Toxilab), кои содржат индивидуални стандарди на супстанциите кои се причинители на труењата, како и на нивните метаболити.

TLC резултатите обично се изразуваат како ретенционен фактор *R_f*.

$$R_f = \frac{\text{растојание од почетокот/стартот/ до примерокот /аналитот/}}{\text{растојание од почетокот до фронтот (на растворувачот)}}$$

Многу фактори влијаат врз репродукцибилноста на *R_f* (слика 3): самата TLC плоча, количината примерок која е нанесена, должината/времето на развивање, степенот на заситеност во комората, амбиенталната температура и сл. Влијанието на овие фактори може да се минимизира ако заедно со примерокот се анализираат и стандарди.



Слика 3. Развиен хроматограм

Б) Гас-хроматографски (GC) скрининг техники

- Гас-хроматографски скрининг на алкохоли и други испарливи супстанции

При вообичаените анализи за квантитативно определување, препорачливо е определувањето на алкохолите кои се лесно испарливи како метанол, етанол, ацетон и пропан-2-ол, да се врши одделно од определувањето на вишите алкохоли (*i*-бутанол, *n*-бутанол, *i*-амил алкохол, *n*-бутанол), трихлоретанолот и метаболитите на гама хидрокси маслената киселина (GHB). Меѓутоа, при вршење на скрининг,

возможно е да се детектираат и сите наведени супстанции со употреба на два различни температурни програми во методот.

- Гас-хроматографски скрининг на лекови

Гасната хроматографија со употреба на капиларни колони и азот-фосфор детектор (NPD) или со детектор „фаќач на електрони“ (ECD), поврзани во серија претставуваат моќен скрининг систем, кој е доволно чувствителен да ги детектира бараните компоненти во ниски концентрации, кои се изолирани од мали волумени на серум, плазма или полна крв за анализа. Повисока селективност и специфичност, се постигнува при употреба на гасен хроматограф поврзан со масен спектрометар.

В) HPLC скрининг со употреба на систематска токсиколошка процедура за идентификација (Systematic Toxicological Identification Procedure – STIP)

Систематската токсиколошка процедура за идентификација се темели на употреба на брза и едноставна процедура за екстракција, проследена со употреба на изократска реверзно фазна HPLC и детектор со диоди (DAD). Библиотека со ретенциони времиња и ултравиолетови (UV) спектри на околу 400 супстанции најчесто детектирани како отрови се наоѓа во склоп на софтверот на системот. Недостаток на овој систем е тоа што голем број на супстанции се елуираат помеѓу првата и третата минута, а овој проблем станува уште поизразен кај супстанции кои немаат карактеристичен UV спектар, т.е. чиј UV спектар е под 210 nm. Во овие случаи, потребно е да се изврши нова хроматографска анализа со употреба на нова мобилна фаза и друг програмиран метод.

Во денешно време, во клиничките лаборатории интензивирани е примената на течната хроматографија со употреба на масен детектор (Triple Quadrupole Mass Spectrometric Detection – HPLC/MS/MS). Големата чувствителност на оваа техника, ја поедноставува и постапката на екстракција и претходната обработка на примерокот, при што наместо примена на долги аналитички постапки на екстракција, реекстракција и прочистување, за изолација на компонентите што се анализираат се користат едноставни постапки, кои вклучуваат разредување на примерокот што се анализира (плазма, серум) со смеса на органски растворувачи (ацетонитрил/метанол) во која се додава интересен стандард. На овој начин, се врши истовремено исталожување на протеините и екстракција на бараните аналити и нивните метаболити. Времетраењето на хроматографската анализа изнесува просечно 5-7 минути. Предноста на LC/MS/MS системот во однос на конвенционалниот LC/MS систем, се состои во можноста за изведување на брз скрининг тест на повеќе супстанции (лекови, дроги и нивните метаболити) со избирање на нивните маси и масите на судир (collision masses), при што за време од 10 минути, може да се исклучи или потврди присуството на серија на аналити. Во областа на форензичката и клиничката токсикологија, LC/MS/MS системите имаат предност во однос на конвенционалните LC/MS системи во однос на можноста за изведување на TDM скрининг. Се смета дека во наредната деценија, во клиничко-токсиколошките лаборатории ќе се заменат HPLC системите со DAD (diode array detector), FI (флуоресцентен детектор) и други детектори со 1 или 2 LC/MS/MS инструменти.

- Имунолошки (Immunoassay) техники

Овие техники даваат брзи квалитативни резултати и во некои случаи и полу-квантитативни резултати за разни супстанции или група на супстанции присутни во примерокот за анализа (најчесто во крв). Кога се работи со овие техники при толкување на резултатите секогаш треба да се има предвид нивната ограничена чувствителност и селективност. Болничките лаборатории кои вршат токсиколошки мониторинг на лекови и дроги (Therapeutic Drug Monitoring -TDM), треба да ги

поседуваат овие техники, како дел од постапката на вршење на рутинските токсиколошки испитувања.

Во групата на комерцијално достапни имуноесејски техники спаѓаат:

1. Флуоресцентно-поларизациони имуно-техники (Fluorescence Polarization Immunoassay (FPIA));
2. Мултипни ензимски имуно-техники (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique (EMIT));
3. Радиоимунолошки испитувања (Radioimmunoassay (RIA));
4. Ензимски поврзани имуносорбентни тестови (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA)).

3. БИОЛОШКИ МАТЕРИЈАЛИ КОИ СЕ КОРИСТАТ ВО КЛИНИЧКО-ТОКСИКОЛОШКИТЕ АНАЛИЗИ

Под земање примерок од биолошки материјал се подразбира земање примерок од човек или животно, додека растителните материјали спаѓаат во примероци храна или примероци од околната средина.

За да се земе соодветно биолошки материјал треба да се познаваат основите на токсикокинетиката на отровот на чија присутност се сомневаме во биолошкиот материјал. При изборот на биолошкиот материјал неопходно е да се избере вистинскиот примерок за анализа врз основа на токсикокинетички податоци за него и притоа тој треба правилно да се подготви. Во токсикологијата се користат различни материјали, а во 98% од случаите тоа се: урина, крв и желудочна содржина, иако во одредени околности за анализа можат да послужат и влакна, млеко и други телесни течности, односно екскрети. Во судската медицина и експерименталната токсикологија важни примероци се и ткивата кои мораат правилно да се земат за анализа. Нивното правилно земање и нивната обработка зависи од токсикокинетичките податоци за отровот на кој се сомневаме дека ја предизвикал смртта на лицето или животното. Во такви случаи, при земање примерок на ткиво за патолошки анализи, важна е улогата на патологот.

Во поголем дел од случаите во токсикологијата најпогодно е да се користи урина како примерок за анализа бидејќи концентрацијата на отровот и неговите метаболити се во високи концентрации и можат да се одредат со помалку осетливи методи. Содржината на желудникот е погоден примерок за анализа доколку отровот е земен преку уста, а предностите на овој примерок се високите концентрации на отровот како и фактот дека во истиот примерок нема метаболити на отровот.

Крвта и нејзините елементи се важни при целни анализи (пр. одредување на активноста на ацетилхолин естераза при труење со органофосфорни соединенија) или при кинетичките одредувања каде што крвта е најсоодветен материјал за анализа.

При земањето на биолошки материјал за анализа важно е следното:

- Избор на садот за чување на примерокот;
- Количината на материјалот;
- Добра евиденција и обележување на садот;
- Обработка на материјалот пред испраќање за анализа во лабораторија;
- Заштита на анализата при транспорт и складирање.

Изборот на садот за земање биолошки материјал е важен чекор при земањето на примерокот, особено кај супстанции кои се наоѓаат во траги или можат да стапат во интеракција со сидовите на садот. Садот мора да биде чист и стерилен и соодветен за понатамошната анализа. При земање материјал за анализа на тешки метали мора да се користи сад кој е специфично измиен и проплакнат со редестилирана вода пред сушењето, бидејќи добиениот резултат може да биде погрешен. Доколку при миењето детергентот не се отстрани комплетно од сидовите на садот може да настане хемолиза на крвта што може да пречи кај некои методи за анализа. Погрешни резултати ќе се добијат исто така и кога отровот во поголеми количини ќе се натрупа во еритроцитите (на пр. цијанидите), а мерењата се вршат во плазмата. Нечистите садови можат да пречат и кај хроматографските анализи давајќи несоодветни сигнали. Пластичните садови се произведуваат со додавање т.н. пластификатор во смесата, кој понекогаш заостанува на пластичниот сад. Овој проблем може да биде голем

особено ако се знае дека не секаде има контрола во производството на лабораториските садови. Притоа, пластификаторот може да го прекрие хроматографскиот сигнал од анализот.

Исто така, важно е да се спомене уште еден аспект за чистотата на садот - микробиолошката чистота. Биолошките материјали се добри хранливи подлоги за бактериите и габите, па контаминацијата често предизвикува (посебно при долг транспорт) развој на различни бактерии или мувли (во зависност од рН на примерокот и неговиот состав). На ваквата контаминација посебно се изложени примероците на крв, плазма, серум, како и урина. Примероците на урина можат лесно да се контаминираат при неправилното земање на примерокот. Бактериите и габичките можат значително да го променат примерокот поради способноста за излучување токсини кои може да влијаат на составот на примерокот (на пр. да ја променат рН на средината), со што се намалува стабилноста на анализот. За да се спречи ваквата контаминација, во примерокот понекогаш се додаваат конзерванси, иако многу посоодветен метод е транспортот или складирањето на примерокот да се врши на ниска температура.

Количината на материјалот за анализа обично е предмет на дискусија, во зависност од тоа кој материјал го употребуваме. Оние примероци кои се полесни за земање како на пример урината или желудочниот сок, може да се земат во поголеми количини, додека за испитувања на крвта потребна е најмалку една епрувета од 10 mL.

Од токсиколошко-кинетичко гледиште важни се: точните податоци за времето на земање на примерокот во однос на внесувањето на отровот, начинот на обработка на материјалот за анализа, евентуалната количина на материјал од која е земен примерокот, како и податоците за лицето од кое е земен примерокот.

Најважни примероци од биолошки материјал за токсиколошки анализи се: крв, урина и желудочен сок. Во одредени случаи се користат и други биолошки материјали како на пример: делови од органи (особено во биолошки експерименти и судска медицина), влакна (за докажување на хронична изложеност на некои отрови), мајчино млеко (при проценка на изложеност на детето на отрови кои се акумулирале кај мајката), итн.

При дијагностицирање на причината за труење најчесто употребуван примерок е урината. Отровот и/или неговите метаболити во урината се застапени во поголеми концентрации отколку во крвта. Проблем се јавува доколку поголем дел од отровот не се излучува во урината на пр. при акутни оштетувања на бубрезите што предизвикува намалена концентрација на отровот во урината. Меѓутоа, од концентрацијата на отровот во урината не може да се заклучи колкава е неговата концентрација во крвта. Желудочната содржина понекогаш се употребува за дијагностицирање на причината за труењето, бидејќи во него не се содржат метаболитите на отровот и концентрацијата на отровот овде е висока, доколку не поминало подолго време од времето на ингестија. Недостаток при оваа дијагноза е тоа што желудочниот сок не дава податок за тоа дали отровот е веќе навлезен во крвотокот. Примероците на крв се најважни при дијагностицирање на степенот на труењето или за следење на ефикасноста на терапијата. Недостатокот при користење на овој примерок е ниската концентрација на отровите во однос на нивната концентрација во урината и желудочната содржина, па затоа се потребни поспецифични методи за нивно определување. По правило крвта поретко се употребува за дијагностицирање на отрови во примерок. Другите биолошки материјали имаат свое место во посебни случаи.

➤ Крв, серум и плазма

Крвта од пациентот може да се земе релативно лесно, а добиените аналитички резултати се во корелација со здравствената состојба на пациентот и може да се употребат за фармакокинетски и токсикокинетски пресметувања. Крв со волумен од 10 mL (по земањето во епруветата со крв се додава антикоагуланс- најчесто EDTA – етилендиамин тетраоцетна киселина) или 10 mL коагулирана крв, лесно може да се земат од возрасни лица при прием во болница. Од деца се зема пропорционално помал волумен на крв. Повеќето од квантитативните испитувања се вршат во плазма и серум. Антикоагулираната полна крв е значајна како матрикс доколку отровот е поврзан со функцијата на еритроцитите како во случајот на труење со: јаглерод моноксид, цијаниди, олово, жива. За анализа, може да се употреби и серум од антикоагулирана крв, иако концентрациите на испитуваниот отров во серумот се еднакви со вредностите добиени во плазмата. Серумот како матрикс за испитување има предност, во однос на тоа што во серумот не се присутни потенцијални интерференции од присуството на адитиви како антикоагулансите на пример. Во случај на труење со етанол, се препорачува земање на 2 mL крв во епрувети со флуорид/оксалат. Гази или памук за дезинфекција на кожата кои содржат алкохол (етанол, пропан-2-ол) или јоден раствор, не смеат да се користат за дезинфекција на кожата пред венопункцијата од причини што може да го контаминираат примерокот. Венопункцијата на крв со игла, може во некои случаи да предизвика хемолиза на еритроцитите и да влијае на точноста на резултатите, кои се добиваат за вредностите на серумското железо и калиум. Современите епрувети за земање на крв содржат слој од гел за одвојување. Меѓутоа пак гелот, може да изврши адсорпција на некои лекови (на пример, трициклични антидепресиви) или да испушти органски растворувач (толуен), кој влегува во неговиот состав на што исто така треба да се внимава при толкување на резултатите од направената клиничко-токсиколошка анализа.

➤ Урина

Урината содржи вообичаено повисоки концентрации на лекови, отрови и нивни метаболити отколку крвта и од овие причини претставува идеален матрикс за квалитативен скрининг. Во случаи на итност, кога пациентот е во несвесна состојба, урината се зема со помош на катетер. Волумен од 25-50 mL е доволен за повеќето видови анализи.

Кога примерокот урина се зема за форензичко испитување, донорот може да биде мотивиран да даде лажен (чист) примерок. Во оваа ситуација, уринирањето треба да се изврши под надзор на овластено лице. Најчест начин за фалсификување примерок урина е разредување со чешмена вода или подметнување нечиј друг примерок (пример, испитување на ниво на алкохол во урина). 20 или повеќе милилитри урина треба да се соберат во пластична чаша наменета за оваа цел. Примерокот треба добро да се запечати и соодветно да се обележи:

- име на субјектот;
- датум и време на земањето примерок;
- иницијали на присутното овластено службено лице.

Ако примерокот урина се транспортира, примарната опаковка (пластична чаша) треба да се запечати во пластична ќеса која треба да оневозможи какво било истекување. Ако ова се направи соодветно, оваа пластична ќеса ќе биде секундарна опаковка која ќе овозможи дури и во случај на истекување, примерокот да може да се анализира. Внатре во пластичната ќеса не смее да се поставува никаква хартија и етикети за обележување.

➤ Желудочна содржина

Примерокот од желудочна содржина вклучува: повратени маси и течност која се добива при испирање на желудникот. Испирањето на желудникот не се користи често во рутинските процедури на лекување, но при изведување на процедурата на испирање, од особена важност е да се собере првиот примерок од испирањето. Ако овој примерок се собере непосредно по предозирањето, постои веројатност во него да се препознаат дури и неразградените таблети или капсули, како и карактеристичниот (својствен) мирис на одредени супстанции. Желудочната содржина, при вршење на токсиколошкиот скрининг, може да се користи како замена за урина и е поволен матрикс за идентификација на отрови кои потекнуваат од растенија и габи, како и за други отрови кои тешко се детектираат во крв и урина.

➤ Плунка и (или) орални секрети

Постои растечки интерес за користење на плунката како алтернативен, неинвазивен тест-примерок, кој се користи во клиничката токсикологија. Овој матрикс се користи за определување на присуство на кофеин кај новороденчиња и како помошен тест при детекцијата на наркотици.

➤ Други видови матрикси

Мекониум претставува темно-зелениот леплив екскрет (фецес) на новороденчињата и често се користи за анализа наркотици и други недозволените супстанции во случај да постои сомневање дека мајката ги користела за време на бременоста.

4. ПРОТОКОЛИ ЗА ДЕТЕКЦИЈА И ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА ИЗБРАНИ ГРУПИ ОТРОВИ

4.1. Квалитативна анализа на избрани отрови со обоени тестови

Обоените тестови овозможуваат брза и лесна идентификација на многу супстанции кои во повисоки концентрации и во отсуство на интерферирачки компоненти даваат карактеристично обојување при реакција со соодветни реагенси. Подолу во текстот се наведени специфични обоени реакции за идентификација на избрани токсични супстанции. Да се изведат долунаведените обоени реакции во чисти стаклени епрувети и да се коментираат добиените резултати.

Табела 9. Примери за обоени реакции за детектирање на присуство на определени лекови и други отрови

Соединение кое се докажува	Тест	Постапка	Позитивен резултат
Салицилна киселина/ Ацетил салицилна киселина)	Trinder – ов тест	Се додава Trinder – ов реагенс 100 μ L во 2 mL урина и се меша 5 сек.	Виолетова боја
Фенотиазини	FPN - тест	Се додава 1 mL FPN-реагенс на 1 mL примерок и се меша 5 сек.	Бојата се менува од розева, портокалова, виолетова или сина
Импипрамин и слични соединенија	Forrest – тест	Се додава 1 mL Forrest-ов реагенс на 0,5 mL примерок и се меша 5 сек.	Жолто-зелена боја
Трихлоро и тетрачлоро соединенија (хлоралхидрат, јаглерод тетрачлорид, хлороформ, трихлоретилен)	Fujiwara – тест	Тестот се изведува во 3 тест-епрувети: 1 – примерок; 2 – вода (слепа проба); 3 – раствор на трихлороцетна киселина. Во сите се додава 1 mL NaOH и 1 mL пиридин, се меша и се загрева на водена бања 2 мин.	Интензивна црвено-пурпурна боја
Парацетамол	Фенацетин–о крезол/ амонијачен тест	Се додава 0,5 mL conc.HCl на 0,5 mL примерок, се загрева на водена бања 1 мин и се лади. Се додава 1 mL о-крезол и 2 mL амониум хидроксид и се меша 5 сек.	Темно-сина до црна боја
Паракват, Дикват	Дитионит – тест	Се додава 5 mL амониум хидроксид на 1 mL тест-раствор, се меша 5 сек. и се додава 2 mg раствор Na-дитионит.	Паракват – сина до сино-црна боја Дикват – жолто-зелена боја
Етанол и други радуцирачки	Дихромат тест	Се додава калиум дихромат на парче	Зелена боја

испарливи соединенија		филтер хартија која се поставува во тест-епруветата со примерокот. Се загрева на водена бања.	
Хлорати и други оксидирачки агенси	Дифениламин тест	Се додава 0,5 mL дифениламин на 0,5 mL примерок.	Силно сино обојување
Феро/фери јон	Ферицијанид/фероцијанид тест	На 50 μ L примерок се додава 10 μ L HCl и 50 μ L ферицијаниден раствор. На други 5 μ L примерок се додава 10 μ L HCl и 5 μ L калиум ферицијаниден раствор.	Син преципитат

4.2. Нитрати

Кај возрасен може да настапи смрт по ингестија на околу 15 g натриумова или калиумова сол. Нитратите се метаболизираат до нитрити во ГИТ. Нитратите се силни оксидациски агенси и методот за детекција со обоена реакција што е даден подолу, ќе детектира исто така и компоненти со слични својства, како бромати, хлорати, хипохлорити, јодати и нитрити.

Квалитативен тест

Соодветен е за примероци во вид на воден раствор, од биолошките материјали соодветен е за желудочна содржина, урина, а исто и анализа на материјали од местото на настанот.

Потребни реагенси

Дифениламин (10 g/L) во концентрирана H_2SO_4 (со релативна густина 1,83).

Протокол за работа

а) Се филтрира (ако е потребно) 5 mL желудочна содржина во стаклена епрувета од 10 mL;

б) Се одмерува 0,5 mL од филтратот во чиста епрувета и бавно се додава 0,5 mL од растворот на дифениламин по ѕидовите на епруветата да се формира слој под слојот на примерокот.

Резултати

Позитивен резултат е интензивната сина боја која се добива веднаш по допирот на двата слоја. Светлосина боја ќе се добие од повеќето примероци од желудочна содржина поради присуството на органски материји. Бидејќи сите силни оксидациски агенси силно се редуцираат во биолошките примероци, тестот треба да се изведува веднаш по добивањето на примерокот за анализа.

Чувствителност - нитрати, 10 mg/L.

Тест за потврдување на резултатот

Соодветен е за урина, желудочна содржина и анализа на материјал од местото на настанот.

Реагенси

а) Реагенс сулфаминска киселина: Се меша 1 mL амониум сулфамат (150 g/L) со 1 mL HCl (2 mol/L), свежо подготвени;

б) Воден раствор на имипрамин хидрохлорид (20 g/L);

в) H₂SO₄ (со релативна густина 1,83).

Протокол за работа

а) Се меша 0,1 mL од растворот за анализа со 0,1 mL реагенс сулфаминска киселина;

б) Кон 0,1 mL од растворот на имипрамин хидрохлорид, внимателно се додава 0,2 mL конц. H₂SO₄ по ѕидовите на епруветата за да се формира слој под слојот на пробата.

Резултати

Интензивната сина боја која се добива на допирниот слој ги потврдува нитратите. Реагенсот сулфаминска киселина се употребува за да ги отстрани евентуално присутните нитрити пред анализата.

Чувствителност - нитрати, 50 mg/L.

4.3. Етанол (Етил алкохол; C₂H₅OH)

Акутно троење со етанол е многу честа појава во клиничката пракса и најчесто е резултат на ингестијата на алкохолни пијалоци. Троењето со технички алкохол (метил алкохол) исто така е често среќавано во клиничката пракса. Квалитативниот тест опишан подолу ќе ги детектира испарливите редуцирачки агенци, меѓу кои е и етанолот.

Квантитативниот тест се базира на оксидацијата на етанолот до ацеталдехид под дејство на алкохолдехидрогеназата (ADH) во присуство на NAD и тој е применлив на полна крв; во случај да се користи плазма или серум, протеинската преципитација со перхлорна киселина не се прави. Постојат фирми-производители на готови кит реагенси за етанол кои се базираат на оваа реакција.

Квалитативен тест – обоена реакција

Соодветен е за примероци во воден раствор, од биолошки материјал соодветен е за урина и желудочна содржина.

Реагенси

Раствор на калиум дихромат (25 g/L) во воден раствор на H₂SO₄ (500 ml/L).

Протокол за работа

а) Се става 50 µL од растворот на калиум дихромат на лента од фиберглас филтер хартија и хартијата се става во отворот на тест-епрувета која содржи 1mL од примерокот за анализа;

б) Епруветата лабаво се затвора и се става на загреана водена бања околу 2 мин.

Резултати

Промената на бојата од портокалова во зелена индицира присуство на испарливи редуцирачки агенси како етанол. Метилалдехид, метанол и паралдехид исто така ќе дадат позитивна реакција.

Чувствителност - етанол, 0,5 g/L.

Алкохол дехидрогеназен тест за определување на етанол во крв

Овој квантитативен тест се темели на реакцијата на оксидација на етанолот до ацеталдехид под дејство на ензимот алкохолдехидрогеназа (ADH) во присуство на никотинамидаденин-динуклеотид (NAD) и се користи за анализи во примероци серум и плазма. Неколку вида на комерцијални тестови на ADH, се присутни на пазарот. Овој тест може да се изведува како рутински тест во клиничко-токсиколошката анализа. Пропан-2-ол и другите виши алкохоли, исто така може да вршат редукција на NAD и да дадат позитивен резултат. Метанолот и ацетонот, не реагираат со NAD и не даваат позитивен резултат. Од овие причини (можност за добивање на лажно позитивен резултат), техниката на гасна хроматографија е најсоодветен избор, при анализа на етанол во биолошки матрикси.

4.4. Хипохлорити

Хипохлоритите, како што е NaOCl и Ca(OCl)₂ се широко користени како избелувачи и дезинфектанти. Избелувачите кои се користат како средства за чистење во домаќинствата најчесто се 30-60 g/L водени раствори на NaOCl, но, исто така, може да се користат и повисоки концентрации од 200 g/L, на пример за хлорирање вода во пливачки базени.

Хипохлоритите се силни оксидациски агенси и методот за анализа даден подолу ќе детектира, исто така, и други компоненти со слични својства како бромати, хлорати, јодати, нитрати и нитрити.

Квалитативен тест

Соодветен е за примероци во воден раствор, од биолошки материјал соодветен е за желудочна содржина.

Реагенси

Дифениламин (10 g/L) во конц. H₂SO₄ (со релативна густина 1,83).

Протокол за работа

а) Се филтрира (ако е потребно) 5 mL желудочна содржина во стаклена епрувета од 10 mL;

б) Се одмерува 0,5 mL од филтратот во чиста епрувета и бавно се додава 0,5 mL од растворот на дифениламин по сидовите на епруветата да се формира слој под пробата.

Резултати

Позитивен резултат е интензивната сина боја која се добива веднаш по допирот на двата слоја. Светлосина боја ќе се добие од повеќето примероци од желудочна содржина поради присуството на органски материји. Бидејќи сите силни оксидациски агенси брзо се редуцираат во биолошките примероци, тестот треба да се изведува веднаш по добивањето на примерокот за анализа.

За разлика од другите силни оксидациски агенси, хипохлоритите имаат тенденција да развиваат опоен зелен гас хлорин кога се третираат со конц. H_2SO_4 и ова е уште една потврда дека се работи за хипохлорит.

Чувствителност - Хипохлорит, 10 mg/L.

Тест за потврдување

А) Тест со олово ацетат

Реагенси

- а) Ледена оцетна киселина;
- б) Воден раствор на олово ацетат (50 g/L).

Протокол за работа

а) Додавај капка по капка оцетна киселина кон 1 mL примерок за анализа до pH околу 6 (користи индикаторска хартија);

б) Додади 0,5 mL воден раствор на олово ацетат и загревај до вриење околу 2-3 минути.

Резултати

Добивањето кафеав преципитат го потврдува присуството на хипохлорит. Сулфидите даваат кафеаво-црн преципитат веднаш штом ќе се додаде воден раствор на олово ацетат.

Чувствителност - Хипохлорит, 10 mg/L.

Б) Тест со калиум јодид/скроб

Реагенси

- а) Воден раствор на калиум јодид (100 g/L);
- б) Ледена оцетна киселина;
- в) Скроб (прашок).

Протокол за работа

а) Додади 0,1 mL од примерокот за анализа кон 0,1 mL оцетна киселина, а потоа додади и 0,1 mL од растворот на калиум јодид;

б) Измешај и додади околу 20 mg скроб.

Резултати

Добивањето сина боја ги потврдува хипохлоритите.

4.5. Јод и јодиди

Јодот (I_2) е еден од најстарите антисептици користен во медицината. Се употребува како топичен препарат во вид на алкохолен раствор (тинктура) кој содржи елементарен јод заедно со калиум јодид (KI) или натриум јодид (NaI), кој од своја страна ја менува растворливоста на јодот со формирање на полијодиден јон. Кога јодот се аплицира на кожа или мукозни мембрани се абсорбира како јодид. Квалитативниот тест даден подолу, служи за детекција на присуство на неорганички јодиди или бромиди, а по него треба да се направи и соодветен тест за потврдување.

Квалитативен тест

Соодветен е за примероци во воден раствор, од биолошки материјал соодветен е за урина, желудочна содржина, а исто така и за анализа на материјали од местото на настанот.

Реагенси

- а) Азотна киселина (2 mol/L);
- б) Раствор на сребро нитрат (10 g/L);
- в) Концентриран амониум хидроксид (со релативна густина 0,88).

Метод

а) Додади 0,1 mL азотна киселина кон 1 mL примерок, измешај и додади 0,1 mL раствор на сребро нитрат;

б) Центрифугирај за да се изолира преципитатот и третирај со 0,1 mL раствор на конц. амониум хидроксид.

Резултати

Добивањето на бел преципитат растворлив во амониум хидроксид е индикација за присуство на хлориди, добивањето преципитат со друга боја умерено растворлив во амониум хидроксид е индикација за присуство на бромиди, додека жолт, нерастворлив преципитат, индицира јодиди.

Чувствителност - Јодид, 100 mg/L.

Тест за потврдување

Соодветен е за урина, желудочна содржина и анализа на материјал од местото на настанот.

Реагенси

- а) Хлороводородна киселина (2 mol/L);
- б) Скроб (прашок);
- в) Раствор на натриум нитрит (100 g/L).

Протокол за работа

Измешај со вортекс 0,1 mL раствор од примерокот, околу 20 mg скроб, 0,1 mL HCl и 0,1 mL раствор на натриум нитрит. Синото обојување потврдува присуство на јодиди.

5. КВАЛИТАТИВНА И КВАНТИТАТИВНА АНАЛИЗА НА ИЗБРАНИ ОТРОВИ СО СПЕКТРОФОТОМЕТРИСКИ МЕТОДИ

5.1. Спектрофотометриско определување на фенол со 4-аминоантипирин

Својства на фенол

Фенолот е органска компонента со хемиска формула C_6H_5OH . На собна температура е бела кристална супстанција која се топи на температура над $40\text{ }^\circ\text{C}$. Има силен, карактеристичен мирис. Има својства на слаба киселина, со супституција на Н-атомот од хидроксилната група со атоми на алкални метали дава соли – фенолати.

Употреба на фенол

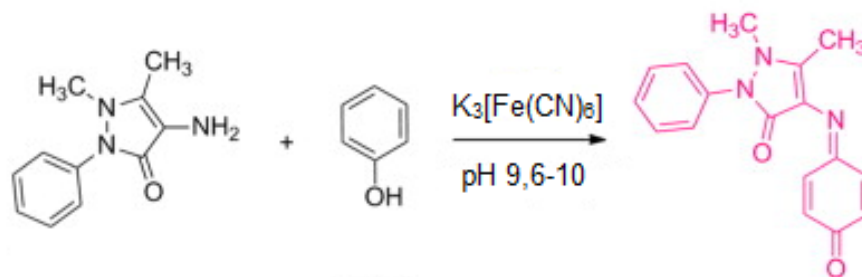
Фенолот има дезинфекциско и антисептично дејство, во минатото се користел како универзален дезинфициенс. Прекурсор е на многу материјали и широко употребувани компоненти. Фенолните компоненти се клучни во синтезата на епоксиди, поликарбонати, бакелит, најлон, пластични маси, детергенти и широк спектар на лекови и хербициди.

Токсичност на фенол

Фенолот е силен невротоксин. Ако се инјектира директно во крвотокот може да доведе до моментална смрт поради блокирање на нервно-трансмисивниот систем. Фенолот и неговите испарувања се иританси и корозивни за очите, кожата и респираторниот тракт. Повторен и долготраен контакт на фенолот со кожата може да предизвика дерматитис, или дури и изгореници од 2 и 3 степен поради неговите каустични својства. Инхалацијата на фенолни пареи може да доведе и до белодробен едем. Супстанцијата може да предизвика штетни ефекти на ЦНС и срцето со појава на дисаритмија, напади и кома. При хронична експозиција, исто така може да бидат засегнати и бубрезите и црниот дроб. Покрај хидрофобниот ефект, друг механизам на токсичност на фенолот е и формирањето на фенокси-радикали. Хемиските изгореници при експозиција на кожата може да бидат деконтаминирани со миење со пропилен гликол или изопропил алкохол. Отстранувањето на контаминираната облека е прва мерка која се презема, а неопходен е и итен болнички третман. Ова е особено важно ако фенолот е измешан со хлороформ (во микстурите кои вообичаено се користат во молекуларната биологија за пречистување на DNA и RNA од протеините).

Принцип на реакцијата

Методот за определување се базира на образувањето на обоено соединение на фенолот (и негови деривати) со 4-аминоантипирин во присуство на калиум (III) хексацитраноферат во алкална средина, при pH интервал од 9,6 до 10. Во дадената реакција, се образува жолто обоено соединение со различен интензитет на бојата во зависност од концентрацијата на фенолот. Спектрофотометриското определување се врши при $\lambda = 510\text{ nm}$.



Слика 4. Механизам на реакцијата на добивање обоено соединение помеѓу фенолот и 4-аминоантипирин

Протокол за работа

Потребни реагенси

1. Амонијачен пуфер: NH_4Cl во 25% NH_3 ($\text{pH}=9,8$);
2. 4-аминоантипирин, 2% раствор;
3. $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 8% раствор;
4. Работен стандарден раствор на фенол бр. 1; 10 g/L (10 mg/1 mL);
5. Работен стандарден раствор на фенол бр. 2; 1 mL од раствор бр. 1 се разредува до 100 mL.

Калибрациона крива

- за фенол до максимум 0,5 mg/mL:

Табела 10. Резултати за калибрациона крива

Р. бр.	V од раствор бр. 2	mg/mL фенол
0 (слепа проба)	/	/
1	1	
2	2	
3	3	
4	4	
5	5	

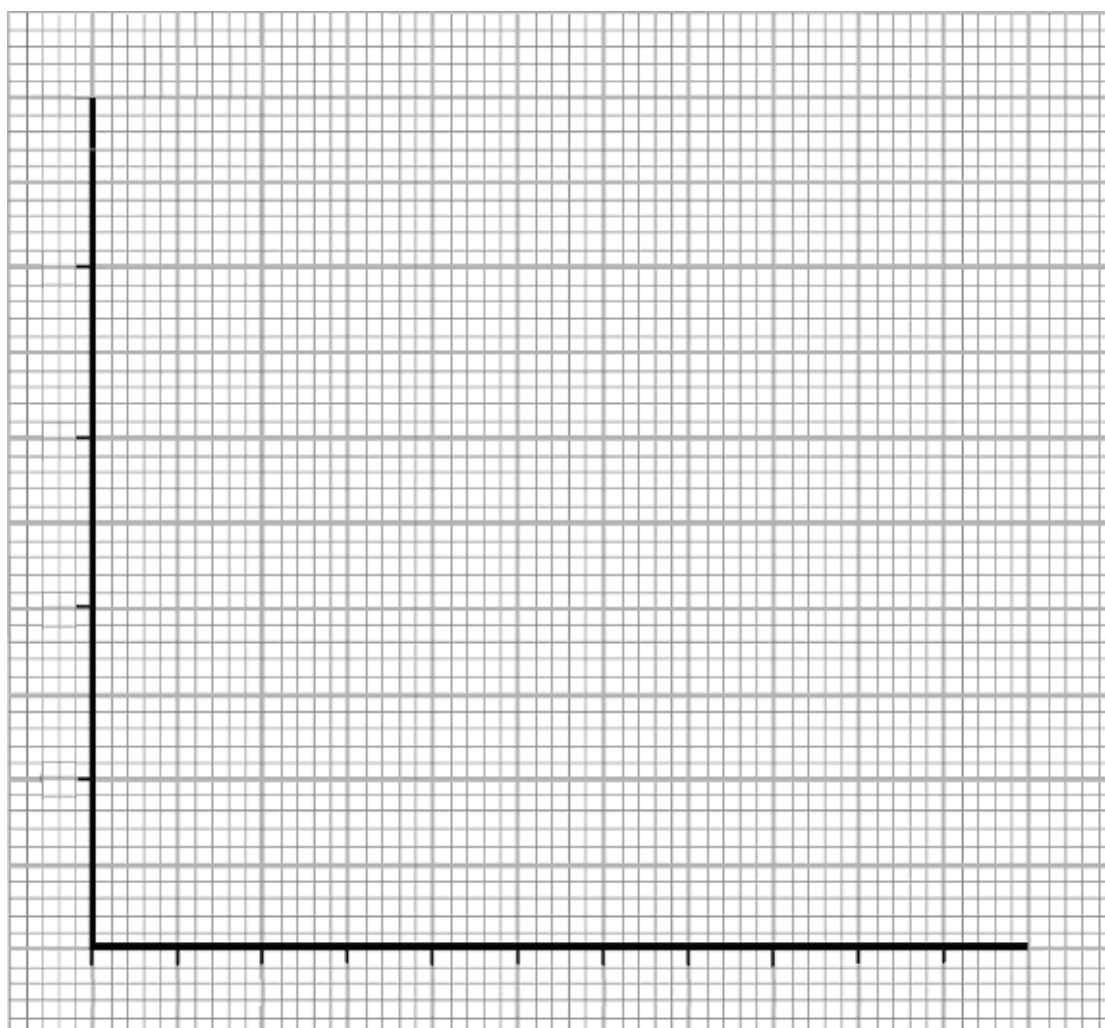
Подготовка на калибрационите раствори и примерокот:

Кон одмереното количество фенол според горната таблица се додава 0,5 mL пуфер, 2 mL 4-аминоантипирин и 2 mL калиум (III) хексацијаноферат. Се дополнува со A. destilata до 100 mL. Се определува апсорбанца при $\lambda = 510 \text{ nm}$. Содржината на фенолот во примерокот за анализа се определува од калибрационата крива која графички се претставува.

Табела 11. Добиени резултати од СФМ определување на фенол

Раствор	mL фенол	ABS
0 (слепа проба)	0	
1	1	
2	2	
3	3	
4	4	
5	5	
Непознат примерок		

- Добиените резултати да се претстават графички и да се определи непознатата содржина на фенол во добиениот примерок за анализа.



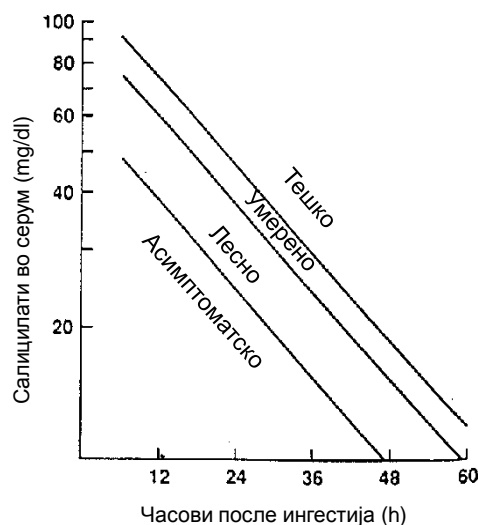
5.2. Спектрофотометриско определување на ацетилсалицилна киселина

Ацетилсалицилната киселина (Аспирин) е дериват на салицилната киселина и се употребува во вид на таблетна фармацевтска форма, самостојно или во комбинација со други НСАИЛ лекови со основна индикација аналгетик, антипиретик, антиинфламаторен лек и дополнително како анти тромботик.

Салицилната киселина, пак, се употребува како кератолитик во дерматолошки препарати или во вид на натриум салицилат за внатрешна употреба. Метил салицилатот е активна компонента на дерматолошки линименти и масти кои се употребуваат надворешно со аналгетско дејство.

Труењето со аспирин и другите салицилати се нарекува салицилизам и може да биде акутно и хронично. Леталната доза на салицилатите е 0,2-0,5 g/kg. Во зависност од временскиот тек на труењето, токсичните дејства се јавуваат при различни плазмени концентрации (слика 5), но обично нема значајни симптоми до концентрации под 30 mg/dL.

Дури и единечно предозирање може да предизвика акутно труење, додека долготрајната употреба на високи дози доведува до хронично труење. Кај акутното предозирање има во просек 2 % случаи кои летално завршуваат, додека хроничното предозирање почесто завршува летално (околу 25 %). Труењето со салицилати е еден од најчесто среќаваните случаи на труења кај деца. Во денешно време поради зголемена безбедност и сигурност на опаковките на лекот, бројот на случајни труења кај деца со аспирин и салицилати е значително намален.



Слика 5. Концентрација на салицилати во серум и очекуван степен на труење во различни временски интервали

Салицилатите во токсични дози директно го стимулираат ЦНС предизвикувајќи хиперпнеја, а зголемената содржина на органски киселини доведува до метаболички нарушувања. Поради хиперпнејата, загубата на CO_2 се компензира со метаболичкото зголемување на органските киселини кои одржуваат рН на крвта блиску до 7,4 кое во некои случаи може и да расте. Поради излучувањето на органските киселини се губат Na^+ и K^+ , се депонираат органски метаболити, се јавува кетоза поради гладувањето и дехидратацијата, што доведува до настанување метаболичка ацидоза, посебно кај деца под 4 години. Ацидемијата ја зголемува

количината на нејонизираната салицилна киселина со што се олеснува нејзиното навлегување во ЦНС. CO_2 , бикарбонатите и рН на крвта прогресивно паѓаат што укажува на неадекватност на пуферскиот капацитет на крвта.

Во терапевтски дози салицилатите ја намалуваат агрегацијата на тромбоцитите доведувајќи до продолжено време на крварење. Во токсични дози, салицилатите пречат на искористувањето на витамин К во црниот дроб и така ја намалуваат содржината на протромбин во плазмата.

Салицилатите се елиминираат преку бубрезите, па при нормална функција на бубрези околу 50% од токсичната доза ќе се излачат во првите 24 h. Екскрецијата ќе биде 3-10 пати побрза ако урината се алкализира.

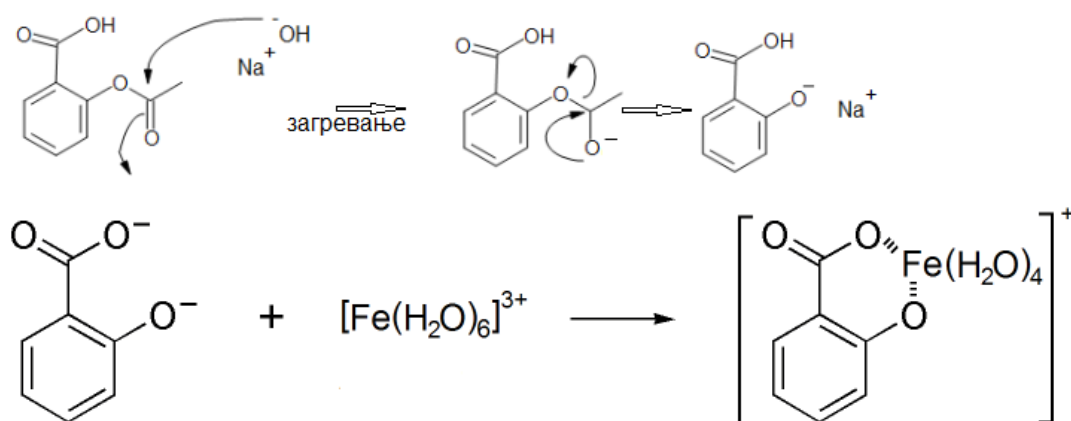
Лабораториска дијагностика на труење со аспирин и други салицилати

- *Обоен тест за присуство на салицилати во примерок урина (Trinder-ов тест).* Тестот е многу чувствителен и при добивање позитивен резултат значи дека пациентот зел салицилати, но не може да се утврди концентрацијата. Треба да се внимава и на можните интерференции (други НСАИЛ, фенотиазини, ацетаминофен и други);
- *Определување на концентрацијата на салицилати во крв.* Нивоата на плазмените салицилати вообичаено се движат во рангот на 30-100 mg/L по терапевтска доза, 50-300 mg/L кај пациенти кои примиле високи дози и 700-1400 mg/L по акутно предозирање со салицилати;
- *Содржина на бикарбонати во крв под 8 mEq/L* покажува значајна ацидоза и нарушување на метаболизмот на јаглехидрати;
- *рН на артериска крв, содржина на хлориди, К и Na во серум, глукоза во крв.*

Основи на спектрофотометриското определување (СФМ) на ацетилсалицилна киселина

При реакција меѓу ацетилсалицилната киселина и железо (III) јонот се формира обоен комплекс. Интензитетот на бојата е директно поврзан со концентрацијата на ацетилсалицилната киселина, па затоа може да се користи спектрофотометрско определување. Потребно е да се направи серија на стандардни раствори од ацетилсалицилна киселина со различни концентрации, се определува нивната апсорбанца и се конструира стандардната крива. Со користење на оваа крива може да се определи непозната концентрација на ацетилсалицилна киселина во примерокот за анализа.

При реакција меѓу ацетилсалицилната киселина и NaOH прво се формира салицилат дианјон, а потоа со додавање на железо (III) јон (кисело рН) се добива виолетов тетрааквосалицилат железо (III) комплекс (слика 6).



Слика 6. Формирање на виолетов комплекс

Цел на вежбата: да се определи непозната концентрација на ацетилсалицилна во примерок

Протокол за работа

Потребни реагенси:

- Ацетилсалицилна киселина;
- 1 M NaOH;
- 0,02 M Железо (III) пуфер (6,48 g FeCl₃ во 2 L 0,1 M HCl).

Подготовка на стандарди

1. Се мери 400 mg ацетилсалицилна киселина во ерленмаер. Се додава 10 mL 1 M NaOH раствор и се загрева до вриење;
2. Растворот се префрла во одмерна колба од 250 mL и се дополнува со A. destilata;
3. Се пипетира 5 mL од овој стандарден раствор на ацетилсалицилна киселина во одмерна колба од 100 mL и се разредува со 0,02 M железно (III) пуфер. Овој раствор се обележува со A;
4. Се подготвуваат серија раствори со 4, 3, 2 и 1 mL од стандардниот раствор на ацетилсалицилна киселина (раствор A) на истиот начин (чекор 3). Овие раствори се обележуваат со B, C, D и E.

Подготовка на слепа проба

1. Слепата проба е растворот од 0,02 M железно (III) пуфер.

Подготовка на примерокот за анализа

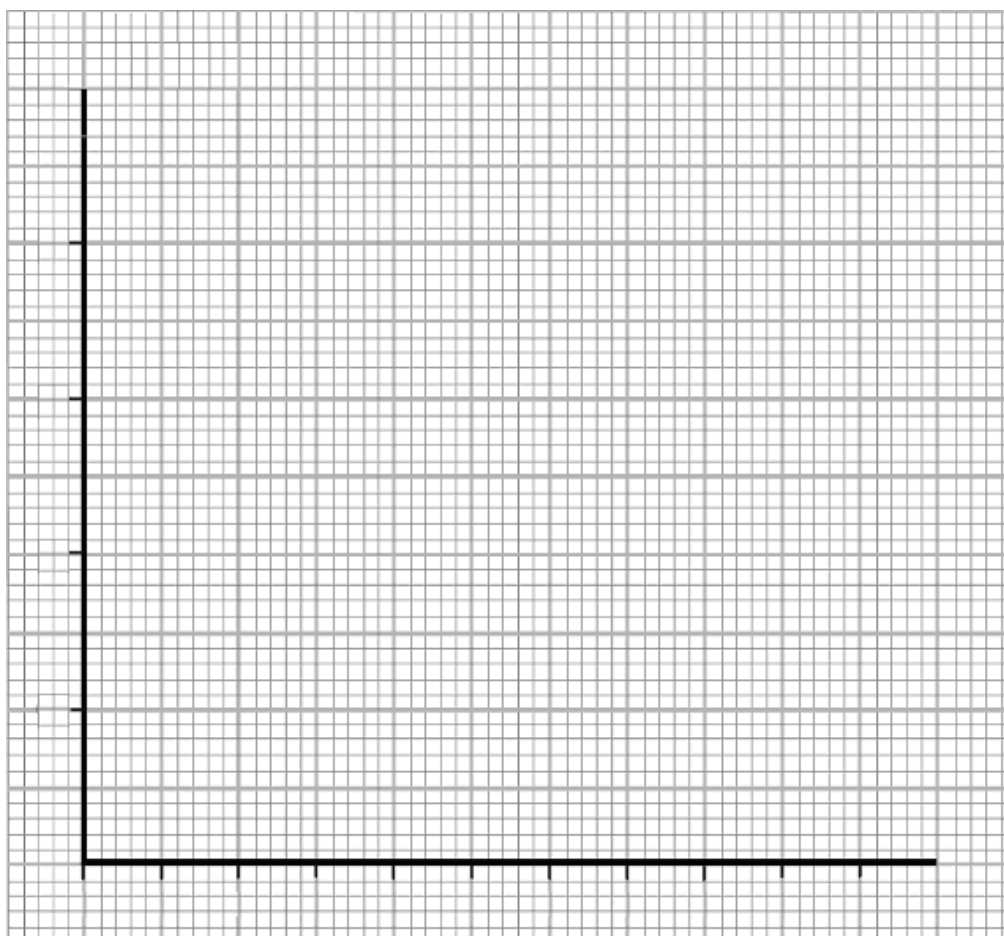
1. Примерокот за анализа треба да биде воден раствор кој содржи ацетилсалицилна киселина со непозната концентрација + чекор 3.

СФМ определување

1. Првата кивета се полни со слепа проба, а втората со раствор А;
2. Се бира бранова должина од 530 nm;
3. Се поставува киветата со слепата проба и се определува ABS;
4. Се поставува киветата со раствор А. Се забележува ABS во табелата подолу;
5. Овој чекор се повторува со растворите В, С, D, Е и примерокот за анализа;
6. Резултатите се претставуваат графички;
7. Се определува непознатата концентрација на ацетилсалицилната киселина во примерокот од графикот според определената ABS.

Табела 12. Добиени резултати од СФМ определување на ацетилсалицилната киселина

Раствор	Концентрација (mg/L)	ABS
A		
B		
C		
D		
E		
Примерок за анализа		



5.3. Спектрофотометриско определување на метали (Cu²⁺, Ni²⁺)

Металите се меѓу најстарите отрови познати на човештвото. Од елементите во периодниот систем околу 80 се метали, а од нив токсични ефекти кај човекот предизвикуваат околу триесетина. Денес, во современата токсикологија се следат концентрациите на металите во животната и работната средина за да може да се преземат соодветни мерки при концентрации кои ги надминуваат дозволените вредности.

Фактори кои влијаат на токсичноста на металите

Интеракција со есенцијалните метали: Кога токсичниот метал има сличен метаболизам со есенцијален метал се зголемува неговата ресорпција (Fe и Cd);

Формирање комплекси метал-протеини: Комплексите со протеините се важни за детоксикацијата на металите (металотионеин); токсичноста е обратнопропорционална со содржината на протеини во храната;

Возраст: Децата и повозрасните лица се поосетливи на токсичните ефекти на металите; децата внесуваат повеќе храна во однос на телесна маса; кај децата металите подобро се ресорбираат во ГИТ (посебно Pb), произразен е и генотоксичниот ефект бидејќи децата побрзо растат, побрза е делбата на клетките, а исто така и нивниот метаболизам;

Лични животни навики;

Хемиски облик на металот: типичен пример е металот жива - метилживата (липосолубилна и добро се раствара во миелинот) и елементарната жива (не се ресорбира во организмот).

Класификација на металите со токсичен ефект

- **Токсични метали:** As, Cr, Cd, Pb, Hg...;
- **Есенцијални метали со потенцијално токсични ефекти:** Cu, Fe, Se;
- **Токсични метали во состав на лекови:** Al, Au, Bi, Li, Pt.

Цел на вежбата

- Да се дискутираат токсичните ефекти на избрани метали за што е потребно студентите да подготват кратки проектни задачи за карактеристиките и токсичноста на бакар, никел, хром, олово, жива;
- Користење на СФМ методи за определување на концентрација на метали;
- Користење графички техники за анализа на податоци.

Иако основни техники за инструментална анализа на металите се ICP и FAAS, бидејќи многу од металните катјони даваат обоени раствори, нивната концентрација може да биде определена и спектрофотометриски во UV/VIS-областа на електромагнетниот спектар.

Експериментална процедура за спектрофотометриско определување на бакар и никел

Протокол на работа

- Се подготвува работен раствор од испитуваните метали од 100 mL 0,1 M раствор на металот (да се види точната формула на металната сол која ќе се користи);
- Измерената супстанција се префрла во одмерна колба од 100 mL која до половина е полна со 0,01 M HNO₃, се додава соодветниот волумен на комплексирачки агенс (10 mL конц. NH₃) и потоа се дополнува со 0,01 M HNO₃ до маркицата.

Се подготвува следната серија стандардни раствори (табела 13):

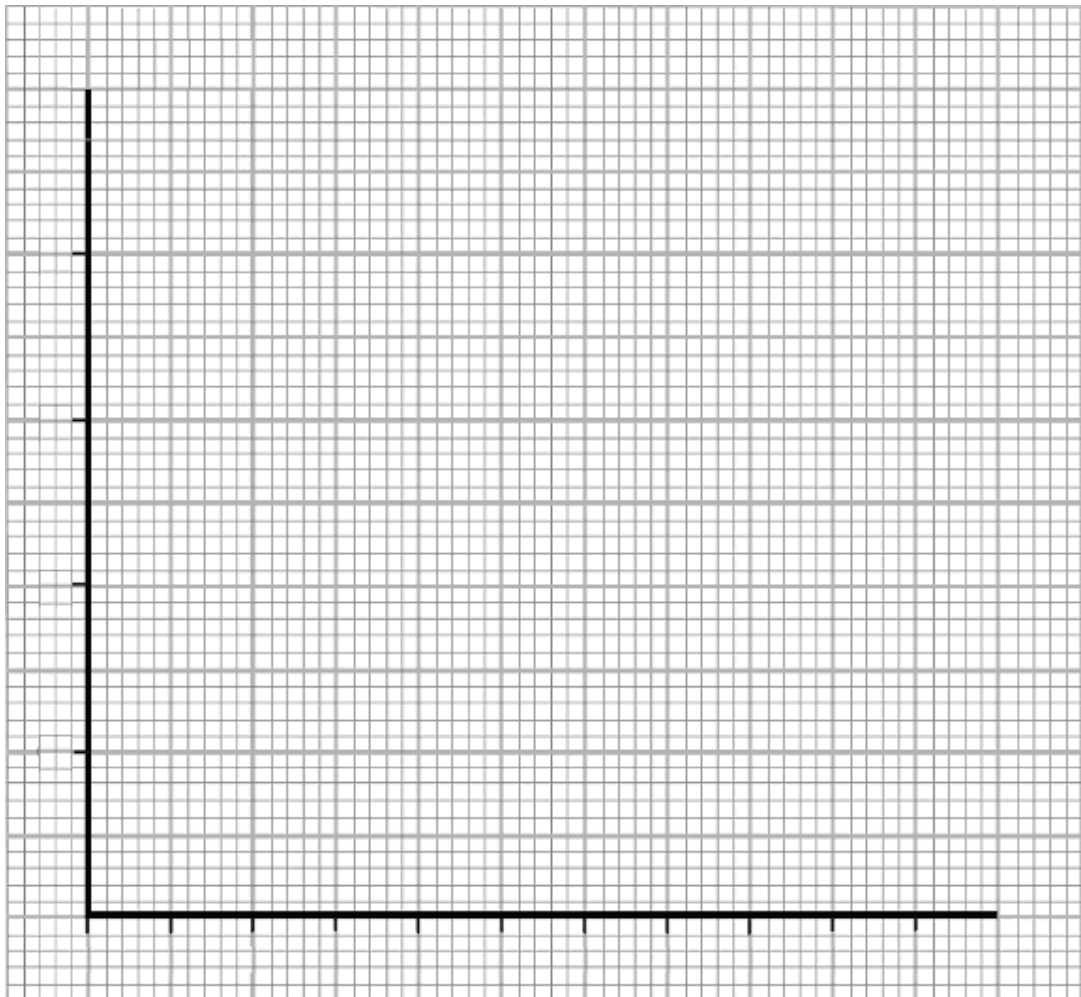
Табела 13. Серија стандардни раствори

Стандарден раствор	0,1 M р-ор на метал (работен раствор)	0,01 M HNO ₃
Слепа проба	0 mL	Се дополнува до 25 mL
1	1 mL	Се дополнува до 25 mL
2	5 mL	Се дополнува до 25 mL
3	10 mL	Се дополнува до 25 mL
4	15 mL	Се дополнува до 25 mL
5	20 mL	Се дополнува до 25 mL

- Да се пресметаат моларните концентрации на металите во соодветните раствори (1-5) за претставување на калибрационата крива. Апсорбанцата на овие раствори треба да биде во рангот < 1,1. Внеси ги резултатите во табела X;
- Апсорбанцата на овие раствори може да се определи на која било бранова должина од видливиот спектар (400-700 nm) во зависност од обојувањето кое го дава металниот катјон. Во случајов на добивање син раствор (бакар, никел) најточни резултати се добиваат на 645-650 nm;
- Се определува апсорбанцата на испитуваниот примерок и од графикот се определува концентрацијата на металот (m/V). Вообичаено концентрацијата на метали се изразува во ppm (mg/L) или други соодветни помали концентрации ppb (µg/L).

Табела 14. Концентрации определени СФМ

Раствор	Cu Концентрација (mg/L)	ABS	Ni Концентрација (mg/L)	ABS
1				
2				
3				
4				
5				
Примерок за анализа				



5.4. Спектрофотометриско определување на нитрити во вода (метод на Griess)

Нитритите и нитратите имаат широка примена, почнувајќи од индустријата за бои па сè до конзервирање на храната.

Формирањето на нитритниот јон е важен чекор во циклусот на азот во природата. Нитрити се формираат во текот на биодеградацијата на домашни или индустриски азотни отпадоци како и од некои видови ѓубрива. Азотните оксиди од воздухот се конвертираат во нитритен јон кој станува компонента на киселите дождови.

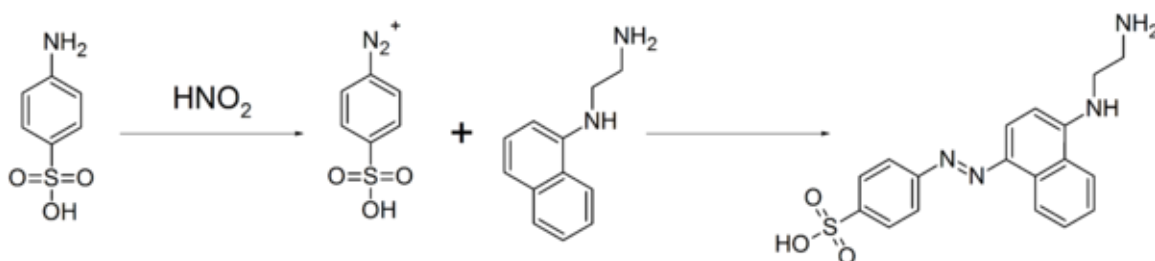
Дејството на нитритниот јон со секундарните амини во човечкото тело доведува до формирање N-нитрозоамини, кои се добропознати канцерогени супстанции.

Нитритите и нитратите присутни во траги во водата за пиење може да предизвикаат формирање метхемоглобин кај децата, а при долготрајна изложеност постои и канцероген ризик, поради што нивната содржина во водата за пиење и во храната е строго регулирана со законски нормативи. Максималниот дозволен лимит на нитрити според U.S. Public Health Association е 0,06 mg/L во водата за пиење. Ако во неа има присуство на нитрити и амонијак тоа е индикација за присуство на бактериска активност и органско загадување.

Метод на Griess

Griess-овиот тест се користи за детектирање присуство на органски нитрити во примерок за анализа. Основа е реакцијата на дијазотирање во која се користи Griess-ов реagens (за прв пат опишан во 1858 год. од Peter Griess). Нитритите се детектираат преку формирање црвено-розовото обојување на растворот при третирање на примерок кој содржи нитрити со Griess-овиот реagens. При додавање на сулфанилната киселина (слика 7), нитритите формираат дијазониум сол. Кога ќе се додаде азо-бојата, N- α -нафтил-етилендиамин, се добива розово обојување. Овој диамин (N- α -нафтил-етилендиамин) во реакцијата се користи наместо оригиналниот реagens α -нафтиламин кој е канцероген и многу повеќе поларен што го прави порастворлив во кисели водени раствори.

Комерцијалниот Griess-ов реagens содржи: 0,2 % N- α -нафтил-етилендиамин дихлорид и 2% сулфаниламид во 5% фосфорна киселина.



Слика 7. Механизам на реакцијата (Griess-ов тест)

Протокол на работа

Потребни реагенси

Griess I: 0,8% раствор на сулфанилна киселина во оцетна киселина

Griess II: 0,5% раствор на α -нафтиламин во оцетна киселина

*Во случај да овие соединенија не се достапни во лабораторијата, како реагенси може да се искористат други хемиски супстанции кои исто така стапуваат во реакција на диазотирање како на пример:

1. Соединенија ароматични амини или кои содржат сулфаматна група (наместо Griess I): 4-аминосалицилна киселина, 4-аминобензоева киселина, 2-нитроанилин, 4-аминобензен, сулфаниламид, сулфатазол и др.;
2. Соединенија фенолни деривати или други ароматични соединенија (наместо Griess II): резорцинол, 1-нафтол, флороглуцинол, хромотропна киселина, 8-хинолинол и др.

СФМ определување

Концентрацијата се определува графички врз основа на определената апсорбанца на примерокот при бранова должина 540-580 nm. Се подготвува серија стандардни раствори на нитрити за конструирање на калибрационата крива (конц. max до 0,05 mg/L).

Калибрациона крива

Се работи во епрувети, кон 6 mL од стандардниот p-op се додава по 125 μ L Griess I и 125 μ L Griess II. (Концентрација на стандарни p-ори: 0,05; 0,025; 0,0125; 0,00625 и 0,00312 mg/L)

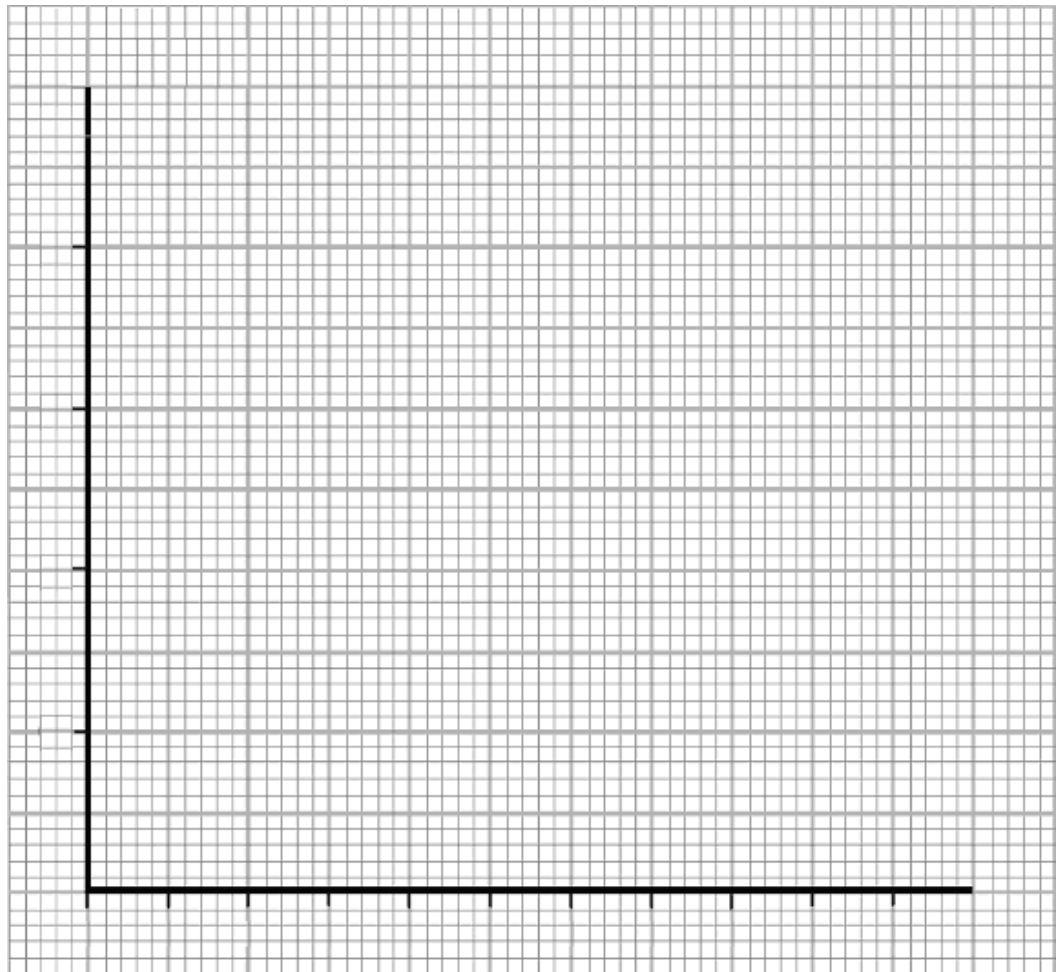
Слепа проба: дејонизирана вода + 125 μ L Griess I и 125 μ L Griess II.

Примерок 1: чешмена вода (6 mL) +125 μ L Griess I и 125 μ L Griess II.

Примерок 2: примерок со непозната конц. нитрити (6 mL) + 125 μ L Griess I и 125 μ L Griess II.

Табела 15. Добиени резултати од СФМ определување на нитрити

Раствор	Концентрација (mg/L)	ABS
1		
2		
3		
4		
5		
Примерок чешмена вода		
Примерок со непозната концентрација на нитрити		



6. КВАЛИТАТИВНА АНАЛИЗА НА ИЗБРАНИ ОТРОВИ СО ТЕНКОСЛОЈНА ХРОМАТОГРАФИЈА (TLC)

6.1. TLC за идентификација на аналгетици

Тенкослојната хроматографија (TLC) е лесен, брз и прецизен начин за определување на бројот и идентификација на компоненти во смеси. Во овој случај ќе се користи TLC за идентификација на активните супстанции во различни аналгетици во форма на таблети (препарати кои се издаваат без рецепт - OTC). Во таблетите може да се содржат некои од супстанциите: ацетилсалицилна киселина, парацетамол (ацетаминофен), ибупрофен, аналгин или кофеин. Дополнително може да се анализира и примерок кој содржи салицилна киселина или метил салицилат во препарати за надворешна употреба (масти). Да се споредат добиените хроматограми. Додека TLC плочата се развива и по развивањето, овие компоненти не се видливи. Позициите може да се детектираат под UV светлина или со експозиција на хроматографската плоча на јодни пари.

Протокол за работа

Потребни реагенси и хемикалии

- Метанол;
- Етил ацетат;
- Оцетна киселина (ледена);
- Комерцијални таблети кои ги содржат наведените супстанции (Аспирин, Парацетамол, Далерон, Кафетин (содржи парацетамол 250 mg, пропифеназон 210 mg, кодеин 10 mg и кофеин 50 mg), Бруфен или други комерцијални препарати кои ги содржат).

Стационарна фаза

TLC плочи со силика гел

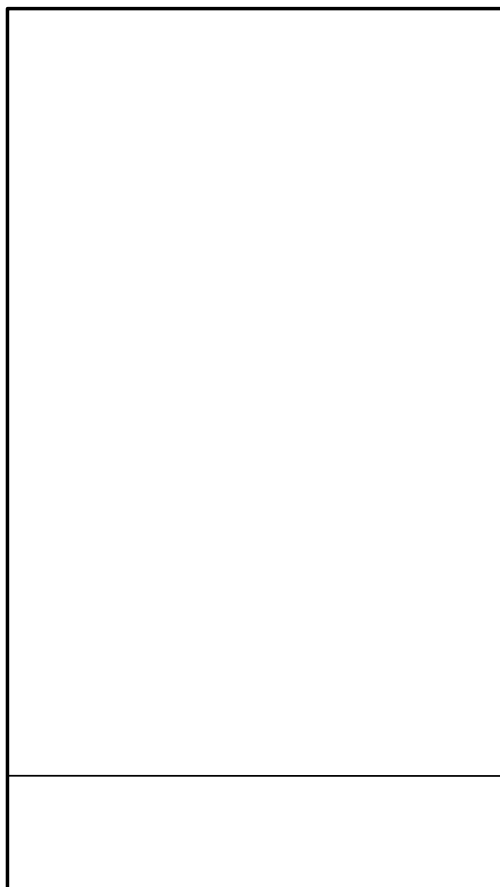
Мобилна фаза

Етил ацетат/оцетна киселина = 99:1

Постапка

Секој од примероците таблети од различен аналгетик се хомогенизира и се раствора во мало количество метанол (да се има предвид дека целото количество од таблетата нема да се раствори заради содржината на различни ексципиенси, полнителни и додатоци во таблетата). Од секој примерок со капилара внимателно се нанесува на претходно приготвената TLC плоча. Плочата се поставува во комората за развивање во која веќе претходно е поставена мобилната фаза. Внимателно се следи движењето на растворувачот (за цело време на развивањето примероците не се видливи). Плочата се вади од комората, се остава да се исуши (во дигестор), и се пристапува кон визуелизација. Визуелизацијата може да се изврши со UV-лампа или со експозиција на јодни пари (комора во која се оставени да испаруваат кристали од I₂) за време од 10-15 минути. Со молив се обележуваат позициите на компонентите.

- Определи ги R_f вредностите на сите компоненти;
- Нацртај го добиениот хроматограм (слика 8);
- Идентификувај ја непознатата компонента во твојот примерок во споредба со R_f вредностите на стандарди.



Слика 8. Добиен хроматограм по тенкослојна сепарација на испитуваните аналгетици

6.2. Квалитативно определување на алкалоиди во урина со тенкослојна хроматографија

Алкалоидите се органски соединенија од растително потекло кои содржат C, H, N, а некои од нив дополнително и O и S во молекулата. Имаат базен карактер, а во растенијата се наоѓаат врзани со органски киселини во облик на соли, од каде што може да се направи екстракција со јака база. Алкалоидите се со големо токсиколошко значење бидејќи се силно токсични, но исто така се тешки и за детекција во материјалите за анализа (само мала концентрација е доволна да предизвика тешко труење, а и молекулата брзо се трансформира со метаболизирање). Алкалоидите може да покажат и хронична и акутна токсичност. Симптомите кои се развиваат при труење со алкалоиди се многу карактеристични за различните групи (тропански, пурински, пиролизидински, фенантренски) и може лесно да бидат забележани. Третманот на труење со алкалоиди се состои во испирање на желудник, предизвикување на повраќање, антидот – танини и други помошни мерки.

Квалитативното определување на алкалоиди со TLC се заснова на нивните својства да се распределуваат во хроматографски систем кој се состои од стационарна фаза и мобилна фаза. Бидејќи во урината алкалоидите се наоѓаат во вид на конјугати, урината се закиселува со разредена H_2SO_4 или HCl за да се преведат алкалоидите во соли, а потоа се додава $(NH_4)_2SO_4$ до заситување. Од филтратот со етер се екстрахираат киселите и неутралните компоненти присутни во анализата, а алкалоидите како базни компоненти се задржуваат во водениот слој. Водениот слој понатаму се алкализира со амонијак за да се ослободат алкалоидите и истите се екстрахираат со етер. Упарениот етерски екстракт се раствора во алкохол и се аплицираат петна на хроматографската плоча. После развивање на плочата во претходно подготвена мобилна фаза, се врши хемиска детекција со помош на хромоген реагенс, 0.1% етанолен раствор на нинхидрин, сушење и повторно прскање со Dragendorf-ов реагенс. Идентификација на непознатите алкалоиди се врши со споредба на петната добиени од анализата со петната добиени од стандардните раствори.

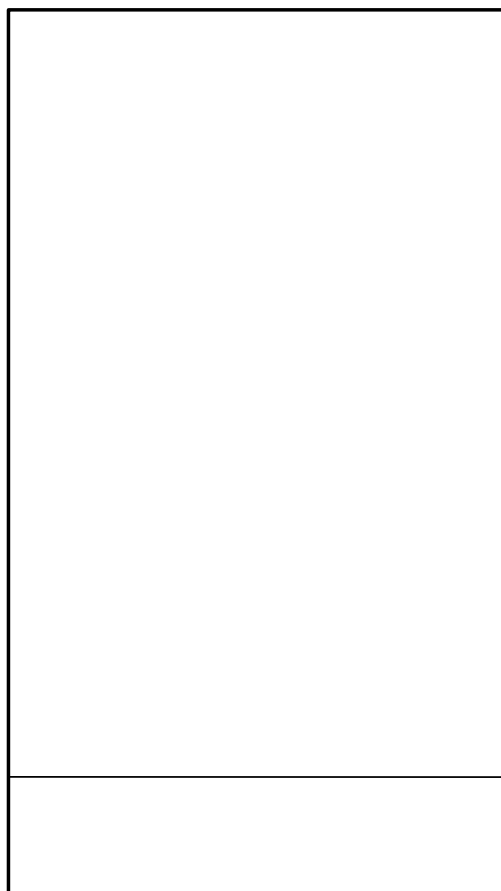
Протокол на работа

Стационарна фаза – силика гел

Мобилна фаза – смеса од етил ацетат, ацетон, метанол, амонијак (8,5:1:1:0,5)

Екстракција на алкалоидите – кон 10 mL урина се додава H_2SO_4 или HCl до закиселување ($pH=2$). Се додава до заситување на растворот $(NH_4)_2SO_4$ и се загрева 30 минути (водена бања). Растворот (топол) се филтрира во одделителна инка, се промива со 10 mL закиселена вода, се лади и се додаваат 20 mL етер за екстракција (5 минути). Се користи водениот слој кој се алкализира (со амонијак, $pH=9$) и се екстрахира со етер (5 мин.). Етерскиот слој кој се префрла преку филтер хартија во чаша (треба да биде сува) се испарува до суво и сувиот остаток се раствара во етанол (0,25 mL). Од овој екстракт се нанесуваат 2-3 примероци во различен волумен на плочата за анализа. Развивањето се врши во наведената мобилна фаза. Детекција се врши прво со прскање со 0,1% етанолен раствор на нинхидрин, сушење (80 °C, 5-10 мин.) и повторно прскање со реагенс на Dragendorf.

- Определи ги R_f вредностите на сите компоненти;
- Нацртај го добиениот хроматограм (слика X);
- Идентификувај ја непознатата компонента во твојот примерок во споредба со R_f вредностите на стандарди.



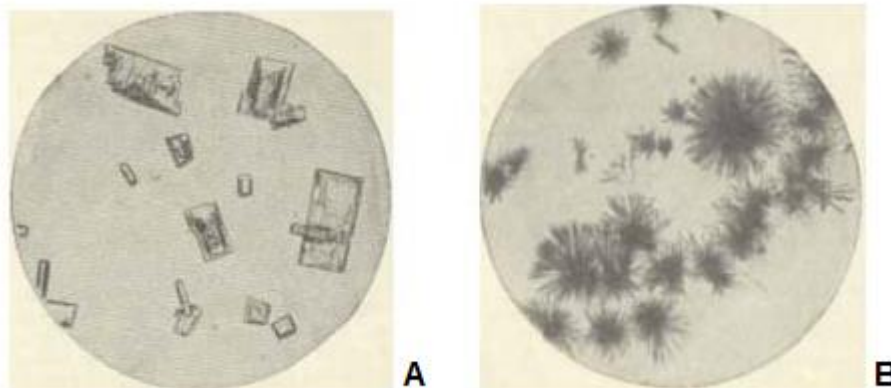
Слика 9. Добиен хроматограм по тенкослојна сепарација на испитуваниот примерок

7. ДЕТЕКЦИЈА НА ТОКСИЧНИ СУПСТАНЦИИ СО НЕУТРАЛНИ, СЛАБО КИСЕЛИ ИЛИ КИСЕЛИ СВОЈСТВА СО МИКРОКРИСТАЛОСКОПСКИ МЕТОД

Студентите можат да детектираат различни супстанции со неутрални, слабо базни или кисели својства како салицилна киселина, ацетилсалицилна киселина, фенобарбитал, кофеин, алкалоиди и сл., во моделни екстракти со помош на микрокристалоскопски методи.

Детекција на деривати на барбитурна киселина со микрокристалоскопски реакции

а) Реакција со конц. сулфурна киселина – на саатно стакло се капнува 1 капка од екстрактот за анализа (кој содржи дериват на барбитурна киселина) и се суши на собна температура. Сувиот остаток се раствара во 1 капка конц. сулфурна киселина, а после 3-5 минути се додава 1 капка вода. Во тек на 20-тина минути се појавува кристален преципитат. Се набљудува под микроскоп за идентификација: просирни правоаголни призматични кристали – барбитал; безбојни игличести кристали – фенобарбитал (слика 10);



Слика 10. Микрокристалоскопска идентификација: А – барбитал; В – фенобарбитал.

б) Реакција со смеса од раствори на желез(III) хлорид и калиум јодид – на саатно стакло се капнува капка од моделен хлороформски екстракт и се суши. На сувиот остаток се додава капка од реагенсот. После 10-15 минути под микроскоп се набљудуваат формираните кристали: портокалово кафеави призматични кристали – барбитал; портокалово-кафеави или кафеави кристали – фенобарбитал;

в) Реакција со бакарни соли и пиридин – на саатно стакло се капнува неколку капки од моделен хлороформски екстракт и се суши. На сувиот остаток се додаваат 2 капки 10% раствор амонијак и 1-2 капки од реагенсот (раствор од бакар сулфат во амонијак и пиридин). После 10-15 минути под микроскоп во присуство на барбитал се набљудуваат формираните виолетови кристали со правоаголна форма.

8. ПРЕЛИМИНАРНА ЕКСПРЕСНА АНАЛИЗА НА БИОЛОШКИ ТЕЧНОСТИ (КРВ, УРИНА) ЗА ДЕТЕКЦИЈА НА ПРИСУСТВО НА БАРБИТУРАТИ, БЕНЗОДИАЗЕПИНИ, ДЕРИВАТИ НА САЛИЦИЛНА КИСЕЛИНА И ФЕНОТИАЗИНИ

Прелиминарните тестови се многу важни за планирање на протоколот за токсиколошка анализа во материјал за кој немаме никаква информација за присуството на токсични супстанции. При добивање на негативен резултат од ваков прелиминарен тест, токсичната супстанција за чија детекција е направен тестот се исклучува од списокот за суспектни отрови. Само позитивен резултат води кон продолжување на анализата за детекција на соодветниот отров.

А) Прелиминарен експресен тест за докажување на присуство на барбитурати во урина

Во одделителна инка се поставува 50 mL урина, се додаваат неколку капки 10% раствор на сулфурна киселина до рН 4,5 и 50 mL диетилетер. Се одделува етерскиот екстракт (се остава на страна). Водената фаза се екстрахира уште еднаш со 50 mL диетилетер. Етерските екстракти се собираат и се сушат. Сувиот остаток се раствара во 1 mL хлороформ. Се додаваат 2 капки на свеж раствор од 1% литиум хидроксид во метанол. Појавата на сино обојување индицира присуство на барбитурати.

Б) Прелиминарен тест за присуство на салицилна киселина и салицилати во урина и крв

- кон 1 mL урина се додаваат 2-3 капки Trindler-ов реаген (железо (III) хлорид). Се појавува виолетова боја;

- кон 0,5 mL урина или крвна плазма се додаваат 4,5 mL 0,55% железо (III) нитрат во 0,04 N азотна киселина. Се појавува пурпурно-црвено обојување.

В) Прелиминарен тест за присуство на хлорпромазин или друг фенотиазински дериват во урина

- кон 1 mL урина се додава 1 mL реагенс (10% сулфурна киселина и 5% железо (III) хлорид (8:2)). Појавата на пурпурно-црвено обојување индицира присуство на фенотиазини;

- кон 1 mL урина се додава 1 mL реагенс (FPN реагенс). Појавата на розово обојување индицира присуство на фенотиазини.

9. ЛИТЕРАТУРА

- Daintith, J. (2008) *A Dictionary of chemistry* (6-то издание). Oxford University Press.
- Derelanko, M.J., Hollinger M.A. (Eds.). (2002) *Handbook of toxicology*. CRC Press, London.
- Diaz, J. (2006) *Color atlas of human poisoning and envenoming*. Taylor & Francis Group.
- Dreisbach, R., True, B-L. (2005) *Dreisbach Trovanja priručnik - prevencija, dijagnoza i lečenje*. Data status, Beograd.
- Flanagan, R.J., Taylor, A., Watson, I.D., Whelpton, R. (Eds.). (2007) *Fundamentals of analytical toxicology*. John Wiley & Sons Ltd.
- Flora, S.J.S., & Pachauri, V. (2010). *Chelation in Metal Intoxication*, Int. J. Environ. Res. Public Health, 7, 2745-2788.
- Gilbert, S.G. (2012) *A small dose of toxicology* (2 издание). Healty World Press, USA.
- Hodgson, E. (Ed). (2004) *A textbook of modern toxicology* (3-то издание)., Wiley-intersciemce, A John Wiley & Sons, Inc., Publication, Hoboken, New Jersey, USA.
- Jokanović, M. (2001) *Toksikologija*. Elit-Medicina, Beograd.
- Klaassen, C.D. (2008) *Casarett and Doull's Toxicology, The Basic Science of Poisons* (7-мо издание). The McGraw-Hill Companies, Inc., USA.
- Leikin, J.B., Paloucek, F.P. (Eds.). (2008) *Poisoning and toxicology handbook* (4-то издание). Informa Healthcare USA, Inc.
- Lewis, D. (1998) *Aspirin - A curriculum resource for post-16 chemistry courses*. The Royal Society of Chemistry, London, UK.
- Manahan, S.E. (2003) *Toxicological chemistry and biochemistry* (3-то издание). Lewis Publishers CRC Press LLC, Boca Raton, Florida 33431, USA.
- Matović, V. (2010) *Toksikologija metala*. Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Beograd.
- Matović, V., Đukić, M., Antonijević, B., Vujanović, D., Bulat, Z.P. (2012) *Praktikum iz toksikologije sa analitikom*. Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Beograd.
- Narayana, B., Sunil, K. (2009) *A Spectrophotometric Method for the Determination of Nitrite and Nitrate*. Eurasian J Anal Chem. 4(2): 204-214.
- Plavšić, F., Žuntar, I. (2006) *Uvod u analitičku toksikologiju*. Školska knjiga, Zagreb.
- Smith, F.P. (Ed.) (2005) *Handbook of forensic drug analysis*. Elsevier Academic press.
- World Health Organization (1995) *Basic analytical toxicology*. WHO, Geneva.
- Ѓоргиева Ацкова, Д., Костиќ, В. (2014). *Практикум по Токсиколошка хемија*, Факултет за медицински науки, Универзитет „Гоце Делчев“ – Штип. ISBN 978-608-244-142-9.
- Ѓоргиева Ацкова, Д. (2017). *Токсиколошка хемија за фармацевти*, Е-библиотека, Факултет за медицински науки, Универзитет „Гоце Делчев“ – Штип, ISBN: 978-608-244-424-6.

<http://www.atsdr.cdc.gov/csem/csem.asp?csem=8&po=5>

<http://chm.pops.int/default.aspx>

www.toxipedia.org

<https://www.drugbank.ca/drugs/>

ISBN 978-608-244-651-6