TOKSİKOLOJİK ANALİZ







Arş. Gör. Dr. Ezgi Öztaş

İ.Ü. Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı
2019-2020

Modern Toksikolojinin Uğraş Alanları

- ✓ Kimyasal maddelerin (zehirlerin) kaynakları
- ✓ Fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri
- ✓ Canlı organizmada uğradığı değişmeler ve etki mekanizmaları
- ✓ Toksik dozları
- ✓ Zehirlenmelerin tedavileri
- ✓ Zehirlerin izolasyonu, nitel ve nicel analizleri
- ✓ Güvenli kullanımları için risk analizleri ve standardizasyonlarının yapılması

Toksikolojik Analiz

✓Akut veya kronik zehirlenmelerin teşhisi,

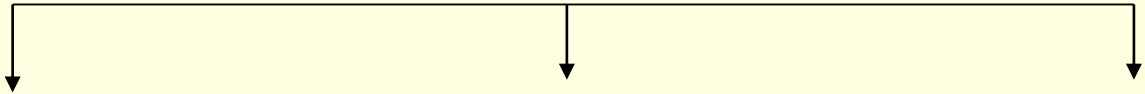
✓Mesleki veya çevresel kimyasal maddelere akut veya kronik maruziyetin değerlendirilmesi,

✓İlaç suistimali ve bağımlılığının araştırılması,

✓Terapötik ilaç izlenmesi,

✓Adli vakaların aydınlatılması.

Toksikolojik analiz



Hedefli analiz

Sistematik analiz

Çabuk sistematik analiz

Toksikolojik analizde önemli faktörler:

- ☑ Doğru numune seçimi.
- ☑ Numunenin alım şekli.
- ☑ Alınabilen numune miktarı.
- ☑ Numunenin saklanma koşulları.
- ☑ Numune ile birlikte toplanan tüm bilgilerin eksiksiz verilmesi.
- ☑ Şüphelenilen maddenin biyotransformasyonu, özellikle postmortem doku veya sıvılarda oluşabilecek bozunma durumları.
- ☑ Ana madde ile birlikte ana metabolitlerin de izole edilmesi.
- ☑ Analizin en kısa sürede yapılması.
- ☑ Analizde kullanılacak kimyasal madde ve standartların saf olması.
- ☑ Analizin güvenirliliğinin sağlanması.

Zehirlenmiş hastadan örnek alınmasında, özellikle zehrin cinsi ve hastanın bunu ne zaman aldığı bilinmiyorsa, hatalar yapılabilir.

Ya az ya da yanlış materyal alınabilir. Bu yüzden gereksiz olabilecek örnekler dahi alınmalı ve mümkün olduğunca bol tutulmalı.

Olay yeri kalıntıları (etraftaki sıvılar, çözeltiler, gıda maddeleri, içecekler, dezenfektan maddeler, tarım ilaçları dahil tüm ilaçlar ve kapları, mesleki zehirlenmelerde ortam havası vs.) ancak destekleyicidirler. Değerlendirmede asıl olan biyolojik örnektir.

Örnek uygun, temiz bir örnek kabına koyulmalıdır.

Örneğin alındığı tarih, saat, örneğin cinsi, kime ait olduğu, örneği alan kişinin adı ve imzasının bulunduğu bir etiket ile etiketlendirilmelidir.

Örnek kabı sıkıca kapatılıp mümkün olduğunca çabuk analize gönderilmelidir.

Toksikolojik tam analiz (sistematik analiz) için cesetten alınan örnekler:

İçindekilerle beraber mide,
İnce barsaklar (en az 20 cm),
Kalın barsak içeriği (100-200 g),
Toplardamardan alınmış kan (olabildiğince fazla, en az 20 ml),
Kalbin içindeki kanın tümü,
Karaciğer (200-500 g),
Böbrek (en az biri),
Mesanedeki idrarın tümü (0,5 ml gibi çok az miktarda bulunsa dahi alınır),
Beyin (300 g),
Kaslar (300 g),
Kemikler (uyluk ve göğüs kemiğinden 10'ar g),
Safra (tümü, zorunlu durumda boş safra kesesi),
Saçlar (baş derisine yakın kısmından kesilmiş olmak üzere 5 g),
El ve ayak tırnakları (olabildiğince fazla) dır.

(Yöntemler geliştikçe alınması gereken örnek miktarı da azalmaktadır.)

(Organda lezyon görülmüş ise tüm lezyonlu bölge sağlam dokudan da bir kısım alınacak şekilde alınmalıdır.)

- ✓ Eğer uçucu narkotiklerden şüphe ediliyorsa yağ dokusundan,
- ✓ zehir solunum yolu ile alınmışsa akciğerden,
- ✓ cesette enjeksiyon izleri veya kimyasal madde tahriş ve yanıkları varsa, bu işaretlerin etrafındaki dokudan (emilmemiş zehirin teşhisi için) örnek alınır.

Mezar açılarak cesetten örnek almak gerektiğinde (ekshumasyon):

Eğer ceset ve tabut tam halde ise; ceset çıkarılıp otopsi yapılır.

Gömülmeden sonra uzun zaman geçmiş ve ceset ile tabut tahtaları çürümüş ise; kemik artıkları ve bunlarla temasta olan topraktan alınan örnekler ile karşılaştırma amacıyla çeşitli derinliklerden alınan toprak örnekleri de alınarak analiz yapılır.

Mezardan çıkarılmış ceset veya saklanmış ceset örneklerinde, bazı zehirlerin şu süreler içinde teşhis edilebildikleri saptanmıştır:

Arsenik ve kurşun	9 yıl	Talyum	8 yıl
Baryum ve antimon	5 yıl	Cıva	1 ay
Karbonmonoksid	18 ay	Sarı fosfor	15 ay
Siyanürler	3 ay	Flor	2 ay
Atropin ve skopolamin	3 yıl	Morfin ve türevleri	8 yıl
Striknin	12 yıl	Akonitin	16 ay
Kolşisin	9 ay	Fisostigmin	8 ay
Kürar	4 ay	Kokain	6 ay
Barbitüratlar	5 yıl	Digitaloidler	5 ay
Bromoform ve kloroform	22 ay	Paratiyon	8 ay

Toksikolojik analiz için hastadan alınan örnekler (sırası ile):

Kusmuk veya mide yıkama suyu (ilk iki yıkama, en az 1 litre),
Kan (10-50mL),
İdrar (24 saatlik, 200-300 mL),
Feçes (100 g),
Saçlar (5 g),
El ve ayak tırnağı parçaları,
Yağ dokusu (biyopsi ile)
Hastanın soluğu,
Tükürük,
Safra,
Gözyaşı,
Beyin omurilik sıvısı,
Anne sütü.

Analize başlamadan önce;

- ✓Örneğin büyüklüğü, şekli incelenir.
- ✓Ambalaj üzerindeki etiket okunur.
- ✓Adli bir vaka ise mühür olup olmadığı incelenir.
- ✓Örneğin net ağırlığı belirlenir.
- ✓Örnek açılıp temiz, kuru, uygun bir kap içerisinde karıştırılır.
- ✓Örnek analizin amacına göre parçalara ayrılır.

Toksikolojik tam analizde örneklerin bölünmesi ve analizin ana hatları:

Örneğin 1/3'ü olası tekrar işlemleri için ayrılır. Geri kalan kısım 5, eğer kantitatif tayin isteniyorsa 6 eşit kısma bölünür.

1. **Kısım** Ön deneyler (fizikokimyasal, kimyasal ön deneyler),
2. **Kısım** Uçucu zehirlerin analizi,
3. **Kısım** Uçucu olmayan, tartarik asitli alkol ile ekstre edilebilen ve sulu ortamdan organik çözücülerle tüketilebilen organik maddelerin analizi,
4. **Kısım** Organometaller ve anorganik bileşiklerdeki metallerin analizi,
5. **Kısım** Özel vasıflı bileşiklerin analizi,
6. **Kısım** Kantitatif tayin (isteniyorsa).

Eğer zehirlenmenin sebebi biliniyorsa analize direkt başlanır.

1. Kısım: Ön deneyler

Duyu deneyleri: Çıplak göz, büyüteç ve mikroskopla görünümleri, renkleri, fluoresans göstermeleri, kokuları

Uçurma ve kızdırmadaki durumları

Bazı grup reaktifleri ile çabuk testler
(demir (III) klorür, fujiwara, nessler, aldehid reçinesi testi)

Koku varsa;	(Belirgin kokular nefeste de hissedilebilir).
Amonyak kokusu	Üre, amonyum tuzları, siyan bileşikleri
Acıbadem kokusu	Siyanür
Tütün kokusu	Nikotin
Ayakkabı cilası kokusu	Nitrobenzen
Yanmış saç kokusu	Proteinli maddeler
Sarımsak kokusu	Arsenik bileşikleri, fosfor
Çürük yumurta	Hidrojen sülfit, stibin, merkaptan

Renk varsa;	
Kahverengi renk	Brom, azotdioksit
Yeşil renk	Ni tuzları
Sarı renk	Pikrik asit, Nitrik asit
Yeşil, mavi renk	Cu tuzları
Mor renk	İyot

Süblimleşme oldu ise;	
Beyaz renkli	Arsenik trioksit, civa (I) tuzları, salisilik asit
Siyah renkli	Metalik Sb, As, Hg

Kömürleşme oldu ise;	Organik maddeler

Alev deneyindeki renkler;	
Soluk mavi	As, Sb, Sn, Pb, Hg
Mavi yeşil	Cu
Yeşil	Borik asit, Tl
Koyu sarı	Ca
Sarı	Na
Mavi	Ce, Se

2. Kısım: Uçucu zehirler (I. Esas Grup)

(Anilin, amfetamin, hidrosiyanik asit, asetik asit, formaldehid, kloralhidrat, toluen, naftalin, benzaldehid, kafur, timol vs)

✓ Uçucu zehirlerin ayrılmasında;

Kaynama dereceleri 90°C'nin altında olanlar için fraksiyonlu distilasyon,

Kaynama dereceleri 90°C'nin üstünde olanlar için su buharı ile distilasyon kullanılır.

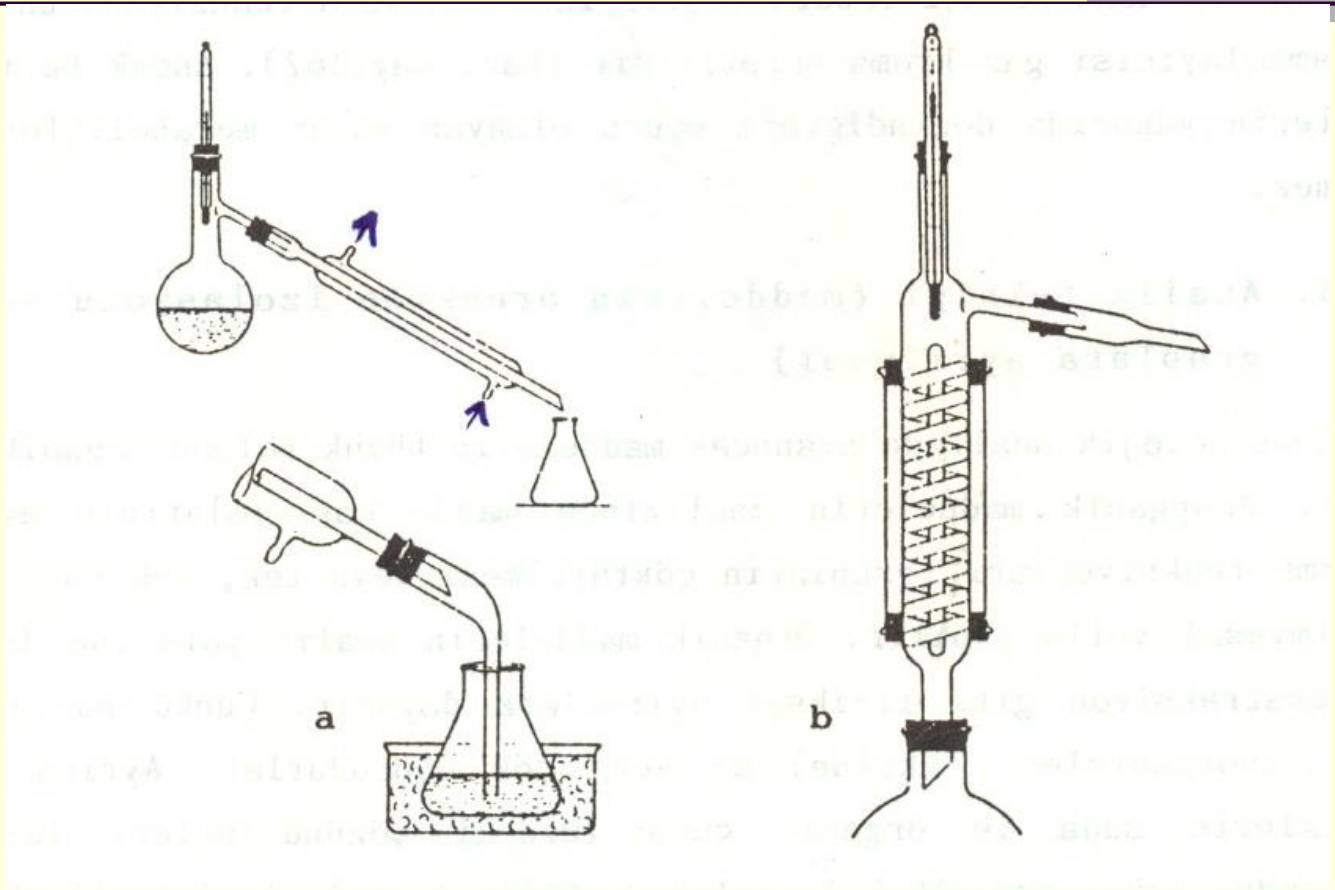
Su buharı ile distilasyonda asit veya nötr yapıdaki uçucu bileşikler için asit pH, alkali yapıdakiler için ise alkali pH kullanılır.

✓ Uçucu zehirlerin analizinde;

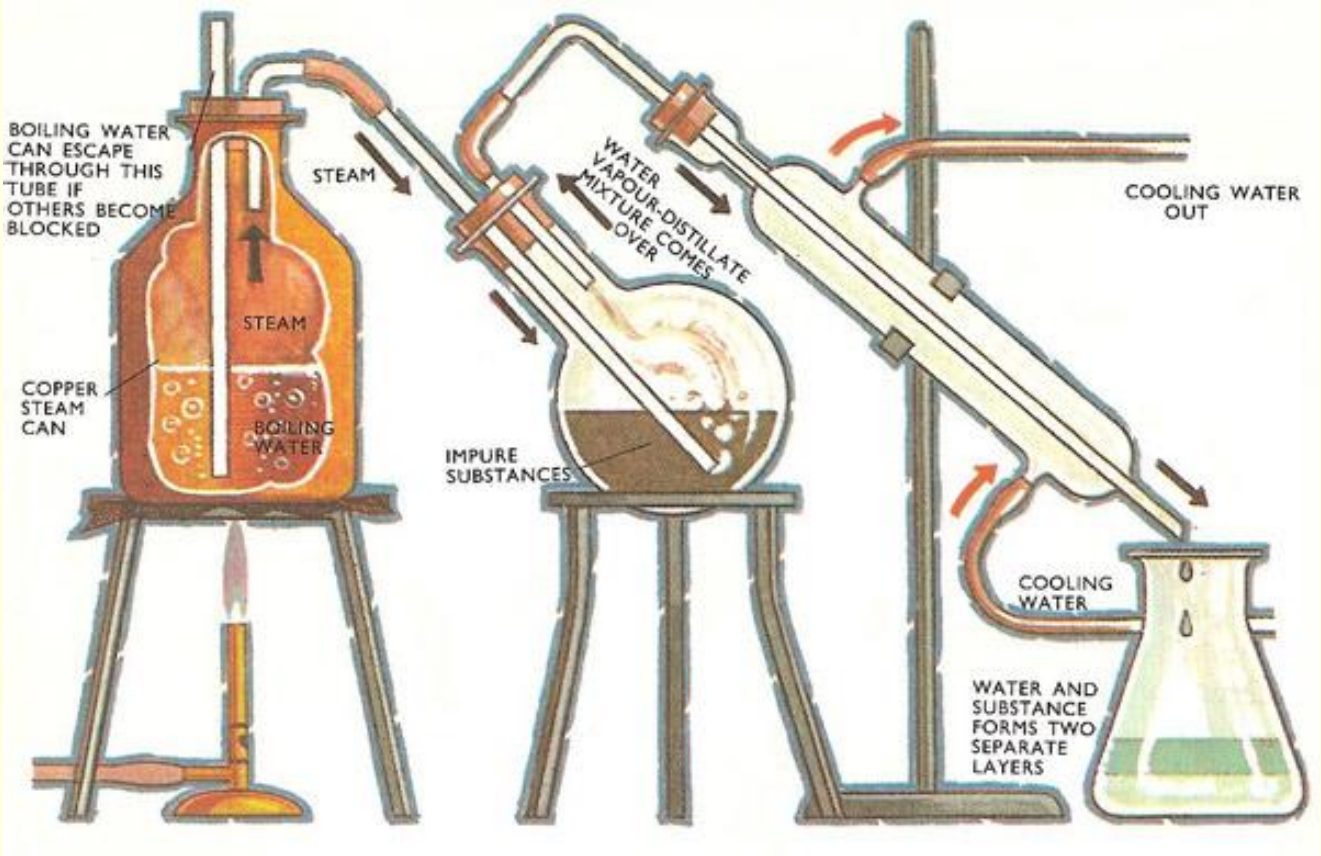
Distilanın görünüşü,
Distilanın kokusu,
pH kontrolü,
Kimyasal ön tecrübeler.

a) Distilasyon cihazı

b) Fraksiyonlu distilasyon (Widmer başlıklı)



Su buharı ile distilasyon



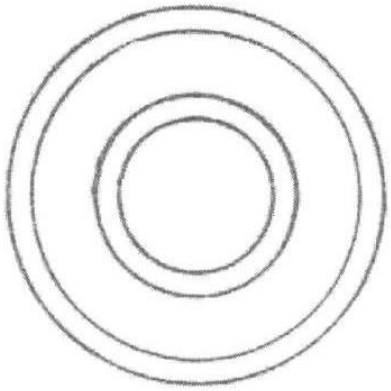
Uçucu zehirlerin mikrodifüzyon yöntemi ile izolasyonları

Az miktarda uçucu zehirlerin dokulardan izole edilmesinde kullanılan diğer bir teknik mikrodifüzyon yöntemidir.

İlk kez Feldstein ve Klendshoj tarafından uygulanan bu teknik için Convay'in mikrodifüzyon düzeneği kullanılmaktadır.

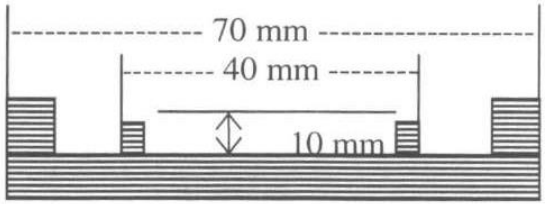
Bu yöntem ile ayrıca uçucu zehirlerin tanınması ve kantitatif analizi de yapılabilir.

Conway mikrodifüzyon düzeneği



üstten görünüş





Enine kesit

Conway mikrodifüzyon düzeneğinin

dış odacığına: uçucu zehrin aranacağı biyolojik materyal ve uçucu zehri serbest hale geçirecek reaktif;

iç odacığına: uçucu zehri aborbe edecek ve renk reaksiyonu verecek olan reaktif ilave edilir.

Düzeneğin ağzı derhal kapatılır ve difüzyon için bekletilir.

Genellikle kan ile çalışırken oda sıcaklığında 2 saat, dokularla çalışırken 37°C de 3 saat beklemek yeterlidir.

Conway mikrodifüzyon düzeneğinde uçucu zehirlerin aranması

Aranacak Zehir	DIŞ ODACIK	İÇ ODACIK	
	Zehiri açığa çıkaran reaktifler	Absorban reaktifler	Renk reaktifleri ve sonuç
CO	% 10 H_2SO_4	----	$PdCl_2$→ Siyah
Siyanür	% 10 H_2SO_4	% 10 NaOH	$FeSO_4$+HCl→mavi ↓
Klorlu hidrokarbonlar	----	1 ml saf toluen	1 ml % 30 NaOH+ saf piridin→kırmızı
Alkoller (etil-metil-, izopropil-)	Doymuş Na_2CO_3	----	Ansties reaktifi→Yeşil ($K_2Cr_2O_4$+H_2SO_4)
Metil alkol	Doymuş Na_2CO_3	H_2SO_4	Kromotropik asit→viyole
Fenoller	% 10 H_2SO_4	% 10 NaOH	Folin-fenolftalein→mavi
Fosfür	Doymuş Na_2CO_3	HNO_3	% 5 $AgNO_3$→kahverengi ↓ % 10 Amonyum molibdat+ ısı→ sarı ↓
Sülfür	% 10 H_2SO_4	% 10 NaOH	a)% 10 Pb asetat→siyah ↓ b)% 10 Cd asetat→ sarı ↓

3. Kısım: Uçucu olmayan ve organik çözücülerle tüketilebilenler (II. Esas Grup)

Analitik ve adli toksikologların ilgilendiği hemen tüm maddelerin %90'ını oluşturan en büyük grup olan II. Esas grup (zayıf asit, hidrofob nötr, amfoter ve bazik karakterli maddeler) analizinde ekstraksiyon geleneksel **Stas-Otto** yöntemine göre yapılır.

Bu yönteme göre II. Esas grup içinde toplanan organik maddelerin;

- ✓ Hemen hemen tümü alkolde, asitli veya sıcak suda çözünürler,
- ✓ Ortamın reaksiyonuna bağlı olmaksızın (nötrler için) veya pH değeri uygun (zayıf asidik veya bazik için) halde sulu ortamdan organik çözücülerle tüketilebilirler.

Buna göre 3. kısım analizinde;

- ilk işlem; etken maddelerin örnekten asitli alkol ile tüketilerek asitli sulu çözeltilere alınması,

- ikinci işlem; elde edilen sulu çözelti veya süspansiyonların belli bir sıraya göre organik çözücülerle çalkalanarak, çok sayıda olan maddelerin alt gruplara ayrılmasıdır.

Tartarik asitli alkol ile ekstraksiyon

Amaç: Etken maddeleri organik çözücüler ile çalkalanmalarına engel olan protein, yağ, karbonhidrat vs den uzaklaştırmak.

Analizi engelleyecek düzeyde bu tip maddeleri içermeyen numunelerde (göz damlaları, enjektabl çöz. vs) ekstraksiyona gerek olmayabilir.

Stas-Otto yöntemine göre asitleyici ajan olarak tartarik asit kullanılmasının sebebi:

HCl kull. ise; fenotiyazin türevleri, eroin, kodein vs gibi bazların hidroklorürleri asit ortamda organik çözücüde çözünür ve esas aranmaları gereken organik baz alt grubunda bulunmazlar.

H_2SO_4 kull. ise; bazı ester alkaloidleri veya glikozidler parçalanabilir, bazı maddeler sülfat tuzları oluşturabilir.

CH_3COOH kull. ise; amfetamin ve diğer uçucu bazların asetatları da uçucudur.

Aşırı miktarlarından kaçınmak suretiyle tartarik asit en uygun asitleyici ajandır.

Organik çözücülerle tüketme

II. Esas grubun sulu çözeltilerden, su ile karışmayan organik çözücülere çekilmesi, disosiye olmamış bileşiklerin organik çözücüye geçmesi esasına dayanır.

2 Faktör önemlidir:

- ✓ Organik maddelerin kimyasal yapısı,
- ✓ İyonize olmamış haldeki organik maddelerin, organik çözücüde çözünebilme özelliği.

Buna göre;

- ✓ Nötr maddeler ortamın pH'sına bağlı olmaksızın organik çözücüye çekilebilirler.
- ✓ Zayıf asidik veya zayıf bazik bileşikler yalnız uygun pH'lı ortamda organik çözücülerle geçerler.
- ✓ Kuvvetli asitler veya bazlar organik çözücü ile tüketilemezler.

Organik maddenin 2 fazda dağılımı **Nernst'in dağılma eşitliği** ile açıklanabilir:

1- Birbirleriyle karışmayan iki faza dağılmış maddenin her iki fazdaki konsantrasyonlarının birbirine oranı, belli temperatür ve basınçta sabit olup, çözünmüş maddenin konsantrasyonuna bağlı değildir.

2- Çok sayıda maddenin bir arada bulunması, her bir maddenin dağılma durumunu etkilemez ve her bir madde için aşağıdaki eşitlik geçerlidir.

$$\frac{C_{\text{organik faz}}}{C_{\text{sulu faz}}} = K \quad \text{(dağılma katsayısı)}$$

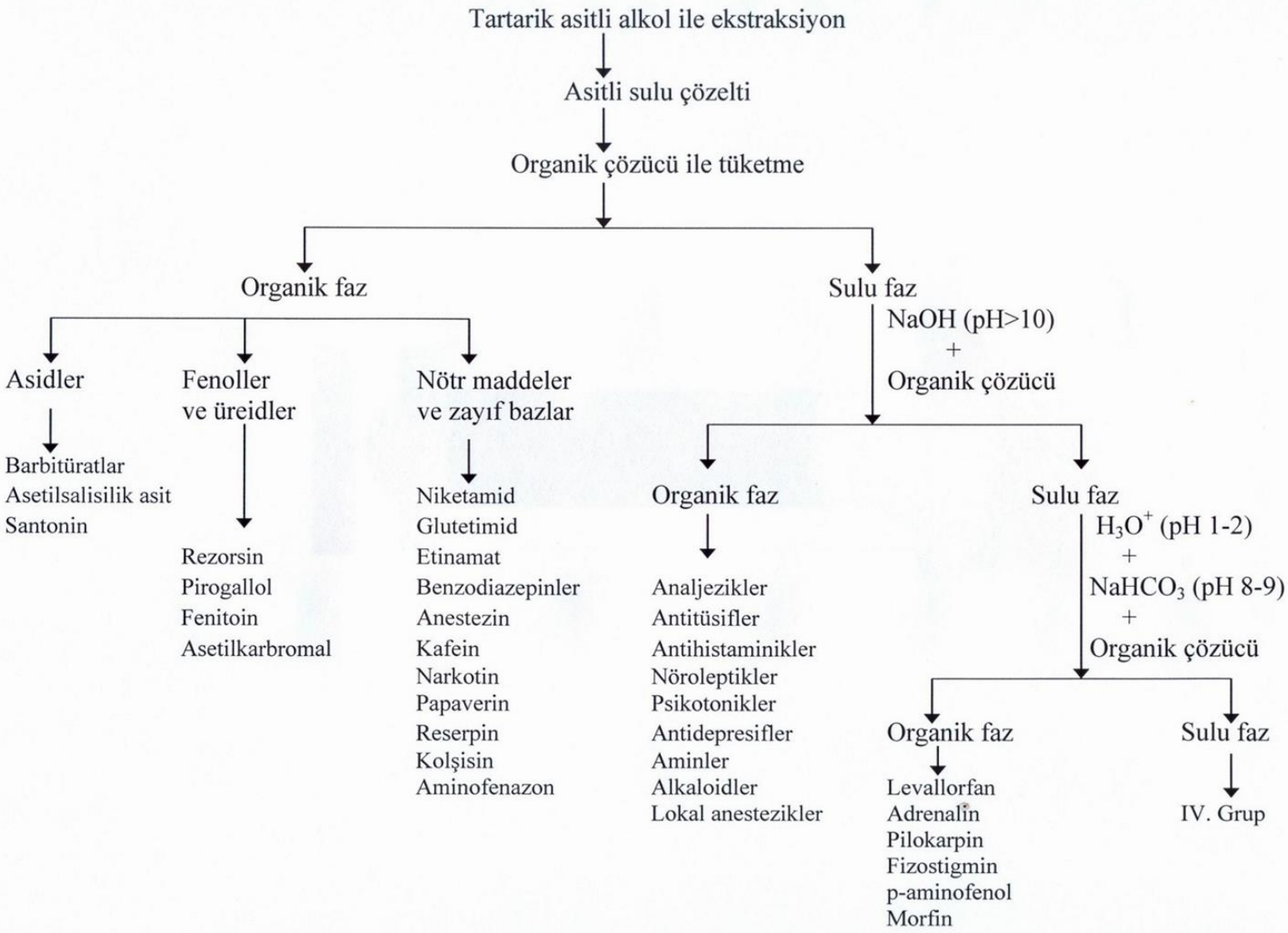
Maddenin K değeri ↑ suda çözünürlüğü ↓ organik çözücüye geçme olasılığı ↑

Dağılma katsayısını dolayısıyla ekstraksiyonun verimini etkileyen faktörler:

- Çözücü seçimi,
- Ekstraksiyon sayısı,
- pH,
- Sulu fazın iyonik gerilimi

Çözücü seçiminde dikkat edilecek hususlar;

- Madde, çözücüde, içinde bulunduğu biyolojik örnekten daha fazla çözünmelidir.
- Çözücü biyolojik örnek (sulu faz) ile karışmamalıdır.
- Çözücü kolayca uçurulabilmesi için nispeten düşük kaynama noktasına sahip olmalıdır.
- Maliyeti ve toksisitesi düşük, alev almayan bir çözücü tercih edilir.
- Ekstraksiyonlarda genellikle kloroform veya eter kullanılır. Amfoter karakterli maddelerde kloroform-alkol karışımı tercih edilirken, organik bazlarda eter tercih edilir.


Tartarik asitli alkol ile ekstraksiyon
Asitli sulu çözelti
Organik çözücü ile tüketme
Organik faz
Sulu faz
NaOH (pH>10)
+
Organik çözücü
Asidler
Barbitüratlar
Asetilsalisilik asit
Santonin
Fenoller
ve üreidler
Rezorsin
Pirogallol
Fenitoin
Asetilkarbromal
Nötr maddeler
ve zayıf bazlar
Niketamid
Glutetimid
Etinamat
Benzodiazepinler
Anestezin
Kafein
Narkotin
Papaverin
Reserpin
Kolşisin
Aminofenazon
Organik faz
Analjezikler
Antitüsifler
Antihistaminikler
Nöroleptikler
Psikotonikler
Antidepresifler
Aminler
Alkaloidler
Lokal anestezikler
Sulu faz
H_3O^+ (pH 1-2)
+
$NaHCO_3$ (pH 8-9)
+
Organik çözücü
Organik faz
Levallorfan
Adrenalin
Pilokarpin
Fizostigmin
p-aminofenol
Morfin
Sulu faz
IV. Grup

4. Kısım: Metalik zehirler (III. Esas Grup)

(As, Pb, Cd vs)

Organik maddenin parçalanarak (yaş veya kuru usul ile) uzaklaştırılmasının ardından metallerin analizine geçilir.

- ✓ Reinsch testi (asit ortamda metalik bakırla metallerin açığa çıkarılması)
- ✓ Örneklerin yaş veya kuru usulle parçalanması
- ✓ Katyon analizi yöntemleri ile metallerin tayini (atomik absorbsiyon spektroskopisi !)

Kuru usul ile parçalanma

Numune yakılır (~250^{0}C), sonra yüksek derecede (400-800^{0}C) küllendirilir As, Pb, Cd, Hg ve Se gibi uçucu elementler hariç tüm metallere uygulanabilir. Organ örneklerine uygulanır. Saf deniz kumu ile yüzey büyültülerek küllendirme süresi kısaltılabilir.

Avantajı: Basittir, uzun sürmesine rağmen başında durmayı gerektirmez.

Dezavantajı: Kapla reaksiyon olabilir ya da kap tarafından adsorbe edilebilir. Uçucu elementlerin analizinde kullanılmaz.

Yaş usul ile parçalanma

Oksidan, çözücü ve katalizör olarak etkili reaktifler yardımıyla kjeldahl balonu içinde yapılan küllendirmedir. Kan ve idrar gibi sıvı örneklere uygulanır. Çalışma temperatürü en fazla 200^0C'dir.

En iyi oksidan nitrik asittir. Aynı zamanda pek çok biyolojik örnek için iyi bir çözücüdür. Asidin fazlası kolay ve uzaklaştırılabilir. Yardımcı olarak sülfürik asit, güç örneklerde ise ayrıca peroksit ve perklorik asit ilave edilebilir.

Avantajı: Süre kısadır. Parçalanma sıvı içerisinde olduğundan kapla etkileşim olmaz. Uçucu metallerde de kullanılabilir.

Dezavantajı: Eğer örnekte kalay varsa metastannik asit oluşur. Kalsiyum gibi toprak alkaliler varsa sülfatları çöker. İşlem sırasında sık kontrol ve dikkat gereklidir. Patlama olabilir.

Reinsch testi

Toksikolojik analizde; biyolojik materyaldeki metalik zehirlerin teşhisi için direkt olarak analiz örneğine uygulanabilen Reinsch testi önemli bir yer tutmaktadır.

Analiz örneğinde eğer küllendirme ve alev deneyi yardımıyla anorganik maddelerin bulunduğu saptanırsa; toksik metal iyonlarının kalitatif ve kantitatif tayinleri için öncelikle organik maddenin parçalanarak uzaklaştırılması gereklidir.

Çünkü, toksik metaller biyolojik örneklerde proteinler ile kompleks yapmış halde bulunduklarından karakteristik iyon reaksiyonlarını veremezler.

Organik maddeler kuru usul ve yaş usul adını verdiğimiz iki ayrı yöntemle parçalanmaktadır.

Reinsch testi ile bu işleme gerek duyulmadan bazı metallerin (arsenik, antimon, civa, bizmut ve gümüş) kolay ve çabuk analizi yapılabilmektedir.

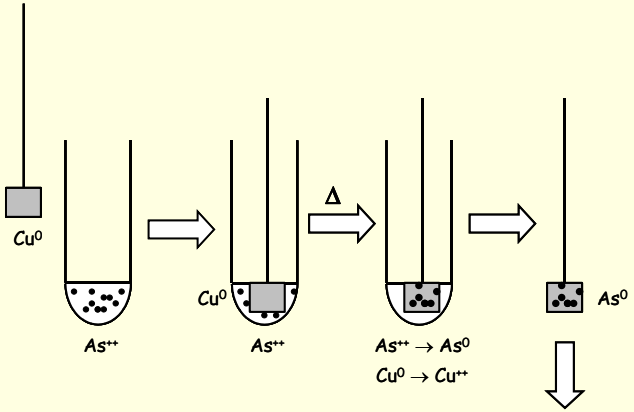
Reinsch testi, zehirli gıda maddeleri, mide içeriği, idrar ve dışkı gibi çeşitli vücut sıvıları ve hatta karaciğer ve böbrekler gibi organlara doğrudan uygulanabilir.

Bu test ile 20 mL çözeltide bulunan 50 mg civa, 5 mg arsenik, 20 mg antimon, 20 mg bizmut tanınabilir.

Reinsch Testinin Esası

Test, metal iyonlarının (arsenik, antimon, civa, bizmut ve gümüş), hidroklorik asidli ortamda metalik bakırla açığa çıkarılması esasına dayanır. Metal iyonları asitli ortamda bakır levha üzerinde toplanır.

Bu durum, bir elementin normal potansiyeli kendininkinden daha az negatif olan element için redüktör etkisi oluşturması sonucu gerçekleşmektedir.



5. Kısım: Özel vasıflı bileşikler (IV. Esas Grup)

Bu grup diğer üç grubun ayrılması işlemleri esnasında elde edilemezler veya tam olarak hiçbir gruba dahil olmazlar.

Mineral asitler
Yakıcı alkaliler
Organik asitler (laktik asit, oksalik asit vs)
Kuvvetli organik asitlerin tuzları
Protein, yağ ve karbonhidratlar
Glikozid, enzim, hormon, vitamin vs
Sülfonamidler
Nötr hidrofiller

Kimyasal maddelerin biyolojik materyalde teşhis ve kantitatif analizlerinde kullanılan teknikleri kısaca şu şekilde sıralayabiliriz:

Spektrofotometrik yöntemler:

UV-Spektrofotometresi
Visible-Spektrofotometresi
IR-Spektrofotometresi
Emisyon Spektrografisi
Atomik Absorpsiyon Spektroskopisi
Plazma Emisyon Spektrofotometresi
Spektroflorimetri
Kütle Spektrometresi

Spektrofotometrik analizlerde örneğin kantitatif tayini şu şekilde yapılır;

Referans yöntemi
Kalibrasyon doğrusu yöntemi

Kromatografik yöntemler:

İnce Tabaka Kromatografisi
Gaz Kromatografisi
Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi

İmmunoassay teknikleri:
Radyoimmunoassay
Enzim immunoassay
Fluoroimmunoassay

Diğer yöntemler:
Elektrometri
Optik Kristallografi vs

Akut klinik vakalarda uygulanan çabuk sistematik analiz

Akut zehirlenme vakalarında hastanın aldığı zehirli madde bilinmiyorsa, hekime alınacak önlemler yönünden bir an evvel yardımcı olmak üzere çabuk sistematik analiz yapılarak önemli olan olağan zehirler aranır.

Ayrıca şüphelenilen maddenin doğru olmadığı veya bazı maddeler için uygulanan basit testlerin spesifik olmadığı durumlarda ve daha önemlisi klinik tabloyu örten veya daha kötüleştiren ikinci bir maddenin varlığı durumlarında da çabuk sistematik analizin yapılması doğru olur.

Çabuk sistematik analizde mide içeriği, idrar ve kan örneği kullanılır.

Mide içeriğinin analizi

Örnekler etken madde emilmeden önce alınmışsa mide içindekilerin analizi doğru sonucu verir.

Örneğin görünüş, koku ve reaksiyonu kontrol edildikten sonra 3 eşit kısma bölünür.

1. Kısımda uçucu zehirler ve anorganik zehirler,
2. Kısımda uçucu olmayan organik zehirler aranır ve
3. Kısım tekrar işlemleri için saklanır.

Uçucu ve anorganik zehirler için;

- *Potasyum bikromat :* etil alkol ve metil alkol,
- *Fujiwara :* klorlu hidrokarbonlar,
- *Schiff belirteci :* asetaldehid, formaldehid,
- *Gutzeit testi :* arsenik, antimon veya hipofosfitler,
- *Reinsch testi :* arsenik, antimon, bizmut ve cıva,
- *Potasyum iyodür :* talyum bileşikleri,
- *Potasyum ferrisiyanür :* demir (II),
- *Potasyum ferrosiyanür :* demir (III),
- *Difenilamin :* klorat, bromat, nitrat,
- *Baryum klorür :* sülfat, fluorosilikatlar,
- *Asetik asit ve kalsiyum klorür :* oksalat, florür.

Uçucu olmayan organik zehirler için;

Bu grup maddeler için en büyük kolaylık çeşitli ve yeterince temizlenmemiş örneklere uygulanabilen ve her laboratuvarda bulunabilen ince tabaka kromatografisidir.

Mide yıkama suyunun 1/3'ü asitlendirilip, organik çözücü ile çalkalanır.

Sulu faz alkali ekstraksiyon için saklanır.

Organik faz ise rotavaporda kuruluğa kadar uçurularak kalan artık kloroform:metanol karışımında çözülüp, ince tabaka kromatografisi yardımıyla incelenir (*asit ekstre*).

Ayırma hunisinde kalan sulu çözelti NH_3 veya NaOH yardımıyla alkalilendirilir (pH=8-9) ve aynı yukarıdaki gibi çalışılarak organik bazları içeren *alkali ekstre* elde edilir.

Asit ekstre için mobil faz: Kloroform-aseton (9:1) veya (4:1)

Alkali ekstre için mobil faz: Metanol-amonyak (100:1,5) veya
Etilasetat-metanol-amonyak (85:10:5)

Elde edilen ekstreler ince tabaka kromatografisine tatbik edilir.

Çeşitli kimyasal, biyolojik, enzimatik veya radyoaktif yöntemler ve Rf değerlerine göre tanımlanırlar.

Asid ekstrenin incelenmesinde kullanılan reaktifler:

- *Klor/o-dianisidin :* Azot içeren tüm bileşikler
- *Fluoressein-hidrojen peroksid-asetik asit :* Bromlu bileşikler
- *Cıva(I) nitrat :* Barbituratlar, glutetimid gibi uyku ilaçları
- *Demir(III) klorür :* Parasetamol, salisilamid gibi fenolik maddeler
- *Ehrlich :* Aminler
- *Dragendorf :* Azotlu bileşikler
- *Nötr potasyum permanganat çözeltisi :* Doymamış yan zincir taşıyan barbituratlar, allobarbital, etinamat gibi uyku ilaçları

Alkali ekstrenin incelenmesinde kullanılan reaktifler:

- *%5'lik sülfürik asit :* Kloropromazin, mepazin, flufenazin ve diğer fenotiyazin türevleri
- *Iyodoplatinat :* Tüm alkaloitler ve sentetik bazlar
- *Dragendorf :* Alkaloit ve sentetik bazlar
- *β-Naftokinonsülfonik asid sodyum tuzu :* Amfetamin ve metamfetamin
- *Ninhidrin :* Amfetamin ve metamfetamin
- *Mandelin :* Amitriptilin, nortriptilin gibi antidepresif ilaçlar
- *Marquis :* Morfin, eroin, kodein, hidromorfon, amitriptilin
- *Vanilin-H_2SO_4:* Steroidler

Kanda yapılan analizler

- Glukoz ve üre tayini
- Serum kolinesteraz aktivesi
- Methemoglobin miktarı
- Karbonmonoksit-hemoglobin miktarı
- Alkol konsantrasyonu
- Salisilat ve barbituratların tayini

İdrarda yapılan analizler

- *Lange :* Aseton ve diğer keton cisimleri
- *Fe(III)klorür :* Fenolik bileşikler
- *Fujiwara :* Alifatik klorlu hidrokarbonlar ve metabolitleri
- *FPN :* Fenotiyazin türevleri
- *Forrest :* İmipramin ve desimipramin
- *Cronheim-Ware :* Bazik ilaçlar
- *Diazo :* Fenasetin ve parasetamolun metaboliti olan p-aminofenol
- *İndofenol :* Paration, Klortion, folition vs metaboliti olan p-nitrofenoller
- *Fehling:* Glukoz ve ketonlar
- *Dikromat:* Alkol ve aldehitler
- *Trinder:* Salisilatlar
- *Krezol-NH_3:* Parasetamol
- *Difenilamin:* Etklorvinil
- *Ditionit:* Paraquat, diquat

Farmasötik Toksikoloji Dersi Laboratuvar Uygulamaları

MTT testi
Tripan mavisi testi

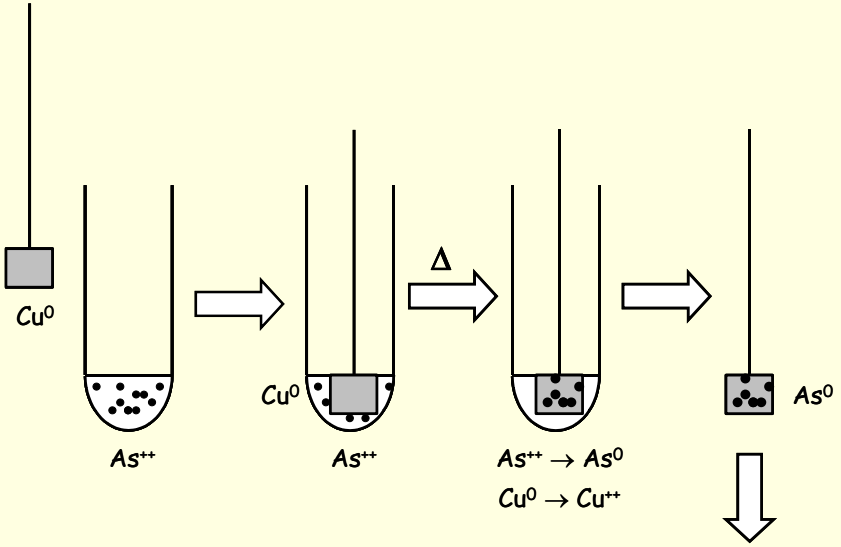
Reinsch testi

Kanda methemoglobin tayini

Alkol tayini

Metalik Zehirlerin Analizi (Reinsch Testi)

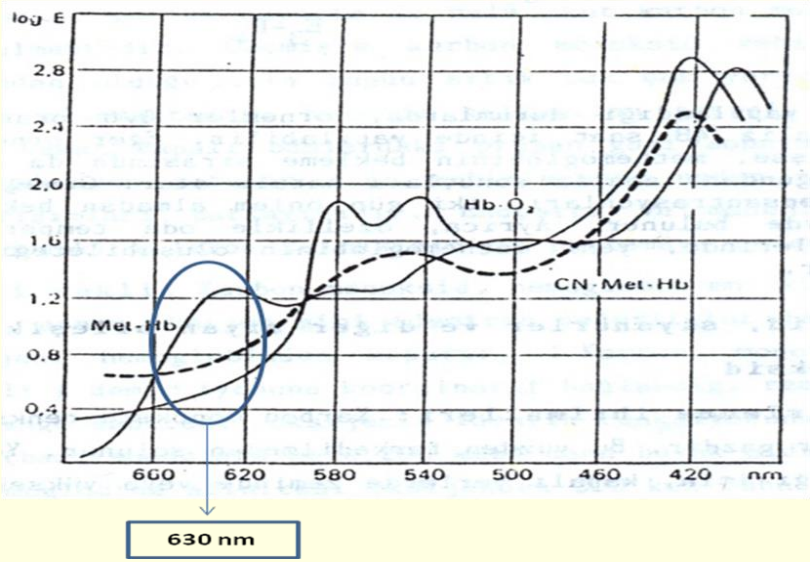
Test, metal iyonlarının (arsenik, antimon, civa, bizmut ve gümüş), hidroklorik asidli ortamda metalik bakırla açığa çıkarılması esasına dayanır. Metal iyonları asitli ortamda bakır levha üzerinde toplanır.



İleri Analizler

Kanda Methemoglobin (Met-Hb) Tayini

Methemoglobinin 630 nm'deki maksimum absorpsiyon bandının siyanür ilavesi ile kaybolması esasına dayanır. Oluşan siyano-methemoglobin bileşiği çok düşük bir absorpsiyon gösterir. İki absorpsiyon arasındaki fark, çözeltideki methemoglobin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.



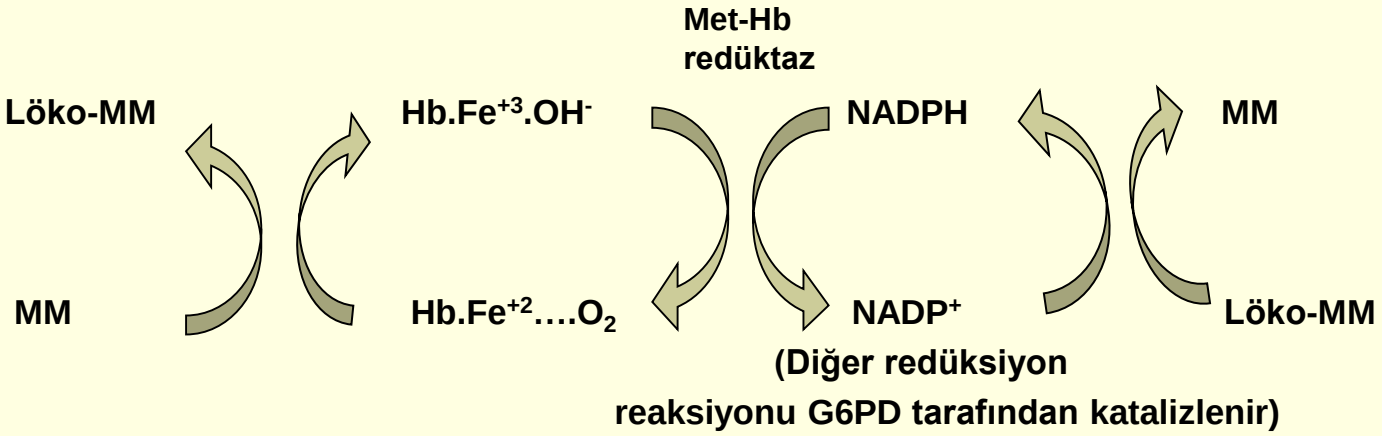
Met-Hb, hemoglobin (Hb)'in oksidasyon ürünüdür.

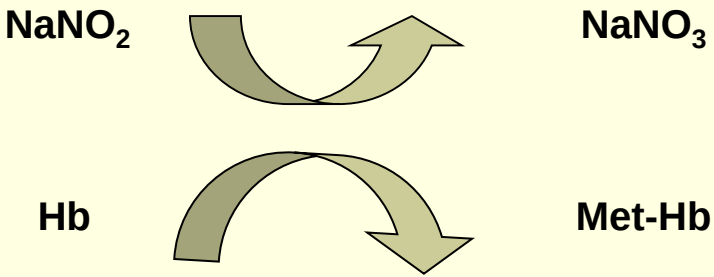
Hb deki +2 değerlikli merkezi demir atomu, Met-Hb'de +3 değerlikli hale geçmiştir.

Met-Hb oksijen taşıma kabiliyetine sahip değildir.

Dokulara yeterli oksijen taşınamadığı için methemoglobinemi denilen hastalık tablosu ortaya çıkar.

Kloratlar, perkloratlar, nitritler (sodyum nitrit), nitratlar, aromatik amino ve nitro bileşikleri, azot oksitler, sülfonamidler, redoks boyaları (metilen mavisi) methemoglobinemiye neden olan maddelerdendir.


Met-Hb
redüktaz
Löko-MM
Hb.Fe+3.OH-
NADPH
MM
MM
Hb.Fe+2….O2
NADP+
Löko-MM
(Diğer redüksiyon
reaksiyonu G6PD tarafından katalizlenir)


NaNO2
NaNO3
Hb
Met-Hb

Kanda MetHb düzeyine bağlı belirtiler:

%10-15	siyanoz
%20-40	baş ağrısı, halsizlik, solunum kıtlığı, çarpıntı, bilinç bulanıklığı
%60-80	ölüm