

УНИВЕРЗИТЕТ “СВ. КИРИЛ И МЕТОДИЈ” – СКОПЈЕ  
ФАРМАЦЕВТСКИ ФАКУЛТЕТ



**ПРАКТИЧНИ ВЕЖБИ**  
**ПО**  
**ТОКСИКОЛОГИЈА**  
- за студентите по фармација -



Подготвиле:  
Проф. д-р Татјана Кадифкова-Пановска  
Проф. д-р Лидија Петрушевска-Този  
Асс. Тања Петреска Ивановска

Скопје, 2010

**Рецензенти:**  
**Проф. д-р Зоран Кавраковски**  
**Доц. д-р Руменка Петковска**

## Содржина

1. Вовед	4
2. Проценување на ризикот во токсикологијата (однос доза-одговор)	28
3. Квантитативно определување на јаглерод моноксид во воздух	36
4. Квантитативно определување на јаглерод моноксид во крв по микродифузиона метода	42
5. Квантитативно определување на јаглерод диоксид во воздух по метода на Pettenkofer	49
6. Определување на вкупни феноли во урина по метода на Rainsford – Davies	54
7. Квантитативно определување на етил алкохол во урина по методата на Widmark	61
8. Квантитативно определување на делта аминок левулинска киселина (ДАЛК) во урина	69
9. Квантитативно определување на копропорфирин во урина	76
10. Квалитатитативно определување на метали со тенкослојна хроматографија	81
11. Квалитатитативно определување на органохлорни и органофосфорни пестициди во брашно со тенкослојна хроматографија	88
12. Квалитатитативно определување на барбитурати во урина со тенкослојна хроматографија	94
13. Квалитатитативно определување на алкалоиди во урина со тенкослојна хроматографија	98

## Вовед

Токсикологија претставува научна дисциплина која ги проучува штетните ефекти на супстанциите врз живите организми и последиците од тие ефекти. Терминот токсичност го опишува степенот на токсично дејство на супстанциите. Токсичноста зависи од различни фактори како што се дозата, начинот на експозиција, времетраењето на експозицијата, видот и структурата на хемискиот агенс и индивидуалните хумани фактори.

Во токсикологијата труењата се дефинираат како хемиски индуцирани повреди на ткивата и органите или нарушувања на функциите на биолошките системи предизвикани од хемиски агенси. Труењата се делат на акутни и хронични. Акутни труења настануваат кога организмот е изложен на високи дози од некоја токсична супстанција во тек на краток временски период. Симптомите на труењето се појавуваат веднаш по експозицијата. Хроничните труења настануваат со повторени експозиции на токсични агенси во подолг временски период, но со секоја експозиција се обезбедува влез на ниски дози од отровот во организмот. Исто така, не се појавуваат симптоми како резултат на поединечна експозиција. При хроничните труења, токсичниот агенс обично се акумулира во ткивата или предизвикува мали иреверзибилни оштетувања. После долготрајна експозиција, кога значителна количина од отровот ќе се акумулира во организмот, се појавуваат клинички симптоми. Хроничните труења обично се професионално поврзани и најчесто станува збор за експозиција на тешки метали како олово, кадмиум, жива, инхалација на органски растворувачи или експозиција на пестициди. Во овие случаи се прави биолошки мониторинг на количината на отровот кој навлегува во организмот, како и следење на концентрацијата на отровите во животната и работната средина.

Приодот кон пациенти со акутно труење зависи од проценувањето на ризикот за пациентот предизвикан со труењето. При третман на акутно труење многу се важни податоците што можат да се најдат за природата и видот на отровот, начинот и времетраењето на експозицијата, како и лични информации за пациентот. Општиот принцип при третман на акутни труења ги опфаќа следните фази: историја за пациентот, клинички испитувања, истражување на отровот, поставување на диференцијална дијагноза, давање на општи и помошни мерки и специфични интервенции.

Ако постои сомневање за акутно труење, клиничарот мора да воспостави комуникација со пациентот за да постави соодветна дијагноза на труењето. Ако пациентот е во бессознание, тогаш се што е пронајдено на местото на труење (пилули, разни контејнери) може да има големо значење. Ако пациентот е свесен, тогаш се поставуваат прашања за евентуално присуство на отрови во домот или на работното место, за неговото медицинско досие (пропишани лекови, психијатриски заболувања), животни навики и хоби со цел да се открие отровот кој го предизвикал труењето.

Физичкото испитување на пациентот може да го детектира отровот кој предизвикал труење или класата на отрови каде тој припаѓа. Клиничките симптоми кои се појавуваат при труење со некои специфични отрови се прикажани во табела 1.

Табела 1. Клинички симптоми што се појавуваат при акутни труења со специфични отрови

<b>Клинички симптоми</b>	<b>Отров</b>
<p>Централен нервен систем</p> <p>Атаксија</p> <p>Кома</p> <p>Конвулзии</p>	<p>Бромиди, карбамазепин, етанол, хипнотици, седативи, фенитоин, талиум</p> <p>Алкохоли, хипнотици, седативи, опиоиди, транквилизери</p> <p>Амитриптилин и други трициклични антидепресиви, стрихнин, теофилин</p>
<p>Респираторен систем</p> <p>Респираторна депресија</p> <p>Пулмонарен едем</p> <p>Хиперапнеа</p>	<p>Алкохоли, хипнотици, седативи, опиоиди, транквилизери</p> <p>Ацетилсалицилна киселина, хлорофенокси хербициди, иритантни гасови, опиоиди, органски растворувачи, паракват</p> <p>Ацетилсалицилна киселина, етилен гликол, хидроксibenзонитрил хербициди, изониазид, метанол, пентахлорофенол</p>
<p>Кардиоваскуларен систем</p> <p>Тахикардија</p> <p>Брадикардија</p> <p>Хипертензија</p> <p>Хипотензија</p> <p>Аритмии</p>	<p>Антихолинергици, симпатомиметици</p> <p>Холинергици, бета блокатори, дигоксин, Антихолинергици, симпатомиметици</p> <p>Алкохоли, хипнотици, седативи, опиоиди, транквилизери</p> <p>Бета блокатори, хлорокин, цијаниди, дигоксин, фенотиазини, кинидин, теофилин, трициклични антидепресиви</p>
<p>Очи</p> <p>Миоза</p> <p>Мидријаза</p>	<p>Карбаматни пестициди, опиоиди, органофосфорни пестициди, фенциклидин, фенотиазини</p> <p>Амфетамин, атропин, кокаин, трициклични антидепресиви</p>

Телесна температура	
Хипертермија	Ацетилсалицилна киселина, динитрофенол пестициди , хидроксibenзонитрил хербициди, пентахлорофенол, прокаинамид, кинидин
Хипотермија	Јаглерод монооксид, етанол, опиоиди, трициклични антидепресиви, хипнотици/седативи
Кожа, нокти и коса	
Акни	Бромиди, органохлорни пестициди
Косопаст	Талиум
Гастроинтестинален тракт	
Хиперсаливација	Холинестераза инхибитори, стрихнин
Сува уста	Атропин, опиоиди, фенотиазини, трициклични антидепресиви
Констипација	Олово, опиоиди, талиум
Диареа	Арсен, лаксативи, холинестераза инхибитори
Гастроинтестинално крварење	Ацетилсалицилна киселина, каустични супстанции (јаки киселини и бази), кумарински антикоагуланси, индометацин
Оштетување на хепар	Токсини од родот Amanita, јаглерод тетрахлорид, парацетамол, бел фосфор
Уринарен тракт	
Ретенција на урина	Атропин, опиоиди, трициклични антидепресиви
Оштетување на бубрези	Токсини од родот Amanita, кадмиум, јаглерод тетрахлорид, етилен гликол, жива, парацетамол

На пример, појавата на хиперсаливација, инконтиненција, миоза и респираторна депресија укажува на труење со холинестераза инхибитори како што се органофосфорните пестициди. Ако се апсорбирани повеќе отрови со различно дејство, ваквиот пристап е ограничен.

Доколку кај пациентот се присутни симптомите респираторна депресија и стеснати зеници, најверојатно се работи за труење со опиоиди како што се декстропропоксифен или морфин. Ако зениците се дилатирани, тогаш можно е присуство на некои хипнотички лекови како што е глутетимид. Мидријаза се појавува како симптом и при церебрално оштетување, па затоа, при поставување на

дијагноза на акутно труење треба да се земат во предвид и други претходно поставени дијагнози. На пример, комата може да биде резултат на цереброваскуларно оштетување или на терапевтски неконтролиран дијабетес во иста мера како и резултат на труење. Затоа при вакви случаи резултатите од биохемиските и хематолошките тестови имаат големо значење.

Состојбата на бессознание (кома) е честа појава при акутните труења, посебно ако причинители на труењето се ЦНС депресиви. За да се направи класификација на степенот на кома кај затруените, често се користи едноставната Edinburgh-ова скала (табела 2). Предноста на овој систем за класификација на комата се состои во тоа што епизодите на кома се опишани преку вербална конверзација на пациентот со медицинскиот персонал.

Табела 2. Класификација на длабочината на кома според Edinburgh-овата скала

Степен на кома	Клинички симптоми
1	Пациентот е во заспана состојба, но реагира на вербални команди
2	Пациентот е во бессознание но реагира на минимални дразби (тресење, чешање и сл.)
3	Пациентот е во бессознание и реагира на болни дразби
4	Пациентот е во бессознание и не реагира на никакви дразби

Труењето со некои соединенија не секогаш успешно се дијагностицира, особено ако пациентот се наоѓа во подоцнежен стадиум. Најчестите примери опфаќаат: кардиореспираторен застој при труење со цијаниди, хепатитис при труење со јаглен тетрахлорид и парацетамол, дијабетес при труење со хипогликемици, вклучувајќи го и етанолот кај мали деца, парестезија при труење со талиум, прогресивна пневмонија при труење со паракват и ренално оштетување при труење со етилен гликол.

Ако постои сомневање за акутно труење, уште пред да се потврди дијагнозата, неопходно е да се превземат општи, симптоматски и помошни мерки. Во случај на инхалирање на отровот, пациентот треба веднаш да се отстрани од загадената околина. Ако се работи за контаминација на кожа, прво се отстранува облеката, па потоа кожата се испира со соодветна течност, најчесто вода.

При ингестија на отровот со цел да се намали ризикот од негова апсорпција, кај возрасни пациенти, често се врши гастрична аспирација и лаважа. Кај деца, намалување на апсорпцијата на отровот може да се постигне со предизвикување на емега со помош на сируп од ипекакуана. Апсорпцијата на евентуални остатоци после гастричната лаважа може да се минимизира со давање на поголема доза од активен јаглен. Повеќекратното давање на активен јаглен претставува ефикасен начин за зголемување на елиминацијата на одредени отрови. Меѓутоа, во случај кога е даден протективен агенс, активен јаглен не треба да се администрира.

Голем број пациенти сами превземаат помошни мерки при труење со цел да ги спречат симптомите. Најчесто се употребуваат интравенски применети антиконвулзивни лекови како diazepam или clometiazol, или пак антиаритмици како

lidocain. Овие лекови можат подоцна да се докажат во лабораториските тестови кои се користат во токсиколошките анализи.

Понекогаш се применуваат специфични терапевтски постапки како што се давање на антидоти и терапија со активна елиминација. Пред да се започне третманот, потребни се резултатите од квалитативните и квантитативните токсиколошки анализи. Главно, специфичната терапија започнува кога е позната природата, својствата и количината на отровот кој го предизвикал труењето.

Употребата на антидоти или протективни агенси е ограничена на помал број отрови (табела 3).

Табела 3. Антидоти и протективни агенси што се користат за третман на акутно труење

Антидот / протективен агенс	Индикација
Ацетилцистеин	Парацетамол
Атропин	Карбаматни пестициди, органофосфорни пестициди
Дефероксамин	Алуминиум, железо
Димеркаптосукцинска киселина (DMSA)	Антимон, арсен, бизмут, кадмиум, олово, жива
Димеркаптопропансулфонат (DMS)	Бакар, олово, жива (елементарна и неорганска)
Етанол	Етилен гликол, метанол
Антиген врзувачки Fab антитела	Дигоксин
Флумазенил	Бензодиазепин
Метионин	Парацетамол
Метиленско сино	Оксидирачки агенси (хлорати, нитрати)
Налоксон	Опиоиди (кодеин, петидин, морфин)
Обидоксим хлорид или пралидоксим јодид	Органофосфорни пестициди (контраиндицирани се при труење со карбаматните пестициди)
Кислород	Јаглерод монооксид, цијаниди
Физостигмин	Атропин
Фитоменадион (витамин K <sub>1</sub> )	Кумарински антикоагуланси
Калиум	Теофилин, бариум
Протамин сулфат	Хепарин
Прусианско сино (калиум ферихексацијаноферат)	Талиум
Пиридоксин (витамин B <sub>6</sub> )	Изониазид
Натриум калциум едетат	Олово, цинк



Постојат контраверзни ставови за употребата на некои антидоти како оние што се користат при третман на труење со цијаниди, додека пак други покажуваат потенцијална токсичност и треба претпазливо да се користат.

Отсуството на одговор кон дадениот антидот, не треба да упатува на отсуство на соодветниот отров. На пример, опиодниот антагонист, налоксон кој се дава при труење со морфин и кодеин, може да ја поврати состојбата на кома комплетно и брзо, но без ризик за пациентот.

Зголемување на елиминацијата на отровот од системската циркулација може да се направи на 4 начини:

1. Повеќекратна орална администрација на активен јаглен;
2. форсирана диуреза со промена на рН на урината;
3. перитонеална дијализа и хемодијализа;
4. хемоперфузија.

Системската елиминација на барбитурати, carbamazepin, quinine и theophyllin, како и на салицилна киселина и нејзини деривати може да се зголеми со давање на повеќекратни дози на активен јаглен во временски интервали од 4-6 часа се додека не настане клиничко опоравување. Со цел да се намали времето на транзит на отровот, а со тоа и неговата реапсорпција, активниот јаглен често се дава во комбинација со лаксатив. Овој начин за зголемување на елиминацијата на отровот има предност затоа што е неинвазивен, но во некои случаи е помалку ефикасен (на пр. ако пациентот добил паралитички илеус како резултат на ингестија на phenobarbital).

Форсирана диуреза се применува со цел да се зголеми уринарната екскреција на отровот, а се постигнува со зголемување на волуменот на екскретирана урина во единица време. Најчесто за таа цел се аплицира интравенски компатибилна течност. Во последно време форсираната диуреза се постигнува со промена на уринарната рН. Реналната елиминација на слабите киселини како хлорофенокс хербицидите и салицилатите може да се зголеми со интравенска администрација на натриум бикарбонат. Предноста на алкализацијата која е ефикасна метода за зголемена елиминација на отровите како и традиционалната алкална диуреза, се состои во тоа што го минимизира ризикот од компликации кои настануваат поради ретенција на течности при церебрален или пулмонарен едем, електролитен дисбаланс и сл. Меѓутоа, рК вредноста на отровот мора да биде соодветна за да промената на уринарната рН со цел за зголемување на неговата ренална елиминација, се движи во физиолошки граници. Исто така важно е внимателно да се следи рН на урината за да се види дали се постигнати саканите ефекти. Закиселувањето на урината со цел да се зголеми клиренсот на слабите бази како amfetamin, prociklidin, quinine, во денешно време не се применува.

Дијализата и хемоперфузијата го отстрануваат отровот директно од циркулацијата. При хемодијализа крвта поминува низ мембрана која е во контакт со водената фаза на вештачки бубрег, додека кај перитонелната дијализа аплицираната течност се дренира од перитонеалната празнина.

При хемоперфузија крвта се дренира низ адсорбирачки материјал (обложен активен јаглен или компатибилна смола). Хемодијализата претставува 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 обложен јаглен или смола).

Изборот на постапката, дијализа или хемоперфузија зависи од клиничката состојба на пациентот, својствата на ингестираниот отров и неговата концентрација во плазмата. Хемодијализата и хемоперфузијата се ефикасни методи само доколку волуменот на дистрибуција на отровот е мал (релативен Vd помал од 5L/kg).

Поголемиот број на пациенти со акутно труење можат успешно да се третираат врз основа на резултатите од биохемиските и хематолошките анализи. Ова е применливо кај пациенти каде не постои сомневање за отровот што го предизвикал труењето и кога резултатите од квантитативните анализи не влијаат на терапијата.

Токсиколошките анализи имаат голема улога ако постои сомневање за дијагнозата, изборот на антидоти или протективни агенси или изборот на метода за активна елиминација на отровот. Анализата на секој случај на труење опфаќа 3 фази и тоа: пре-аналитичка, аналитичка и постаналитичка фаза (табела 4).

Табела 4. Фази и чекори според кои се врши аналитичко токсиколошко испитување

Чекори	
<b>Пре-аналитичка фаза</b>	
1.	Добивање на детални информации за пристапот, вклучувајќи ги условите при кои настанало труењето и резултатите од биохемиските и хематолошките испитувања
2.	Добивање на медицинска историја за пациентот, утврдување на пристапот кон соодветниот примерок и избор на анализите кои се приоритетни
<b>Аналитичка фаза</b>	
3.	Изведување на одбраните анализи
<b>Пост-аналитичка фаза</b>	
4.	Интерпретација на резултатите и дискусија со клиничарот после прегледот на пациентот
5.	Ако се појави потреба, извршување на дополнителни анализи на оригиналните примероци или на примероци подоцна земени од пациентот

При третман на акутните труења секогаш треба да се практикува да се направи корелација помеѓу резултатите од лабораториските анализи и клиничките испитувања. Исто така, за да се избере соодветен третман неопходно е познавање на токсиколошките ефекти на супстанциите.

Голем број на клинички лабораториски тестови можат да помогнат за поставување на дијагноза на акутното труење. Најчесто користени биохемиски тестови за таа намена се:

- 1.определување на глукоза во крв;
- 2.мониторинг на електролити, крвни гасови и рН;
- 3.мерење на осмолалноста на плазмата;
- 4.определување на активноста на ензимите во плазмата;
- 5.определување на активноста на ензимот холинестераза (индикатор за експозиција на орнанофосфати и карбамати).

Од хематолошките тестови најчесто се изведуваат следните:

- 1.коагулација на крвта;
- 2.определување на карбоксихемоглобин (индикатор за труење со јаглерод моноксид) и определување на метхемоглобин (индикатор за труење со дихлорометан);
- 3.определување на хематокрит
- 4.анализа на бројот на леукоцити

Токсиколошките тестови кои се вршат при акутни труења се состојат од три вида на анализи: физичко испитување на примероците, боени тестови и тенкослојна хроматографија.

Најчести примероци кои се користат во токсиколошките анализи и служат за идентификација на отровите се: урина, желудочна содржина, остатоци од местото на труење (таблети, сомнителни течности најдени близу до пациентот) и крв.

За да се добијат точни и релевантни резултати од токсиколошките анализи, потребна е соработка помеѓу клиничарот и аналитичарот. Во табела 5 е прикажан еден формулар кој треба да се пополни пред да се земат примероците од пациентот, бидејќи постои можност за потреба од специјален примерок. Пополнетото аналитичко токсиколошко барање се транспортира заедно со примероците во лабораторијата каде тие се анализираат.

Пред да се започнат анализите, важно е да се соберат што е можно повеќе податоци за пациентот (медицински, социјални, медицинска историја, претходна терапија, лабораториски резултати и сл.). Исто така, треба да се земе во предвид времето помеѓу експозицијата на отровот и собирањето на примероците бидејќи има влијание врз интерпретацијата на резултатите од токсиколошките анализи.

Примероците за анализа мора да бидат јасно означени со името на пациентот, датумот и времето на собирање, како и природата на примерокот. Датумот и времето на прием на сите примероци се состојат во бројот за идентификација кој се прикачува на секој примерок. Контејнерите со испарливи материјали како што се органските растворувачи се чуваат одделно од биолошките материјали за да се спречи вкрстена контаминација. Сите биолошки примероци се дистрибуираат и чуваат на 4°C. Ако постои можност, идеално е да се чува примерокот на 4°C и после анализата во тек на 3-4 седмици, заради потреба од дополнителни анализи. Ако истрагата за труењето сеуште е во тек, а постојат сомневања околу решавање на случајот, примерокот се чува на -20°C .

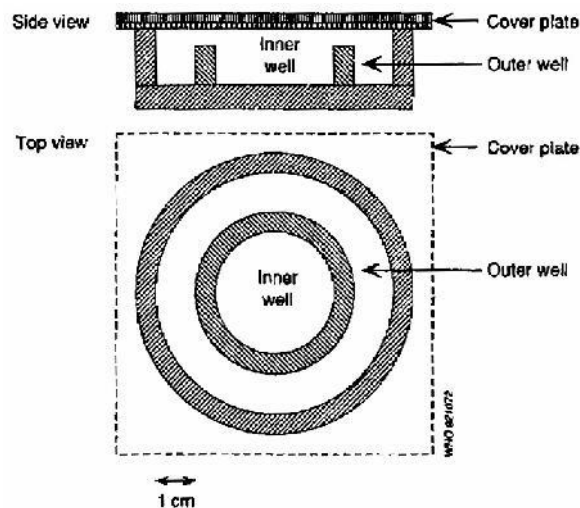
Табела 5. Аналитичко токсиколошко барање

<b>Аналитичко токсиколошко барање</b> До: име на лабораторија, адреса и телефон Специјално барање			дата/час на прием		
			дата/час на експозиција		
			лекови кои се пропишани или употребувани во претходна терапија		
Доктор: Телефон: Адреса на болница: Печат: <span style="float: right;">Дата:</span>			лекови/отрови за кои постои сомнение		
Пациент: <span style="float: right;">Др.имиња:</span> Возраст/год. на раѓање: <span style="float: right;">Пол:</span> Консултант: Референтен бр:			клинички податоци/ потребни испитувања/ приоритет		
тип на примерок	дата	час			
крв(хепаринизирана)					
урина					
стомачна содржина					
друг примерок					

Токсиколошките анализи најчесто се работат на биолошки примероци, па затоа е потребен предтретман на примероците. Кога примерокот е плазма или серум, предтретманот се врши со преципитација на протеините со помош на воден раствор на трихлорооцетна киселина, а за анализа се користи супернатантот. Понекогаш треба да се направи хидролиза на коњугираните метаболити во урината (сулфати и глукурониди), со загревање со киселина или со ензимска хидролиза. Овој начин овозможува добивање на соединенија кои директно влегуваат во реакција со тест реагенсите (бензодиазепини, парацетамол) или зголемување на сензитивноста на реакцијата за нивна идентификација (лаксативи, морфин).

Во аналитичката токсикологија често се користи течно-течната екстракција со чија помош се екстрахираат липофилните отрови од примерокот со соодветен органски растворувач при погодна рН вредност. Екстракцијата овозможува отстранување на водениот слој и растворените интерферирачки супстанции, а потоа со испарување се намалува волуменот на екстрактот со што се концентрира супстанцијата од интерес и се зголемува нејзината сензитивност. Најчесто екстракцијата се изведува со механичко мешање на водената и органската фаза или со вортексирање (брз и ефикасен начин за мешање на мали волумени од примерокот).

Микродифузијата исто така претставува начин за пурификација на примерокот кој се заснова на ослободување на испарливата компонента од тест растворот кој се наоѓа во еден затворен систем како што е специјално конструираниот сад по Conway (слика 1). На пример, на овој начин се ослободува испарливиот водород цијанид од цијанидните соли и реагира со соодветен реагенс кој се наоѓа во другиот дел од затворениот систем.



Слика 1. Микродифузионен апарат по Conway

За да биде комплетен микродифузиониот процес, вообичаено е примероците да се чуваат во затворениот систем по Conway 2-5 часа на собна температура.

Концентрацијата на растворот кој се добива со реакција помеѓу анализот и реагенсот се мери спектрофотометриски или со визуелна споредба на обојувањето на растворот со бојата на стандардните раствори кои се анализираат на ист начин.

Урината е погоден примерок за изведување на токсиколошки анализи бидејќи се добива во поголем волумен и обично содржи повисока концентрација на лекови или други отрови отколку крвта. Присуството на метаболити во урината понекогаш овозможува идентификација на отровот со помош на хроматографски техники. Примерокот треба да се земе од пациентот што е можно побрзо, во идеален случај се зема уште пред да се воведо било каква терапија со лекови.

Желудочната содржина како примерок опфаќа повратена маса, содржина добиена со гастрично испирање и stomачно миеење. Примерокот треба да има волумен од

најмалку 20 ml за да се направат поголем број тестови, при што во примерокот не се додаваат конзерванси. Овој тип на примерок е варијабилен, па за да се добие соодветна течност за анализа често се прави хомогенизација на примерокот со филтрирање и центрифугирање. Во желудочната содржина можна е детекција на одредени супстанции според мирисот, а можно е да се идентификуваат таблети или капсули и сл.

Примерок за токсиколошките анализи можат да бидат и остатоци од местото на труење (често се поврзани со предизвикувачот на труењето), па затоа се задржуваат за анализа сите контејнери најдени во близина на пациентот.

Крвта како примерок (серум или плазма) најчесто се користи за изведување на квантитативни тестови, иако при труење со некои отрови како што се СО и цијаниди, полната крв се користи за квалитативна анализа. Вообичаено се земаат околу 10ml примерок во епрувета со хепарин. Ако постои сомневање за труење со етанол се земаат 2ml примерок кој се собира одделно во епрувета со флуорид/оксалат. Воглавно, не постои значителна разлика во концентрацијата на отровот помеѓу плазмата и серумот.

Доколку резултатите од тестовите имаат суштинско влијание врз клиничкиот наод и изборот на терапијата, тогаш резултатите мора да се добијат за време од 2-3 часа по приемот на примерокот. Позитивниот резултат не може веднаш да го потврди труењето, туку отвора прашања од типот дали пациентот случајно бил изложен на отровот или се работи за примена на лекови во несоодветна доза. Во некои случаи присуството на повеќе од еден отров ја комплицира анализата и потребни се дополнителни анализи на различни примероци земени од пациентот.

Притоа, многу е важно да се увидат предностите и недостатоците на направените тестови и да се усогласат резултатите од тестовите со мислењата на аналитичарот и клиничарот, како и да постои добра лабораториска пракса особено ако се работи за итни анализи. Во секој случај, подобро е да не се издадат резултати отколку да дојде до интерпретирање на погрешни и нерелевантни резултати. Најдобро е резултатите од анализите да се запишат во формулар наречен токсиколошки прашалник (табела 6).

Табела 6. Токсиколошки прашалник

<b>ТОКСИКОЛОШКИ ПРАШАЛНИК</b>				Квалитативни анализи	Лабораториски број	Тест
Пациент:		Доктор:		1. Салицилати		
Болница:		Телефон:		2. Фенотиазини		
Потребни испитувава:		Приоритет:		3. Имипрамин		
Примерок	Лаб. број	Дата	Час	4. Трихлоро соединенија		
				5. Парацетамол		
				6. Паракват		
				7. Етанол		
				8. Хлорати и др.		
				9. Железо		
Супстанца	Примерок	Лаб. број	Концентрација	10. TLC кисели и базни лекови		
				11.		
				12.		
				13.		
				14.		
				15.		
				16.		
				17.		
				Аналитичар:	Дата:	Час:

Физичкото испитување на примероците може значително да придонесе за брза детекција на отровот што го предизвикал труењето. Така на пример, високата концентрација на некои лекови или метаболити може да ја промени бојата на урината (табела 7). Дефероксаминоот 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. Заматената урина упатува на патолошки промени (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 phenytoin, grimidon и sultiam исто така се формираат кристали во урината, а ингестија на етилен гликол доведува до формирање на карактеристични безбојни кристали од калциум оксалат при неутрална pH на урината. Овие промени не треба да се игнорираат, дури и ако не се поврзани со труењето.

Табела 7. Причинители за промена на бојата на урината

Боја	Можен причинител
Кафеава или црна	nitrobenzen, phenol
Жолта или портокалова	casacara, fluorescin, phenolphthalein, nitrofurantoin, senna
Боја на црвено вино или кафева	aloin, phenothiazin, phenytoin, phenolphthalein, quinine, warfarin
Сина или зелена	amitriptylin, indometacin, phenol

Некои карактеристични мириси се поврзани со различни супстанции (ethchlorvynol, methyl salicylat, paraldehyd, phenelzin) кои можат да бидат присутни во желудочната содржина (табела 8). Многу ниска или многу висока pH вредност асоцира на внес на киселина или база, зелена или сина боја укажува на присуство на соли на железо односно бакар. Микроскопското испитување со помош на поларизационен микроскоп помага да се утврди евентуално присуство на таблети или капсули.

Табела 8. Отрови со карактеристичен мирис

Карактеристичен мирис	Можен причинител
Горчлив бадем	цијанид
Овошен	алкохоли (етанол), естри
Лук	арсен, фосфор
Круша	хлорал
Петролеј	дестилати на бензен (вехикулум на пестицидните формулации)
Фенолен	дезифициенси, феноли
Пепел од цигари	никотин
Боја за чевли	нитробензен
Сладок	хлороформ и други халогени јаглевородороди

Боените тестови претставуваат важен дел од токсиколошките анализи бидејќи во најголем дел се специфични и резултатите се добиваат за кратко време. Голем број на лекови и други отрови ако се присутни во примерокот во доволна концентрација и во отсуство на интерферирачки супстанции даваат карактеристични обојувања со соодветни реагенси. Недостатоците на боените тестови се однесуваат на тоа што примерокот може да содржи и други слични функционални групи кои потекнуваат



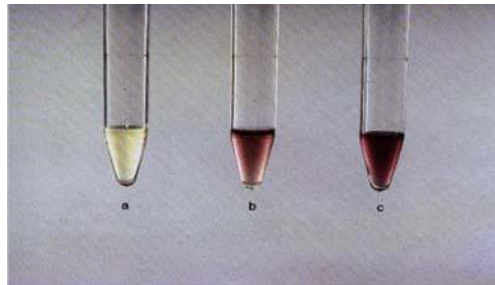
од други отрови, метаболити или онечистувања, понатаму субјективноста во толкување на бојата, варирање на интензитетот на обојувањето, нестабилност на бојата во текот на анализата и сл. Боените тестови се изведуваат во стаклени тест епрувети или во порцелански плочи со вдлабнати бунарчиња и униформна позадина која овозможува лесно споредување, дури и кога се аплицира мало количество на примерок. При изведување на боени тестови, задолжително со тест примерокот се анализираат: слепа проба која не го содржи анализатот од интерес (ако примерок е урина, тогаш како слепа проба се зема урина, во друг случај слепа проба претставува дестилирана вода) и стандард со позната концентрација на анализатот.

Овие тестови најчесто се изведуваат на урина како примерок (докажување на аспирин), но можат да се вршат и во други примероци како што се желудочната содржина и во остатоците најдени на местото на труење (хлорати, оксидирачки агенси, феро и фери јоните).

На сликите подолу (слика 2 - слика 9) прикажани се боени тестови кои често се практикуваат во состав на токсиколошките анализи.

□ Салицилна киселина (ацетилсалицилна киселина) – **Trinder-ов тест**

Се додаваат 100  $\mu$ l Trinder-ов реагенс (смеса од 40 g жива хлорид во воден раствор на HCl, 40 g фери нитрат) во 2 ml урина и содржината се меша 5 секунди. Појавата на виолетова боја означува присуство на салицилати. Ако примерокот е желудочна содржина, прво се врши хидролиза со 0.5M HCl на водена бања што врие во тек на 2 минути, потоа содржината се неутрализира со 0.5 M NaOH и понатаму анализата е иста.

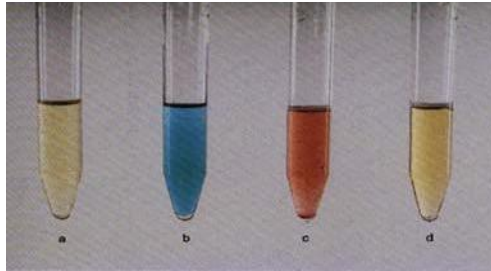


Слика 2. Trinder-ов тест

a. слепа проба (урина), b. слабо позитивен резултат, c. позитивен резултат

□ Фенотиазини – **FPN тест**

Се додава 1 ml од FPN реагенсот (смеса од 5 ml фери хлорид, 45 ml перхлорна киселина, 50 ml азотна киселина) на 1 ml примерок и се меша за време од 5 секунди. Промена на бојата од розева, портокалова, црвена, виолетова до сина упатува на позитивен резултат.

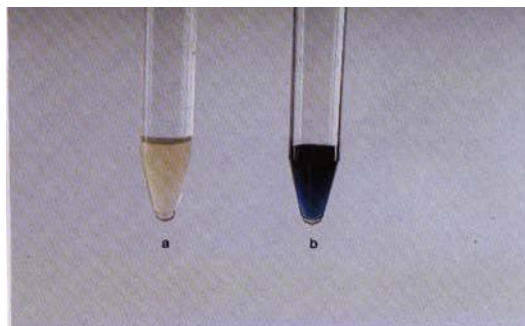


Слика 3. FPN тест

а.слепа проба (урина), b. thioridazin, c.perphenazin, d.trifluperazin

□ Имипрамин и слични соединенија – **Forrest-ов тест**

Се додава 1 ml од Forrest-овиот реагенс (смеса од 25 ml калиум дихромат, 25 ml перхлорна киселина, 25 ml сулфурна киселина, 25 ml азотна киселина) на 0.5 ml примерок и се меша содржината 5 секунди. Жолто-зелена боја која може да премине во темно зелена до сина означува позитивен резултат.

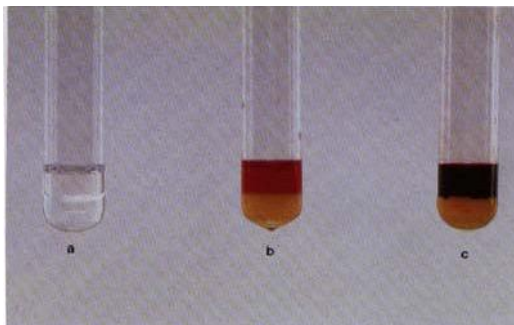


Слика 4. Forrest-ов тест

а.слепа проба, b. позитивен резултат

- Трихлоро соединенија (chloral hydrat, chloroform, trichloroethylene) - **Fujiwara тест**

Во три епрувети, слепа проба, примерок и раствор на трихлорооцетна киселина се додава по 1 ml NaOH и 1 ml пиридин, потоа епруветите се мешаат и се загреваат на водена бања 2 мин. Појавата на интензивна црвена или пурпурна боја на пиридинскиот слој претставува позитивен резултат.

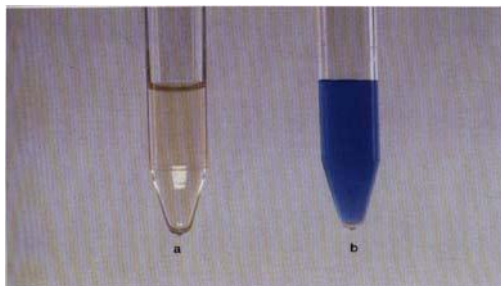


Слика 5. Fujiwara тест

а.слепа проба, б. позитивен резултат, с.силно позитивен резултат

- Paracetamol, phenacetin – **о-крезол / амонијачен тест**

Се додаваат 0.5 ml конц. HCl на 0.5 ml примерок, се загрева содржината на водена бања 1 минута и се лади. Потоа се додаваат 1 ml раствор на о-крезол и 2 ml  $\text{NN}_4\text{OH}$  и се меша содржината 5 секунди. Темно сина до црна боја која се појавува веднаш означува позитивен резултат.

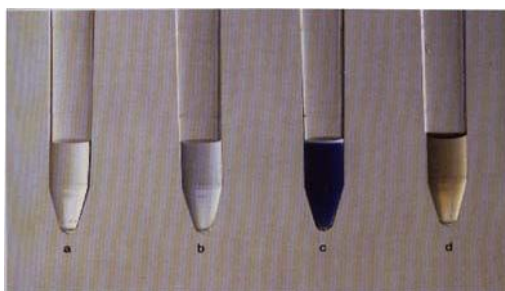


Слика 6. о-крезол / амонијачен тест

а.слепа проба, б. позитивен резултат

□ Paraquat, diquat - **ДИТИОНИТ ТЕСТ**

Се додаваат 0,5 ml амониум хидроксид на 1 ml примерок, потоа содржината се меша 5 секунди и се додаваат околу 2 mg натриум дитионит. Притоа, паракват формира сина до синоцрна боја, а дикват жолто-зелена боја која е незначителна во присуство на паракват.

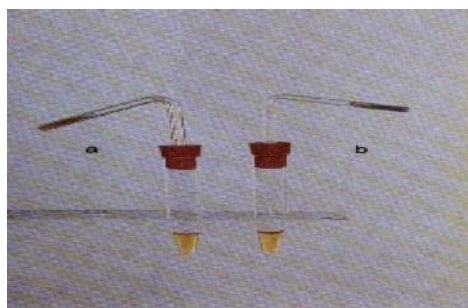


Слика 7. Дитионит тест

a. слепа проба, b. слабо позитивен резултат за паракуат, c. силно позитивен за паракуат  
d. слабо позитивен резултат за паракуат во урина

□ Етанол и други редуцирачки испарливи реагенси - **ДИХРОМАТ ТЕСТ**

Се додаваат 50  $\mu$ l од калиум дихромат (раствор во сулфурна киселина), на парче филтерна хартија која се става во епрувета со 1 ml урина. Епруветата се остава на водена бања 2 минути. Промена на бојата од портокалова во зелена означува присуство на испарливи супстанции со редукутивни својства.



Слика 8. Дихромат тест

a. слепа проба, b. позитивен резултат

□ Хлорати и други оксидирачки агенси - **diphenylamin тест**

Внимателно се додаваат 0.5 ml diphenylamin (раствор во конц. сулфурна киселина) на 0.5 ml филтрат добиен од желудочна содржина. Ако се појави јако сино обојување за кратко време означува позитивен резултат.

□ Феро / фери јони – **ферицијанид / фeroцијанид тест**

На 50  $\mu$ l филтрирана желудочна содржина се додаваат 100  $\mu$ l HCl и 50  $\mu$ l раствор на калиум ферицијанид. На други 50  $\mu$ l од примерокот се додаваат исто така 100  $\mu$ l HCl и 50  $\mu$ l калиум фeroцијанид. Ако се појави син преципитат означува присуство на феро, односно фери јони.



Слика 9. Ферицијанид / фeroцијанид тест  
a. слeпа проба, b. позитивен резултат

Супстанцииите што се од интерес за токсиколошките анализи често се екстрахираат од примерокот со помош на органски растворувач во алкална или кисела средина и потоа екстрактите се анализираат со TLC. Тенкослојната хроматографија опфаќа капиларно движење на мобилната фаза (најчесто органски растворувач) низ тенок слој на стационарна фаза (најчесто силика гел) нанесена на стаклена, пластична или алуминиумска плоча. Соединенијата се раздвојуваат со распределба помеѓу стационарната и мобилната фаза во зависност од нивниот партиционен коефициент. Освен за квалитативна анализа, TLC може да се употребува и како семиквантитативна техника.

Во зависност од поларноста на фазите, TLC плочите можат да бидат нормално-фазни со поларна стационарна фаза и неполарна мобилна фаза и реверзно-фазни кои содржат хидрофобни групи врзани за силика матриксот. Постојат комерцијални плочи со инкорпориран флуоресцентен индикатор кои директно се визуелизираат, како и TLC плочи со високи перформанси кои се карактеризираат со честици помали од 2 $\mu$ m и поголема ефикасност на разделување отколку конвенционалните плочи.

Во аналитичката токсикологија за визуелизација на аналитите најчесто се користат хромогени реагенси за хемиска детекција. Хромогениот реагенс обично се нанесува на плочата во облик на аеросол со специјални спреј контејнери под притисок, при

што се добиваат петна со карактеристичен облик или боја. Ако се користат алуминиумски или пластични плочи наместо стаклени, колоните со примероци се сечат и секоја колона одделно се прска со реагенс. Кај некои примероци хемиската детекција мора да се направи брзо бидејќи со тек на времето ја губат бојата или се менуваат. Повеќето реагенси за хемиска визуелизација се токсични и задолжително се работи во дигестор. Најчесто користени TLC реагенси за визуелизација се:

- меркуро нитрат кој се користи за визуелизација на примероци што се добиваат како кисели екстракти (визуелизација на барбитурати, glutethimid при што се добиваат бели петна со сив центар на затемнета позадина);
- кисел јодоплатинат кој се користи за визуелизација на примероци што се добиваат како базни екстракти (визуелизација на базни и неутрални метаболити, при што се добиваат виолетови, сини или кафеави петна)
- Mandelin-ов реагенс кој се користи за визуелизација на примероци што се добиваат како базни екстракти (со голем број базни соединенија дава петна со портокалова, црвена, зелена и сина боја; при прскање со овој реагенс трицикличните антидепресиви, amitriptylin и nortryptylin даваат флуоресцентни петна што лесно се визуелизираат под UV светлина на бранова должина од 366 nm).
- сулфурна киселина се користи за визуелизација на примероци што се добиваат како базни екстракти (со фенотиазини и нивни метаболити дава црвени, виолетови или сини петна).

Обојувањето што настанува при реакција на анализот со реагенсот варира во зависност од концентрацијата на анализот, присуството на коелуирачки супстанции, времето и интензитетот на прскање и типот на стационарната фаза нанесена на плочата. Понатаму, некои соединенија покажуваат варијација на бојата од периферијата на петното кон центарот поради концентрацискиот градиент и промена на интензитетот на бојата по одредено време. Исто така, проблем претставува и субјективната интерпретацијата на боената реакција, па затоа е најдобро добиеното петно од анализата да се споредува истовремено со петно добиено од стандардна супстанција.

Детекцијата на петната кај тенкослојната хроматографија може да се направи и со помош на ретенциони фактори. Ретенциониот фактор се дефинира како однос помеѓу патот што го поминал анализот и патот што го поминала мобилната фаза. Идентификација на непознатото соединение се прави со пресметување на Rf вредноста и нејзино споредување со референтните Rf вредности. Бројни фактори влијаат врз репродукцибилноста на ретенционата вредност, и тоа: типот и особините на плочите, количеството на аплициран примерок, начинот на развивање на хроматограмот, фронталната линија, степенот на заситеност на околниот воздух со парите од мобилната фаза, температурата, како и типот на примерокот (биолошкиот примерок содржи примеси кои даваат матрикс ефекти). Влијанието на овие фактори може да се минимизира ако заедно со примероците се анализираат стандардни соединенија.

Квантификација на анализите се врши со помош на ултравиолетова (200-400 nm) и видлива спектрофотометрија (400-800 nm). Квантитативната спектрофотометрија се заснова на Lambert-Beer – овој закон. За мерење во видливото подрачје можат

да се употребуваат пластични кивети, но за мерење во UV областа се употребуваат само кварцни или силика кивети.

Врз сензитивноста на методите применети во токсиколошките анализи влијаат голем број фактори како што се искуството на аналитичарот, ефикасноста на екстракцијата, интензитетот на боената реакција, кај TLC анализите изборот на реагенсот, формата на петната, типот на силика гелот и др. Обично, детекциониот лимит на сензитивност кај овие анализи е околу 1 mg/l.

Готовите хроматографски плочи се фотографираат и се внесуваат во лабораторискиот дневник, како и останатите резултати што се добиваат од токсиколошките анализи. Сите добиени резултати се запишуваат во лабораторискиот дневник заедно со датумот, име на пациентот, име на анализата, број и тип на примерокот, тестот кој се изведувал, при што примерокот и тестот имаат ист идентификационен број.

Исто така, спектрите и калибрационите графици добиени со анализите треба да се чуваат одредено време после издавање на резултатите. Пред да се издадат нејасни и конфузни резултати, најдобро е за нив да се дискутира со поискусен аналитичар. Ако не е детектиран отров во примероците, тогаш неопходно е во извештајот да се дефинираат применетите тестови и да се наведе лимитот на детекција односно сензитивноста на тестовите.

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 9.

Табела 9. Аналитички токсиколошки извештај

Аналитички токсиколошки извештај						
Од : име на лабораторија, адреса и телефон печат: _____ дата: _____						
пациент: _____ име: _____		возраст / год. на раѓање: _____ пол: _____				
консултант: _____						
референтен број: _____						
примерок	дата	време	лабораториски број	аналитички резултати	концентрација	метод

Пред да се издадат позитивни резултати најдобро е да се направи втора анализа со друг независен метод. Меѓутоа, во практиката не секогаш се применува, посебно доколку на располагање за анализа се едноставни методи. Во тој случај најважно е

истовремено со примерокот да се анализираат слепа проба и стандард (негативна и позитивна контрола).

Квантитативните резултати се издаваат во мерни единици од SI системот. Најчесто се користат следните единици: kg, g, mg,  $\mu\text{g}$ , ng, pg и fg за маса и L како единица за волумен. Концентрацијата на растворите се изразува во: mg%, mg/dl,  $\mu\text{g/ml}$ . Извештајот треба да ги содржи сите информации кои имаат јасна клиничка примена. Навидум е полесно за аналитичарот да ги интерпретира резултатите од анализите каде не е детектирано присуство на отров, но таквите резултати понекогаш е тешко да се пренесат на клиничарот, особено во пишана форма.

Аналитичарот треба да достави информации за тоа кои отрови ги исклучил како причинители за труењето со помош на токсиколошките тестови, да ги наведе сензитивноста и селективноста на избраните методи за анализа, дополнителни фактори кои влијаат на анализата како што се варијациите помеѓу примероците и сл. Од медицинско-етички аспект, при издавањето на резултатите важно е да не се употребува лабораторискиот жаргон, “негативен”, или “не е најден”. Со цел прецизно да се прикаже лабораторискиот резултат се употребува терминот “детектиран е отровот” или “не е детектиран”, дополнето со опис на примерокот и лимитот на детекција на применетиот тест. Меѓутоа, тешко е да се издадат прецизни резултати кога за анализа се употребуваат релативно едноставни и брзи тестови. Така на пример со помош на Trinder-овиот тест лесно се детектира ацетилсалицилна киселина, но истовремено со него се докажуваат и други салицилати кои реагираат на ист начин. Соодветен начин за претставување на овие информации на клиничарот претставува една листа која се прикачува на крајот од извештајот. На таа листа (табела 10) дадени се соединенија или групи на соединенија кои се детектираат според најчесто користените процедури.



Табела 10. Квалитативни тест групи

Група	Соединенија
1	Салицилати (ацетилсалицилна киселина), 4-аминосалицилна к-на, метилсалицилат и салицилна
2	киселина
3	Фенотиазини (chlorpromazin, perphenazin, prochlorperazin, promazin, promethazin, thioradazin)
4	Имипрамин и слични соединенија (clomipramin, desipramin, trimipramin)
5	Трихлоро соединенија (chloral hydrat, chloroform, dichloralphenazon, trichloroethylen)
6	Paracetamol
7	Paraquat, diquat
8	Испарливи редуцирачки агенси (етанол, метанол)
9	Оксидирачки агенси (бромати, хлорати, хипохлорити, нитрати, нитри)
10a	Железо
10б	TLC кисели лекови (барбитурати, glutethimid, methyprylon, phenytoin, primidon) TLC базни лекови: антихистаминици (cyclizin, diphenhydramin), антималарици (chloroquin, quinine), amfetamin, atropin, kofein, carbamazepin, кардиолекови (lidocain, propranolol, verapamil), clomethiazol, cocain, ephedrine, haloperidol, опиоиди (codein, dextropropoxyphen, diamorphin, dihydrocodein, methadon, morphin, pethidin), фенотиазини (chlorpromazine, perphenazin, promazin, promethazin, thioridazin), strychnin и трициклични антидепресиви (amitryptilin, clomipramin, doxepin, desipramin, dosulepin, imipramin, nortriptylin, protriptylin, trimipramin).

Квалитативната анализа на отровите не вклучува само едноставна анализа на примероците туку и соодветна примена на избрани и осетливи методи со цел да се даде целосен и јасен аналитички извештај, кој ќе има значајна улога во третманот на акутното труење. Во табела 11 претставена е аналитичка шема според која се изведуваат токсиколошките анализи.

Табела 11. Опис на аналитичка шема

Чекори	
1	Проценка на итноста и природата на случајот; потврда на клиничките податоци, начин за собирање на примероци
2	Проверка на времето и датата на земање на примерокот со можното време на труење
3	Прелиминарно физичко испитување на примерокот и остатоците од местото на труење
4	Детекција на специфични соединенија на кои упатиле клиничките испитувања и тоа со едноставни тестови и со квантитативна анализа во плазма, серум, полна крв
5	Директни квалитативни тестови на урина, желудочна содржина или остатоци собрани од местото на труење
6	Подготовка на кисели и базни екстракти од примерокот за TLC анализа и развивање на плочите во соодветна мобилна фаза
7	Сушење на плочите и визуелизација на хроматограмите со помош на UV светлина или хромогени реагенси
8	Собирање на резултати и што е можно побрзо пишување на извештај
9	Ако е потребно вршење на квантитативни тестови на полна крв, плазма или серум и дополнителни тестови на оригиналните примероци, како и примероци подоцна земени од пациентот
10	Предавање на итните резултати до клиничарот во форма на аналитички извештај.

За да се добијат веродостојни и релевантни резултати при изведување на токсиколошките анализи, треба да се применуваат принципите на добрата лабораториска пракса. Од аспект на здравствената безбедност, аналитичарот треба да биде свесен за токсичноста на хемиските супстанции и реагенси што се користат во токсиколошките лаборатории. Токсичните реагенси треба да бидат јасно означени и аналитичарите треба да ги почитуваат правилата за нивно чување и ракување: силни киселини и бази не се чуваат заедно, хигроскопни хемикалии се чуваат во десикатор, при разредување на јака киселина не се додава вода во киселината, туку внимателно во мали порции со мешање се додава киселината или базата во вода, со органски растворувачи се работи во дигестор, органските растворувачи се загреваат само на водена бања, никако не смеат да се загреваат на директен пламен и сл. Исто така, треба да се почитуваат правилата за чување и ракување со биолошки примероци, специфични токсични супстанции, прописите за фрлање на отпадни материи и биолошки материјал и сл.

Хемиските реагенси се класифицираат од страна на производителот според степенот на чистота на реагенси со аналитичка чистота, лабораториски степен на

чистота и реагенси за општа примена. На амбалажата на реагенсите обично се наведени препорачаните услови за чување и максималниот лимит за можните онечистувања. Референтните соединенија и стандарди што се употребуваат во аналитичката токсикологија не мора да поседуваат висок степен на чистота како оние кои се употребуваат во фармацевтската квалитативна контрола. Најчесто се применуваат стандарди со лабораториски степен на чистота кои потекнуваат од референтната колекција на лабораторијата и се чуваат под услови што гарантираат сигурност и стабилност.

За подготовка на реагенсите во токсиколошките лаборатории се користи дестилирана или дејонизирана вода која се добива со помош на јоноизменувачка смола. Ако е потребна високо прочистена вода тогаш дестилираната вода се редестилира. рН вредноста на дестилираната вода е околу 4 поради растворениот  $\text{CO}_2$ . Кога се припремаат реагенси или стандардни раствори, посебно треба да се внимава на релативната молекулска маса на солите и нивниот степен на хидратација или кристализација.

За да се обезбеди сигурен квалитет на анализата, истовремено со тест примерокот се анализираат позитивна и негативна контрола. Негативната контрола (слепа проба) се користи за да не се добие лажно позитивен резултат поради контаминиран реагенс или стаклен прибор, а позитивната контрола се користи за да се провери дали реагенсите се правилно подготвени и дали ја зачувале стабилноста.

Ако постои сомневање за лажно позитивен резултат, тогаш анализата се повторува со чист стаклен прибор. Стаклениот лабораториски прибор прво се мие со чешменска вода, па потоа со топол раствор на детергент, се плакне повторно со вода, неколку пати се испира со дестилирана вода и потоа се суши. Ако стаклениот прибор е многу нечист, тогаш се мие со раствор на концентрирана сулфурна киселина и калиум дихромат, но овој начин се избегнува во современите лаборатории поради токсичноста на реагенсот.

Квантитативните тестови бараат многу поголемо внимание и спремност при нивно изведување за да се обезбеди точност, прецизност и репродуцибилност на резултатите.

Како и во другите области на клиничката лабораториска пракса, треба да се постави внатрешна контрола на квалитет за сите квантитативни процедури, која мора да се совпаѓа со надворешните шеми за сигурност на квалитетот.

Лабораториските ваги, автоматските и семиавтоматските пипети покрај тоа што мора да се чуваат чисти, треба да се проверува нивната точност. Автоматските пипети што се калибрирани за одмерување на водени раствори, не треба да се употребуваат за одмерување на органски растворувачи со поголема релативна густина од водата. За одмерување на крв се користат посебни пипетори за една употреба.

Покрај основниот лабораториски прибор, токсиколошките лаборатории се опремени со специјализиран прибор како што е оној за изведување на тенкослојна хроматографија, апаратура за UV/VIS спектрофотометрија, садови за микродифузија и др. За детекција на некои соединенија потребни се посложени методи и техники со поголема сензитивност и селективност како што се гасно-течната хроматографија, HPLC, атомската апсорпциона спектрофотометрија или

имунолошките анализи. Инструментите кои овозможуваат примена на овие техники се поврзани со континуирано одржување и сервисирање на компонентите (инјекторски дел, шприцеви за инјектирање, хроматографски колони, филтри за растворувачите, детекторски лампи, материјали за пакување на колоните).

Задолжителната опрема во токсиколошките лаборатории опфаќа: центрифуга за сепарирање на примероци од крв и екстракти, вортекс или друг механички мешач или пак ротирачки миксер за ресуспендирање, водена бања, бутан гас пламеник, ладилник за чување на примероци и стандарди, рН метар, автоматски или семиавтоматски пипети, поларизационен микроскоп, лабораториски стаклен прибор, волуметриски садови, соодветно место за миеење на приборот, хемиски чиста вода, гас под притисок или азот, плочи за тенкослојна хроматографија, прибор за развивање и визуелизирање на TLC хроматограми, UV лампа, UV/VIS спектофотометри со еден сноп (single-beam) или со два снопа на светлина (double-beam), микродифузионен сад по Conway, порцелански плочи и др.

## ВЕЖБА БР. 1

Датум \_\_\_\_\_  
Работно место \_\_\_\_\_

Име и презиме \_\_\_\_\_  
Досие бр: \_\_\_\_\_ Група \_\_\_\_\_

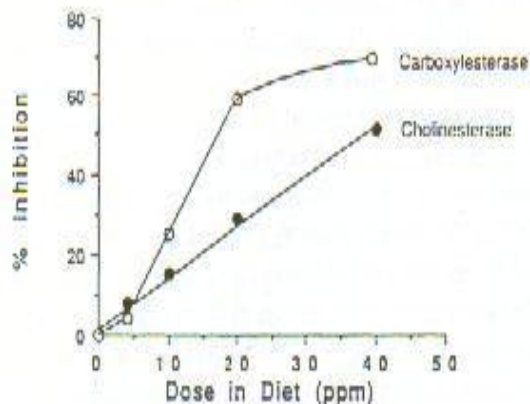
### Проценување на ризикот во токсикологијата (однос доза-одговор)

Врската доза-одговор во токсикологијата ги опишува карактеристиките на реакциите на живите единки кон различни дози на токсичните супстанции. Всушност поврзаноста помеѓу карактеристиките на експозицијата на популацијата кон отровите и спектарот на добиените несакани ефекти се именува како доза - одговор врска. Овој однос претставува основен концепт во токсикологијата, бидејќи неговото правилно толкување има суштинско значење за проучување на токсичните ефекти на супстанциите.

Одговорот на единките што е во зависност од дозата се добива како резултат на промените на специфични биохемиски процеси.

На график 1 е претставена врската доза-одговор за различни дози на органофосфорни пестициди и степенот на инхибиција на ензимите холинестераза и карбоксилестераза.

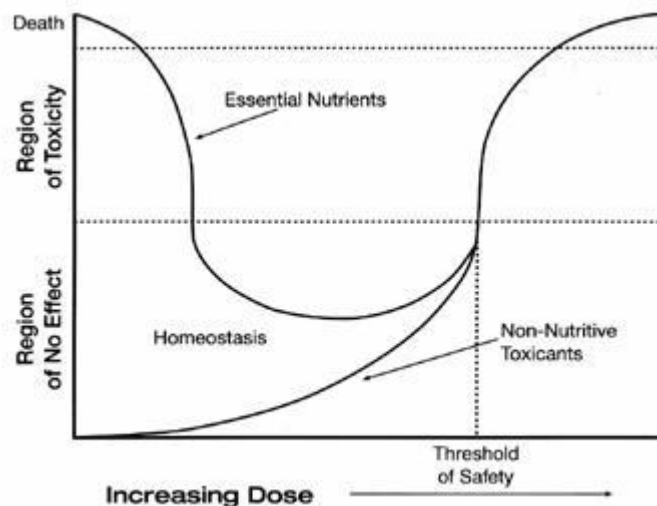
Вообичаено, при графичкото претставување на односот доза-одговор, на ординатата се претставува одговорот како степен или процент, а на апсцисата се нанесуваат администрираните дози.



Слика 1. Доза-одговор врска помеѓу различни дози на органофосфатниот пестицид диоксатион и ензимската инхибиција на ензимите холинестераза и карбоксилестераза

Степенот на инхибиција на двата ензими зависи пропорционално од применетата доза. Нагибот на добиените криви за врската доза-одговор е различен. Одговорот зависи директно од степенот на инхибиција на ензимот холинестераза, иако клиничките симптоми предизвикани од токсичното дејство варираат со промена на дозата поради тоа што некои органски системи се релативно посензитивни на холинестеразната инхибиција. Воглавно, одговорот на еден организам кон различни дози на хемиски супстанции продуцира комплицирана слика односно голем број токсични супстанции делуваат на различни механизми и на повеќе места во организмот. Притоа секоја супстанција се карактеризира со своја доза-одговор врска и соодветен штетен ефект.

При проценувањето на ризикот во токсикологијата, односно за проценка на токсичноста на одредена супстанција, формата на кривата доза-одговор има големо значење. На пример, за супстанциите што се потребни за одвивање на нормалните физиолошки функции (витамини, есенцијални елементи во трагови како Cr, Co и Se), кривата на доза-одговор врската има форма на латинската буква U (слика 2).



Слика 2. Крива доза-одговор за експозиција на есенцијални супстанции и супстанции кои не претставуваат дел од исхраната

Од сликата се гледа дека при многу ниски дози есенцијалните супстанции покажуваат штетни ефекти што се намалуваат со зголемување на дозата. Овој дел од кривата доза-одговор за есенцијалните супстанции одговара на дефицит во организмот. Со зголемување на дозата настанува состојба при која не се детектираат штетни ефекти односно состојба на хомеостаза. Меѓутоа, ако дозата се зголеми на екстремно високо ниво, се појавуваат штетни ефекти кои се квалитативно различни од штетните ефекти што се резултат од внес на многу ниски дози. Интензитетот на штетните ефекти што се појавуваат при многу високи дози расте со зголемување на дозата, исто како и кај други токсични супстанции.

И покрај тоа што есенцијалните супстанции применети во мали дози се суштински за животот на човекот, познато е дека високи дози на витамин А може да предизвикаат оштетување на хепарот и ембрионални дефекти, високи дози на селен го оштетуваат мозокот, а високи дози на естрогени можат да го зголемат ризикот од канцер на дојка.

Друг важен аспект на доза-одговор врската при ниски дози претставува концептот за праг на токсичен ефект. Имено, постојат дози при кои веројатноста за индивидуален одговор е нула. Идентификацијата на прагот на токсичен ефект зависи од мерењето на поединечниот одговор, сензитивноста на мерењето, како и од бројот на примероци што се анализираат. Прагот на токсичен ефект постои речиси за секој токсичен ефект, меѓутоа, варијабилноста во одговорот помеѓу единките и квалитативните промени на одговорот со промена на дозата тешко можат да се опишат преку дозата која не предизвикува ефект.

Затоа, проценка на токсичноста на една супстанција се врши вообичаено преку анализа на формата и нагибот на доза-одговор кривата, а не преку апсолутните вредности за прагот на токсичен ефект. Во зависност од природата на супстанцијата, нагибот на кривата при високи дози може битно да се разликува од нагибот на кривата што се добива при ниски дози. Остар нагиб на кривата доза-одговор најчесто се добива како последица на заситувањето на биотрансформациониот капацитет, протеин-врзувачките места или рецепторите, како и исцрпувањето на интраклеточните кофактори во организмот.

На пример, аналгетикот ацетаминофен кога се употребува во терапевтски дози покажува минимална хепатотоксичност. И покрај тоа што при терапевтски дози на ацетаминофен, се продуцира во хепарот неговиот токсичен метаболит, N-acetyl-p-benzoquinonimin (NAPQI), тој брзо се детоксицира преку процес на коњугација со интраклеточниот антиоксиданс глутатион. Меѓутоа, при внес на високи дози на ацетаминофен, се исцрпува нивото на глутатион во хепарот и се акумулира NAPQI, предизвикувајќи сериозно оштетување на црниот дроб.

При утврдување на доза-одговор врската се подразбираат неколку претпоставки. Првата претпоставка се однесува на добиениот ефект кој е резултат на дејството на испитуваната супстанција при што нивото на ефектот е пропорционален на применетата доза. Втората хипотеза опфаќа три претпоставки, и тоа:

- постои молекула или рецепторно место со кое супстанцијата влегува во интеракција за да продуцира одговор;
- степенот на добиен одговор е пропорционален со концентрацијата на супстанцијата на рецепторното место;
- концентрацијата на рецепторното место е пропорционална на внесената доза.

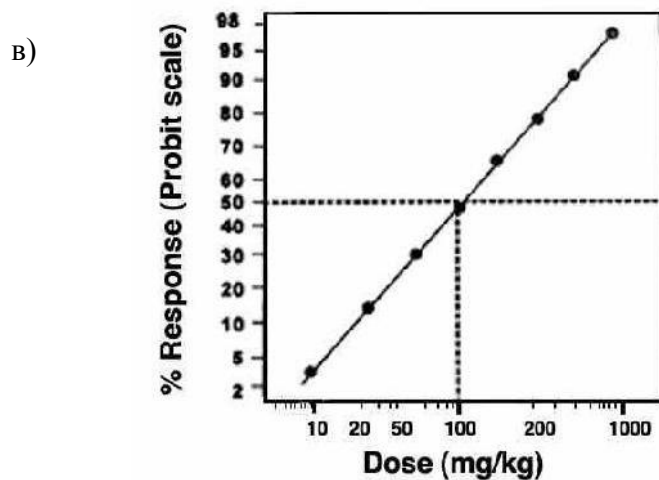
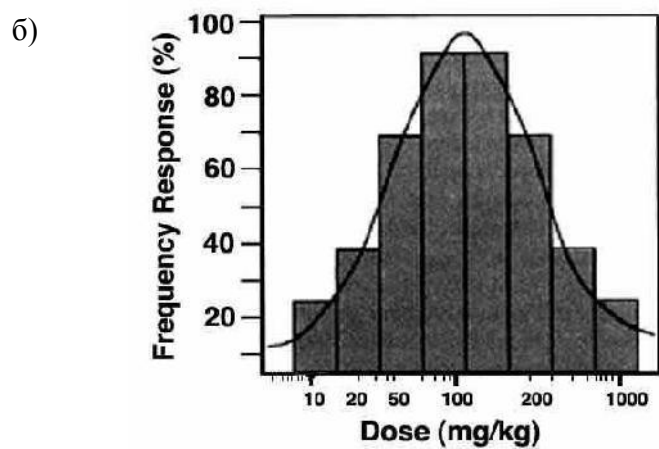
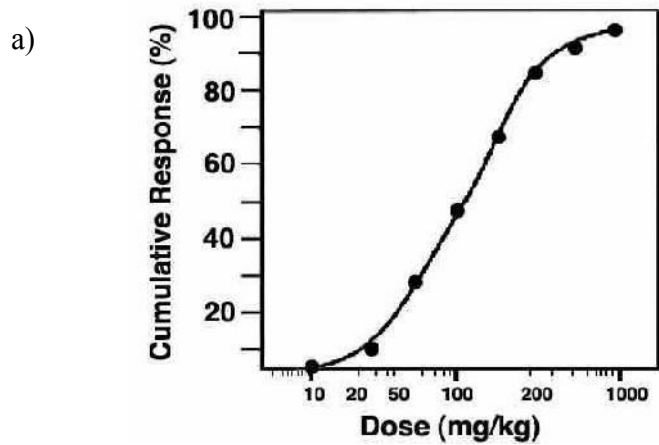
Третата претпоставка на доза-одговор врската се однесува на примена на соодветна метода за мерење и изразување на токсичните ефекти. Притоа, може да се следат различни параметри на токсичноста, но најпогодни се оние кои имаат непосредна врска со промените што се резултат на експозицијата на токсичната супстанција. На пример, при анализа на токсичното дејство на органофосфорните пестициди, најчест критериум за токсичноста претставува активноста на ацетилхолинестеразата во мозокот или еритроцитите, иако можат да се користат и други параметри како што се активноста на серумската холинестераза, промени во однесувањето, крвниот притисок и др. Една токсична супстанција може да има цел

спектар на доза-одговор врски, и тоа по една за секој токсичен ефект. Според тоа, хемиската супстанција која предизвикува канцер преку генотоксични ефекти, оштетување на хепар преку инхибиција на специфични ензими и нарушување на ЦНС преку различни механизми, може да има три различни доза-одговор врски, по една за секој токсичен ефект.

Евалуацијата на токсичните ефекти на супстанцијата се заснова на корелацијата помеѓу количеството на внесена токсична супстанција и степенот на одговор на биолошките системи односно доза-одговор врска. Во токсикологијата често се прави квантификација на доза-одговор врска. Едно од првите вообичаени испитувања што се вршат кај новите хемиски супстанции е одредување на средната летална доза ( $LD_{50}$ ).  $LD_{50}$  претставува статистички изведена поединечна доза за одредена супстанција која предизвикува смрт кај 50% од тестираните животни. Ако испитувањето опфаќа различни дози и поголема група на еднородни примероци од експерименталните животни за секоја доза, резултатите можат да се прикажат графички на неколку начини (слика 3). Кога се работи со голем број дози и експериментални животни, најчесто резултатите се претставуваат со помош на сигмоидна крива доза-одговор. Сигмоидната крива покажува релативна линеарност во делот помеѓу 16 и 84%. Овие вредности ги претставуваат границите на една стандардна девијација од средната вредност во популација што се карактеризира со нормална дистрибуција.

Понатаму доза-одговор врска може да се претстави со помош на хистограм преку фреквенцијата на одговорот (морталитет, леталност) во однос на дозата. Столбчињата на хистограмот ја претставуваат разликата помеѓу бројот на угинати животни третирани со одредена доза и бројот на угинати животни после давање на следна помала доза. Од графикот се гледа дека мал број животни реагирале при примање на најниски и највисоки дози, додека поголем број животни реагирале на дози кои се наоѓаат помеѓу најниските и највисоките дози. Притоа добиената крива со изглед на своно се означува како нормална фреквентна распределба. Нормалната распределба се должи на разликите во чувствителноста на единките кон токсичното дејство на хемиските супстанции, при што тие разлики се означуваат со терминот биолошка варијација. Хистограмот јасно покажува дека експерименталните животни што одговараат на левиот дел од кривата се хиперсензитивни, а оние чиј одговор се наоѓа на десниот дел од кривата се резистентни.





Слика 3. Графичко претставување на односот доза-одговор; на апсцисата е дадена дозата, а на ординатата процент на смртност (а), фреквенција на смртност (б), односно нормални еквивалентни единици на смртност (в)

При нормалната распределба 68.3% од примероците се во границите на средната вредност +/- 1SD, 95.5% во границите на средната вредност +/- 2SD и 99.7% во границите на средната вредност +/- 3SD. Бидејќи квантифицирањето на односот доза-одговор најчесто ја следи нормалната дистрибуција, процентот од одговорот може да се трансформира од единици на стандардна девијација од средната вредност во единици на нормална еквивалентна девијација, при што 50% одговараат на 0 нормални еквивалентни единици, 84.1% одговара на +1, а 16% ефект одговара на -1 нормални еквивалентни единици. За да се избегнат негативни вредности, на нормалните еквивалентни единици им се додава бројот 5, па оттука изведена единица за 50% ефект е 5, за нормалната еквивалентна единица +1, изведена единица е 6, а за нормалната еквивалентна единица -1, изведена единица е 4. Со трансформирање на податоците од сигмоидната крива и хистограмот во изведени единици се добива права, од каде лесно се пресметува LD<sub>50</sub> на испитуваната хемиска супстанција. За таа цел, почнувајќи од изведената единица 5, односно од вредноста за 50% летален ефект се повлекува хоризонтална линија паралелна со апсцисата до местото каде ќе се пресече со правата што ја претставува врската доза-одговор. Од точката на пресекот помеѓу двете линии се повлекува нормала чиј што пресек со апсцисата ја претставува LD<sub>50</sub> вредноста за токсичната супстанција. На овој начин може да се одреди и било која друга летална доза (за 90% од популацијата, LD<sub>90</sub>).

Во последниве години се зголемува интересот за определување на вредноста за LD<sub>50</sub>, првенствено за да се заштитат лабораториските животни вклучени во *in vivo* испитувањата. Важно е да се нагласи дека LD<sub>50</sub> не претставува биолошка константа, затоа што голем број фактори влијаат на токсичноста на некоја супстанција, како што се животинскиот вид, возраста, телесната тежина, видот на исхрана, начинот на третирање со отровите, времетраењето на испитувањата. Поради тесната поврзаност на овие фактори со варијабилноста на LD<sub>50</sub>, се препорачува да се направи карактеризација на LD<sub>50</sub> во одреден опсег, на пр. LD<sub>50</sub> се движи помеѓу 5 и 50 mg/kg или 50-500 mg/kg итн.

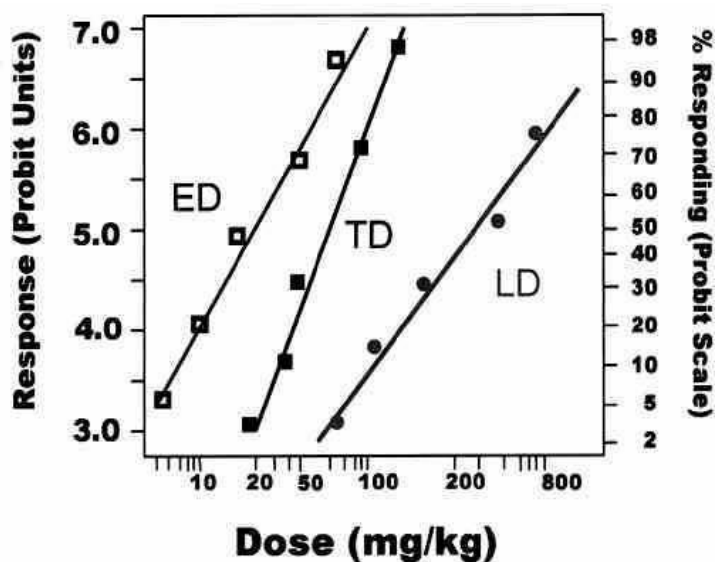
За животните кои се изложени на хемиски супстанции во воздухот или водата во која живеат не може точно да се одреди дозата што ја примаат. Во такви случаи вообичаено се одредува леталната концентрација LC<sub>50</sub>. LC<sub>50</sub> претставува концентрација на хемиска супстанција во водата или воздухот што доведува до смрт кај 50% од животните.

И покрај тоа што LD<sub>50</sub> и LC<sub>50</sub> претставуваат вредности со ограничено значење, акутните летални испитувања се суштински за карактеризирање на токсичните ефекти на хемиските супстанции и нивниот ризик за здравјето на луѓето. Сепак, најзначајните научни податоци не се добиени врз основа на специфичните LD<sub>50</sub> вредности, туку преку тестовите за акутна токсичност и постморталните клинички испитувања при обдукционите прегледи на експерименталните животни.

Во токсикологијата се применува уште еден параметар кој е сличен на LD<sub>50</sub> и се нарекува средна ефективна доза (ED<sub>50</sub>). ED<sub>50</sub> претставува доза на некој лек која предизвикува фармаколошки, биохемиски или физиолошки ефект кај 50% од третираните животни.

Односот помеѓу LD<sub>50</sub> и ED<sub>50</sub> претставува терапевтски индекс (TI = LD<sub>50</sub>/ ED<sub>50</sub>) и се применува како апроксимативен израз за релативната сигурност на лековите.

Терапевтскиот индекс вообичаено се дефинира како однос помеѓу дозата што предизвикува токсичен ефект и дозата неопходна за добивање на саканиот терапевтски одговор. Поголема вредност за терапевтскиот индекс укажува на поголема релативна безбедност на лековите. На слика 4 се претставени доза-одговор врските за саканиот ефект на хемиската супстанција (ED) како на пр. анестезија, токсичниот ефект (TD), пр. оштетување на црн дроб и леталната доза (LD).



Слика 4. Споредба помеѓу ефективната доза на хемиската супстанција (ED), токсичната доза (TD) и леталната доза (LD).

Од графикот се гледа дека кривите за леталната доза и ефективната доза се паралелни помеѓу себе ( $LD_{50}$  е поместена за повисоки дози). Ова упатува на заклучок дека механизмот на кој супстанцијата предизвикува терапевтски ефект е идентичен со механизмот на кој истата супстанција предизвикува летален ефект. Параметарот граница на сигурност најчесто наоѓа примена при еднократно администрирање на некоја хемиска супстанција.

$$GC = LD_1 / ED_{99}$$

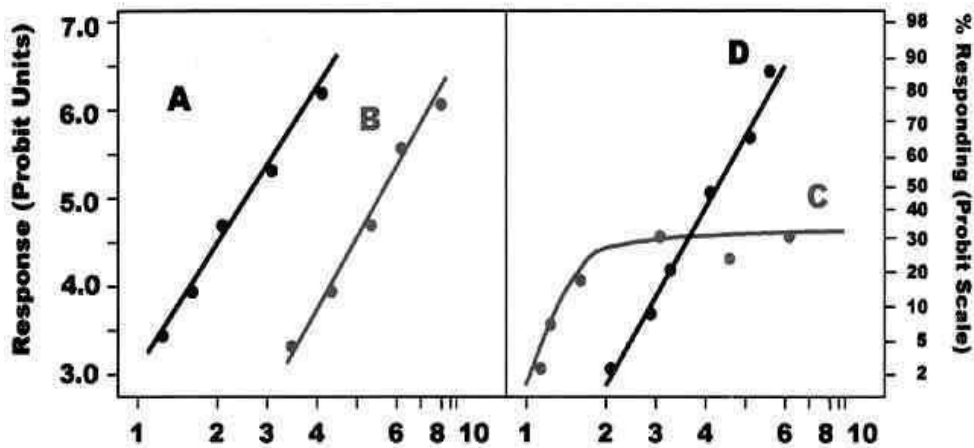
За супстанциите каде се работи за повеќекратна експозиција, овој параметар не е применлив. За хемиските супстанции што не се лекови, границата на сигурност наоѓа примена при проценувањето на ризикот, и тоа како индикатор за разликата помеѓу пресметаната доза на која е експонирана човечката популација и највисоката токсична доза определена кај експерименталните животни. Степенот на акумулација на една хемиска супстанција и нејзините токсични ефекти се изразуваат со помош на параметарот индекс на хроничност.

$$CI = LD_{50} \text{ за поединечна доза (mg/kg/ден)} / LD_{50} \text{ за 90 дневна доза (mg/kg/ден)}$$

Теоретски, ако супстанцијата нема кумулативни својства, индексот на хроничност ќе биде 1. Доколку компонентата е апсолутно кумулативна, индексот на хроничност ќе има вредност 90.

Летално време претставува параметар кој укажува на времето потребно за да се појави токсичниот ефект на една супстанција.  $LT_{50}$  се дефинира како време за кое умираат 50% од експерименталните животни.

За да се споредат токсичните ефекти на две или повеќе хемиски супстанции, неопходно е да се утврдат доза-одговор врските за токсичните ефекти што тие ги предизвикуваат. Потоа графички се споредува моќноста и ефикасноста на токсичните ефекти што ги предизвикуваат хемиските супстанции. На слика 5 се претставени доза-одговор кривите за четири различни супстанции, врз чија основа се објаснуваат параметрите моќност и ефикасност на една супстанција.



Слика 5. Шематско претставување на разликите во односите доза-одговор помеѓу 4 различни супстанции; разлика помеѓу моќност и ефикасност на токсичните супстанции

Кривите доза-одговор покажуваат дека супстанцијата А е помоќна од супстанцијата В според нејзината релативна позиција по должина на апсцисата каде е претставена дозата. Моќноста се однесува на опсегот на дозите од каде што започнува одговорот. Исто така, супстанцијата С е помоќна од D. За разлика од моќноста, максималната ефикасност се однесува на горната граница на кривата доза-одговор во однос на ординатата (оската на која се нанесува одговорот). Оттука следува дека хемиските супстанции А и В имаат еднаква максимална ефикасност, додека максималната ефикасност на супстанцијата С е помала од D.

## ВЕЖБА БР. 2

Датум \_\_\_\_\_

Работно место \_\_\_\_\_

Име и презиме \_\_\_\_\_

Досие бр: \_\_\_\_\_ Група \_\_\_\_\_

### Квантитативно определување на јаглерод моноксид во воздух

#### 2.1. ПРЕТХОДНИ ПРЕДЗНАЕЊА

*Јаглерод моноксид* се вбројува во групата на гасови кои се наоѓаат во животната средина како загадувачи на воздухот. Јаглерод моноксид настанува со непотполно согорување на органските материи. Тој претставува безбоен гас, без мирис и вкус, не иритира, полесен е од воздухот и затоа се наоѓа во погорните слоеви од атмосферата. Просечната концентрација на јаглерод моноксид во воздухот е околу 0,1 ppm. Меѓутоа, неговата концентрација може да надмине и 100 ppm на места каде се одвива интензивен сообраќај, индустриски погони, топилници (отпадните гасови содржат 55-80% CO), при експлозии во рудници, чад од цигари (200-800 ppm). Просечната концентрација на CO во воздухот се одржува преку реакцијата со хидроксил радикалите при што настанува јаглерод диоксид, како и со преминување во повисоките слоеви на атмосферата.

*Токсичните ефекти* на CO произлегуваат од неговото врзување со хемоглобинот, при што се формира стабилно соединение карбоксихемоглобин. Затоа, од физиолошки аспект, CO претставува крвен отров. Неговиот афинитет кон хемоглобинот е поголем за 200-300 пати во однос на афинитетот на кислород кон хемоглобинот. Карбоксихемоглобинот во крвта го инхибира ослободувањето на кислород од оксихемоглобинот, што резултира со отежнато снабдување на ткивата со кислород. Јаглерод моноксид поседува и директно токсично дејство бидејќи има афинитет да се врзува за голем број клеточни протеини (цитохром P450 оксидаза, миоглобин), ја намалува продукцијата на АТР, предизвикува апоптоза на мозочното ткиво, предизвикува оксидативен стрес, дури и кога е присутен во мали концентрации.

Клиничката слика на труење е правопрпорционална на концентрацијата на CO вдишан со воздухот, времето на експозиција, длабочината на дишењето, нивото на срцевата работа, потребите на ткивата за кислород и содржината на хемоглобин во крвта. Симптомите на труење со јаглерод моноксид настануваат како резултат на аноксијата која е најизразена во срцето и мозокот. Клиничката слика на труење ги опфаќа следните симптоми: забрзано дишење, главоболка, емотивна лабилност, конфузија, мачнина, повраќање, дијареа, церебрален и пулмонарен едем, респираторна депресија. Од кардиоваскуларните симптоми најпрво настануваат периферна вазодилатација и забрзување на срцевата работа, а подоцна се појавува исхемична болка во градите, аритмија, хипотензија и застој на срцевата функција.

Кај пациентите во најголем дел се забележуваат цијаноза и бледило. Смрт настапува кога  $2/3$  Hb е блокиран со CO, односно кога коефициентот на интоксикација ќе достигне 66%.

Коефициент на интоксикација претставува однос помеѓу концентрацијата на CO во испитуваната крв и максималната концентрација на CO која може да ја прими крвта.

Реакцијата на создавање на карбоксиемоглобин е реверзибилна во присуство на кислород, што овозможува елиминација на CO од организмот после дисоцијација на COHb со активна респирација.

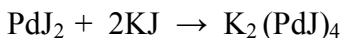
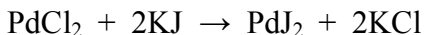
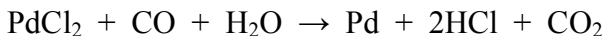
*Третманот при труење со CO* опфаќа брзо отстранување на пациентите од местото на труење. На пациентите со зачувана свест им се дава кислород се додека не исчезнат симптомите на труење, односно додека процентот на заситување на крвта со COHb не се намали под 10%. Децата и бремените жени треба да примаат кислород подолго време, бидејќи CO се врзува и за Hb на фетусот. Кај пациенти кои се во кома, како и кај оние со сериозни невролошки и кардиоваскуларни нарушувања, симптомите не исчезнуваат со давање на кислород и со корекција на хипотензијата и ацидозата и затоа се применува терапија со кислород под притисок со чија помош се скратува времетраењето на комата, се спречува појава на евентуални подоцнежни последици од интоксикацијата, се подобрува снабденоста на ткивата со кислород и се забрзува дисоцијацијата на карбоксиемоглобинот.

*Максимална дозволена концентрација на CO во воздух.* Заради заштита на хуманото здравје, неопходно е да се превземат мерки кои ќе овозможат континуирано следење на концентрацијата на јаглерод моноксид во воздухот, при што граничната вредност изнесува  $10 \text{ mg/m}^3$  (Directive 2000/69/EC of the European Parliament and of the Council, Annex II). Според наведената Европска Директива, граничната вредност за дозволена концентрација на јаглерод моноксид во воздух мора да биде изразена во единицата мерка  $\text{mg/m}^3$  при стандардни услови, температура од 273 K и притисок од 101.3 kPa. Во литературните податоци од постар датум се сретнуваат значително повисоки вредности за максималната дозволена концентрација на CO во воздух од 50 ppm, односно  $58 \text{ mg/m}^3$  (Stankovic, 1986).

**Принцип на вежбата:**

Определување на концентрација на CO во воздух се заснова на редуктивните својства на CO. Јаглерод моноксид го редуцира паладиум хлорид во водена средина до елементарен паладиум, а притоа се оксидира до CO<sub>2</sub>. Вишокот на неизредуциран паладиум хлорид со калиум јодид образува комплексно соединение со црвенкасто обојување. Интензитетот на обојувањето се мери колориметриски преку зелен филтер. Отчитаната апсорпција се нанесува на у оската во координатен систем и потоа графички се определуваат mg на изредуциран PdCl<sub>2</sub> од стандардна крива која се добива како однос помеѓу mg на изредуциран PdCl<sub>2</sub> (вредностите се нанесуваат на x оската) и апсорпцијата на растворот (вредностите се нанесуваат на y оската).

## 2.2. МЕХАНИЗАМ НА РЕАКЦИЈАТА



## 2.3. ПРАКТИЧЕН ДЕЛ

### 2.3.1. Реагенси

- $\text{PdCl}_2$  со концентрација 1 mg/ml
- 10% раствор на  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$
- 1% раствор на Gummi Arabica
- 15% раствор на KJ

### 2.3.2. Лабораториски материјал

- внатрешна фудбалска гума
- стаклени шишиња од 500 ml
- одмерни колби од 100 ml
- филтерна хартија
- колориметар

### 2.3.3. Постапка за определување на концентрација на CO во воздух

Преку погоден систем од стаклени шишиња се зема 500 ml загаден воздух, примерок кој се наоѓа во внатрешна фудбалска гума. Воздухот претходно се пропушта низ активен јаглен за да се отстранат гасовите кои можат да ја попречат реакцијата помеѓу јаглерод моноксид и паладиум хлорид.

Во шишето каде се наоѓа воздухот кој се испитува, брзо се додава 1 ml од растворот на  $\text{PdCl}_2$  со концентрација 1 mg/ml, 0.2 ml 10%  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  и 3 ml дестилирана вода. Шишето повремено се промешува во текот на 1 час.

Потоа, содржината квантитативно се пренесува преку филтер хартија во одмерна колба од 100 ml. Филтерот се испира со дестилирана вода и се додаваат 2 ml раствор на арапска гума. Содржината на колбата добро се промешува и се додаваат 10 ml 15% раствор на KJ и тоа, половина директно во колбата, а остатокот преку филтерната хартија. Колбата се дополнува до 100 ml, а интензитетот на добиеното црвено обојување се мери на колориметар преку зелен филтер.

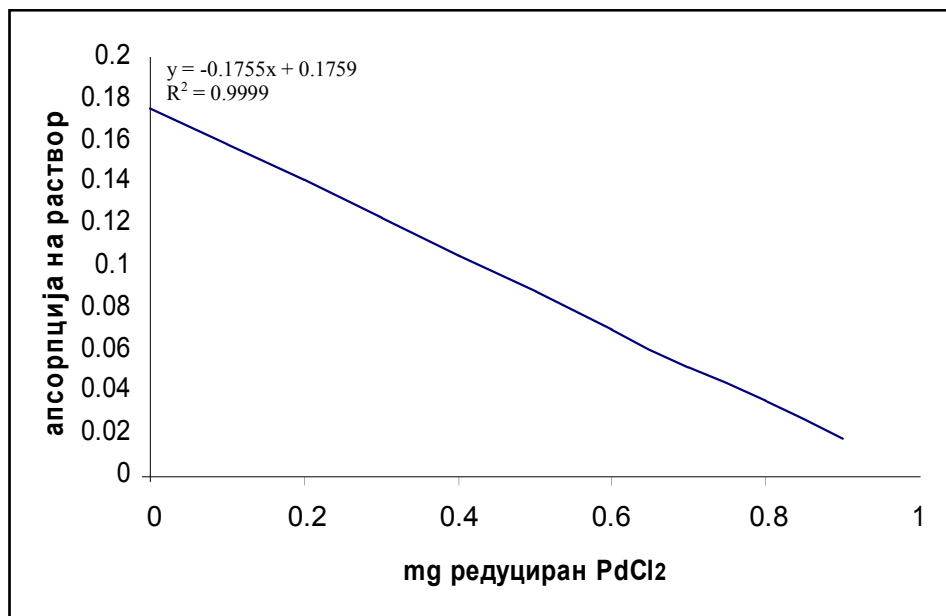
## 2.4. ПРЕСМЕТКИ

Редуцираниот PdCl<sub>2</sub> се добива врз основа на стандардна крива.

Потоа, концентрацијата на CO во воздух се пресметува според следните формули:

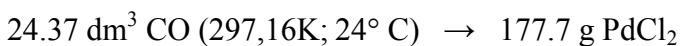
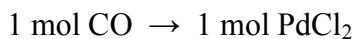
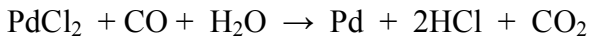
$$\text{CO (ppm)} = 274.3 \times \text{mg (редуциран PdCl}_2\text{)}$$

$$\mu\text{mol / m}^3 \text{ (CO)} = \frac{\text{ppm} \times 1000}{24.5}$$



Слика 1. Зависност на апсорпцијата на растворот на комплексот K<sub>2</sub>(PdJ)<sub>4</sub> од масата на редуцираниот PdCl<sub>2</sub>

Нумеричкиот фактор 274.3 со кој се множат mg редуциран PdCl<sub>2</sub> за да се добие концентрацијата на CO во воздух изразена во ppm, произлегува од следните равенки:





$$24.37 \text{ cm}^3 \text{ CO} \rightarrow 177.7 \text{ mg PdCl}_2$$

$$X \text{ cm}^3 \text{ CO} \rightarrow 1 \text{ mg PdCl}_2$$

$$X = 0.13714 \text{ cm}^3 \text{ CO}$$

Дефиниција:  $0.13714 \text{ cm}^3 \text{ CO}$  претставува максимален волумен на  $\text{CO}$  во  $500 \text{ cm}^3$  воздух кој на дадена температура реагира со  $1 \text{ mg PdCl}_2$ .

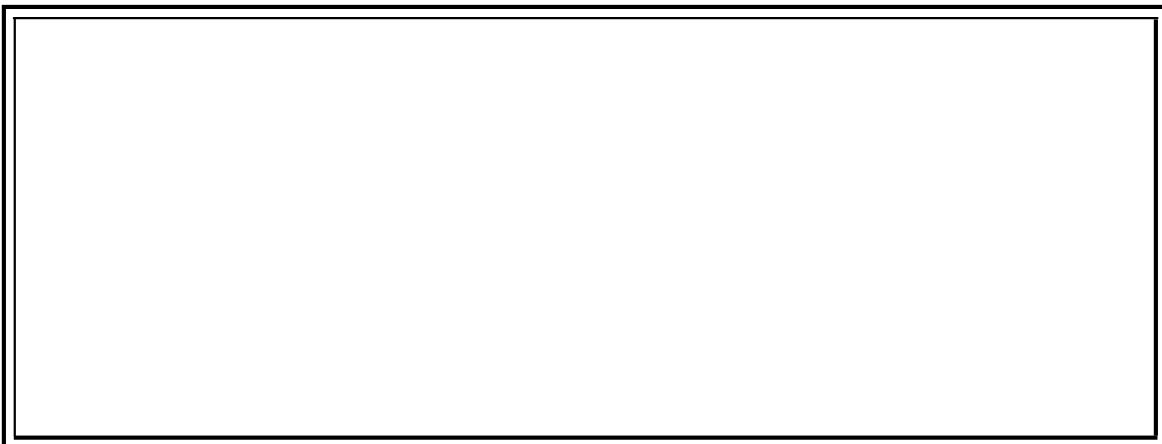
$$500 \text{ cm}^3 \text{ воздух} \rightarrow 0.13714 \text{ cm}^3 \text{ CO}$$

$$1\,000\,000 \text{ cm}^3 (1\text{m}^3) \rightarrow X \text{ cm}^3 \text{ CO}$$

$$X = 274.3 \text{ cm}^3 \text{ CO}$$

## 2.5. РЕЗУЛТАТИ

2.5.1. Пресметај ја концентрацијата на  $\text{CO}$  во воздух врз основа на добиената апсорпциона вредност на растворот од стандардна крива.



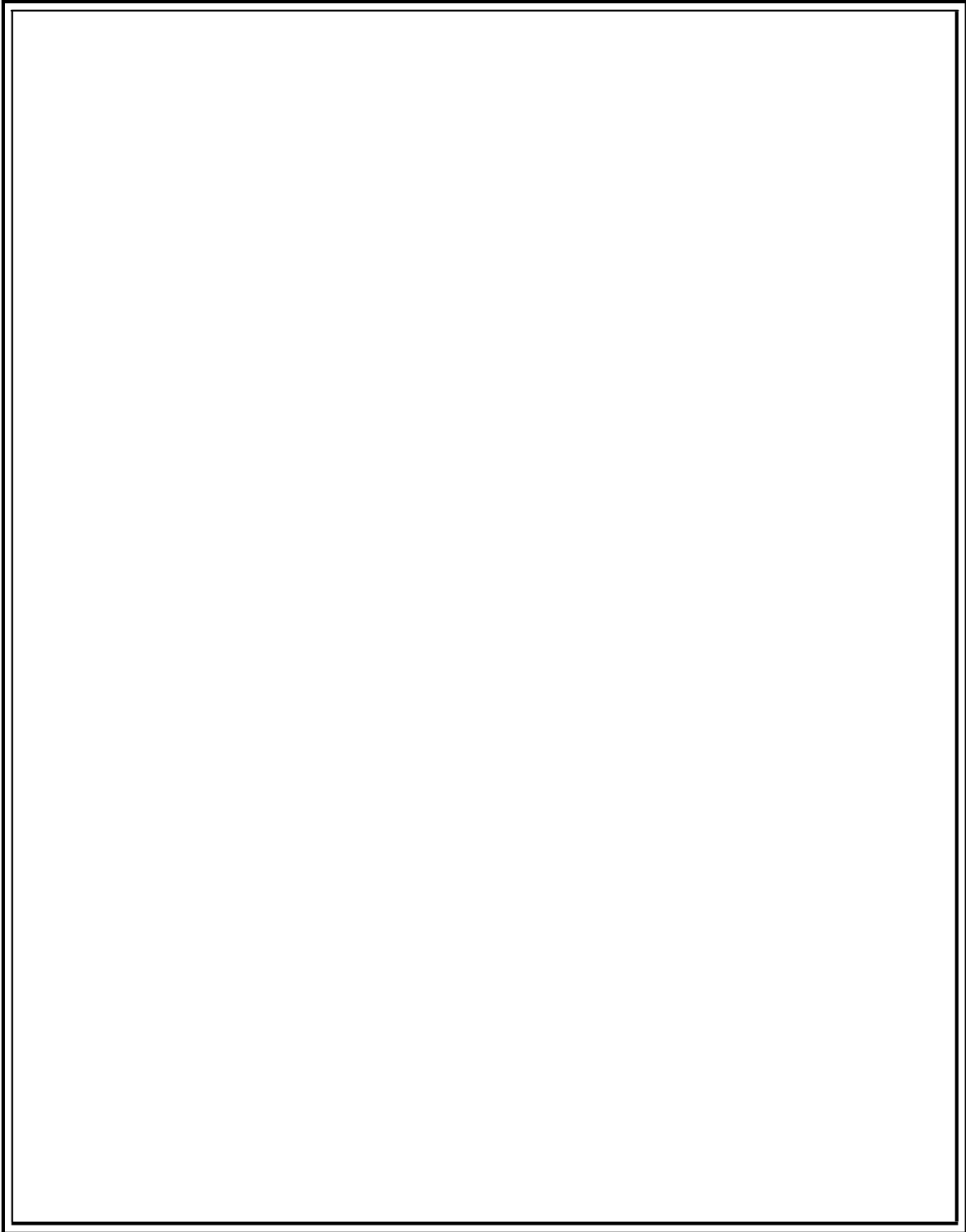
## 2.6. ЗАКЛУЧОК

---

---

## 2.7. ПРАШАЊА

- 2.7.1. Врз основа на што се определува концентрацијата на јаглерод моноксид во реакцијата и од што зависи?
- 2.7.2. Зошто во реакцијата се додаваат алуминиум сулфат и арапска гума?
- 2.7.3. Дефинирај го факторот 274.3.
- 2.7.4. Колку е максимално дозволената концентрација на CO во воздухот?
- 2.7.5. Опиши го токсичното дејство на CO во организмот на човекот.
- 2.7.6. Кои мерки се превземаат при труење со CO?



Освоени бодови:

\_\_\_\_\_

Асистент:

\_\_\_\_\_

### ВЕЖБА БР. 3

Датум \_\_\_\_\_

Работно место \_\_\_\_\_

Име и презиме \_\_\_\_\_

Досие бр: \_\_\_\_\_ Група \_\_\_\_\_

## Квантитативно определување на јаглерод моноксид во крв по микродифузиона метода

### 3.1. ПРЕТХОДНИ ПРЕДЗНАЕЊА

*Својствата, токсичните ефекти, клиничката слика и третманот при труење со јаглерод моноксид се дадени во вежбата бр. 2. Во аналитичката токсикологија се применуваат две едноставни и прецизни методи за определување на јаглерод моноксид во крвта на затруените лица, и тоа: паладометриска (микродифузиона) метода со која се одредува волуменот на CO во крвта и Wolff-ова метода со чија помош се одредува процентот на карбоксиемоглобин во крвта. При акутно труење се одредува степенот на интоксикација, додека пак кај хроничните труења потребна е квантификација заради дијагностицирање на труењето.*

*Wolff-овата метода претставува специфична, брза (се изведува за 15 минути), рутинска метода која е технички лесно изводлива и погодна за анализа на акутни труења со јаглерод моноксид. Принципот на методата се заснова на отпорноста на карбоксиемоглобинот кон различни реагенси кои потполно ја менуваат природата на оксиемоглобинот. За изведување на Wolff-овата метода потребна е венска крв која најпрво се хемолизира (односот крв : вода = 1:4). Потоа во примерокот се додава пуферна смеса што содржи натриум ацетат и оцетна киселина. Анализата се пренесува во водена бања на 55°C и се загрева 5 минути. Доколку крвта содржи оксиемоглобин, тогаш ќе се добие кафеав талог. Ако крвта содржи COHb, тогаш нема да се промени под дејство на пуферот. Потоа, растворот се филтрира, а интензитетот на добиеното обојување е право пропорционален на концентрацијата на COHb во крвта.*

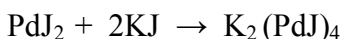
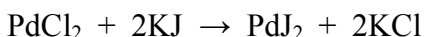
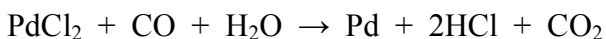
*Паладометриската метода претставува неспецифична, рутинска метода која е исто така технички лесно изводлива, но е погодна за анализа на хронични труења со јаглерод моноксид бидејќи потребно е подолго време за изведување (24 часа). Оваа метода се нарекува уште и микродифузиона затоа што во садот по Conway CO од крвта испарува по пат на микродифузија. За изведување на паладометриската метода потребна е капиларна крв.*

Максимална дозволена концентрација на CO во крв. Според паладометриската метода за одредување на концентрацијата на јаглерод монооксид во крв, максималната дозволена концентрација за CO во крв изнесува 0,7 ml CO / 100 ml крв.

**Принцип на вежбата:**

Определување на концентрација на CO во крв се заснова на редукција на растворот на PdCl<sub>2</sub> и одредување на вишокот на нередуциран паладиум. Вишокот на неизредуциран паладиум хлорид со калиум јодид образува комплексно соединение со црвенкасто обојување. Интензитетот на обојувањето се мери колориметриски преку зелен филтер. Отчитаната апсорпција се нанесува на у оската во координатен систем и потоа графички се определуваат µg на нередуциран PdCl<sub>2</sub> од стандардна крива која се добива како однос помеѓу µg на нередуциран PdCl<sub>2</sub> (вредностите се нанесуваат на x оската) и апсорпцијата на растворот (вредностите се нанесуваат на у оската).

### 3.2. МЕХАНИЗАМ НА РЕАКЦИЈАТА



### 3.3. ПРАКТИЧЕН ДЕЛ

#### 3.3.1. Реагенси

- n/200 PdCl<sub>2</sub>
- 3% раствор на H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- 5% раствор на KJ
- вазелин

#### 3.3.2. Лабораториски материјал

- микродифузионен сад по Conway
- саатно стакло
- одмерни колби од 25 ml
- стаклена инка
- памук
- колориметар

### 3.3.3. Постапка за определување на концентрација на CO во крв

Во надворешниот сад по Conway, чии ивици се премачкани со вазелин се ставаат 0,2 ml крв и 1,4 ml дестилирана вода. Во централниот дел од садот се поставува мало саатно стакло во кое се додава точно 0,5 ml n/200 PdCl<sub>2</sub> што одговара на 133 µg Pd. Потоа, во надворешниот дел од садот се додаваат 0,6 ml 3% сулфурна киселина, внимавајќи крвта и киселината да не се измешаат. Садот брзо се затвора со стаклен поклопец кој треба добро да се залепи на намачканите ивици. Откако ќе се затвори садот, хемализираната крв и киселината кои се наоѓаат на двете спротивни страни, добро се мешаат со кружни движења на микродифузиониот сад. Потоа садот се остава на темно најмалку 2 часа и притоа повремено се промешува содржината. После завршената дифузија содржината на саатното стакло квантитативно се пренесува во одмерна колба од 25 ml преку стаклена инка во која се наоѓа малку навлажнет памук. Саатното стакло и стаклената инка се промиваат со мал волумен дестилирана вода.

Потоа во одмерната колба се додаваат 1 ml 5% раствор на KJ и колбата се дополнува до 25 ml со дестилирана вода. Интензитетот на добиеното обојување се отчитува на колориметар преку зелен филтер наспроти слепа проба која се приготвува од 1 ml 5% раствор на KJ и се дополнува со дестилирана вода до 25 ml.

## 3.4. ПРЕСМЕТКИ

Нередуцираниот PdCl<sub>2</sub> се добива врз основа на стандардна крива.

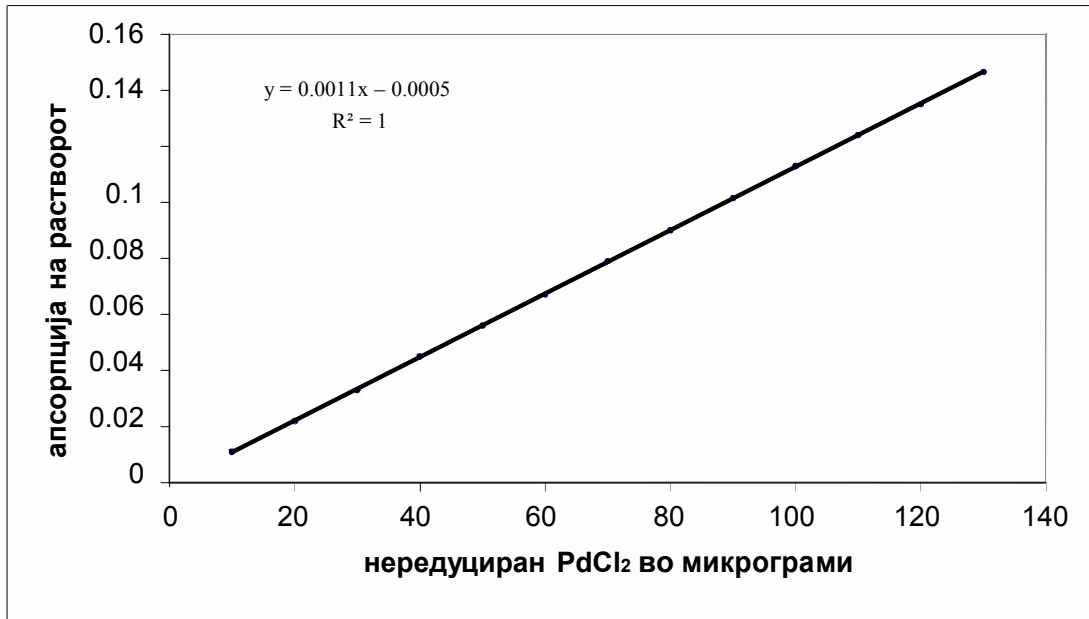
Потоа, концентрацијата на CO во крв се пресметува според следните формули:

$$\text{CO (ml/100ml крв)} = (133 - X) \times 0.105$$

133 = количество на Pd во микрограми пред редукција

X = количество на Pd во микрограми по редукција

$$\text{CO (mmol/L крв)} = \text{CO (ml/100ml крв)} \times 0.415$$



Слика 1. Зависност на апсорпцијата на растворот на комплексот  $K_2(PdJ)_4$  од масата на нередуцираниот  $PdCl_2$

- Пресметка на концентрацијата на растворот на  $PdCl_2$  кој се користи во анализата:

$$n/200 PdCl_2 = 1/200 \times N = 0.005 N PdCl_2 = 0.0025 M PdCl_2$$

\*Во 0.5 ml 0.0025 M  $PdCl_2$  раствор имаме 133  $\mu g$  Pd:

$$1L 1M PdCl_2 \rightarrow 177.7 g PdCl_2$$

$$1L 0.0025 M PdCl_2 \rightarrow X g PdCl_2$$

$$X = 0.444 g PdCl_2$$

$$1000 ml 0.0025M PdCl_2 \rightarrow 444 mg PdCl_2$$

$$0.5 ml 0.0025 M PdCl_2 \rightarrow X mg PdCl_2$$

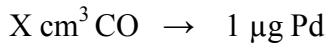
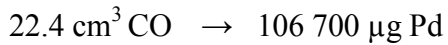
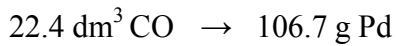
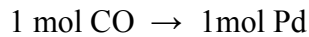
$$X = 0.222 mg PdCl_2$$

$$177.7 \mu g PdCl_2 \rightarrow 106.7 \mu g Pd$$

$$222 \mu g PdCl_2 \rightarrow X \mu g Pd$$

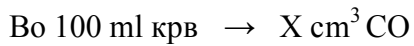
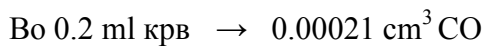
$$X = 133 \mu g Pd$$

- Пресметка на нумеричкиот фактор 0,105:



$$X = 0.00021 \text{ cm}^3 \text{ CO}$$

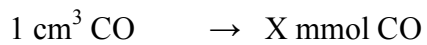
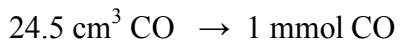
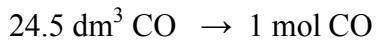
Дефиниција: 0.00021 cm<sup>3</sup> CO претставува максимален волумен на CO кој продуцира 1 μg Pd при притисок од 1 атмосфера и температура од 0°C, изразен на работен волумен од 0,2 ml крв.



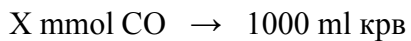
$$X = 0.105 \text{ cm}^3 \text{ CO}$$

- Пресметка на факторот 0.415:

$$T = 298\text{K} \text{ и } V = 24.5 \text{ dm}^3/\text{mol}$$



$$X = 0.0409 \text{ mmol CO}$$



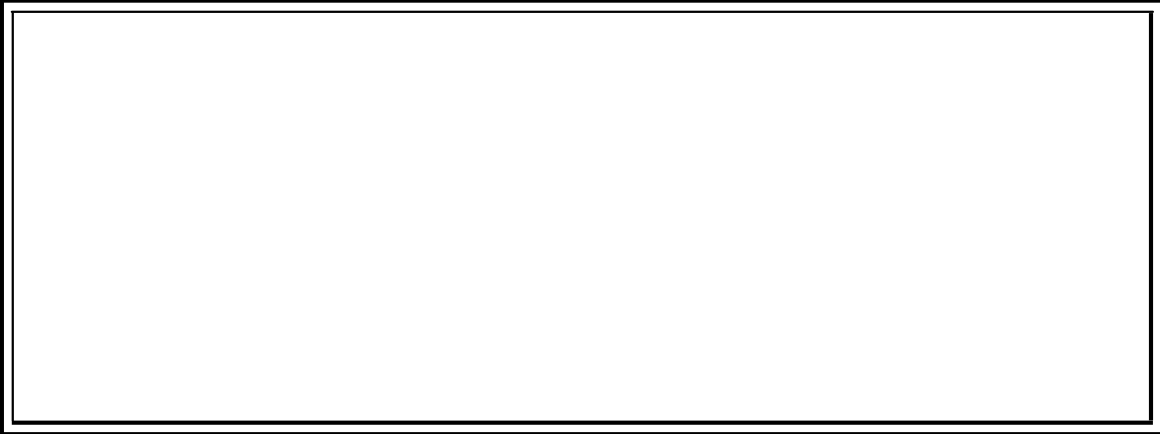
$$X = 0.409 \text{ mmol CO} / 298 \text{ K}$$

$$X = 0.415 \text{ mmol CO} / 293 \text{ K}$$



### 3.5. РЕЗУЛТАТИ

3.5.1. Пресметај ја концентрацијата на CO во воздух врз основа на добиената апсорпциона вредност на растворот од стандардна крива.



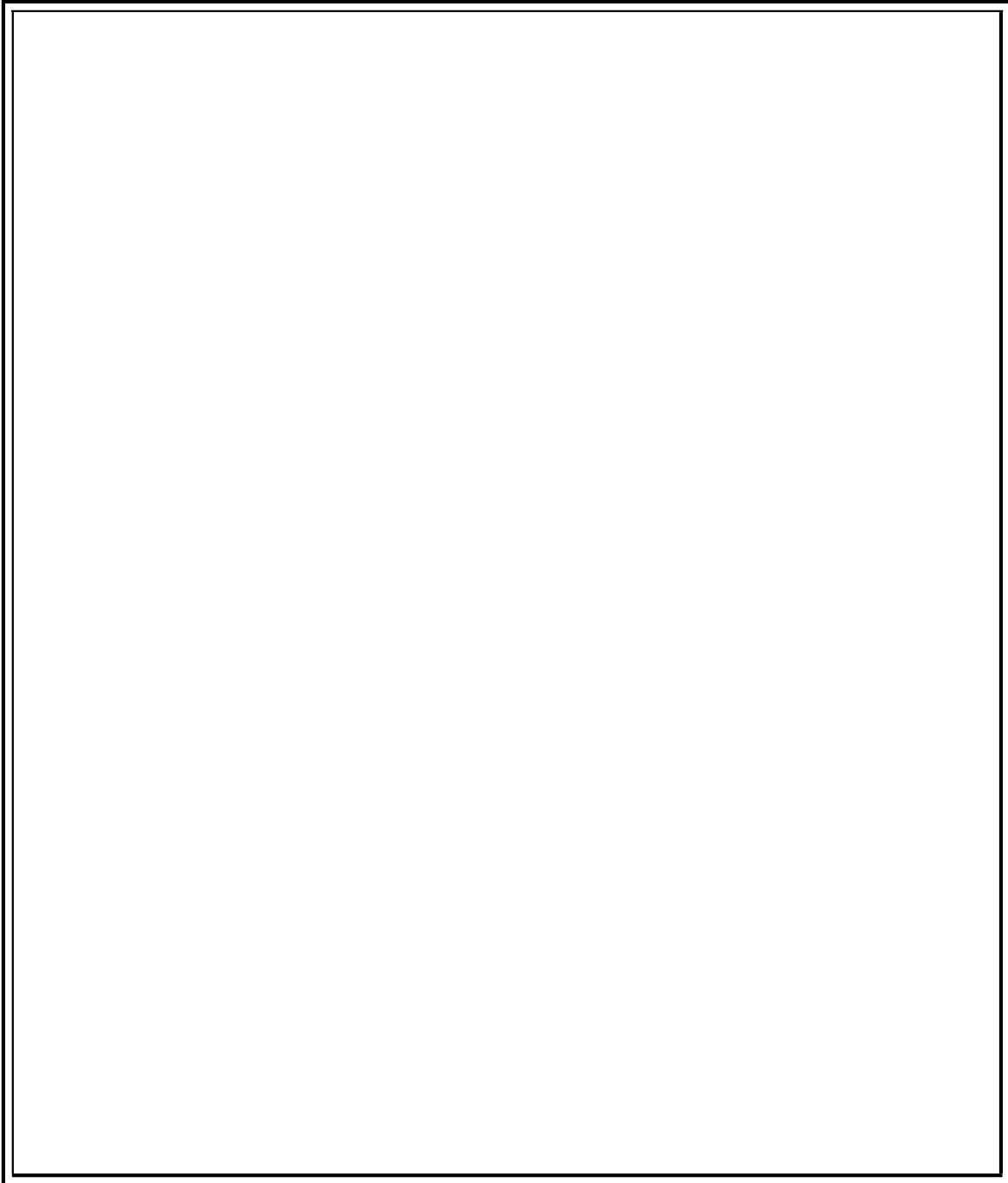
### 3.6. ЗАКЛУЧОК

---

---

### 3.7. ПРАШАЊА

- 3.7.1. Опиши ја накратко реакцијата што се одвива во затворениот систем и објасни зошто реагенсите се ставаат по одреден редослед во садот по Conway?
- 3.7.2. Врз основа на што се пресметува концентрацијата на CO во крвта?
- 3.7.3. Наведи ги разликите помеѓу паладометриската и Wolff-овата метода за определување на CO во крв.
- 3.7.4. Опиши ја накратко квантитативната метода што се користи за определување на CO во крв при акутни труења?
- 3.7.5. Колку е максималната дозволена концентрација изразена како ml CO/100ml крв?



Освоени бодови:

\_\_\_\_\_

Асистент:

\_\_\_\_\_

**ВЕЖБА БР. 4**

Датум \_\_\_\_\_

Работно место \_\_\_\_\_

Име и презиме \_\_\_\_\_

Досие бр: \_\_\_\_\_ Група \_\_\_\_\_

**Квантитативно определување на јаглерод диоксид во воздух по метода на Pettenkofer****4.1. ПРЕТХОДНИ ПРЕДЗНАЕЊА**

*Јаглерод диоксид* не претставува отров во класична смисла на зборот. Токсиколошкото значење на  $\text{CO}_2$  се согледува при зголемување на неговата концентрација над концентрацијата на кислород во атмосферата.  $\text{CO}_2$  настанува во процесите на согорување, вклучително и дишењето. Нормалната концентрација на  $\text{CO}_2$  во атмосферата се движи помеѓу 0,03 и 0,06 волуменски проценти. Во експирираниот воздух на луѓето  $\text{CO}_2$  се содржи околу 5,6%. Концентрацијата на  $\text{CO}_2$  во работните простории не смее да надмине 0,1%. Покрај тоа што во животната средина постои рамнотежа помеѓу енормното создавање на  $\text{CO}_2$  и фотосинтетската функција на растенијата, во последниве години, поради се поголемата употреба на цврсти горива доаѓа до пореметување на геохемискиот баланс на  $\text{CO}_2$  и  $\text{O}_2$ . Јаглерод диоксид во атмосферата создава еден слој кој оневозможува премин на топлината преку него т.н. ефект на стаклена бавча со што доаѓа до глобално покачување на температурата.

Јаглерод диоксид претставува гас без боја и мирис, со накисел вкус, потешок е од воздухот, во поголема концентрација доведува до загушување кое не е резултат на неговата токсичност, туку настанува поради намалената концентрација на кислород.

*Токсичните ефекти* на  $\text{CO}_2$  произлегуваат од редукцијата на рН вредноста во крвта што води кон состојба на ацидоза. Благите симптоми на ацидозата претставуваат замор и слабо изразена хипертензија. Со зголемување на степенот на ацидоза се појавуваат сонливост и конфузија. Продолжена експозиција на умерени концентрации на  $\text{CO}_2$  освен ацидоза, може да предизвика несакани ефекти врз метаболизмот на калциум и фосфор и настанување на калциумови депозити во меките ткива. Освен тоа, тој е токсичен и за срцето бидејќи ја намалува контрактилната функција. Исто така, можна е појава на ембрионални абнормалности поради влијанието на зголемената концентрација на  $\text{CO}_2$  во атмосферата врз метаболизмот на мајката.

При подолга експозиција на концентрација на  $\text{CO}_2$  од 1%, како симптом се појавува поспаност. Концентрацијата од 2% делува слабо наркотично, го зголемува крвниот притисок и го ослабува слухот. Во случаи кога концентрацијата на  $\text{CO}_2$  ќе достигне 5%, делува стимулативно на респираторниот центар, предизвикува вртоглавица,

конфузија, потешкотии при дишењето. Ако се зголеми концентрацијата на 8% и доколку времето на експозиција е помеѓу 5 и 10 минути, тогаш се појавуваат симптоми како главоболка, потење, нарушен вид, тремор и губење на свест.

*Третманот при труење со CO<sub>2</sub>* опфаќа брзо отстранување на затруените лица од просторијата.. На пациентите им се дава вештачко дишење или кислород.

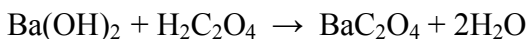
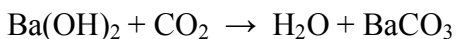
*Максимална дозволена концентрација на CO<sub>2</sub> во воздух.* Според Европската регулатива, граничната вредност за дозволена концентрација на CO<sub>2</sub> во воздух изнесува 5000 ppm, односно 9000 mg/m<sup>3</sup> (Commission Directive 2006/15/EC, Annex).

#### **Принцип на вежбата:**

Определување на концентрацијата на CO<sub>2</sub> во воздух се заснова на неговата реакција со бариум хидроксид при што се формира бариум карбонат. Вишокот од неизреагираниот бариум хидроксид се титрира со оксална киселина при што настанува бел талог од бариум оксалат. Од разликата на потрошениот волумен на оксална киселина за титрација на слепата проба и анализата и со множење со соодветни нумерички фактори се пресметува концентрацијата на јаглерод диоксид во ppm.

Титрацијата на вишокот од бариум хидроксид секогаш се врши со помош на слаба киселина (H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>), затоа што јаките минерални киселини како што се хлороводородната или сулфурната киселина го раствораат талогот од бариум карбонат и волуменот од киселината потрошен за титрација на слепата проба и на анализата ќе биде еднаков.

## **4.2. МЕХАНИЗАМ НА РЕАКЦИЈАТА**



## **4.3. ПРАКТИЧЕН ДЕЛ**

### **4.3.1. Реагенси**

- 0.05 mol/l раствор на Ba(OH)<sub>2</sub>
- 0.05 mol/l раствор на H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>
- индикатор фенолфталеин

### **4.3.2. Лабораториски материјал**

- специјално стаклено шише
- испираница
- бирети, ерленмаери, пипети

### 4.3.3. Постапка за определување на концентрација на CO<sub>2</sub> во воздух

Со помош на специјална стаклена апаратура се провлекуваат 500 cm<sup>3</sup> воздух преку испираница во која се наоѓаат 10 ml 0.05 mol/l раствор на Ba(OH)<sub>2</sub>. Притоа, јаглерод диоксид од воздухот реагира со баритната вода и настанува BaCO<sub>3</sub>.

Вишокот од непотрошениот Ba(OH)<sub>2</sub> се титрира со 0.05 mol/l раствор на H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub> во присуство на индикатор фенолфталеин. Паралелно со анализата се изведува и слепа проба која се состои од 10 ml 0.05 mol/l раствор на Ba(OH)<sub>2</sub>. Титрацијата треба да се врши што е можно побрзо за да не се дозволи навлегување на CO<sub>2</sub> од околниот воздух кој се наоѓа во просторијата каде се изведува анализата. Исто така, при титрацијата треба да се избегнува директно дишење над испираницата во која се врши титрацијата.

## 4.4. ПРЕСМЕТКИ

Концентрацијата на CO<sub>2</sub> во воздух се пресметува според следниве формули:

$$\text{CO}_2 \text{ (ppm)} = (H-A) \times 2 \times 1.225 \times 1000$$

X = ml 0.05 mol/L оксална киселина потрошена за титрација на слепа проба

A = ml 0.05 mol/L оксална киселина потрошена за титрација на примерокот

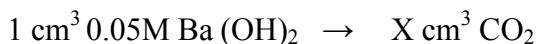
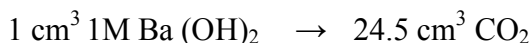
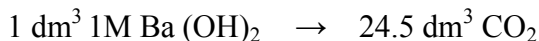
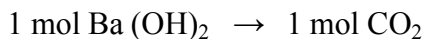
$$\text{CO}_2 \text{ (mmol/m}^3\text{)} = \text{CO}_2 \text{ (ppm)} / 24.5$$

- За да се изрази резултатот во ppm, треба да се помножи со 2 и 1000:

Анализата се работи со 500 cm<sup>3</sup> воздух, оттука следува:

$$500 \text{ cm}^3 \times 2 = 1000 \times 1000 = 1\,000\,000 \text{ односно ppm}$$

- Пресметка на факторот 1.225:



$$X = 1.225 \text{ cm}^3 \text{ CO}_2$$

## 4.5. РЕЗУЛТАТИ

4.5.1. Пресметај ја концентрацијата на  $\text{CO}_2$  во воздух според дадените формули.

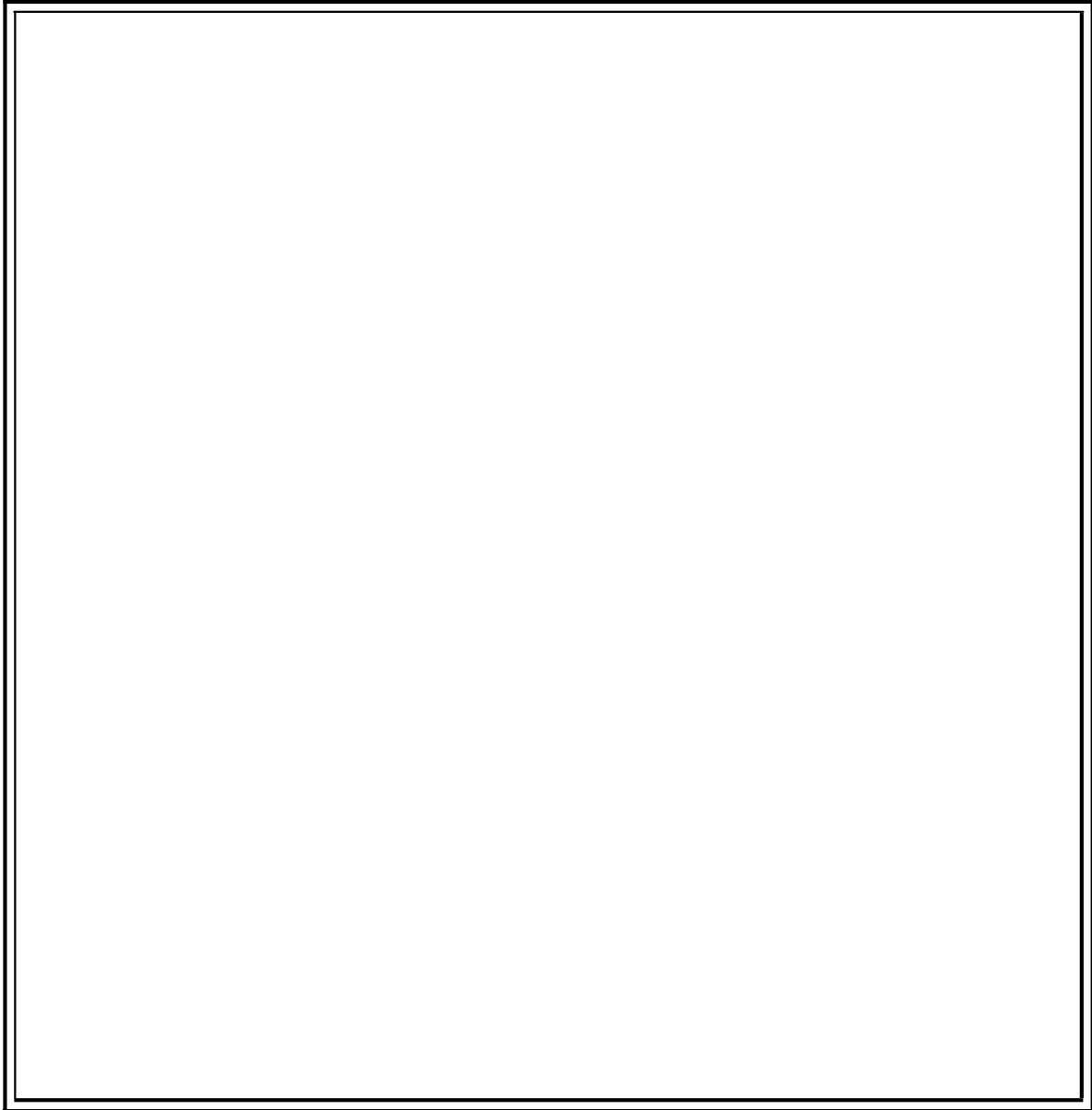
## 4.6. ЗАКЛУЧОК

---

---

## 4.7. ПРАШАЊА

- 4.7.1. Кога јаглерод диоксид има токсиколошко значење?
- 4.7.2. Опиши ја накратко токсичноста на  $\text{CO}_2$  за организмот на човекот?
- 4.7.3. Зошто титрацијата на бариум карбонат се врши со слаба киселина како што е оксалната, наместо со  $\text{HCl}$  или  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ?
- 3.7.4. Колку е максимално дозволената концентрација на  $\text{CO}_2$  во воздухот?



Освоени бодови:

\_\_\_\_\_

Асистент:

\_\_\_\_\_

## ВЕЖБА БР. 5

Датум \_\_\_\_\_

Работно место \_\_\_\_\_

Име и презиме \_\_\_\_\_

Досие бр: \_\_\_\_\_ Група \_\_\_\_\_

### Определување на вкупни феноли во урина по метода на Rainsford - Davies

#### 5.1. ПРЕТХОДНИ ПРЕДЗНАЕЊА

*Фенол* се сретнува уште под неколку различни имиња како на пример, карболна киселина, хидроксибензен, монохидроксибензен, бензенол, фенил хидроксид, фенил алкохол. Фенолот е запалива супстанција, со јако изразени корозивни својства и остар мирис. Добро се апсорбира преку сите патишта на експозиција, а како последица од неговото токсично дејство се појавуваат системски ефекти. Фенолот се добива со фракциона дестилација на камениот јаглен, како и со органска синтеза. Најзначајна примена има во производство на фенолни смоли и пластички. Исто така наоѓа примена во производство на експлозивни, вештачки ѓубрива, бои, гуми, адхезиви, во смеса со гасена вар претставува ефикасно средство за дезинфекција. Фенолот е одамна познат по своето антисептично делување, а сеуште се користи како антипруритик, каустичен агенс и надворешно како анестетик. Може да се најде во ниски концентрации во состав на многу лековити производи, вклучително препарати наменети за третман на локални оштетувања на кожата.

*Токсичните ефекти* на фенол се должат на експозиција на овој токсичен агенс и тоа со инхалација, контакт со очи и кожа и ингестија. Без разлика на начинот на експозиција, фенолот може да предизвика системско труење. Заради корозивните својства, фенолот предизвикува хемиски изгореници локално на местото на контактот. Симптомите при системско труење опфаќаат иницијална преодна стимулација на CNS, после што следи депресија на CNS. Можна е појава на напади и кома само за неколку минути од почетокот на експозицијата, но исто така може да се појават и по 18 часа од експозицијата. Останатите симптоми се науzea, повраќање, дијареа, метхемоглобинемија, хемолитичка анемија, обилно потење, хипотензија, аритмија, респираторна депресија, пулмонарен едем и тахикардија.

Клиничката слика на труење е резултат на способноста на фенолот да врши денатурација на протеините. Генерално, фенолот се смета за протоплазматски отров. Тој може да предизвика периферно нервно оштетување познато како демиелинизација на аксоните. Нарушувањето што го предизвикува фенолот врз други органски системи (ацидобазен дисбаланс, акутна бубрежна инсуфициенција) доведува до понатамошни компликации.



Хроничната експозиција на фенол може да предизвика ренално оштетување, вклучително бубрежна инфламација, едеми на бубрежните тубули и клетки и дегенеративни промени на гломерулите. Можна е појава на хепарно нарушување и промени на пигментот на кожата.

*Третманот при труење со фенол* вклучува брза деконтаминација и регулирање на респираторната и срцевата функција. Доколку експозицијата на фенол е преку кожа, веднаш се отстранува облеката и се испираат зафатените делови од кожата со полиетилен гликол со ниска молекулска маса (PEG 300 или PEG 400), кој може да се аплицира разреден (50%) за полесно нанесување. Третманот продолжува се додека се чувствува мирис на фенол. За оваа цел може да се употреби и раствор на глицерол. При труење со фенол кое настанало со ингестија, не смее да се предизвика емеза. Ако затруениот е во свесна состојба, тогаш се дава активен јаглен (за возрасни 60-90 g, а за деца 25-50 g). Исто така, кај свесни пациенти може да се даде млеко, белки од јајце, раствор на желатин или варова вода.

*Максимална дозволена концентрација на фенол.* Заради изразеното токсично дејство на бензенот и фенолот, Европската Директива пропишува гранични вредности за експозиција овие супстанции. Наведената Директива го карактеризира бензенот како генотоксичен карциноген за човекот, од каде произлегува дека граничната вредност за бензен во воздухот мора да биде пониска од онаа што е поврзана со ризик по хуманото здравје и изнесува  $5 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (Directive 2000/69/EC of the European Parliament and of the Council, Annex I). Оваа вредност мора да биде изразена во единицата мерка  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  при стандардни услови, температура од 273 K и притисок од 101,3 kPa. Граничната вредност при професионална експозиција на фенол во тек на работно време од 8 часа изнесува 2 ppm, односно  $7,8 \text{ mg}/\text{m}^3$  (Commission Directive 2000/39/EC, Annex). Граничната вредност за бензен во циркулацијата не може да се одреди затоа што тој нормално не се наоѓа во крвта. Вообичаено бензенот после инхалација брзо се оксидира и преминува во феноли кои се излучуваат во урината врзани со сулфурна и глукуронска киселина. Граничната вредност за екскреција на феноли во урина кај неекспонирана популација и за методи кои се користат за определување на бензен е до 20 mg/l, додека за методи со кои се определуваат вкупни феноли, максималната дозволена концентрација на феноли во урина изнесува 50 mg/l (Stankovic, 1986).

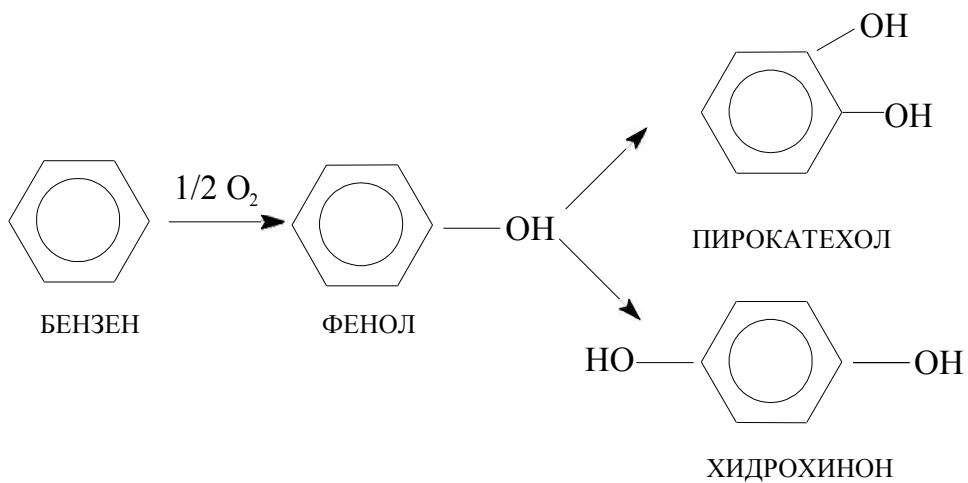
**Принцип на вежбата:**

Според методата по Rainsford – Davies, фенолите екстрахирани од урина се определуваат семиквантитативно. Фенолите во урината се наоѓаат во облик на врзани коњугати со глукуронска и сулфурна киселина. Затоа најпрво се ослободуваат со помош на перхлорна киселина при загревање. Ослободените феноли се екстрахираат од урината со етер. Етерскиот екстракт на феноли со Gibbs-ов реагенс во алкална средина (pH = 10.5) која се обезбедува со алкално-боратен пуфер формира комплексни соединенија со сино обојување. Врз основа на интензитетот на синото обојување се проценува концентрацијата на фенолите во анализата при што концентрацијата на фенолите се однесува право пропорционално со интензитетот на обојувањето.

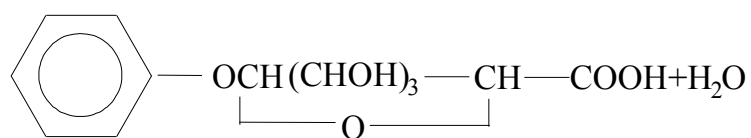
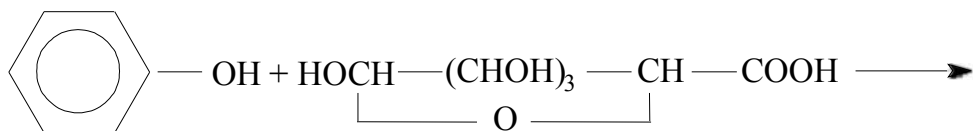
## 5.2. РЕАКЦИИ НА ФЕНОЛ

### 5.2.1. Синтеза на фенол

### 5.2.2. Реакции за детоксикација на фенол

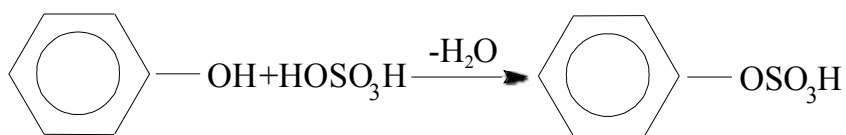


#### а) коњугација на фенол со глукуронска киселина



ФЕНИЛ ГЛУКУРОНСКА КИСЕЛИНА

#### б) коњугација на фенол со сулфурна киселина



ФЕНИЛ СУЛФОНСКА КИСЕЛИНА

### 5.3. ПРАКТИЧЕН ДЕЛ

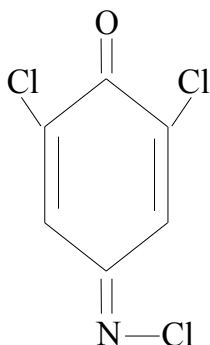
#### 5.3.1. Реагенси

- $\text{HClO}_4$
- диетил етер
- алкален боратен пуфер ( $\text{pH} = 10.5$ )
- Gibbs-ов реагенс (2,6-дихлорохинон-4-хлоримид)

#### 5.3.2. Лабораториски материјал

- епрувети со брусен затворач
- водена бања
- бела порцеланска плоча со вдлабнати бунарчиња
- автоматски пипети

#### 5.3.3. Структура на Gibbs-ов реагенс



2.6 – ДИХЛОРОХИНОН–4 - ХЛОРИМИД

#### 5.3.4. Постапка за определување на вкупни феноли во урина

Во епрувета со брусен затворач се зема 1 ml урина и 0.4 ml перхлорна киселина. Епруветата се загрева 10 минути на зовриена водена бања која во моментот на поставување на анализата треба да се тргне од решото. При загревање на урината во присуство на  $\text{HClO}_4$ , фенолите кои се наоѓаат во врзана состојба во облик на коњуиграни глукурониди и сулфати, се хидролизираат и преминуваат во слободна состојба. Потоа, анализата се лади под воден млаз до собна температура, се додаваат 4 ml етер, епруветата се затвора и се промешува неколку пати за да се изврши екстракција на фенолите. Откако ќе се издвои етерскиот екстракт, се пристапува кон негова анализа. Во длабнатината на една бела порцеланска плоча по следниов редослед се додаваат:

- 0.2 ml алкален боратен пуфер ( $\text{pH} = 10.5$ )
- 0.1 ml етерен екстракт
- 2 капки Gibbs-ов реагенс.

После додавањето на реагенсите и екстрактот, содржината на плочата се промешува со кружни хоризонтални движења. Во случај на присуство на феноли во екстрактот, во длабнатината на плочата ќе се појави сино

обојување, чиј интензитет е во директна врска со концентрацијата на фенолите во урината.

#### **5.4. ПРЕСМЕТКИ**

Проценка на концентрацијата на фенолите се врши визуелно врз основа на интензитетот на обојувањето:

- розево обојување	17 mg/l
- сиво обојување	26 mg/l
- многу слабо сино обојување	66 mg/l
- синкасто обојување	94 mg/l
- сино обојување	138 mg/l
- многу силно сино обојување	320 mg/l

#### **5.5. РЕЗУЛТАТИ**

5.5.1. Определи ја концентрацијата на вкупни феноли во урина според интензитетот на добиеното обојување.

--

#### **5.6. ЗАКЛУЧОК**

---

## 5.7. ПРАШАЊА

5.7.1. Врз основа на кој принцип се определува концентрацијата на феноли во урина?

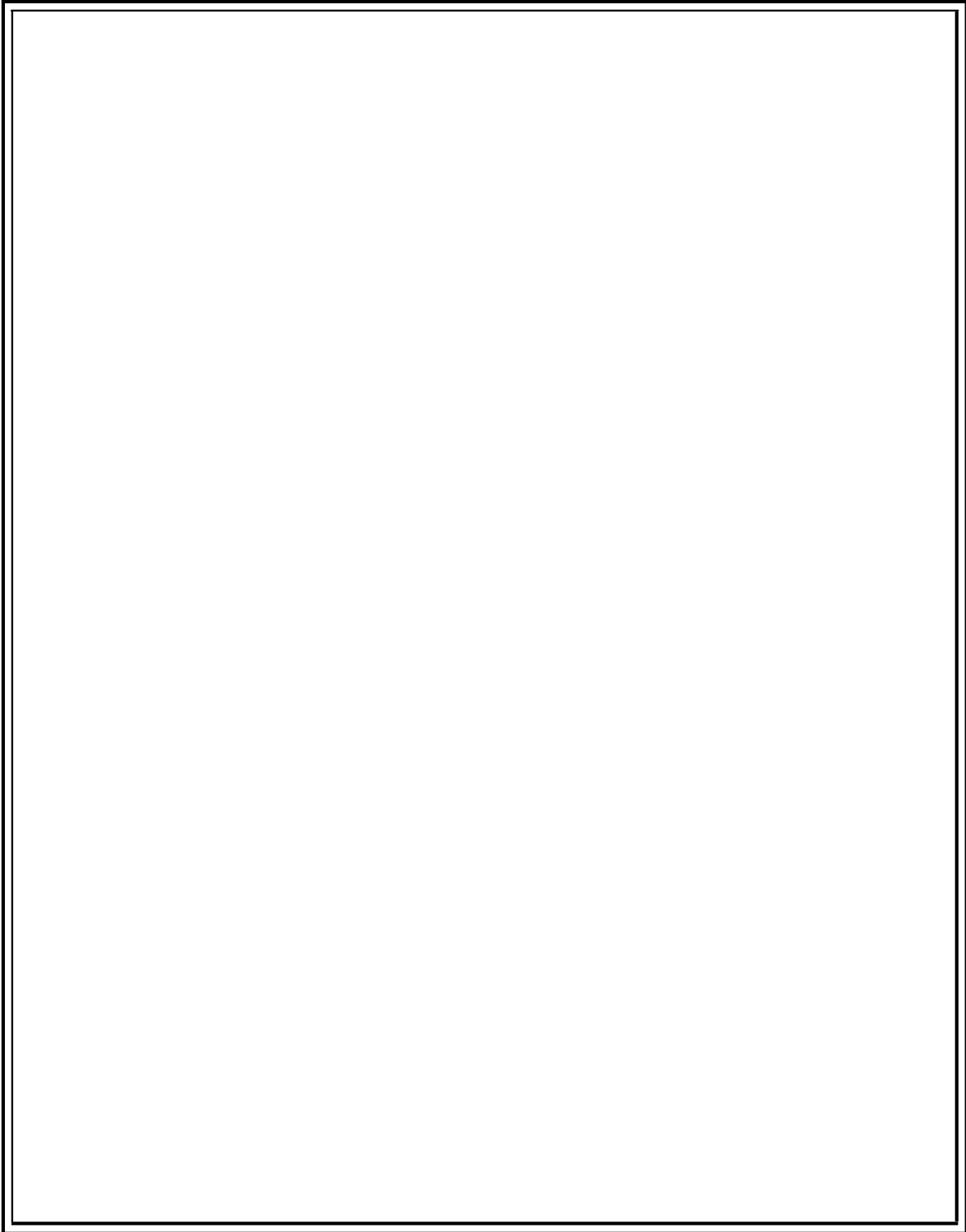
5.7.2. Каква улога има перхлорната киселина во реакцијата и зошто се врши загревање на урината?

5.7.3. Колку е максималната дозволена концентрација на фенолите во урина?

5.7.4. На што се должи токсичното дејство на фенолите?

5.7.5. Опиши ги симптомите при труење со фенол.

5.7.6. Кои мерки се превземаат при труење со фенол?



Освоени бодови:

\_\_\_\_\_

Асистент:

\_\_\_\_\_

## ВЕЖБА БР. 6

Датум \_\_\_\_\_

Работно место \_\_\_\_\_

Име и презиме \_\_\_\_\_

Досие бр: \_\_\_\_\_ Група \_\_\_\_\_

### Квантитативно определување на етил алкохол во урина по метода на Widmark

#### 6.1. ПРЕТХОДНИ ПРЕДЗНАЕЊА

*Етил алкохол* претставува органски растворувач на чие дејство луѓето се најмногу изложени. Покрај неговата употреба во индустријата, етанолот често се конзумира во состав на алкохолните пијалоци.

Молекулата на етил алкохолот е слабо наелектризирана и лесно преминува преку клеточните мембрани. После перорална примена, неговата ресорпција започнува уште преку мукозните мембрани во усната празнина и езофагусот, потоа продолжува во желудникот и дебелото црево, иако најзначајната ресорпција се одвива во проксималните делови на тенкото црево. Брзината на ресорпција се зголемува со празнење на желудникот, во отсуство на јаглехидрати, масти и протеини и во присуство на јаглерод диоксид.

Во најголем дел етанолот се биотрансформира под дејство на ензимот алкохол дехидрогеназа во хепарот. Во метаболизмот на етанол учествуваат и ензимот каталаза, како и ензимскиот систем P-450 оксидаза, меѓутоа тие имаат помало значење за неговата биотрансформација.

*Токсичните ефекти* на етил алкохол најверојатно се предизвикани од флуидизација на клеточната мембрана и намалување на нејзиниот вискозитет, при што настануваат низа промени кои се поврзани со процесите во мембраните. Затоа етанолот ја менува функцијата на рецепторите за централните невротрансмитери, ја инхибира функцијата на ензимите како што се Na, K-АТРаза, Ca-АТРаза, аденил циклаза и ацетилхолинестераза и ја менува функцијата на јонските канали за Ca и Na во мембраната. Ниски концентрации на етанол можат да стимулираат некои екситаторни синапси и рефлекси поради инхибирање на контролните механизми во кората на мозокот. Со зголемување на концентрацијата на етанол во крвта се појавуваат токсични ефекти врз менталните функции, се зголемува самодовербата, настанува еуфорија, промена во говорот, намалување на остријата на видот, се продолжува реакционото време, се намалува сетилото за мирис и вкус, се зголемува прагот за болка, се намалува координацијата при движење. Исто така може да настане мачнина, повраќање, диплопија, хипотермија, пореметување на сонот, депресија на дишењето и губење на свест. Хроничниот внес на етил алкохол доведува до промени на функцијата на централниот нервен систем како што се нарушување на интелектуалните и моторните функции, емоционална лабилност,

намалена способност за перцепција, амнезија. Етанолот делува депресивно врз контрактилноста на миокардот, ја забрзува срцевата работа поради директното вазодилататорно дејство на периферните крвни садови, а хроничната примена на поголеми количини етанол предизвикува иререверзибилна кардиомиопатија поради директното токсично дејство на миокардот.

Клиничката слика на труење при акутна интоксикација обично се карактеризира со реверзибилни промени на хепарната функција. Меѓутоа, честата примена на етанол предизвикува токсични ефекти зависни од дозата, кои се всушност последица на неговиот метаболизам. Употребата на етанол може да предизвика потенцирање на хепарните оштетувања како што се хепатитис и цироза, дури и кај лица кои внесуваат доволно хранливи материи. Интересно е тоа што внес на мали количини етанол доведува до акумулација на масти во хепарот и хепатомегалија како резултат на инхибиција на циклусот на трикарбоксилни киселини и оксидацијата на мастите. Секојдневното внесување на поголеми количини алкохол доведува до насобирање на ацеталдехид во организмот кој предизвикува липидна пероксидација, оштетување на клеточните мембрани и митохондрии, намалување на нивото на глутатион, одредени витамини и минерали. Како резултат на тоа доаѓа до намалување на содржината на протеините, мастите и водата во хепатоцитите со понатамошно прогрестирање во некроза и цироза на хепарот. Меѓународната агенција за истражување на канцер го вбројува етанолот во карциногени супстанции. Утврдена е поврзаноста на хроничната примена на етанол и појавата на одредени видови канцер и зголемување на токсичноста на некои лекови. Етил алкохолот има тератогено дејство врз развојот на ембрионот познато како фетален алкохол синдром, кој се карактеризира со микроцефалија, ментална заостанатост, намален коефициент на интелигенција, забавен раст, малформации на лицето.

*Третманот при труење* со етанол опфаќа помошни мерки како што се лаважа на желудник и предизвикување на повраќање. Притоа, потребна е корекција на хипогликемијата и ацидозата, како и спречување на пулмонарна аспирација на повратената содржина. Во некои случаи може да се даде кислород, централни analeптици и глукоза интравенски.

*Методите за докажување* и определување на етил алкохол во разни примероци вклучуваат:

1) Квалитативни реакции

а) реакција на создавање на јодоформ ( $\text{CHI}_3$ ): дестилат на алкохол се третира со раствор на јод во калиум јодид во алкална средина при што се ослободува јодоформ со карактеристичен мирис;

б) реакција со бензоил хлорид: етанол и бензоил хлорид реагираат во присуство на  $\text{NaOH}$  при што се добива етил естер на бензоева киселина со карактеристичен мирис;

в) реакција на добивање на етил ацетат: етанол реагира со  $\text{CH}_3\text{COOH}$  во присуство на сулфурна киселина при што се ослободува пријатен мирис од етил естер на оцетна киселина.

2) Семиквантитативна реакција (алко тест)

Експириран воздух се провлекува низ цевка исполнета со силика гел и импрегнирана со калиум бихромат. Ако воздухот содржи етанол, настанува зелено обојување.



### 3) Квантитативни реакции

Етил аcohol може да се определи квантитативно врз основа на неговите оксидо-редукциски својства со помош на разни методи, и тоа: колориметриски, спектрофотометриски, титриметриски, како и со гасна хроматографија.

*Максимална дозволена содржина на етанол во сообраќајот.* Со цел да се подобри безбедноста во сообраќајот, Европската регулатива пропишува максимална дозволена содржина на алкохол во крвта на возачите. Имено, како гранична вредност се наведува 0,5 mg/ml, меѓутоа, се смета дека пониска максимална дозволена содржина на алкохол во крв (0.2 mg/ml) е релевантна за оние учесници во сообраќајот кои се поврзани со поголем ризик од незгоди, и тоа:

- возачи со недоволно искуство;
- возачи на моторни возила со 2 тркала;
- возачи на возила наменети за превоз на поголем број патници;
- возачи на товарни возила и превозници на ризични добра (Commission Recommendation 2001/115/EC).

Одредувањето на содржината на етил алкохол во крвта на возачите најчесто се врши со тест на експириран воздух, потоа во примерок од урина, но исто така може да се одреди и во плунка. Согласно препораките на Европската Директива, најголем број земји во Европа ја почитуваат максималната дозволена содржина на алкохол во крв од 0.5 mg/ml (Македонија, Бугарија, Белгија, Данска, Германија, Финска, Франција, Грција, Италија, Србија, Црна Гора, Хрватска, Летонија, Холандија, Австрија, Португалија, Словенија, Шпанија, Турција, северен Кипар). Јужниот дел од Кипар сеуште толерира гранична вредност од 0.9 mg/ml алкохол во крв, додека пак максималната дозволена содржина на алкохол во крв во Англија, Ирска, Луксембург, Малта и Швајцарија изнесува 0.8 mg/ml. Во Литванија како гранична вредност за максимална содржина на алкохол во крв се смета 0.4 mg/ml, во Норвешка, Полска и Шведска 0.2 mg/ml, додека пак во Естонија, Малта, Романија, Словачка, Чешка и Унгарија не е дозволено присуство на етил алкохол во крвта на возачите, односно максималната дозволена содржина на алкохол во крв е 0.0 mg/ml.

Европската Комисија дава препораки за ограничување на максималната дозволена содржина на етанол во крв, додека пак за метил алкохол кој се карактеризира со значително поголема токсичност пропишува гранична вредност при експозиција на популацијата на метанол во осум часовен период од 260 mg/m<sup>3</sup>, односно 200 ppm (Commission Directive 2006/15/EC, Annex).



Откако ќе се извади анализата од термостат, најпрво се лади, па потоа се отстранува затворувачот и внимателно се додава свежо подготвен 5% раствор на KJ и 25 ml дестилирана вода. Ослободениот јод се титрира со 0.01 mol/l Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> до појава на слаб жолто-зелен прстен. Потоа се додаваат 2-3 капки 1% раствор на скроб и титрацијата продолжува до обезбојување на прстенот. Паралелно со анализата на ист начин се изведува и слепа проба со 2 ml K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>.

#### 6.4. ПРЕСМЕТКИ

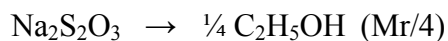
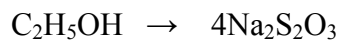
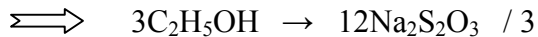
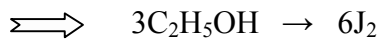
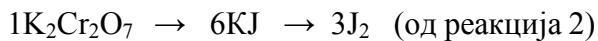
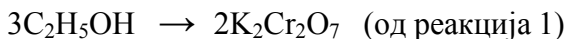
Концентрацијата на етил алкохол во урина се пресметува според следнава формула:

$$C_2H_5OH (g\%) = (X-A) \times 0.575$$

X = ml 0.01M Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> потрошени за титрација на слепа проба

A = ml 0.01M Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> потрошени за титрација на анализа

- Пресметка на фактор 0,575:



1L 1M Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> → 11.5g C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH

1ml 1M Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> → 0.0115g C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH

1ml 0.01M Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> → 0.000115g C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH

за 0,2 ml урина → (X-A) x 0.000115

за 1000 ml урина → (X-A) x Y

Y=0.575

## 6.5. РЕЗУЛТАТИ

6.5.1. Пресметај ја концентрацијата на етил алкохол во урина со помош на дадената формула.

--

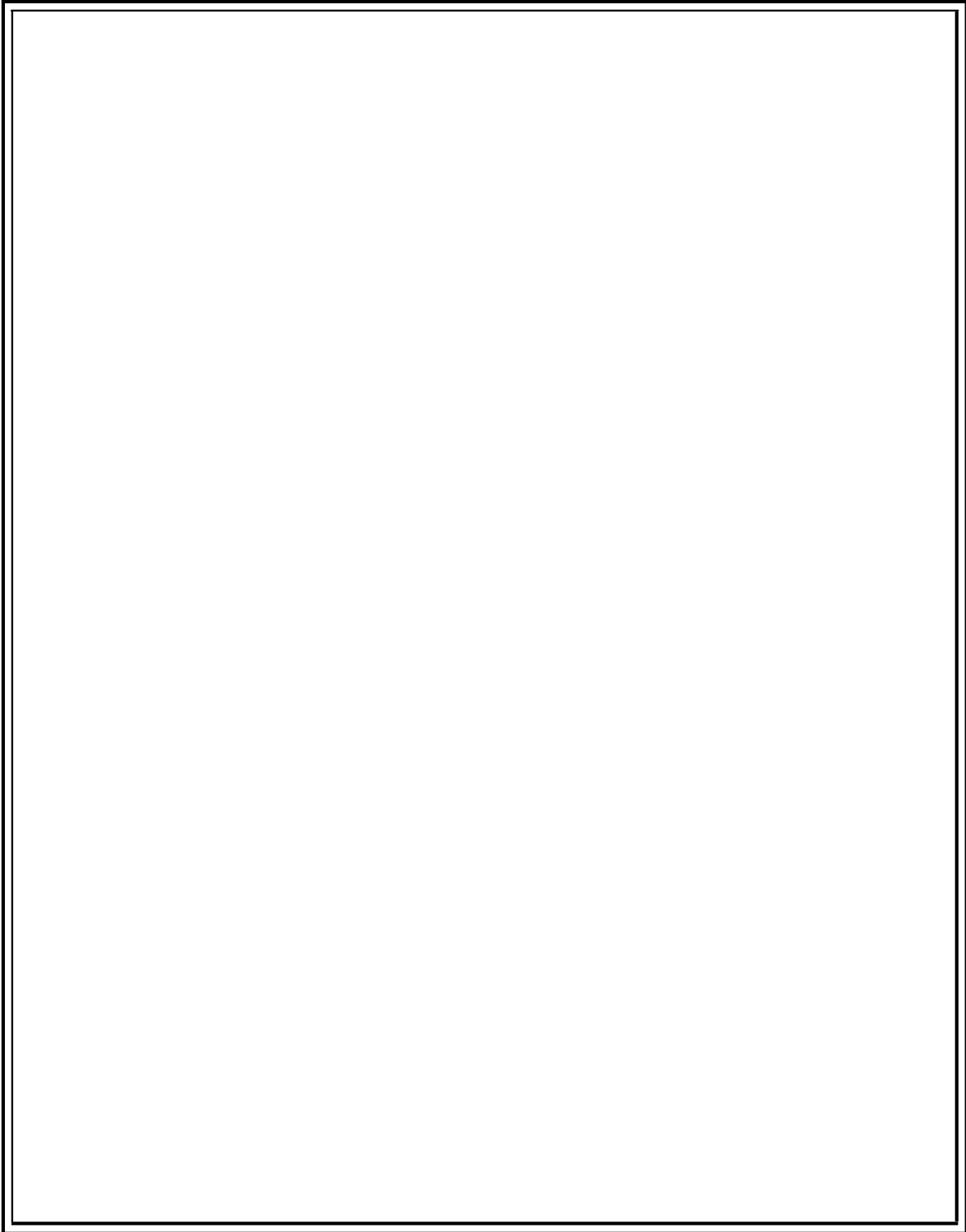
## 6.6. ЗАКЛУЧОК

---

---

## 6.7. ПРАШАЊА

- 6.7.1. Зошто се употребува раствор на калиум бихромат подготвен во концентрирана сулфурна киселина?
- 6.7.2. Со кој вид на титрација и преку што се определува концентрацијата на етанол во урина?
- 6.7.3. Наброј ги методите и реакциите што се користат за докажување и определување на етанол во разни примероци.
- 6.7.4. Колку е максимално дозволената концентрација на алкохол во сообраќајот во Р. Македонија?
- 6.7.5. Опиши ги токсичните ефекти на етанол во организмот на човекот.
- 6.7.6. Кои мерки се превземаат при труење со етанол?
- 6.7.7. Направи споредба помеѓу токсичноста на метанол и етанол.



Освоени бодови:

\_\_\_\_\_

Асистент:

\_\_\_\_\_

**ВЕЖБА БР. 7**

Датум \_\_\_\_\_

Работно место \_\_\_\_\_

Име и презиме \_\_\_\_\_

Досие бр: \_\_\_\_\_ Група \_\_\_\_\_

**Квантитативно определување на делта аминокиселина левулинска (ДАЛК) во урина****7.1. ПРЕТХОДНИ ПРЕДЗНАЕЊА**

*Оловото* се вбројува во групата на токсични метали, без никакво биолошко значење за организмот на човекот. Се карактеризира со синкаво-сива боја, се наоѓа во мали количини во Земјината кора, но може да се најде и насекаде во животната средина. Во најголем дел оловото потекнува од горивата на кои им се додаваат алкил соединенија на олово како адитиви, потоа од преработувачката индустрија на метални руди како и од оловните бои. Најчувствителна популација на токсичното дејство на оловото се новороденчињата и децата, иако оловото делува токсично и во тек на ембрионалниот развој.

*Токсичните ефекти* на оловото настануваат кога ќе се зголеми количеството на внесено олово за сметка на елиминирано олово од организмот. Откако ќе се ресорбира оловото во организмот преку ГИТ или респираторниот систем, во крвта се сретнува во вид на олово двобазен фосфат, а потоа се таложи во коските во облик на олово тробазен фосфат. Депоата на олово во коските претставуваат нетоксична форма, но во одредени околности, како на пример употреба на лековити препарати, може да настане мобилизација на оловото од коските и да се појават симптоми на труење со олово. Полуживотот на депонираното олово во коските може да биде и подолг од 20 години. Во централниот нервен систем оловото има афинитет да се концентрира во сивата маса. Оловото преминува преку плацентата и неговата концентрација во крвта на фетусот е пропорционална со концентрацијата во крвта на мајката. Исто така, оловото може да го замени калциумот во јонските измени на ниво на клеточните мембрани и синапси и да влијае на енергетскиот метаболизам, синтезата и ослободувањето на невротрансмитерите. Оловото претставува ензимски отров бидејќи се врзува за сулфхидрилните групи на протеините. Како резултат на оваа реакција, оловото ги инхибира ензимите кои учествуваат во синтеза на хемоглобинот. Реакцијата е важна и од аспект на аналитичката токсикологија бидејќи при инхибиција на ензимот ДАЛК дехидратаза се зголемува концентрацијата на ДАЛК во урина, а при инхибиција на ензимот хем синтетаза се зголемува концентрацијата на копропорфирин во урина.

Клиничката слика на труење со олово, односно токсичните ефекти на оловото се разликуваат помеѓу детската и возрасната популација. Меѓутоа, целно ткиво за токсичното дејство на оловото и кај деца и кај возрасни претставува нервниот систем. Оловото предизвикува слабост на прстите и зглобовите, мало зголемување на крвниот притисок, анемија (се врзува за мембраната на еритроцитите и ја намалува нејзината цврстина), повисоки дози доведуваат до сериозно оштетување на мозокот и бубрезите, кај бремени жени може да предизвика абортус, а повисоки дози на олово делуваат токсично на репродуктивната функција кај машкиот пол. Хроничното труење со олово кај возрасни се карактеризира со абдоминална болка, анемија, главоболка, пореметување на бубрежната функција, периферна невропатија, атаксија, губење на меморијата. Кај деца, многу поизразени се ефектите на ЦНС што понатаму како последица имаат појава на ментална ретардираност, пореметување на говорот, свеста и однесувањето. Акутната форма на труење со олово која ретко се случува се карактеризира со промени во синтезата на порфириновите, а симптомите опфаќаат абдоминална болка, вознемиреност, повраќање, летаргија, губење на апетит, анемија, атаксија, отежнат говор. Во потешки случаи на труење настануваат конвулзии, кома и смрт поради постоење на церебрален едем и застој во работата на бубрезите.

Карактеристичен симптом на сериозно труење со олово кај деца со енцефалопатија е појавата на виолетово-сина боја на гингивите.

Сеуште не постојат цврсти докази за канцерогено дејство на оловото, но согласно поединечните извештаи за можноста да предизвикува бубрежен аденокарцином, EPA и IARC го вбројуваат оловото во потенцијални карциногени супстанции за хуманото здравје.

*Третманот при труење со олово* опфаќа давање на соединенија кои со оловото формираат хелатни комплекси како што се калциум натриум едетат, димеркапрол, пенициламин и сукцимер. Хелатните агенси покажуваат висок афинитет кон оловото и се карактеризираат со слаба растворливост, така што ефикасно ја намалуваат концентрацијата на олово во организмот.

*Максимална дозволена концентрација на олово; ДАЛК.* Европската регулатива пропишува гранична вредност за професионална експозиција на олово во тек на осум часовно работно време од  $0,15 \text{ mg/m}^3$  (Council Directive 98/24/EC, Annex I). Исто така, во регулативата се наведува потребата од медицински мониторинг на експонираната популација преку мерење на нивото на олово во крвта со помош на апсорпциона спектрометрија, при што граничната вредност за биолошки врзаното олово изнесува  $70 \text{ } \mu\text{g}$  на  $100 \text{ ml}$  крв (Council Directive 98/24/EC, Annex II).

Концентрацијата на ДАЛК во урина вообичаено се категоризира во 4 групи, и тоа:

- ако нивото на ДАЛК во урина е помало од  $6 \text{ mg/L}$  се смета за нормална екскреција;
- ако нивото на ДАЛК во урина се движи од  $6 - 20 \text{ mg/l}$ , се смета за прифатлива екскреција;
- доколку нивото на ДАЛК во урина е во опсег од  $20 - 40 \text{ mg/l}$  станува збор за прекумерно или зголемено излучување на ДАЛК во урината и

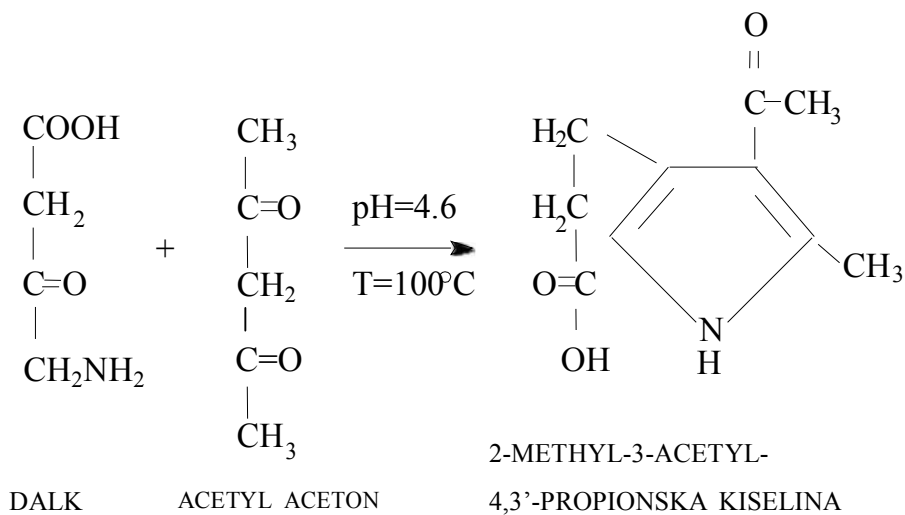


- кога концентрацијата на ДАЛК во урина надминува 40 mg/l станува збор за ризична екскреција што укажува дека нивото на апсорпција на олово во организмот е опасно (O'Kelly, 1985; Ahmed et al., 2008).

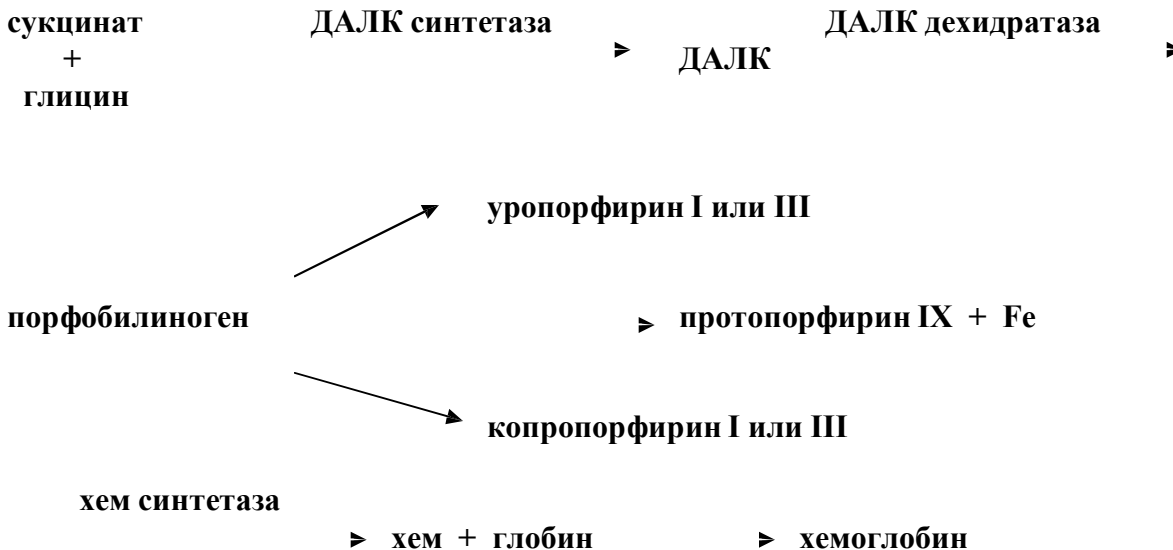
**Принцип на вежбата:**

Определувањето на концентрацијата на ДАЛК во урина се заснова на реакцијата на делта аминокиселината леулинската киселина со ацетил ацетон при загревање на 100°C во рН средина со вредност 4,6. Продукт на реакцијата претставува 2-метил-3-ацетил-4,3'-пропионска киселина која со Erlich-ов реагенс подготвен ex tempore образува карактеристично жолто обојување. Интензитетот на обојувањето се мери колориметриски со зелен филтер наспроти слепа проба која содржи пуфер со рН 4.6 и урина. Концентрацијата на ДАЛК се определува врз основа на баждарна крива која е добиена со познати концентрации на ДАЛК.

**7.2. МЕХАНИЗАМ НА РЕАКЦИЈАТА**



### 7.2.1. Механизам на труење со олово



## 7.3. ПРАКТИЧЕН ДЕЛ

### 7.3.1. Реагенси

- ацетил ацетон
- пуферен раствор со рН 4,6
- Erlich-ов реагенс (p-dimethyl amino benzaldehyd)

### 7.3.2. Лабораториски материјал

- епрувети, пипети
- водена бања
- колориметар

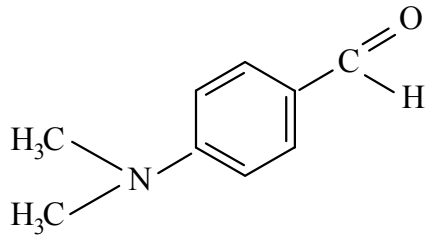
### 7.3.3. Постапка за определување на ДАЛК во урина

Во сува епрувета (обележана со А) се земаат 1 ml свежа урина, 0,2 ml ацетил ацетон и 8 ml пуферен раствор со рН 4.6. Епруветата силно се промешува и се остава да стои 10 минути на зовриена водена бања. После загревањето, пробата се лади под воден млаз.

Потоа, се земаат 2 ml од растворот и се мешаат со еднаков волумен на свежо подготвен Erlich-ов реагенс. Добиеното обојување се мери точно после 15 минути, на колориметар спрема слепа проба, со помош на зелен филтер.

Слепата проба се подготвува истовремено со анализата во друга епрувета (обележана со В), така што се земаат 1 ml урина и 9 ml пуфер со рН 4,6.

### 7.3.3. Структура на Erlich-ов реагенс



p-DIMETHYLAMINO BENZALDEHYD

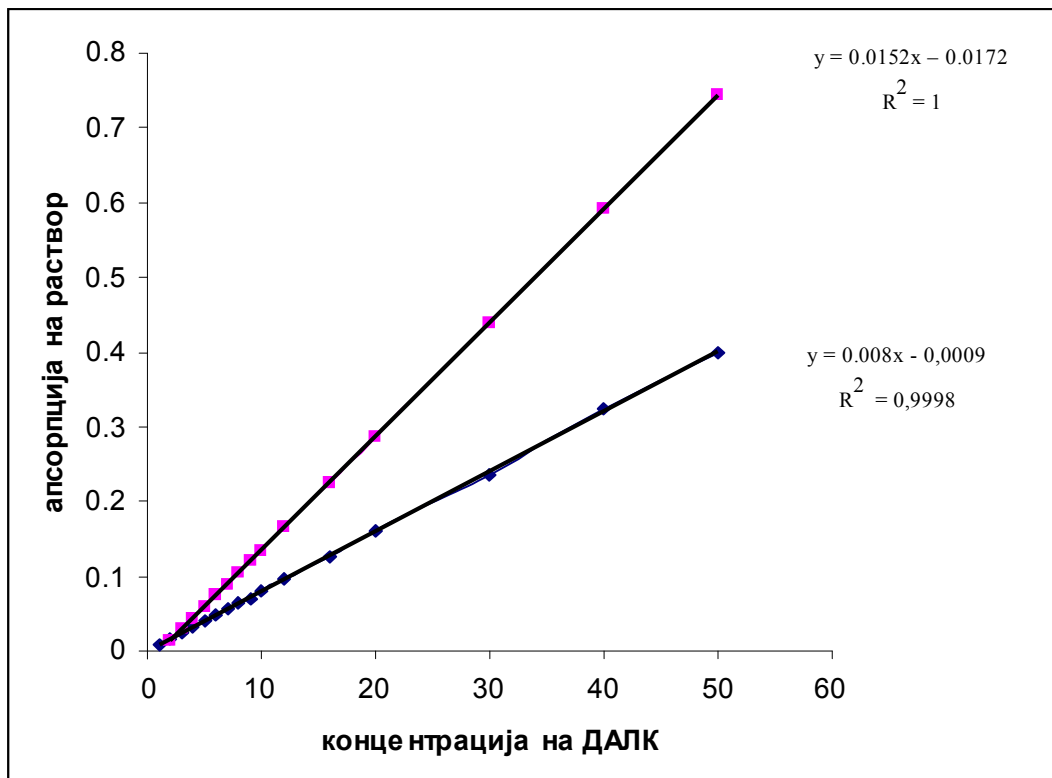
### 7.4. ПРЕСМЕТКИ

Концентрацијата на ДАЛК во урина се пресметува според баждарна крива како разлика од апсорпцијата на анализата и слепата проба:

$$c \text{ (ДАЛК)} = (A - X) \text{ mg/l}$$

A = апсорпција на анализа

X = апсорпција на слепа проба



Слика 1. Зависност на апсорпцијата на растворот од концентрацијата на ДАЛК

## **7.5. РЕЗУЛТАТИ**

7.5.1. Пресметај ја концентрацијата на ДАЛК во урина врз основа на разликата од добиените апсорпциони вредности на анализата и слепата проба според баждарната крива.

--

## **7.6. ЗАКЛУЧОК**

---

---

## **7.7. ПРАШАЊА**

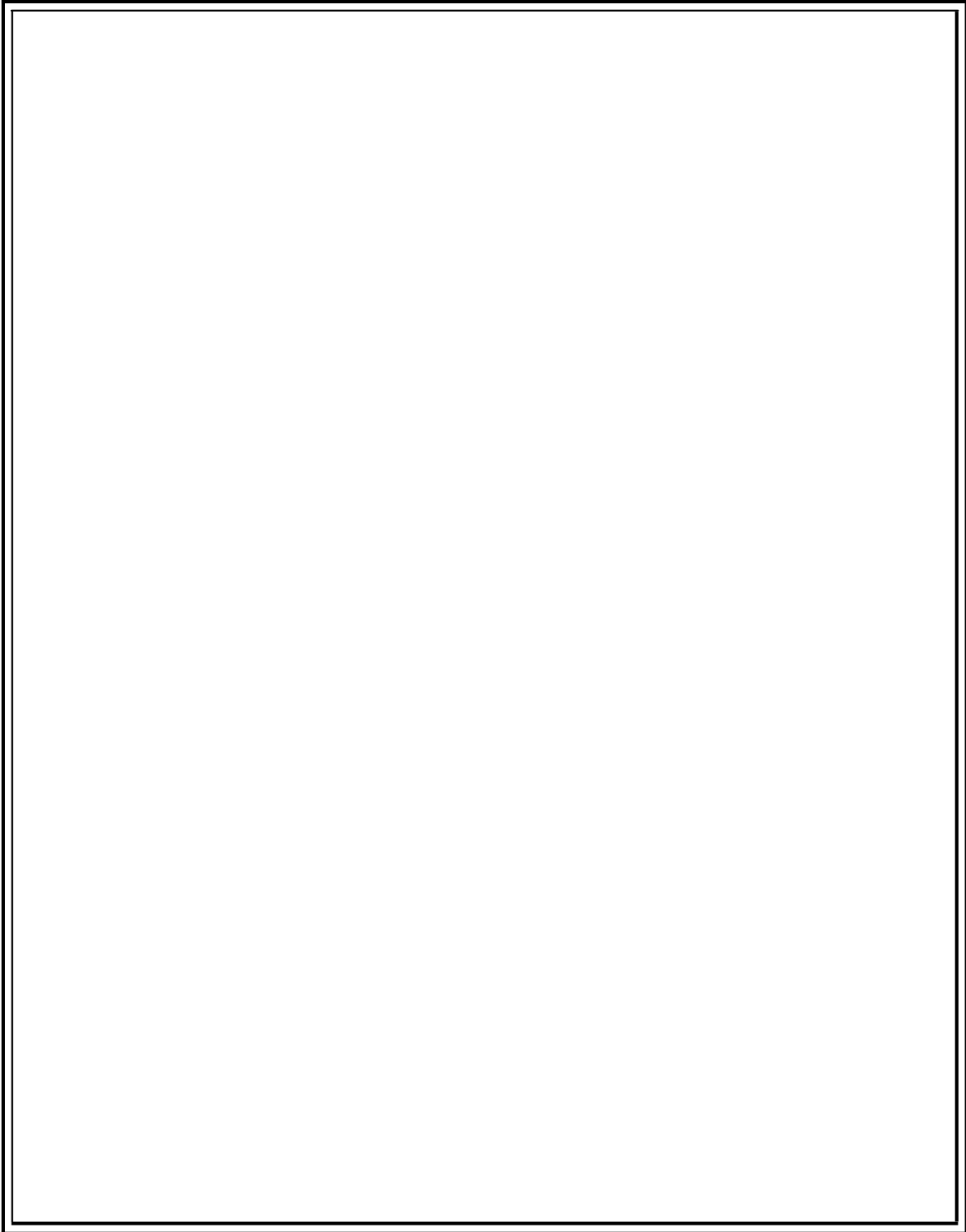
7.7.1. Каков вид на труења со олово најчесто настануваат?

7.7.2. Опиши го механизмот на труење со олово.

7.7.3. Наброј ги симптомите при хронично труење со олово.

7.7.4. Како резултат на што се зголемува концентрацијата на ДАЛК во урина?

7.7.5. Наброј ги антидотите што се даваат при труење со олово.



Освоени бодови:

\_\_\_\_\_

Асистент:

\_\_\_\_\_

## ВЕЖБА БР. 8

Датум \_\_\_\_\_

Работно место \_\_\_\_\_

Име и презиме \_\_\_\_\_

Досие бр: \_\_\_\_\_ Група \_\_\_\_\_

### Квантитативно определување на копропорфирин во урина

#### 8.1. ПРЕТХОДНИ ПРЕДЗНАЕЊА

*Токсичното дејство* на оловото се манифестира скоро на сите ткива и органски системи во телото на човекот. После неговата ресорпција навлегува во циркулацијата каде околу 90% се наоѓа во еритроцитите врзано за нивната мембраната и за хемоглобинот. Оловото интерферира со синтезата на хемоглобинот поради својството да се врзува со сулфхидрилните групи на ензимите ДАЛК дехидратаза и хем синтетаза, ја инхибира нивната активност и како последица се појавуваат зголемени концентрации на ДАЛК, односно копропорфирин во урина.

При труење со олово еден од главните симптоми претставува анемијата која се карактеризира со намалување на големината на еритроцитите и зголемување на бројот на ретикулоцитите. Анемијата се појавува како последица на скратениот животен век на еритроцитите и нарушената синтеза на хемот. Намаленото синтетизирање на хемот резултира од инхибиторното дејство на оловото врз вметнувањето на фери јонот во порфиринскиот прстен. Наместо  $Fe^{2+}$ , со протопорфиринскиот прстен се поврзува  $Zn^{2+}$ , што од друга страна се користи за мониторинг на експозицијата на олово заради тоа што еритроцитите кои содржат цинк-порфирин покажуваат интензивна флуоресценција.

Исто така, следење на концентрацијата на олово со цел за превенција на труења со олово може да се врши во различни примероци како загаден воздух, вода, прехранбени продукти, амбалажа за чување на храна, биолошки материјал и др.

*Максимална дозволена концентрација на копропорфирин.* Варијабилниот степен на апсорпција на оловото освен преку определување на нивото на ДАЛК во урина може да се следи и преку определување на нивото на копропорфирин во урина. Слично како за ДАЛК, постои категоризирање на максималното дозволено ниво на копропорфирин во урина во 4 групи, и тоа:

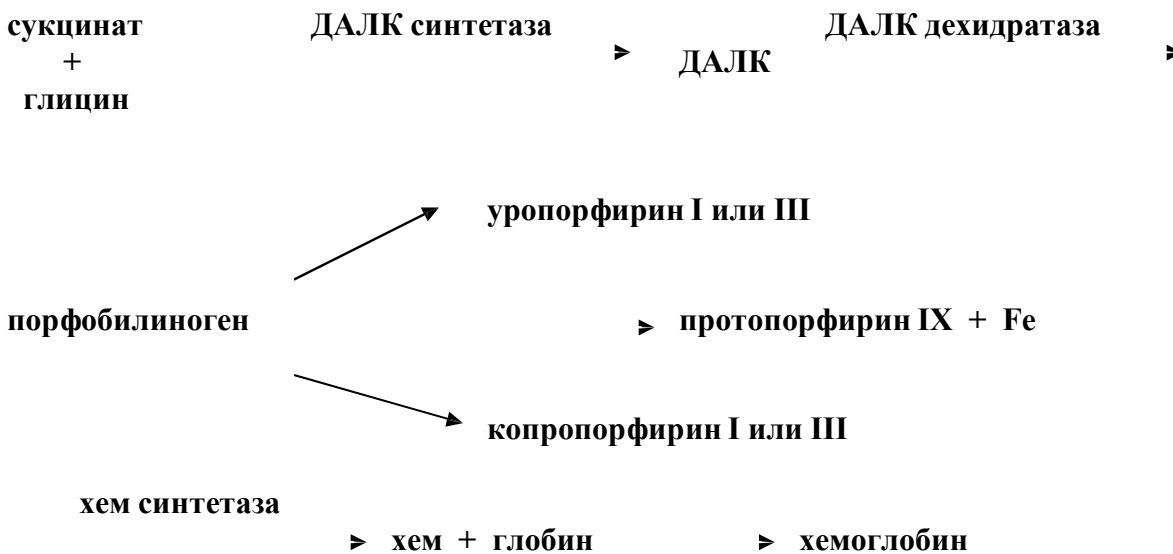
- нормално ниво на екскреција на копропорфирин се смета кога концентрацијата на копропорфирин во урина е помала од 150  $\mu\text{g/l}$ ;
- прифатливо ниво на екскреција на копропорфирин се смета кога концентрацијата на копропорфирин во урина се движи од 150 - 500  $\mu\text{g/l}$ ;
- ако концентрацијата на копропорфирин е во опсег од 500 - 1500  $\mu\text{g/l}$ , тогаш станува збор за прекумерна или зголемена екскреција;

- доколку концентрацијата на копропорфирин надминува 1500  $\mu\text{g/l}$ , тогаш екскрецијата на копропорфирин во урина е ризична што укажува на опасно ниво на апсорпција на олово во крвта (O'Kelly, 1985).

**Принцип на вежбата:**

Определувањето на концентрацијата на копропорфирин во урина се заснова на екстракција на копропорфиринот од урината со помош на етер во кисела средина. За да се обезбеди квантитативна екстракција етерскиот слој се екстрахира повеќекратно со хлороводородна киселина. Апсорпцијата на собраните екстракти се мери колориметриски наспроти слепа проба (HCl), со син филтер. Концентрацијата на копропорфирин во урина претставува производ на определената апсорпција на растворот и емпирискиот фактор, 600.

**8.2. МЕХАНИЗАМ НА ТРУЕЊЕ СО ОЛОВО**



**8.3. ПРАКТИЧЕН ДЕЛ**

**8.3.1. Реагенси**

- заситен раствор на  $\text{NaCH}_3\text{COO}$
- концентрирана  $\text{CH}_3\text{COOH}$
- диетил етер
- 5% HCl

### 8.3.2. Лабораториски материјал

- одделителна инка 250 ml
- епрувети, пипети
- колориметар

### 8.3.3. Постапка за определување на копропорфирин во урина

Во одделителна инка од 250 ml се ставаат 25 ml урина, 5 ml заситен раствор на натриум ацетат и 5 ml концентрирана оцетна киселина. Содржината на инката се промешува и се додаваат 40 ml диетил етер. После додавањето на етерот се врши екстракција на копропорфиринот со матење на инката во тек на 5 минути. Потоа одделителната инка се поставува на стакак и се испушта долниот воден слој. Во етерскиот слој се додаваат 7.5 ml дестилирана вода во која се претходно додадени 5 капки од заситениот раствор на  $\text{NaCH}_3\text{COO}$ . Одделителната инка повторно се меша во тек на 1 минута и водениот слој повторно се отстранува. На крај етерскиот слој се екстрахира уште 2 пати со по 5 ml 5% раствор на HCl. Екстракцијата со HCl се одвива најмалку 3 минути. Потоа, киселинските екстракти се собираат во епрувета и се отчитува нивната апсорпција на спектрофотометар (бранова должина од 401 nm) или на колориметар преку син филтер наспроти слепа проба која се состои од 5% раствор на HCl.

## 8.4. ПРЕСМЕТКИ

Концентрацијата на копропорфирин во урина се пресметува според следнава формула:

$$c \text{ (копропорфирин)} = (A \times 600) \mu\text{g/l}$$

600 = емпириски фактор

$$c \text{ (копропорфирин, } \mu\text{mol/l)} = c \text{ (}\mu\text{g/l)} \times 0.0015$$

0,0015 = реципрочна вредност од молекулската маса на копропорфирин



## **8.5. РЕЗУЛТАТИ**

8.5.1. Пресметај ја концентрацијата на копропорфирин во урина според горенаведените формули.

--

## **8.6. ЗАКЛУЧОК**

---

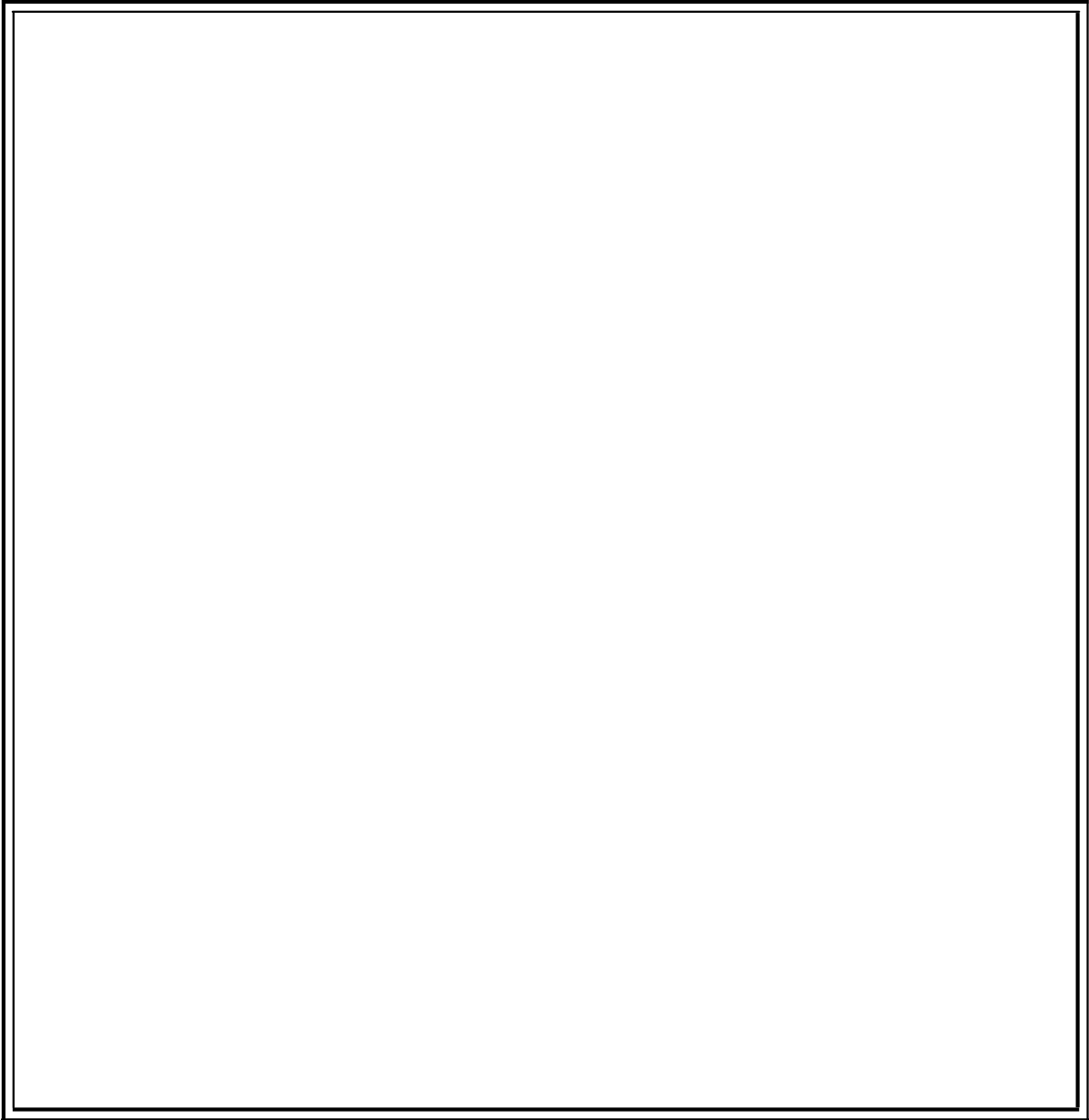
---

## **8.7. ПРАШАЊА**

8.7.1. Опиши го токсичното дејство на оловото врз хематолошкиот систем.

8.7.2. Како резултат на што се зголемува концентрацијата на копропорфирин во урина?

8.7.3. Во кои примероци се следи концентрацијата на олово?



Освоени бодови:

\_\_\_\_\_

Асистент:

\_\_\_\_\_

## ВЕЖБА БР. 9

Датум \_\_\_\_\_

Работно место \_\_\_\_\_

Име и презиме \_\_\_\_\_

Досие бр: \_\_\_\_\_ Група \_\_\_\_\_

### Квалитативно определување на метали со тенкослојна хроматографија

#### 9.1. ПРЕТХОДНИ ПРЕДЗНАЕЊА

*Металите* се вбројуваат во отрови кои одамна се познати за луѓето. Меѓутоа, во минатото се следеле главно ефектите што произлегуваат од акутната експозиција на токсичните метали, за разлика од современата токсикологија која врши мониторинг на концентрацијата на метали во работната и животната средина. За секој токсичен ефект, квантитативно се одредува врската помеѓу дозата, нивото во ткивата и ефектите, се објаснува метаболизмот на металите на ткивно и клеточно ниво, како и механизмот на настанување на токсичните ефекти. Освен тоа, се воведуваат и биолошки маркери на токсичноста и експозицијата на отровите кои служат за предвидување и дефинирање на нивните ефекти.

*Токсичните ефекти* на металите зависат од голем број фактори: интеракцијата на токсичните метали со есенцијалните метали во случај кога имаат сличен метаболизам, формирање на комплекси помеѓу металите и протеините (детоксикација), индиректното влијание на пушењето и алкохолот врз токсичноста на металите, хемискиот облик на металот, имунолошката состојба на организмот кога се во прашање метали кои предизвикуваат хиперсензитивни реакции (жива, злато, платина, хром, никел). За некои метали е утврдено дека имаат карциногено дејство. Меѓународната агенција за истражување на канцер (IARC), во метали за кои постојат докази дека се карциногени, ги вбројува As, Be, Cd, Cr<sup>6+</sup>, Ni, додека пак, Pt, Se, Pb ги вбројува во метали со потенцијално карциногено дејство.

Иако живата е токсична во сите три облици (елементарен, неоргански и органски), најопасна е органската жива. Елементарната е во облик на пареи и обично предизвикува инхалационо труење, брзо преминува во меркури облик кој има голем афинитет за врзување со сулфхидрилните групи на протеините. Откако ќе се ресорбира органската жива, се врзува за хемоглобинот во еритроцитите, а исто како и елементарната преминува преку крвно-мозочната бариера и плацентата.

Клиничката слика на труење со живини пареи опфаќа воспалителни процеси во респираторните органи и промени на ЦНС. Симптомите вклучуваат ексцитабилност, гингивитис и тремор, а можна е појава на повраќање, дијареа, кашлица, бронхитис, губење на апетит, метален вкус во устата, губење на меморија, депресија и делириум. Кај хронични труења се појавуваат и зголемена саливација, опаѓање на забите, тахикардија и тремор на мускулите. Труењата со

соединенија на  $\text{Hg}^{2+}$  се карактеризираат со улцерација, крварење и некроза во ГИТ, придружени со повраќање, абдоминална болка, крвава дијареа и циркулаторен колапс. Соединенијата на  $\text{Hg}^{1+}$  се помалку токсични заради помалата растворливост, а најчесто предизвикуваат хиперсензитивност, хиперкератоза, вазодилатација и зголемено лачење на потните жлезди. Симптомите на труење со органска живаопфаќаат парестезија наусните и прстите, главоболка, пореметување на слухот, видот и говорот, губење на меморијата, лоша координација при движењето, парализа на нозете, губење на свест и кома. Забележана е појава и на генотоксични ефекти за кои се смета дека се последица на врзувањето на метилжива со SH групите на DNK и RNK и промена во нивната синтеза.

Кадмиумот се внесува во организмот на човекот најчесто преку храна (црн дроб, печурки, школки, какао прав) и со чадот од цигарите. После ресорпцијата, кадмиумот се транспортира со крвта до хепарот каде се врзува со протеините и гради комплекси што понатаму се транспортираат до бубрезите. Во бубрезите кадмиумот има својство да се акумулира и да го оштетува механизмот на филтрација, што како последица има екскреција на есенцијални протеини и шеќери од организмот. Акутната експозиција на чад што содржи кадмиум најчесто се карактеризира со симптоми кои потсетуваат на грип (кивавица, грозница, мускулна болка). При континуирана експозиција настануваат трахео-бронхитис, пневмонија и пулмонарен едем. Инхалација на кадмиумов прав доведува до ренално оштетување проследено со тубуларна дисфункција во проксималниот дел на бубрезите која се карактеризира со хипофосфатемија (мускулна слабост, кома). Реналната дисфункција може да предизвика појава на хиперурикемија и гихт.

Токсичното дејство на никел најчесто се појавува во облик на алергиска реакција (сензитивност на никел кога накит или други предмети што содржат никел ќе дојдат во контакт со кожата). Најсериозните токсични ефекти на никел како канцер на белите дробови и назалните синуси се забележуваат кај луѓе кои се изложени на никелов прав во индустријата. При труење со никел најчесто се појавуваат следниве симптоми: белодробна емболија, нарушување на респираторната функција, астма и хроничен бронхит, алергиски реакции на кожа, нарушување на срцевата функција, дефекти кај новороденчињата чии мајки биле изложени на никел.

Бакарот претставува есенцијален метал поради тоа што влегува во состав на ензимите кои учествуваат во оксидо-редуктивните процеси, но како последица на нарушениот метаболизам на бакар се појавуваат токсични ефекти. Хроничната експозиција на бакар доведува до иритација на носот, устата и очите, стомачни болки, вртоглавица, повраќање и дијареа. Хроничното труење со бакар е познато како Wilson-ова болест која се карактеризира со хепатична цироза, мозочни оштетувања, демиелинизација, нарушување на реналната функција и депозити на бакар во корнеата.

Железото исто така спаѓа во групата на есенцијални метали поради тоа што влегува во состав на протеините (хемоглобин, миоглобин) и ензимите (цитохром оксидаза). Меѓутоа, постои можност за акутно труење со железо (на пр. намерно земање на таблети) и за хронично труење кое најчесто е резултат на генетско пореметување (нарушена ресорпција на железо), подготовка на храна во железни садови или

инхалација на железен прав во топилници на железо. Ако железото дојде во контакт со ткивата и се задржи во нив може да предизвика воспалителни процеси на коњуктивата и ретината. Хроничната инхалација на прав од железни оксиди предизвикува пневмоконија позната како сидероза, состојба која може да се детектира на рендген снимка, но не е проследена со физичко оштетување на белодробната функција.

Цинк претставува есенцијален елемент за хуманото здравје кога се наоѓа во трагови во организмот. Меѓутоа, поголем внес на цинк може да доведе до оштетување на панкреас, нарушување на протеинскиот метаболизам и да предизвика артеросклероза.

Кобалт како составен дел од молекулата на витаминот  $B_{12}$ , има биолошко значење за човекот. Меѓутоа, кобалтот кога се наоѓа во повисоки концентрации делува токсично, особено на белите дробови, предизвикувајќи астма и пневмонија. Според IARC, за кобалтот постојат податоци дека има потенцијално карциногено дејство. Високи концентрации на кобалт предизвикуваат повраќање, наузеа, проблеми со видот, нарушување на срцевата и тироидната функција. Правот од кобалт предизвикува кашлица, губење на здив, диспнеа, намалена пулмонарна функција, нодуларна фиброза, дури и смрт. Експозицијата на кобалт може да предизвика и губење на телесна тежина, дерматитис и респираторна хиперсензитивност.

*Третманот при труење со метали опфаќа давање на хелаторни агенции познати како специфични антидоти. При труење со жива најчесто се даваат 2,3-димеркаптосукцинска киселина (DMSA) која е одобрена за употреба и кај деца, потоа 2,3-димеркапто-1-пропансулфонска киселина (DMPS), D-пенициламин или димеркапрол. При труење со железо се дава дефероксамин кој го врзува слободниот фери јон, како и железото во облик на феритин и хемосидерин, во мал обем го врзува железото од трансферинот, а не се врзува за железото од цитохромот и хемоглобинот. Еден мол на дефероксамин врзува еден мол на железо образувајќи комплекс фериоксамин, кој се излучува преку бубрезите за неколку часа. При труење со кадмиум како најефикасни се покажале антидотите 2,3-димеркаптопропанол (BAL) и натриум диетилдитиокарбамат.*

*Максимална дозволена концентрација на метали. Експозицијата на некои метали е поврзана со сериозен ризик по хуманото здравје, па затоа се определуваат максимално дозволените концентрации на металите во животната средина. Максималната дозволена концентрација за експозиција на жива изнесува  $0,1 \text{ mg/m}^3$ , додека пак МДК за органските соединенија на жива изнесува  $0,01 \text{ mg/m}^3$  (Stankovic, 1986). Според Европската регулатива, кадмиум и никел претставуваат генотоксични карциногени, поради што максималната гранична вредност за детекција на кадмиум во воздухот изнесува  $5 \text{ ng/m}^3$ , а за никел  $20 \text{ ng/m}^3$  (Directive 2004/107/EC of the European Parliament and of the Council, Annex I).*

**Принцип на вежбата:**

Квалитативното определување на метали со тенкослојна хроматографија се заснова на нивните својства да се распределуваат во хроматографски систем кој се состои од стационарна фаза, микрокристална целулоза и мобилна фаза, смеса од органски и неоргански растворувачи. После сушење на хроматографската плоча, се врши хемиска детекција со помош на хромогени реагенси, пиридил азнафтол и тиазолил азнафтол, при што се добиваат петна со карактеристичен облик и боја. Идентификација на непознатите метали се врши преку споредба на петната добиени од анализата со петната добиени од стандардните раствори.

**9.2. ПРАКТИЧЕН ДЕЛ****9.2.1. Реагенси**

- ацетон
- диетил етер
- метанол
- HCl
- HNO<sub>3</sub>
- 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- 0.1% раствор на PAN (pyridyl azonaphtol)
- 0.1% раствор на TAN (thiazolyl azonaphtol)

**9.2.2. Лабораториски материјал**

- хроматографски плочи со микрокристална целулоза
- покривни плочи
- комора за развивање на хроматографската плоча
- амонијачна комора
- микропипетори
- фен

**9.2.3. Постапка за определување на метали со тенкослојна хроматографија**

Анализата се изведува на хроматографска плоча на која е претходно нанесена стационарна фаза микрокристална целулоза.

Со микропипетор се нанесуваат наизменично 5-10  $\mu$ l од анализата и стандардните раствори и тоа на растојание од 1.5 cm од долната ивица на плочата. При апликацијата треба да се внимава пречникот на петната да не биде поголем од 5 mm. За да се избегне проширувањето на петната, нанесувањето може да се врши со фен.

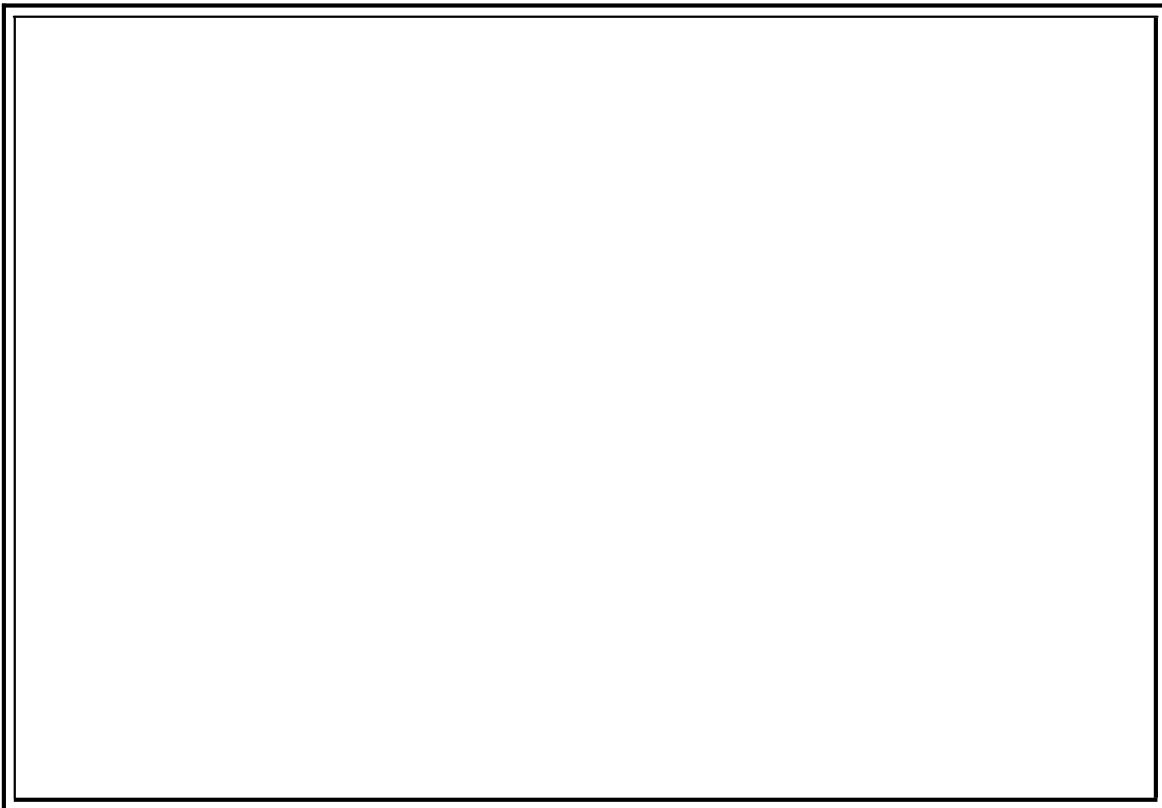
Откако ќе се аплицираат петната, хроматографската плоча се поклопува со покривна стаклена плоча, се прицврстува со дрвени штипалки со што се добива отворена S комора. Долниот дел на плочата се потопува во резервоарот со мобилна фаза. Мобилната фаза претставува смеса од

следниве растворувачи: ацетон:етер:метанол:HCl:HNO<sub>3</sub>:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, подготвена во однос: 9:5:1:1.2:0.25:0.5.

Развивањето на плочата се врши се додека фронтот на мобилната фаза не отпатува до 2-3 cm од горната ивица на плочата. Потоа, хроматографската плоча се суши во дигестор со фен. Детекцијата се врши со 0.1% раствор на PAN. Откако ќе се испрска со PAN, плочата повторно се суши и се внесува во амонијачна комора. Кога ќе се извади од амонијачната комора, плочата пак се суши и се прска со 0.1% раствор на TAN и повторно се внесува во амонијачна комора. Идентификација на непознатиот метал се врши со споредба на петната добиени од анализата со оние добиени од стандардните раствори.

### 9.3. РЕЗУЛТАТИ

#### 9.3.1. Хроматографска плоча после детекција



## 9.4. ЗАКЛУЧОК

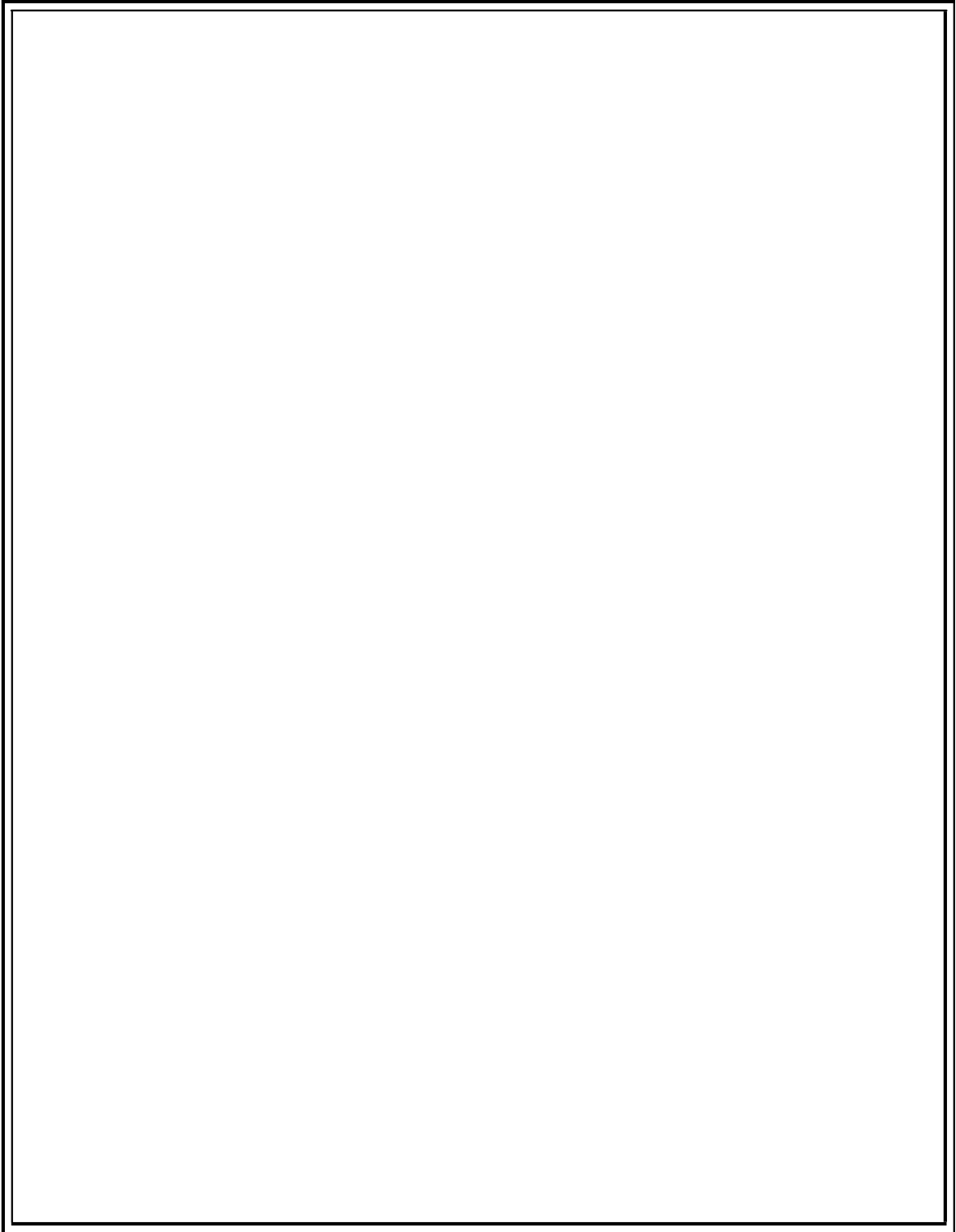
---

---

## 9.5. ПРАШАЊА

- 9.5.1. Од што зависи изборот на мобилна и стационарна фаза кај TLC?
- 9.5.2. Зошто се користи отворена S-комора за развивање на хроматографската плоча?
- 9.5.3. Какви методи се применуваат за визуелизација на петната добиени со TLC?
- 9.5.4. Зошто се внесуваат хроматографските плочи во амонијачна комора?
- 9.5.5. Направи споредба на токсичното дејство на елементарна, неорганска и органска жива.





Освоени бодови:

\_\_\_\_\_

Асистент:

\_\_\_\_\_

## ВЕЖБА БР. 10

Датум \_\_\_\_\_

Работно место \_\_\_\_\_

Име и презиме \_\_\_\_\_

Досие бр: \_\_\_\_\_ Група \_\_\_\_\_

### Квалитативно определување на органохлорни и органофосфорни пестициди во брашно со тенкослојна хроматографија

#### 10.1. ПРЕТХОДНИ ПРЕДЗНАЕЊА

*Пестицидите* претставуваат отрови кои се користат за уништување на биолошки организми што се непожелни за човекот (инсекти, глодари, коров, микроорганизми). Според видот на биолошката врста за чие уништување се наменети, пестицидите се делат на инсектициди, родентициди, хербициди и фунгициди. И покрај тоа што пестицидите се селективно токсични за одредена биолошка врста, тие можат да предизвикаат токсични ефекти и кај човекот во зависност од дозата. Од хемиски аспект, пестицидите претставуваат хетерогена група на соединенија со различни биолошки, хемиски и физички својства. Затоа, за нивно определување не постои универзална аналитичка метода со која лесно и брзо ќе се докажат и квантитативно ќе се определат. Во аналитиката на пестицидите е искористена нивната заедничка хемиска структура, при што од техниките за определување најчесто се употребуваат тенкослојната хроматографија, гасната хроматографија, како и спектрофотометријата и масената спектроскопија. Најмногу користени инсектициди во земјоделството се органофосфорните и органохлорните пестициди.

*Токсичното дејство* на органофосфорните пестициди се заснова на инхибиција на ензимот ацетилхолинестераза во нервниот систем. Органофосфорните инсектициди се делат на три групи и тоа: фосфати кои не содржат атом на сулфур во структурата, фосфоротиоати со еден атом на сулфур и фосфородитиоати што содржат два атоми на сулфур во својата структура. Соединенијата кај кои сулфурот е врзан за фосфор со двојна врска, токсични својства стекнуваат после нивна метаболичка активација во оксони (замена на сулфурниот атом со атом на кислород). Во физиолошки услови, ацетилхолинот кој претставува хемиски медијатор на акциониот потенцијал во завршетоците на холинергичките неврони реагира со мускаринските и никотинските рецептори и потоа во синапсите веднаш се разградува под дејство на ензимот ацетилхолинестераза. Во клиничката слика на акутно труење со органофосфорни пестициди, јасно се разликуваат мускаринските, никотинските и централните ефекти. Мускаринските ефекти се доминантни при благо труење (ацетилхолинестеразата е инхибирана за помалку од 50%), а појавата на никотински ефекти и нарушување на централниот нервен систем зборуваат за

умерено (активноста на ацетилхолинестеразата е 20-40%) и тешко труење со антихолинестеразни соединенија (активноста на ензимот е помала од 20%). Мускаринските ефекти при благо труење се мачнина, повраќање, саливација, лакримација, потење, бронхоконстрикција, зголемена бронхијална секреција и брадикардија, а при умерено труење се карактеризираат со дополнителни симптоми како миоза која не реагира на светлина, нејасен вид, уринарна и фекална инконтиненција. Никотинските ефекти се појавуваат при умерено труење во вид на мускулни фасцикулации и тахикардија, а тешките труења се проследени со мускулни фасцикулации на дијафрагмата и респираторните мускули. Од централните ефекти кај благо труење се појавуваат главоболка и несвестица, при умерено труење се појавуваат и проблеми при говорот, атаксија и ментална конфузија, а тешкото труење се карактеризира со конвулзии, тремор, кома, респираторна депресија и цијаноза.

*Третманот при труење со органофосфорни пестициди се состои од три мерки, и тоа: спречување на понатамошна ресорпција на отровот, примена на помошни мерки и давање на антидоти. Ако труењето е на кожа, тогаш веднаш се отстранува облеката, се деконтаминира кожата со вода и се испира со алкален сапун. Ако интоксикацијата е настаната преку уста, тогаш може да се предизвика емега, доколку затруениот е во свесна состојба и без конвулзии. Исто така можат да се дадат активен јаглен и лаксенси. Кај пациенти во кома, може да се примени лаважа на желудникот, при што се внимава да не дојде до аспирација на желудочен сок во белите дробови. Помошните мерки се состојат во одржување на респираторната функција и по потреба давање на вештачко дишење. Антидот при труење со органофосфорни пестициди претставува атропин кој се дава интравенски на секои 5-10 минути додека не се појават симптоми на атропинизација. Ефикасноста на атропинот се зголемува во присуство на оксими како што е пралидоксим кој исто така се дава интравенски. На пациентите може да им се даде и диазепам. Атропинот обично ги отстранува мускаринските ефекти на органофосфатите, но на никотинските не делува. Оксимите го разградуваат комплексот ензим-отров и ја реактивираат активноста на ензимот ацетилхолинестераза, така што врзуваат еден дел одмолекулата на органофосфорниот инхибитор за својата молекула, градејќи фосфорилиран оксим.*

*Токсичното дејство на органохлорните пестициди се заснова на различни механизми на токсичност како резултат на разликите во хемиската структура. Според разликите во структурата, органохлорните пестициди се делат на дихлордифенилетани (DDT, метоксихлор), хлорирани циклодиени (алдрин, диелдрин, хлордан) и хлорирани соединенија на бензен или циклохексан (линдан, хексахлорбензен, хексахлорциклохексан). DDT врши инхибиција на АТФ-азите во нервните клетки, влијае на активниот транспорт на  $\text{Na}^+$  од нервните клетки, го намалува транспортот на  $\text{K}^+$  низ мембраната на нервните клетки и ја намалува способноста на калмодулинот да го врзува и да го пренесува калциумот. Како продукт на овие ефекти се намалува брзината на реполаризација на нервните клетки и се зголемува реактивноста спрема стимулансите од надворешната средина. Симптомите на акутно труење со дихлордифенилетани опфаќаат парестезија на јазикот, усните и лицето, зголемена осетливост на надворешни дразби, вртоглавица, периферен тремор, пореметување на движењето, конфузија,*

конвулзии и атаксија. Хроничното труење се карактеризира со губење на телесна тежина, анемија, тремор, мускулна слабост, анксиозност, хиперекситабилност.

Покрај токсичното дејство на DDT врз ЦНС, познати се и други токсични ефекти врз хепарот (центрилобуларна некроза, хипертрофија на хепатоцитите и органелите), како и врз репродуктивните органи (промени во сперматогенезата, директно естрогено дејство). DDT при дермална експозиција покажува многу слаба токсичност заради незначителната апсорпција преку кожа.

Циклодиените делуваат антагонистички на  $\gamma$ -аминобутерната киселина и го блокираат транспортот на  $Cl^-$  во нервните клетки. Затоа настанува непотполна реполаризација на невроните и состојба на неконтролирана експитација што води кон појава на конвулзии. Циклодиените исто така вршат инхибиција на  $Na^+K^+$ -АТРазата и  $Ca^{2+}Mg^{2+}$ -АТРазата и влијаат врз транспортот на калциумовите јони низ мембраната на нервните клетки. Главна карактеристика на труењата со циклодиени е појавата на конвулзии. Покрај конвулзии, акутните труења се карактеризираат со главоболка, вртоглавица, повраќање, хиперрефлексија, моторна хиперекситабилност и миоклонични грчеви. При хронично труење со циклодиени се појавуваат следниве симптоми: главоболка, вртоглавица, губење на свест, миоклонични грчеви, психолошки пореметувања, болка во градите, црвенило на кожата, атаксија, лоша координација на движењето, пореметување на говорот, проблеми со видот, депресија, губење на меморијата, слабост на мускулите на рацете и нарушување на процесот на сперматогенеза. Алдрин и диелдрин покажуваат значителна токсичност во однос на репродуктивната функција (тератогено дејство кај глувци). Хлордекон предизвикува зголемување на хепар и слезина, дегенерација на аксоните, оштетување на миелинската обвивка и импотенција.

*Третманот при труење со оргонохлорни пестициди се врши со деконтаминација и примена на помошни мерки. Најчесто се дава активен јаглен, а се препорачува интравенска употреба на диазепам или фенобарбитон. При труење со хлордекон се дава анјонската изменувачка смола холестирамин која има висок афинитет да го врзува хлордеконот формирајќи комплекси кои брзо се излачуваат со фецесот.*

**Принцип на вежбата:**

Квалитативното определување на органофосфорни и органохлорни пестициди со тенкослојна хроматографија се заснова на нивните својства да се раздвојуваат меѓусебно во хроматографски систем кој се состои од стационарна фаза, силика гел и мобилна фаза, смеса од петролетер и ацетон. Најпрво пестицидите се екстрахираат од брашното со смеса од етер и петролетер. Упарениот екстракт се раствора во алкохол и се аплицираат петна на хроматографската плоча. После развивање на плочата во претходно подготвена мобилна фаза, се врши детекција на органохлорните пестициди со помош на 1% раствор на дифениламин под UV светлина, а органофосфорните пестициди се детектираат со прскање на плочата со 0.5% раствор на  $\text{PdCl}_2$ . Идентификација на непознатите пестициди се врши со споредба на петната добиени од анализата со петната добиени од стандардните раствори.

**10.2. ПРАКТИЧЕН ДЕЛ****10.2.1. Реагенси**

- ацетон
- диетил етер
- петролетер
- етанол
- 1% раствор на дифениламин
- 0.5% раствор на  $\text{PdCl}_2$

**10.2.2. Лабораториски материјал**

- одделителна инка
- стаклени чаши, ерленмаери
- водена бања
- филтер хартија
- хроматографски плочи со силика гел
- микропипетори
- покривни плочи
- комора за развивање на хроматографската плоча
- UV комора

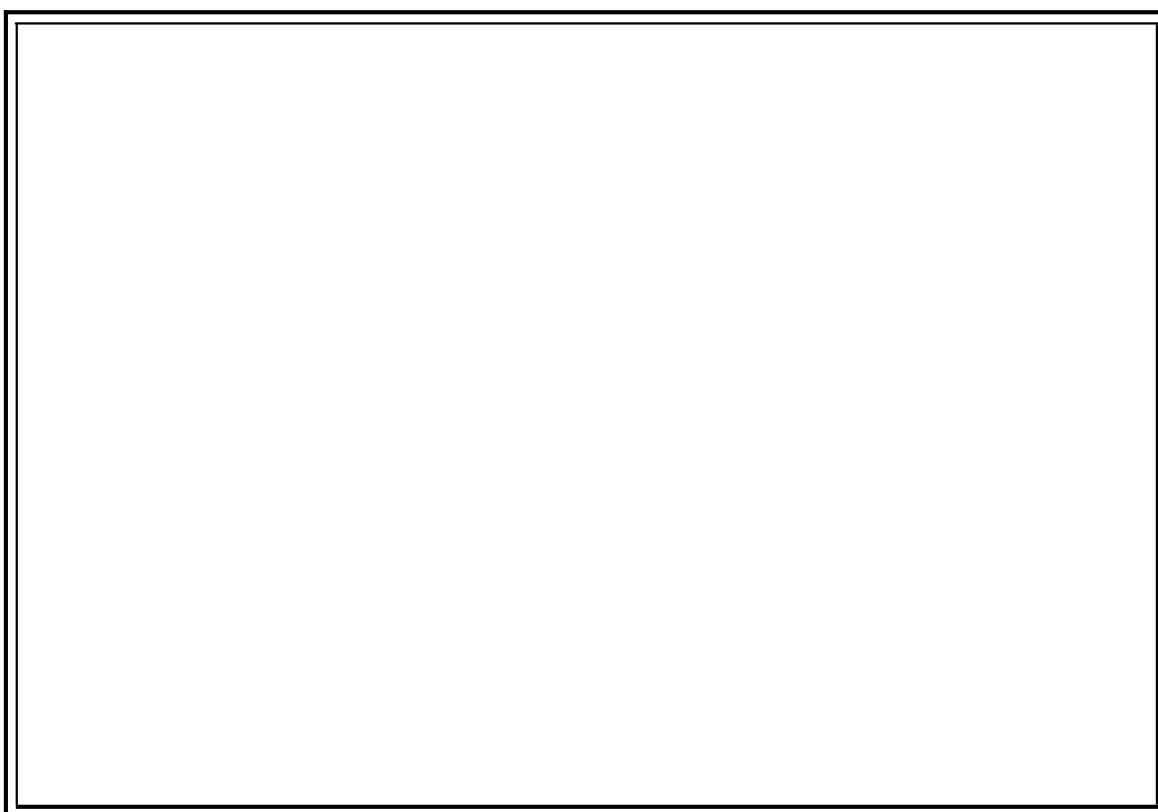
**10.2.3. Постапка за определување на органофосфорни и органохлорни пестициди со тенкослојна хроматографија**

Во ерленмаер од 100 ml се мери 5 g брашно и се врши екстракција со смеса од 20 ml етер и петролетер во однос 1:4. Екстракцијата се одвива во тек на 5 минути. Потоа, талогот се отстранува, а екстрактот се филтрира преку сува филтер хартија. Филтратот се испарува на водена бања до суво, а остатокот се раствора во 0.5 ml етанол. Потоа, етанолниот екстракт се нанесува на хроматографска плоча со стационарна фаза силика гел. Помеѓу анализите се нанесуваат петна од стандардните раствори.

Развивањето на хроматографските плочи се врши во мобилна фаза која се состои од смеса на петролетер (40-70°C) и ацетон, во однос 9:1. Детекцијата на органохлорните пестициди се врши со 1% раствор на дифениламин под UV светлина. Детекцијата на органофосфорните пестициди се врши со прскање со 0.5% раствор на паладиум хлорид. Идентификацијата на непознатиот пестицид се врши преку споредување на добиените петна со петната од стандардните раствори.

### **10.3. РЕЗУЛТАТИ**

#### 10.3.1. Хроматографски плочи после детекција



### **10.4. ЗАКЛУЧОК**

---

---

## 10.5. ПРАШАЊА

10.5.1. Врз основа на што се врши детекцијата на непознатите органофосфорни пестициди и за каков тип на детекција станува збор?

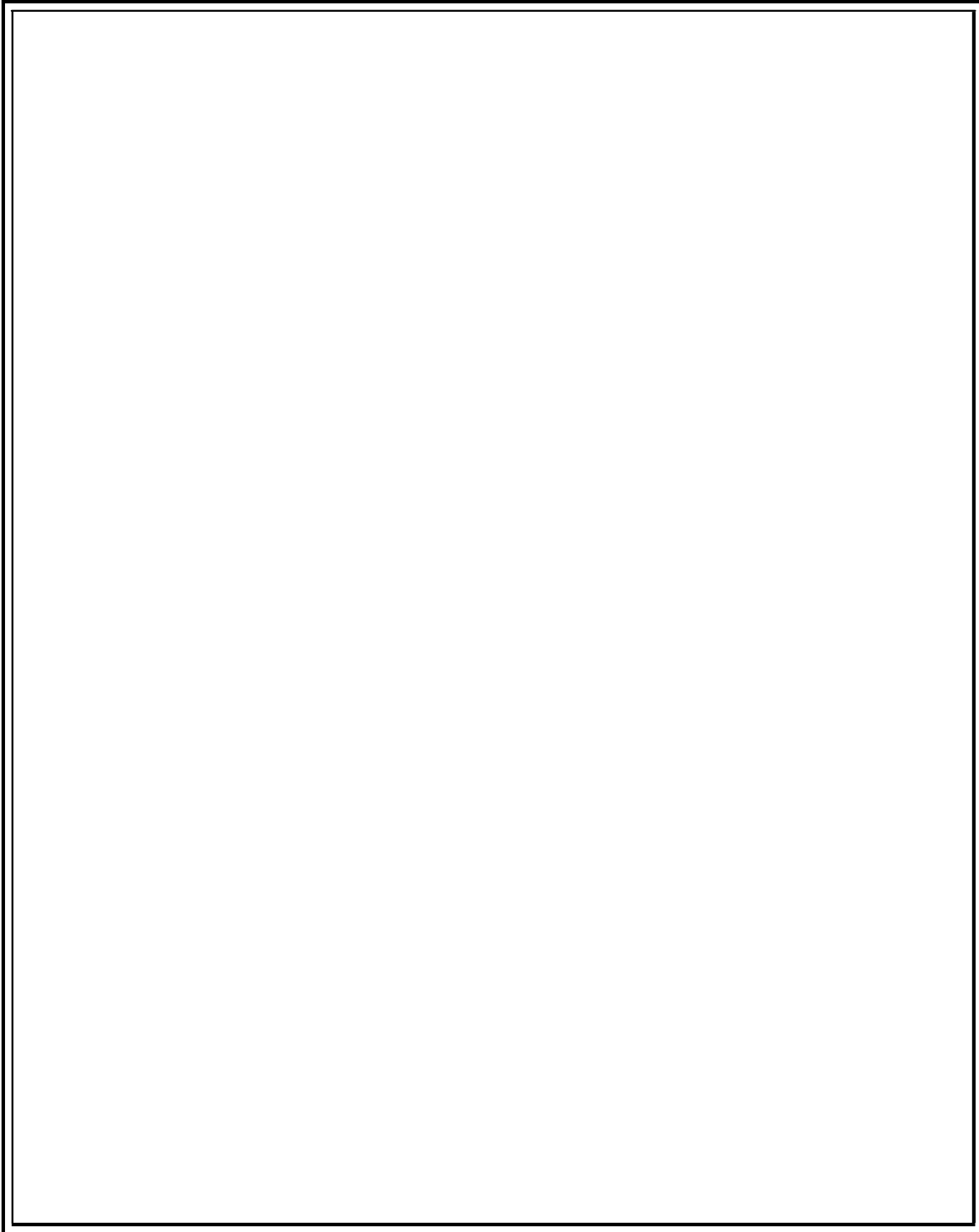
10.5.2. Врз основа на што се врши детекцијата на непознатите органохлорни пестициди и за каков тип на детекција станува збор?

10.5.3. На што се должи токсичното дејство на органохлорните пестициди?

10.5.4. Колкав е процентот на активноста на ензимот холинестераза при благи, умерени и тешки труења со органофосфорни пестициди?

10.5.5. Опиши ги симптомите на хронично труење со циклодиени.

10.5.6. Кои антидоти се користат при труење со органофосфати?



Освоени бодови:

\_\_\_\_\_

Асистент:

\_\_\_\_\_



## ВЕЖБА БР. 11

Датум \_\_\_\_\_

Работно место \_\_\_\_\_

Име и презиме \_\_\_\_\_

Досие бр: \_\_\_\_\_ Група \_\_\_\_\_

### Квалитативно определување на барбитурати во урина со тенкослојна хроматографија

#### 11.1. ПРЕТХОДНИ ПРЕДЗНАЕЊА

*Барбитуратите* претставуваат лекови со депресивно дејство. Примената на барбитуратите во терапевтски дози постигнува ефекти на релаксација, смирување и поспаност. Меѓутоа, многу е честа појавата на злоупотреба на барбитуратите, а исто така голем е бројот на акутни интоксикации со барбитурати. Клиничкиот синдром на интоксикација при употреба на барбитуратите во релативно ниски дози е многу сличен на синдромот на интоксикација со алкохол.

*Терапевтската примена* на барбитуратите во последниве години е намалена заради појавата на голем број несакани ефекти, како и нивниот помал терапевтски индекс во споредба со бензодиазепините.

Симптомите на акутна интоксикација со барбитурати опфаќаат: потешкотии со концентрацијата, поспаност, погрешно расудување, некоординираност, бавен говор, плитко дишење, летаргија, вртоглавица, губење на свест, кома. Потешките случаи на труење со барбитурати се карактеризираат со хипотермија, хипотензија, респираторна депресија и срцев застој.

Симптомите на токсичност се забележуваат после 4 часа од предозирање со барбитурати со кратко дејство и после 10 часа при предозирање со барбитурати со долго дејство.

*Третманот при труење* со барбитурати опфаќа:

- регулација на кардиореспираторната функција;

- мерки за спречување на апсорпцијата:

а) гастрична лаважа се применува ако не поминале повеќе од 2-4 часа од ингестијата на барбитуратите

б) давање на активен јаглен - кај барбитуратите со долго дејство се дава на секои 4 часа со што се забрзува нивната елиминација;

- мерки за отстранување на барбитуратите од организмот:

а) активен јаглен се дава на секои 2-4 часа,

б) форсирана диуреза со алкализирање на урината - посебно е ефикасна кај барбитурати со долго дејство како фенобарбитон кој со алкализација на урината (рН 7,8-8) преминува во јонизирана форма после филтрацијата во реналните тубули каде се заробува со што се инхибира реапсорпцијата на фенобарбитон од реналните тубули и се зголемува неговата екскреција

в) хемодијализа и хемоперфузија – често се користат во третман на интоксикација со барбитурати бидејќи го зголемуваат нивото на нивната елиминација. Количината на барбитурати што се излачува со континуирана диуреза или перитонеална дијализа за 24 часа, со помош на хемодијализа може да се елиминира од организмот за 6 часа.

**Принцип на вежбата:**

Квалитативното определување на барбитурати со тенкослојна хроматографија се заснова на нивните својства да се распределуваат во хроматографски систем кој се состои од стационарна фаза, силика гел и мобилна фаза, смеса од петролетер, ацетон и толуол. Најпрво барбитуратите од урината се раствораат во HCl, а потоа се екстрахираат со етер. Упарениот етерски екстракт на барбитуратите се раствора во алкохол и се аплицираат петна на хроматографската плоча. После развивање на плочата во претходно подготвена мобилна фаза и нејзино сушење, се врши хемиска детекција со помош на хромоген реагенс, 1% раствор на меркуро нитрат. Идентификација на непознатите барбитурати се врши со споредба на петната добиени од анализата со петната добиени од стандардните раствори.

## 11.2. ПРАКТИЧЕН ДЕЛ

### 11.2.1. Реагенси

- ацетон
- диетил етер
- толуол
- петролетер
- етанол
- дилуирана HCl
- 1% раствор на HgNO<sub>3</sub>

### 11.2.2. Лабораториски материјал

- одделителна инка
- стаклени чаши
- филтер хартија
- хроматографски плочи со силика гел
- микропипетори
- покривни плочи
- комора за развивање на хроматографската плоча
- фен

### 11.2.3. Постапка за определување на барбитурати со тенкослојна хроматографија

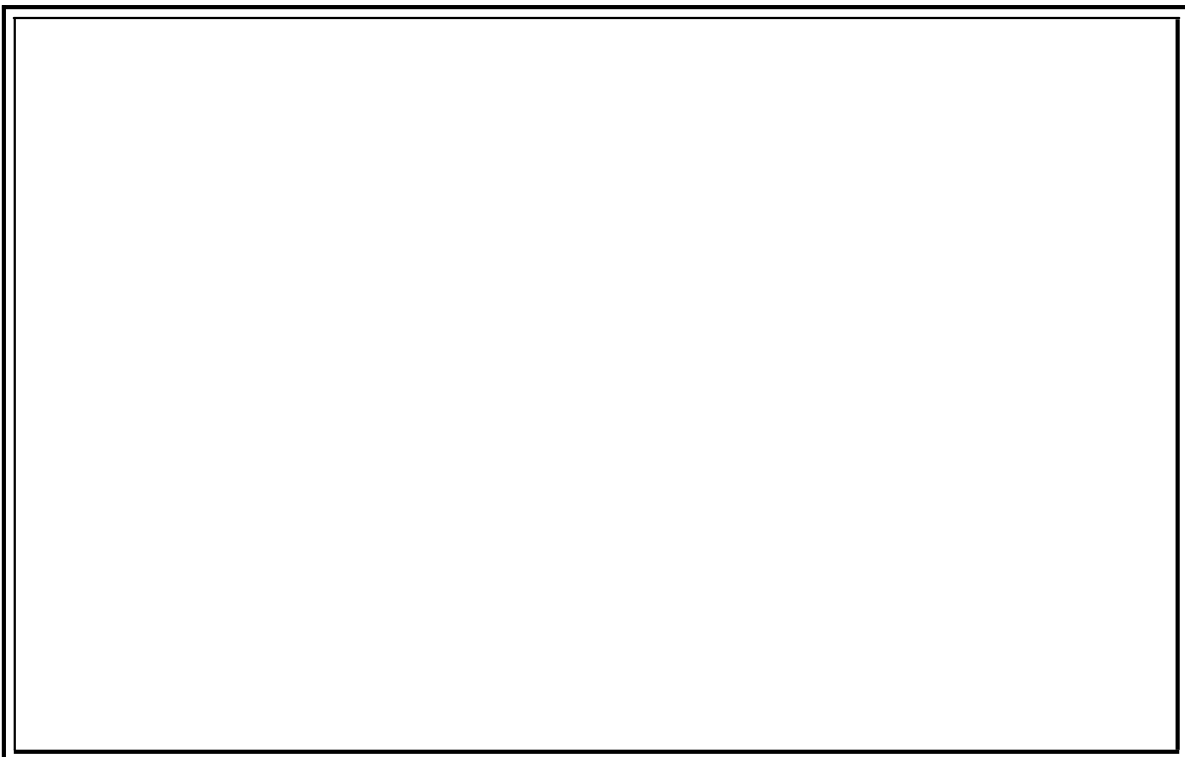
Во одделителна инка се зема 1ml урина и се закиселува со разредена HCl до pH=2. Потоа се додаваат 20 ml етер и содржината се меша 10 минути. Водената фаза се отстранува, а етерскиот слој се префрла преку сува филтер хартија во сува чашка. Етерот се упарува до суво на водена бања, а остатокот се раствора во 0.25 ml алкохол. Потоа, алкохолниот екстракт се нанесува на три мерни точки во волумен од 5, 10 и 15 µl на хроматографската плоча со стационарна фаза силика гел. Помеѓу анализите се нанесуваат по 10 µl од стандардните раствори.

Развивањето на хроматографските плочи се врши во 10 ml мобилна фаза која се состои од смеса на петролетер, ацетон и толуол во однос 15:4:2. Потоа, хроматографската плоча се суши со фен и повторно се развива со 10 ml раствор. После сушењето на плочата, детекцијата на петната се врши со 1% раствор на меркуро нитрат.

После прскање, плочата веднаш се суши со фен, а идентификацијата на непознатиот барбитурат се врши преку споредба на петната добиени од анализата со петната од стандардните раствори.

## 11.3. РЕЗУЛТАТИ

### 11.3.1. Хроматографска плоча после детекција



## 11.4. ЗАКЛУЧОК

---

---

## 11.5. ПРАШАЊА

11.5.1. Врз основа на што се врши детекцијата на непознатиот барбитурат и за каков тип на детекција станува збор?

11.5.2. Со кои симптоми се карактеризира акутната интоксикација со барбитурати?

11.5.3. Кои мерки ги опфаќа третманот при труење со барбитурати?

Освоени бодови:

---

Асистент:

---

## Квалитативно определување на алкалоиди во урина со тенкослојна хроматографија

### 12.1. ПРЕТХОДНИ ПРЕДЗНАЕЊА

*Алкалоидите* претставуваат органски соединенија од растително потекло. Сите алкалоиди во својата молекула содржат С, Н и N, а некои содржат О и S. Алкалоидите имаат базен карактер, во растенијата се наоѓаат врзани за органски киселини во облик на сол, од каде може да се екстрахираат со јака база. Во хемиски поглед претставуваат деривати на хетероцикличните соединенија пирол, пиридин, хинолин, изохинолин и тропин. Алкалоидите имаат големо токсиколошко значење бидејќи нивната токсичност е еднаква на најопасните минерални отрови, а од друга страна, детекцијата на отровот е тешка затоа што алкалоидите не предизвикуваат карактеристични повреди на внатрешните органи.

*Токсичните ефекти* на алкалоидите можат да се појават при долготрајна употреба или невнимателна примена при што настануваат труења со алкалоиди. Токсичноста на алкалоидите и леталната доза зависат од природата на отровот, отпорноста на организмот, како и од степенот на навикнување. Посебен проблем претставува детекцијата на отровот, бидејќи дел од минималните количини кои предизвикуваат труење се елиминира, а другиот дел се разложува во организмот за кратко време. За разлика од тешката детекција на отровот, симптомите при труење со алкалоиди се многу карактеристични и лесно се забележуваат и од страна на обичните луѓе.

Симптомите на труење со тропанските алкалоиди (атропин, кокаин) опфаќаат сувост на кожата и мукозните мембрани, фотофобија, заматување на видот, тахикардија, ретенција на урина, а подоцна можна е појава на хипертермија, конфузија, агитација, напади, кома, амнезија.

Симптомите при труење со пиролизидински алкалоиди вклучуваат абдоминална болка и појава на асцит, проследени со анорексија, наузеа, повраќање, дијареа, едем, хепатомегалија, спленомегалија и хепатит во блага форма.

Токсичноста на пиридинскиот алкалоид, никотин претставува комплексен синдром заради големото варирање на неговото кардиотоксично дејство помеѓу брадикардија и тахикардија. Симптомите на труење во иницијалната фаза опфаќаат општа стимулација со изразена парасимпатичка активност (саливација, лакримација, дефекација, повраќање). Континуираната експозиција се

карактеризира со мускулна слабост, тремор, брадикардија, хипотензија и диспнеа, која ако не се третира доведува до конвулзии и респираторна парализа.

Индолните алкалоиди (стрихнин) при труење предизвикуваат вкочанет израз на лицето и вратот пропратено со зголемена ексцитабилност на рефлексите и тонични конвулзии. Конвулзиите се појавуваат кај глатката мускулатура вклучувајќи ги торакалните, абдоминалните и мускулите на дијафрагмата кои вршат супресија на дишењето. Конвулзивните епизоди можат да бидат континуирани или со паузи, придружени со депресија при што пациентот е во свесна состојба и згрчен од болка. После неколку комплетни конвулзивни напади се појавува медуларна парализа како последица на хипоксијата, по што настанува смрт.

Алкалоидите со фенантренска структура (морфин, кодеин) највисоки концентрации достигнуваат во лимбичкиот систем, таламус, хипоталамус и спиналниот канал. Ефектите на фенантренските алкалоиди врз расположението, однесувањето и движењето зависат од нивната интеракција со рецепторите во базалните ганглии, а менталната конфузија и еуфоријата се резултат на променетата невронска активност на лимбичкиот систем. Клиничката слика на труење со опиоидни алкалоиди се карактеризира со миоза, хипотермија, респираторна депресија и кома. Труењето со терпеноидни алкалоиди (аконитин) се карактеризира со општа парестезија, наузеа, дијареа, вертиго, торакална болка, диспнеа и синусна брадикардија.

*Третманот при труење со алкалоиди се состои во испирање на желудникот, предизвикување на емега, давање на танин како антидот, потоа вклучување на помошни мерки како што се загревање на телото и давање на вештачко дишење.*

#### **Принцип на вежбата:**

Квалитативното определување на алкалоиди со тенкослојна хроматографија се заснова на нивните својства да се распределуваат во хроматографски систем кој се состои од стационарна фаза, силика гел и мобилна фаза, смеса од етил ацетат, ацетон, метанол и амонијак. Најпрво 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. Алкалоидите се задржуваат во водениот слој кој понатаму се алкализира со амонијак за да се ослободат алкалоидите, кои потоа 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. Потоа плочата се суши и повторно се прска со Dragendorf-ов реагенс. Идентификација на непознатите алкалоиди се врши со споредба на петната добиени од анализата со петната добиени од стандардните раствори.

## 12.2. ПРАКТИЧЕН ДЕЛ

### 12.2.1. Реагенси

- ацетон
- диетил етер
- метанол
- етил ацетат
- етанол
- амонијак
- дилуирана HCl или H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- 0.1% етанолен раствор на нинхидрин
- Dragendorf-ов реагенс (NaJ + Bi(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)

### 12.2.2. Лабораториски материјал

- одделителна инка
- стаклени чаши
- водена бања
- филтер хартија
- хроматографски плочи со силика гел
- микропипетори
- покривни плочи
- комора за развивање на хроматографската плоча
- сушница

### 12.2.3. Постапка за определување на алкалоиди со тенкослојна хроматографија

Во чаша од 50 ml се зема 10 ml урина и се додава разредена H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> или HCl за да се закисели примерокот до pH=2. Потоа се додава (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> до заситување и се загрева на водена бања 30 минути. Топлиот раствор се филтрира преку филтерна хартија во одделителна инка и филтерот се испира со 10 ml закиселена вода. Откако ќе се излади филтратот, се додаваат 20 ml етер и се врши екстракција во тек на 3 минути. Етерскиот слој се фрла, бидејќи во него се наоѓаат кисели и неутрални компоненти.

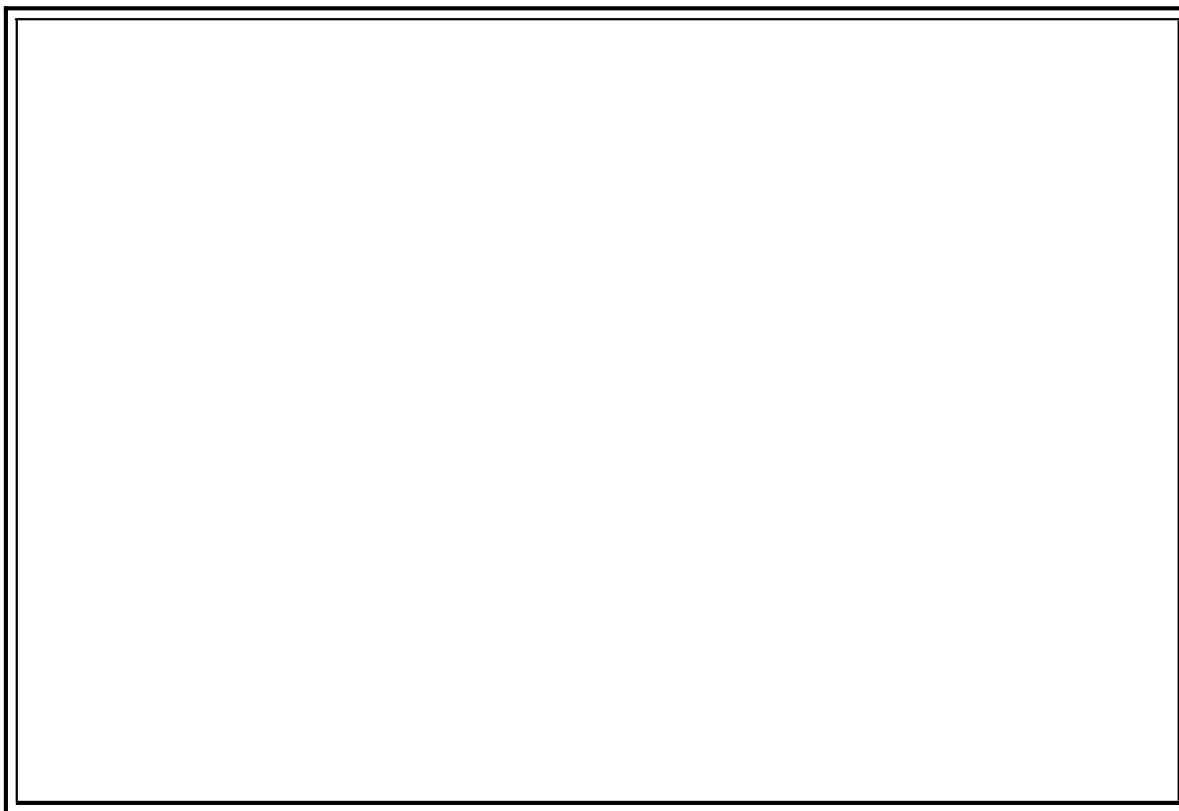
Водениот слој се алкализира со амонијак до pH=9 и се екстрахира со 20 ml етер за време од 5 минути. Етерскиот слој се префрла преку сува филтер хартија во сува чашка. Етерот се упарува до суво на водена бања, а остатокот се раствора во 0.25 ml алкохол. Потоа, алкохолниот екстракт се нанесува на три мерни точки во волумен од 5, 10 и 15 µl на хроматографската плоча со стационарна фаза силика гел. Помеѓу анализите се нанесуваат по 10 µl од стандардните раствори.

Развивањето на хроматографските плочи се врши во 10 ml мобилна фаза која се состои од смеса на етил ацетат, ацетон, метанол и амонијак во однос 8.5:1:1:0.5. Детекција се врши со 0.1% етанолен раствор на нинхидрин. Потоа, хроматографската плоча се суши во сушница загреана на 80°C во тек на 10 минути, па се прска со Dragendorf-ов реагенс. Идентификацијата на

непознатиот алкалоид се врши преку споредување на добиените петна со петната од стандардните раствори.

### **12.3. РЕЗУЛТАТИ**

#### 12.3.1. Хроматографска плоча после детекција



### **12.4. ЗАКЛУЧОК**

---

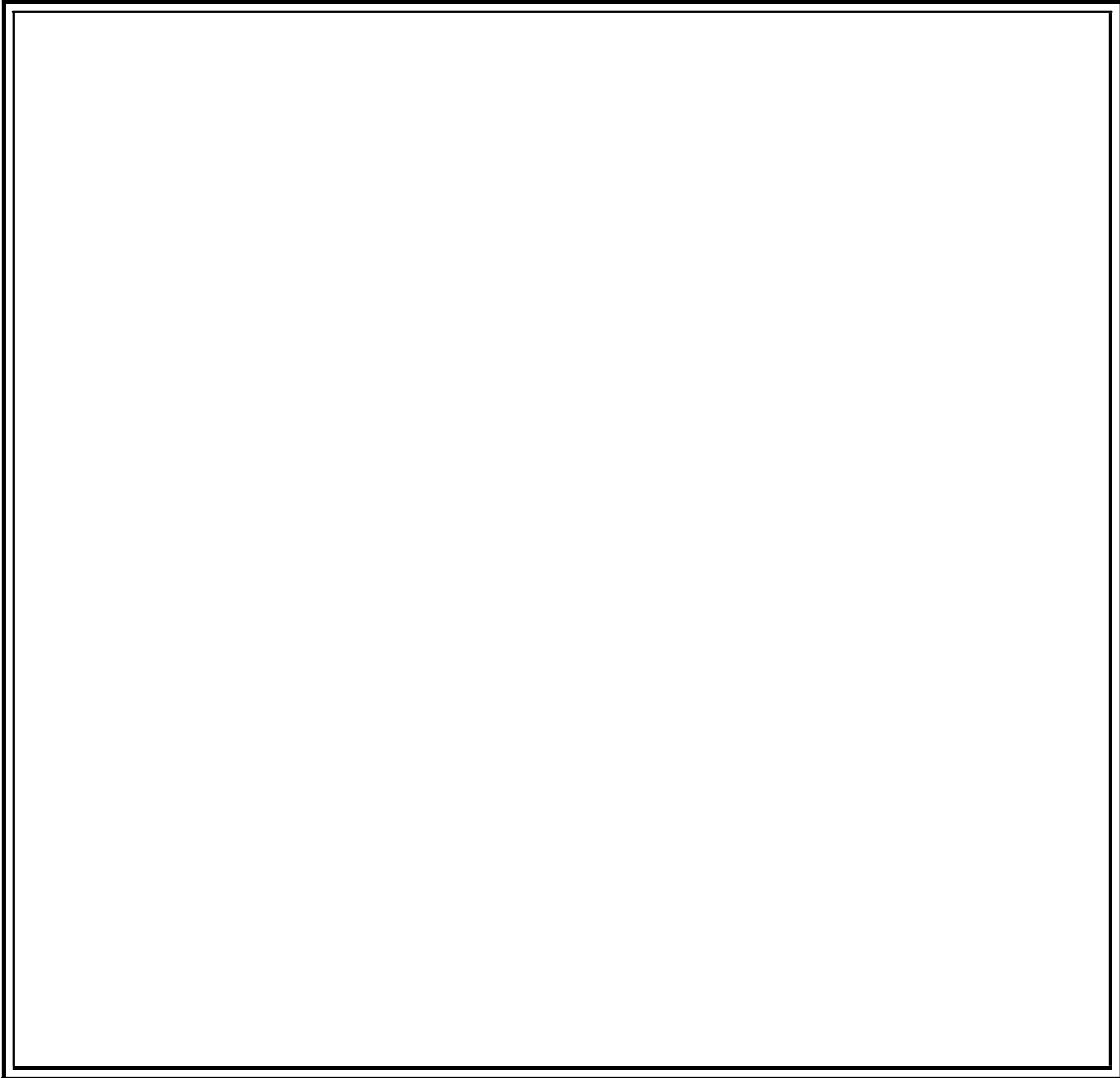
---

### **12.5. ПРАШАЊА**

12.5.1. Врз основа на што се врши детекцијата на непознатиот алкалоид и за каков тип на детекција станува збор?

12.5.2. Кои мерки се превземаат при труење со алкалоиди?





Освоени бодови:

\_\_\_\_\_

Асистент:

\_\_\_\_\_

## Литература:

1. Ahmed K., Ayana G. and Engidawork E. Lead exposure study among workers in lead acid battery repair units of transport service enterprises, Addis Ababa, Ethiopia: a cross-sectional study. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, 2008, 3:30.
2. Berman Eleanor: *The Laboratory Practice of Clinical Toxicology*, Charles C Tomas, Springfield, Illinois, 1996.
3. Casarett and Doull's toxicology: *The Basic Science of Poisons*, 5-th ed., McGraw-Hill, New York, 1996.
4. Commission Directive 2000/39/EC, establishing a first list of indicative occupational exposure limit values in implementation of Council Directive 98/24/EC, on the protection of the health and safety of workers from the risks related to chemical agents at work, OJ L 142, 16.6.2000, p. 47.
5. Commission Directive 2006/15/EC, establishing a second list of indicative occupational exposure limit values in implementation of Council Directive 98/24/EC and amending Directives 91/322/EEC and 2000/39/EC, Official Journal of the European Union, 9.2.2006.
6. Commission Recommendation on the maximum permitted blood alcohol content (BAC) for drivers of motorized vehicles 2001/115/EC, Official Journal of the European Communities, 2001.
7. Council Directive 98/24/EC, on the protection of the health and safety of workers from the risks related to chemical agents at work (fourteenth individual Directive within the meaning of Article 16(1) of Directive 89/391/EEC), OJ L 131, 5.5.1998, p. 11.
8. Directive 2000/69/EC of the European Parliament and of the Council, relating to limit values for benzene and carbon monoxide in ambient air, Official Journal of the European Communities, 13.12.2000.
9. Directive 2004/107/EC of the European Parliament and of the Council, relating to arsenic, cadmium, mercury, nickel and polycyclic hydrocarbons in ambient air, Official Journal of the European Union, 26.01.2005.
10. Flanagan R.J., Braithwaite R.A., Brown S.S., Widdop B., de Wolff F.A.: *Basic Analytical Toxicology*, World Health Organization, Geneva, 1995.
11. Jokanovic Milan: *Toksikologija*, Elit Medica, Beograd, 2001.
12. O'Kelly F.J. *The Hong Kong Practitioner*, January 1985.
13. Prpic-Majic Danica: *Toksikolosko kemijske analize*, Praxis Medica, Medicinska knjiga, Beograd-Zagreb, 1985.
14. Stankovic Dragomir: *Profesionalne bolesti*, I izdanje, "Svjetlost" OOUR Zavod za udzbenike I nastavna sredstva, Sarajevo, 1986.
15. True Bev-Lorraine and Dreisbach H. Robert: *Handbook of Poisoning: Prevention, Diagnosis and Treatment*, 13-th ed., Parthenon Publishing, London, 2002.