

DIAGNOSTYKA LABORATORYJNA W ZATRUCIACH OSTRYCH

Metody Analityczne

pod redakcją Doc. dr hab. J. Hanke

- na prawach skryptu -

Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej Instytutu Medycyny Pracy w Łodzi

Łódź - 1976





INSTYTUT MEDYCYNY PRACY IM. PROF. J. NOFERA



18.192/h

Część I

Orientacyjne metody dla potwierdzenia obecności
trucizn w materiale biologicznym

Opracował: H. Kiereś

Część II

Wykrywanie substancji toksycznej w materiale
biologicznym metodą chromatografii cienkowarstwowej

Opracowała: J. Mielczarska

Część III

Metody identyfikacji i pomiaru stężenia trucizn
eliminowanych z ustroju drogą hemodializy

Opracowała: K. Antczak

Część IV

Postępowanie identyfikacyjne metodą chromatografii
gazowej w przypadku zatruc niektórymi rozpuszczalnikami
organicznymi

Opracowała: H. Radzikowska



MATERIAŁY DLA LABORATORIÓW TOKSYKOLOGICZNYCH

pod redakcją Doc. dr hab. J. Hana

Henryk Kiereś

ORIENTACYJNE METODY DLA POTWIERDZENIA OBECNOŚCI TRUCIZN
W MATERIALE BIOLOGICZNYM

Część I

INSTYTUT MEDYCYNY PRACY IM. PROF. J. NOFERA

INSTYTUT MEDYCYNY PRACY W ŁODZI

1 9 7 6



Wstęp

W każdym przypadku podejrzenia o zatrucie konieczne jest przeprowadzenie próby laboratoryjnej mającej na celu potwierdzenie obecności trucizny w materiale biologicznym /popłuczyny żołądkowe, krew lub mocz/. Wieloletnie doświadczenie uczy nas, że pacjent, który przyjął przypadkowo bądź też świadomie pewne ilości trucizny nie zawsze przekazuje lekarzowi informacje prawdziwe.

W przystępie paniki pacjenci skłonni są wyolbrzymiać epizod; osoby, które zdecydowały się na krok samobójczy niejednokrotnie przekazują informacje fałszywe, chcąc w ten sposób opóźnić lub zmniejszyć skuteczność pomocy. Znane są przypadki, gdy pacjent nieświadomie przekazywał fałszywe informacje, gdyż substancja którą przyjął była mylnie oznakowana.

Potwierdzenie obecności trucizny w ustroju może być dokonane przy pomocy prostych testów laboratoryjnych, których szereg zostało zebranych w niniejszym opracowaniu. Prezentowane testy były wielokrotnie sprawdzane na materiale klinicznym i mogą być uważane za wiarygodne. Nie mniej należy pamiętać o pewnych ograniczeniach diagnostyki laboratoryjnej opartej na proponowanych metodach testowych. Należy sobie przede wszystkim zdać sprawę z tego, że brak potwierdzenia obecności trucizny w określonym materiale biologicznym np. w moczu nie jest jednoznaczny z wyłączeniem podejrzenia, o zatrucie tą trucizną. Trucizna, której obecność w ustroju podejrzewamy, mogła albo jeszcze nie przejść do moczu, albo też jej wydalanie z moczem w postaci niezmienionej mogło już ulec zakończeniu. Niektóre trucizny wydalone są z moczem tylko w bardzo

niewielkim odsetku przyjętej dawki i przez stosunkowo krótki czasokres. Wydalanie niektórych substancji z moczem zależy od kwaśności moczu /jego pH/.

Należy także zdać sobie sprawę z tego, że przedstawione w niniejszym opracowaniu testy nie pozwalają na identyfikację w materiale biologicznym trucizny nieznanej. Wynika to z faktu bardzo niskiej swoistości większości prezentowanych postępowań. Natomiast większość prostych testów odznacza się stosunkowo wysoką czułością, tak, że dodatnie wyniki mogą być niejednokrotnie następstwem wprowadzenia do ustroju dawki terapeutycznej leku np. 1-2 tabletki od bólu głowy mogą dawać dodatni wynik testu na obecność fenacetyny.

Dla ustalenia nieznanej przyczyny zatrucia laboratorium musi podjąć bardziej złożony tok analizy oparty albo na chromatografii cienkowarstwowej lub na chromatografii gazowej.

Przedstawiony zbiór testów służyć ma przede wszystkim takim placówkom, które nie dysponują nowoczesną aparaturą pomiarowo-kontrolną /spektrofotometria UV, chromatografia gazowa, absorpcjometria atomowa czy spektrometria masowa/ i dlatego zmuszone są do korzystania z prostych /aczkolwiek nieraz mylących/ postępowań analitycznych.



OZNACZANIE TALU W MOCZU

Odczynniki

1. 10% roztwór kwasu sulfosalicylowego: 10 g kwasu sulfosalicylowego rozpuścić w wodzie destylowanej i uzupełnić objętość do 100 ml.
2. 0,05% roztwór Rodaminy B w stężonym kwasie solnym: 0,025 g Rodaminy B rozpuścić w kwasie solnym i uzupełnić objętość do 50 ml tym samym stężonym kwasem solnym.
3. Brom cz.d.a.
4. 30% roztwór nadtlenku wodoru /perhydrol/
5. Benzen cz.d.a.
6. Kwas solny stężony cz.d.a.
7. Kwas siarkowy stężony cz.d.a.
8. Roztwór wzorcowy talu: 0,040 g siarczanu talu rozpuścić w wodzie destylowanej i uzupełnić do objętości 1000 ml.

Postępowanie

150 ml moczu mineralizować ogrzewając w kolbie Kjeldahla z 5 ml stężonego kwasu siarkowego /7/, aż do wydzielania białych dymów. Następnie dodać porcjami po 1 ml perhydrolu i ogrzewać aż do całkowitego odbarwienia, a następnie rozłożenia perhydrolu.

Po ostudzeniu dodać 5 ml wody destylowanej.

Do probówki^{do} dać 1 ml mineralizatu, równolegle do probówki kontrolnej oamierzyc 1 ml mineralizatu i 1 kroplę roztworu wzorcowego talu /8/. Obie probówki poddać działaniu bromu /3/, a następnie dodać 1 kroplę roztworu kwasu sulfosalicylowego /1/ w celu usunięcia nadmiaru bromu. Do obu probówek dodać po 1 kropli stężonego kwasu solnego /2/ i po 2 krople roztworu Rodaminy B /2/.

Następnie dodać około 1 ml benzenu /5/ i dokładnie wytrząsnąć.
Po oddzieleniu się warstw, obejrzyć obie probówki w świetle lampy kwarcowej z filtrem Wooda.
Pod ~~wp~~ wpływem promieni UV warstwa-benzenu wykazuje w obecności talu pomarańczową fluorescencję.

U w a g a

Wykrywalność talu 50 ug/l.



OZNACZANIE ARSENU W MOCZU

Odczynniki

1. Kwas solny stężony cz.d.a.
2. Blaszka miedziana oczyszczona do złotego zabarwienia i odtłuszczona przy pomocy eteru.

Postępowanie

15 ml moczu /lub popłuczyn żołądkowych/ mieszamy z równą objętością stężonego kwasu solnego /1/. W mieszaninie tej umieszczamy blaszkę miedzianą i podgrzewamy do wrzenia.

W obecności arsenu blaszka miedziana czernieje na skutek powstawania As_2Cu_5 .

Uwaga:

Wykrywalność około 0,5 mg/l



OZNACZANIE RTECI W MOCZU

Odczynniki

Blaszka miedziana oczyszczona od tlenków /mechanicznie/ do
żółtego zabarwienia i odtłuszczona przy pomocy eteru

Postępowanie

Kroplę badanego roztworu /mocz, popłuczyny żołądkowe/ o pH
3 - 4 nanosi się na miedzianą blaszkę.

W wypadku obecności rtęci po ok. 30 min. powstanie na blaszce
szara plama, która po wysuszeniu i potarciu kawałkiem bibuły
nabiera srebrzystego połysku na skutek tworzenia się amalgamatu.

Uwaga

Wykrywalność około 0.5 mg/l..



OZNACZANIE OŁOWIU W MOCZU

Odczynniki

1. Roztwór podstawowy ditizonu: 51,3 mg ditizonu rozpuścić w 200 ml chloroformu /odczynnik przechowywać w lodówce/.
2. Rozcieńczony roztwór ditizonu przygotować przed użyciem przez rozcieńczenie roztworu podstawowego /1/ w stosunku 1 : 10 używając chloroformu cz.d.a.
3. 10% roztwór cytrynianu sodu. 10 g cytrynianu sodu rozpuścić w wodzie destylowanej i uzupełnić objętość do 100 ml.
Roztwór ten wytrząsać z roztworem ditizonu /2/, aż ten ostatni nie będzie zmieniał zabarwienia. Nadmiar ditizonu usuwa się przez wytrząsanie roztworu cytrynianu z chloroformem
4. 10% roztwór cyjanku potasu: 10,0 g cyjanku potasu rozpuścić w wodzie destylowanej i uzupełnić objętość do 100 ml. Roztwór ten wytrząsać z roztworem ditizonu /2/, aż ten ostatni nie będzie zmieniał zabarwienia, w celu usunięcia zanieczyszczeń ołowiem. Rozpuszczony ditizon w roztworze wodnym usunąć przez kolejne ekstrakcje chloroformem.
5. 25% roztwór amoniaku
6. Roztwór do ekstrakcji nadmiaru ditizonu: 5 ml stężonego amoniaku /5/ dodać do 5 ml roztworu cyjanku potasu /4/ i uzupełnić wodą do objętości 500 ml.

Postępowanie

Do 10 ml moczu dodać 20 ml roztworu cytrynianu sodu /3/ i doprowadzić pH do około 8,5 przy użyciu amoniaku /5/ wobec papierka wskaźnikowego. Następnie całość przenieść do rozdzielacza i dodać

5 ml roztworu cyjanku potasu /4/ i 5 ml ditizonu w chloroformie /1/. Wytrząsać przez około 2 minut.

W przypadku gdy warstwa chloroformowa ulegnie zabarwieniu na kolor czerwony należy wytrząsać próbę jeszcze raz z roztworem ditizonu.

Jeżeli pierwsza porcja jest zabarwiona na kolor zielony lub fioletowy, po dokładnym rozdzieleniu się warstw, należy oddzielić warstwę chloroformową do następnego rozdzielnika i dodać 25 ml roztworu do ekstrakcji nadmiaru ditizonu /6/ w celu odmycia nadmiaru ditizonu. Wytrząsać przez 1 minutę i pozostawić do rozdzielenia się warstw.

Zabarwienie warstwy chloroformowej na kolor różowy lub czerwony świadczy o obecności ołowiu w moczu.

Uwagi

1. Wykrywalność metody 2 ug w próbce /200 ug/l/
2. W moczu zawierającym nieznaczne ilości białka możemy potwierdzić obecność ołowiu bez uprzedniej mineralizacji.
Przy znacznie zwiększonym poziomie białka w moczu może dojść do powstania emulsji, co powoduje trudności w rozdzieleniu faz oraz w ocenie barwy. W takich przypadkach konieczne jest wstępne przygotowanie moczu drogą mineralizacji.
3. Do przygotowania odczynników używamy wyłącznie wodę podwójnie destylowaną.
4. Równolegle do oznaczenia należy przeprowadzić badanie kontrolne na zawartość ołowiu w wodzie i odczynnikach. W tym celu do mieszaniny złożonej ze 100 ml wody redestylowanej i pozostałych odczynników, jak w przypadku próby badanej dodać 2 ml ditizonu i wytrząsać. Warstwa chloroformowa nie powinna zmieniać barwy na różową.



OZNACZANIE KARBROMALU W POPŁUCZYNACH
ZOŁADKOWYCH I WE KRWI

Odczynniki

1. 1 N roztwór kwasu solnego
2. 5% roztwór wodorotlenku sodowego
3. 1% roztwór fluoresceiny w mieszaninie alkohol:woda /1 : 1/
4. Eter etylowy
5. Kwas octowy lodowaty cz.d.a.
6. 30% roztwór nadtlenu wodoru /perhydrol/

Postępowanie

Popłuczyny żołądkowe zakwasić kwasem solnym i ekstrahować dwukrotnie 50 ml eteru. Krew 10-20 ml ekstrahować trzykrotnie 30 ml eteru. Ekstrakty eterowe połączyć, przemyć wodą i odparować do sucha na porcelanowej parownicze. Suchą pozostałość rozpuścić w 2 kroplach 5% roztworu wodorotlenku sodowego /2/. Następnie osuszyć przez łagodne ogrzewanie. Po ochłodzeniu dodać 2 krople 1% roztworu fluoresceiny /3/, 4 krople kwasu octowego lodowatego /5/ i 4 krople nadtlenu wodoru /6/. Odparować do sucha na wrzącej łaźni wodnej. W obecności karbromalu występuje czerwone zabarwienie.



OZNACZANIE POCHODNYCH FENOTIAZYNY W MOCZU

Odczynniki

1. Dwuchlorometan cz.d.a.
2. 0,01 M roztwór chinhydronu w dwuchlorometanie /c.cz.213,2/
3. 0,001 M roztwór chinhydronu przygotować należy każdorazowo przed użyciem rozcieńczyć 10-krotnie dwuchlorometanem roztwór /2/ chinhydronu.
4. 40% roztwór wodorotlenku sodu
5. 85% kwas fosforowy
6. Siarczan sodu bezwodny in substantia

Postępowanie

25 ml moczu lub popłuczyn żołądkowych zalkalizować roztworem wodorotlenku sodu /4/ i ekstrahować 25 ml dwuchlorometanu /1/ przez okres 5 minut. Po rozdzieleniu warstwę dwuchlorometanu osuszyć bezwodnym siarczanem sodu. Następnie 10 ml osuszonej warstwy dwuchlorometanu wytrząsać w rozdzielaczu przez 1 minutę z 1 ml 0,001 M roztworu chinhydronu /3/ i 4 ml kwasu fosforowego /5/, po czym całość odwirować w celu rozdzielenia warstw. Zabarwienie warstwy kwasu fosforowego na kolor różowy, czerwony lub fioletowy świadczy o obecności pochodnych fenotiazyny.



OZNACZANIE FENAKTYLU W MOCZU

Odczynniki

1. 0,001 M roztwór azotanu rtęciowego
2. 3% roztwór nadtlenu wodoru
3. Kwas solny stężony cz.d.a.
4. Bibułę Whatman Nr 1 o wymiarach 3 x 4 cm zanurzyć w roztworze 0,001 M azotanu rtęci /1/ na okres 30 minut; wysuszyć w temperaturze 37°. Przechowywać w szczelnie zamkniętym naczyniu z ciemnego szkła.

Postępowanie

Na bibułę /4/ nanieść kilka kropli moczu i 1 kroplę roztworu nadtlenu wodoru /2/. Po 1 minucie nakropić 1 kroplę stężonego kwasu solnego.

W wypadku obecności fenaktylu pojawia się fioletowo-różowe zabarwienie.



OZNACZANIE TIORIDAZYNY W MOCZU

Odczynniki

1. 5% roztwór chlorku żelaza: 5,0 g FeCl_3 rozpuścić w wodzie destylowanej i uzupełnić objętość do 100 ml.
2. Kwas siarkowy stężony cz.d.a.

Postępowanie

Do probówki w której znajduje się około 1 ml moczu dodać 10 kropli stężonego kwasu siarkowego i 2 krople 5% roztworu chlorku żelaza /1/.

W wypadku obecności tioridazyny zawartość probówki zabarwia się na kolor od fioletowego do granatowego.

Uwaga:

Inne pochodne fenotiazyny np. chlorpromazyna, promazyna dają wyżej opisaną reakcję z zabarwieniem próby od różowego do czerwonego.



OZNACZANIE HYDROCHLOROTIAZYDU W MOCZU

Odczynniki

1. 20% roztwór kwasu p-toluenosulfonowego
2. 3,75 N roztwór wodorotlenku sodu
3. 6 N roztwór kwasu solnego
4. 0,1 N roztwór azotynu sodu /każdorazowo przygotowany bezpośrednio przed użyciem/
5. 0,5% roztwór amidosulfonianu amonu /przygotowany przed użyciem/
6. 0,1% roztwór dwuchlorowodoru N-1-naftyloetylenodwuaminy.

Postępowanie

Do 15 ml wody dodać 1 ml moczu i 4 ml 20% roztworu kwasu p-toluenosulfonowego /w przypadku użycia większej ilości moczu należy odpowiednio zwiększyć ilość kwasu p-toluenosulfonowego tak, aby końcowe jego stężenie wynosiło 4%/. Płyn przesączyć i 5 ml przesączu wolnego od białka przenieść do probówki w której znajduje się 1 ml 3,75 N roztworu wodorotlenku sodu. Zawartość probówki ogrzewać na wrzącej łaźni wodnej przez 30 minut i po oziębieniu zakwasić 1 ml 6 N kwasu solnego /3/. Następnie dodać 0,5 ml roztworu azotynu sodu /4/, wymieszać i po 3 minutach dodać 0,5 ml roztworu amidosulfonianu amonu /5/. Zawartość probówki dobrze wymieszać i po około 5 minutach dodać 0,5 ml roztworu dwuchlorowodoru N-1-naftyloetylenodwuaminy /6/. Delikatnie wymieszać. Pojawiające się różowo - fioletowe zabarwienie utrwała się po około 10 minutach.



OZNACZANIE W MOCZU MEPROBAMATU I INNYCH KARBAMINIANOW

Odczynniki

1. 10% roztwór amoniaku
2. 10% roztwór furfurolu w etanolu
3. Chloroform cz.d.a.
4. Eter etylowy cz.d.a.
5. Siarczan sodu bezwodny in substantia
6. Kwas solny stężony cz.d.a.

Postępowanie

20 - 50 ml moczu zalkalizować do pH około 10 przy użyciu roztworu amoniaku /1/ i następnie ekstrahować dwukrotnie podwójną objętością chloroformu /3/. Połączone ekstrakty przemyć wodą, osuszyć bezwodnym siarczanem sodu /5/ i odparować do sucha. Suchą pozostałość rozpuścić w 1 ml eteru /4/ i nakropić na bibułę filtracyjną. Obok próby badanej nakropić próbę kontrolną /np, roztwór meprobamatu/. Po dokładnym wysuszeniu na próbę badaną i kontrolną nakropić po 1 kropli roztworu furfurolu /2/. Bibułę ponownie osuszyć w temperaturze pokojowej a następnie trzymać nad dymami stężonego kwasu solnego /6/ około 2 minut. W obecności karbaminianów plama przybiera zabarwienie granatowo-czarne.



OZNACZANIE W MOCZU KWAŚU RUBAZONOWEGO
METABOLITU PIRAMIDONU

Odczynniki

1. 10% roztwór amoniaku
2. Octan etylu cz.d.a.

Postępowanie

10 - 15 ml moczu ekstrahować równą objętością octanu etylu /2/.
Po rozdzieleniu warstw do warstwy octanu etylu dodać kroplę
wody i odparować na łaźni wodnej używając do tego celu porcela-
nowej parowniczkii. Po odparowaniu i ostudzeniu do suchej pozosta-
łości dodać 2 - 3 kropli roztworu amoniaku /1/.

W wypadku obecności, pozostały na parownicy kwas rubazonowy
rozpuszczając się w amoniaku daje czerwono - fioletowe zabarwie-
nie.



OZNACZANIE CHININY W MOCZU I POPŁUCZYNACH ŻOŁĄDKOWYCH

Odczynniki

1. 20% roztwór wodorotlenku sodu
2. 0,1 N roztwór kwasu solnego
3. Eter etylowy

Postępowanie

25 ml moczu lub popłuczyn żołądkowych zalkalizować kilkoma kroplami roztworu wodorotlenku sodu /1/ i ekstrahować przez 2 minuty równą objętością eteru /3/. Po oddzieleniu warstwę eterową zatężyć do objętości około 1 ml, odparowując eter na łaźni wodnej o temperaturze około 40°. Zatężony roztwór nakrop-
lać na środek sączka bibułowego, dokładnie nad to samo miejsce po jednej kropli, czekając aż poprzednia całkowicie wyschnie. Powstałą małą plamkę obejrzeć w świetle lampy kwarcowej z filtrem Wooda.

Niebiesko - fioletowa fluorescencja pojawiająca się po zakwasze-
niu kroplą kwasu solnego /2/ we fluorescencję zdecydowanie
błękitną, świadczy o obecności chininy lub chinidyny.



OZNACZANIE SULFONAMIDÓW W MOCZU

Odczynniki

1. 0,05% etanolowy roztwór aldehydu p-dwumetyloaminobenzoowego
2. Kwas siarkowy stężony cz.d.a.
3. Krążki bibuły o średnicy 4 - 5 cm zanurzyć w mieszaninie składającej się ze 100 ml etanolowego roztworu aldehydu p-dwumetyloaminobenzoowego i 1 ml stężonego kwasu siarkowego /2/ na okres 5 minut. Po wyjęciu z kąpieli, krążki bibuły wysuszyć w temperaturze 40° i przechowywać w szczelnie zamkniętym naczyniu z ciemnego szkła.

Postępowanie

Na krążek bibuły nanieść 1 kroplę badanego moczu.

Powstałe żółte zabrawienie do pomarańczowego świadczy o obecności sulfonamidów /wolnych grup aminowych/.



OZNACZANIE POCHODNYCH KWASU SALICYLOWEGO W MOCZU

Odczynniki

1. 5% roztwór chlorku żelaza: 5,0 g FeCl_3 rozpuścić w wodzie i uzupełnić do objętości 100 ml.
2. Alkohol etylowy 95°
3. Krążki bibuły o średnicy 3 - 4 cm zanurzyć w etanolu /2/ na okres 1 godziny. Osuszyć w temperaturze 37° i następnie zanurzyć w roztworze chlorku żelaza /1/ na okres 30 minut. Po wysuszeniu w temperaturze 37° przechowywać w szczelnym naczyniu z ciemnego szkła.

Postępowanie

Na krążek bibuły nanieść 1 kroplę badanego moczu.

Powstałe fioletowe zabarwienie świadczy o obecności pochodnych kwasu salicylowego.



OZNACZANIE KWASU p-AMINOSALICYLOWEGO W MOCZU

Odczynniki

1. 10% roztwór chlorku potasu: 10,0 g KCl rozpuścić w wodzie i uzupełnić do objętości 100 ml.
2. 10% roztwór amoniaku
3. 10% roztwór kwasu solnego
4. 10% roztwór chlorku żelaza: 10,0 g FeCl_3 rozpuścić w wodzie destylowanej i uzupełnić do końcowej objętości 100 ml.

Postępowanie

Do 10 ml moczu dodać 5 - 10 kropli roztworu chlorku potasu /1/ a następnie kroplami dodawać roztwór amoniaku /2/ aby osiągnąć pH moczu około 8.

Roztwór przesączyć i przesącz zakwasić kwasem solnym do pH 2 i dodać 2 krople roztworu chlorku żelaza /4/.

W wypadku obecności kwasu p-aminosalicylowego powstaje zabarwienie czerwono - fioletowe.



OZNACZANIE IMIPRAMINY W MOCZU

Odczynniki

1. 0,2% roztwór dwuchromianu potasu
2. 20% roztwór kwasu nadchlorowego /% obj./
3. 50% roztwór kwasu azotowego
4. 30% roztwór kwasu siarkowego
5. Mieszanina reakcyjna przygotowana bezpośrednio przed
użyciem przez zmieszanie równych objętości /po 0,5 ml/
odczynników 1 - 4.

Postępowanie

1 ml moczu mieszać w probówce z 1 ml mieszaniny reakcyjnej.
Natychmiastowe pojawienie się zielonego zabarwienia należy
uznać za pozytywny wynik reakcji.



OZNACZANIE FENACETYNY W MOCZU

Odczynniki

1. 10% roztwór azotynu sodu
2. 5% alkoholowy roztwór alfa-naftolu
3. 15% roztwór wodorotlenku sodu
4. Kwas solny stężony

Postępowanie

10 - 20 ml moczu zakwasić kroplą stężonego kwasu solnego /4/, zagotować, a następnie oziębic w łaźni lodowej do temperatury około 5° i dodać 2 - 3 kropli 10% roztworu azotynu sodu /1/.

Po dokładnym wymieszaniu dodać 2 krople alkoholowego roztworu alfa-naftolu /2/ i zalkalizować przez dodanie roztworu wodorotlenku sodu /3/.

W obecności fenacetyny występuje zabarwienie czerwone, które po zakwaszeniu kwasem solnym przechodzi w fioletowe.



OZNACZANIE BROMIANOW W MOCZU

Odczynniki

1. Mieszanina wodno alkoholowa /1 : 1/
2. 2% roztwór fluoresceiny: 1,0 g fluoresceiny rozpuścić w mieszaninie wodno-alkoholowej /1/ i uzupełnić tą mieszaniną do końcowej objętości 50 ml.
3. Tlenek chromu / Cr_2O_3 / in substantia
4. Kwas octowy lodowaty cz.d.a.

Postępowanie

Około 10 ml moczu umieścić w erlenmayerce, dodać kwasu octowego i 1 ziarenko tlenku chromu /3/. Nad erlenmayerką umieścić okrągły sączek nasycony roztworem fluoresceiny.

W przypadku dodatniego wyniku próby na sączku pojawia się czerwona plama wytworzona w wyniku reakcji uwolnionego bromu z fluoresceiny, która ulega przekształceniu w czerwoną tetra-bromofluoresceinę.



OZNACZANIE DWUHLORKU PARAQUATU W MOCZU

/preparat "Gramoxone"/

Odczynniki

1. 10 N roztwór wodorotlenku sodu
2. 1% roztwór dwutlionianu sodu przygotowany bezpośrednio przed użyciem przez rozpuszczenie 0,1 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ w 10 ml roztworu wodorotlenku sodu /1/.

Postępowanie

Pobrać dwie próbki moczu po 25 ml. do jednej dodać 10 ml roztworu dwutlionianu sodu /2/.

W wypadku obecności paraquatu wystąpi natychmiastowa zmiana zabarwienia próbki z dwutlionianem sodu; mocz jasny zabarwia się na niebiesko, ciemny zaś na zielono. Zmiana zabarwienia następuje powoli wskutek procesu utleniania, lecz przez kilka godzin jest wyraźnie widoczna.



OZNACZANIE DDT W MOCZU

Odczynniki

1. 1% roztwór wodorotlenku potasu
2. Mieszanina nitrująca: stężony kwas siarkowy i stężony kwas azotowy zmieszać w równych objętościach /1 : 1/
3. 20% alkoholowy roztwór wodorotlenku potasu: 5,0 g KOH rozpuścić w 2,5 ml wody i dodać 22,6 ml alkoholu etylowego absolutnego/.
4. Chloroform cz.d.a.

Postępowanie

50 ml moczu ekstrahować 50 ml chloroformu /4/. Chloroform odparować do sucha /w porcelanowej parownicze/, dodać, 10 ml mieszaniny nitrującej /2/ i ogrzewać na wrzącej łaźni wodnej przez 1 godzinę. Oziębic i dodać 50 ml wody destylowanej. Roztwór przenieść do rozdzielacza i ekstrahować najpierw 20 ml potem 10 ml chloroformu /4/. Połączone ekstrakty chloroformowe ekstrahować następnie 50 ml roztworu wodorotlenku potasu /1/ i trzykrotnie 50 ml porcjami wody destylowanej. Następnie chloroform osuszyć bezwodnym siarczanem sodu i umieścić w dwu parownicach porcelanowych i odparować do sucha.

Wykonać następujące reakcje:

- 1 parownicza: do suchej pozostałości dodać 1 kroplę alkoholowego roztworu KOH /3/ - w przypadku obecności DDT powstaje zabarwienie jasno niebieskie do zielonego
- 2 parownicza: do suchej pozostałości dodać 1 kroplę alkoholowego roztworu KOH /3/ i 1 - 2 kropli acetonu - w przypadku obecności DDT powstaje zabarwienie różowe.



OZNACZANIE CYJANKÓW WE KRWI

Odczynniki

1. 10% roztwór siarczanu żelaza: 10,0 g FeSO_4 rozpuścić w wodzie i uzupełnić do końcowej objętości 100 ml.
2. 20% roztwór wodorotlenku sodu
3. 15% roztwór kwasu trójklorooctowego
4. 30% kwas solny
5. Fluorek sodu in substantia

Postępowanie

Przygotowanie bibuły: bibułę Whatman Nr 41 zanurzyć w roztworze siarczanu żelaza na okres 10 minut. Wysuszyć i zanurzyć w roztworze wodorotlenku sodu /2/, wysuszyć. Tak przygotowaną bibułę pociąć na paski / 2 x 3 cm/. Pasek umieścić na druciku przytwierdzonym do korka. Bibuła powinna być przygotowana ~~tuż~~ bezpośrednio przed oznaczeniem.

2 ml krwi umieścić w probówce, dodać 2 ml kwasu trójklorooctowego /3/, zakorkować korkiem z bibułą przygotowaną uprzednio. Zawartość probówki wymieszać /uważając aby nie zanurzyć bibuły/ i odstawić na 30 minut. Następnie wyjąć bibułę i zalać ją kwasem solnym /4/. Wystąpienie wyraźnej błękitnej barwy na bibule /błękit pruski/ potwierdza obecność cyjanków w badanym materiale.



OZNACZANIE p-NITROFENOLU WE KRWI

Odczynniki

1. 20% roztwór kwasu trójklorooctowego
2. 33% roztwór wodorotlenku sodu

Postępowanie

3 - 5 ml krwi zmieszać z równą objętością kwasu trójklorooctowego /1/. Klarowny przesącz zadać 4 - 8 kroplami roztworu wodorotlenku sodu /2/ do silnie alkalicznej reakcji. W przypadku obecności we krwi dużych ilości preparatu E 605 /p-nitrofenylo-tiofosforan dwuetylowy/ roztwór zabarwia się na zimno na kolor jasnożółty. Po zagotowaniu barwa znacznie intensywnieje.



OZNACZANIE BORANÓW W MOCZU

Odczynniki

1. 1 N roztwór kwasu solnego
2. Papierek kurkumowy /bibuła filtracyjna wycięta zółtą brylantową S/
3. 10% roztwór amoniaku

Postępowanie

Mocz zakwasić kwasem solnym i nakropić na papierek kurkumowy. W obecności boranów papierek zabarwia się na kolor brązowo-czerwony. Po wysuszeniu zabarwienie papierka staje się bardziej wyraźne. Następnie należy zwilżyć papierek roztworem amoniaku, wówczas barwa przybiera odcień zielonkawo - czarny.



OZNACZANIE RODANKÓW W SUROWICY

Odczynniki

1. 10% roztwór kwasu trójklorooctowego
2. 5% roztwór azotanu żelazowego

Postępowanie

Do 5 ml surowicy lub osocza dodać 5 ml kwasu trójklorooctowego/
Zawartość probówki dokładnie wytrząsnąć i odstawić na 15 minut,
po czym przesączyć. Do 5 ml przesączu dodać 1 ml 5% roztworu
azotanu żelazowego /2/. Powstaje ciemno czerwone zabarwienie,
którego natężenie jest proporcjonalne do stężenia rodanków.

U w a g a

Krew palączy zawiera pewien niewielki odsetek rodanków.



PISMIENNICTWO

1. Oznaczanie talu w moczu

Feigl S.: Spot Test 158, 161, 437, 1958.

2. Oznaczanie arsenu w moczu

Hanke J., Antczak K., Kiereś H.: Badania laboratoryjne w zatruciach /materiały do użytku wewnętrznego na prawach skryptu/ IMP 1970

Gadamer J.: Lebruch der chemischen Toxicologie, Goettingen, Vandenhoeck und Ruprecht 1909

3. Oznaczanie rtęci w moczu

Hanke J., Antczak K., Kiereś H.: Badania laboratoryjne w zatruciach /materiały do użytku wewnętrznego na prawach skryptu/ IMP 1970

4. Oznaczanie ołowiu w moczu

Tiesä H.: Dtsch. Apotheker Ztg. 106, 194, 1966

5. Oznaczanie karbromalu w popłuczynach żołądkowych i we krwi

Clarke E.C.G.: Isolation and identification of Drugs, London 1969

6. Oznaczanie pochodnych fenotiazyny w moczu

Lemontey et al.: Europ J. Toxicol. 3, 331, 1971

7. Oznaczanie fenaktilu w moczu

Hanke J., Antczak K., Kiereś H.: Badania laboratoryjne w zatruciach /materiały do użytku wewnętrznego na prawach skryptu/ IMP 1970

Stolman A.: Progress in Chemical Toxicology, Academic Press, New York - London, vol. I s 167, 1963



8. Oznaczanie tioridazyny w moczu

Hanke J., Antczak K., Kiereś H.: Badania laboratoryjne w zatruciach /materiały do użytku wewnętrznego na prawach skryptu/ IMP 1970

Stolman A.: Progress in Chemical Toxicology Academic Press, New York - London, vol. I. s 167, 1963

9. Oznaczanie hydrochlorotiazydu w moczu

Kaye S.: Handbook of Emergency Toxicology, Charles Thomas, Springfield, Illinois, USA 1961

10. Oznaczanie w moczu meprobamatu i innych karbaminianów

Clarke E. G. C.: Isolation and Identification of Drugs, London 1969

11. Oznaczanie w moczu kwasu rubazonowego, metabolitu piramidonu

Hanke J., Antczak K., Kiereś H.: Badania laboratoryjne w zatruciach /materiały do użytku wewnętrznego na prawach skryptu/ IMP 1970

Ahrens G.: Die Urinanalyse, J.A. Barth, Leipzig 1966

12. Oznaczanie chininy w moczu i popłuczynach żołądkowych

Hanke J., Antczak K., Kiereś H.: Badania laboratoryjne w zatruciach /materiały do użytku wewnętrznego na prawach skryptu/ IMP 1970

13. Oznaczanie sulfonamidów w moczu

Hanke J., Antczak K., Kiereś H.: Badania laboratoryjne w zatruciach /materiały do użytku wewnętrznego na prawach skryptu/ IMP 1970

Bagdasarian G., Pawelec J.: Gruźlica 27, 8, 843, 1959



14. Oznaczanie pochodnych kwasu salicylowego w moczu

Hanke J., Antczak K., Kiereś H.: Badania laboratoryjne w zatruciach / materiały do użytku wewnętrznego na prawach skryptu/ IMP 1970

Bagdasarian G., Fawelec J.: Gručlica 27, 8, 843, 1959

15. Oznaczanie kwasu p-aminosalicylowego w moczu

Ahrens G.: Die Urinanalyse, Leipzig 1966

16. Oznaczanie imipraminy w moczu

Hanke J., Antczak K., Kiereś H.: Badania laboratoryjne w zatruciach /materiały do użytku wewnętrznego na prawach skryptu/ IMP 1970

Stolman A.: Progress in Chemical Toxicology, Academic Press, New York - London vol. I 167, 1963

17. Oznaczanie fenacetyny w moczu

Hanke J., Antczak K., Kiereś H.: Badania laboratoryjne w zatruciach /materiały do użytku wewnętrznego na prawach skryptu/ IMP 1970

Ahrens G.: Die Urinanalyse, J.A. Barth, Leipzig 1966

18. Oznaczanie bromianów w moczu

Büchner M., Nowack A., Dietze I.: Leitfaden der Toxicologisch Chemischen Analyse - Verlag Theodor Steinkopff, Dresden 1968

19. Oznaczanie dwuchlorku paraquatu w moczu

ICI Ltd., Industrial Hygiene Research Laboratories.
- Lithfied Mh, 5th July, 1968

20. Oznaczanie DDT w moczu

Stolman A.: Progress in Chemical Toxicology, Academic Press, New York - London vol. I 148, 1963



21. Oznaczanie cyjanków we krwi

Gettler A., Goldbaum L.: Anal. Chem. 19, 270, 1947

22. Oznaczanie p-nitrofenolu we krwi

Schwerd W., Schmidt A.: Dtsch. med. Wschr. 77, 12, 372, 1955

23. Oznaczanie boranów w moczu

Kaye S.: Handbook of Emergency Toxicology, Charles Thomas, Springfield, Illinois, USA, 1961

24. Oznaczanie rodanów w surowicy

Kaye S.: Handbook of Emergency Toxicology, Charles Thomas, Springfield, Illinois, USA, 1961



MATERIAŁY DLA LABORATORIÓW TOKSYKOLOGICZNYCH

pod redakcją Doc. dr hab. J. Hanke

Jadwiga Mielczarska

WYKRYWANIE SUBSTANCJI TOKSYCZNEJ W MATERIALE BIOLOGICZNYM

METODĄ CHROMATOGRAPHII CIENKOWARSTWOWEJ

Część II

INSTYTUT MEDYCYNY PRACY w ŁODZI

1 9 7 6



Wstęp

Przedstawiony poniżej schemat postępowania umożliwia wykrycie obecności w materiale biologicznym nieznanej trucizny. Próba identyfikacji substancji toksycznej w płynach ustrojowych nabiera szczególnego znaczenia wtedy gdy lekarz klinicysta nie posiada pewności, że hospitalizowana w oddziale ostrych zatruc osoba, jest rzeczywiście zatruta. Śpiączkę toksyczną lub inne zaburzenia kliniczne obserwowane w zatruciach, mogą bowiem naśladować różne zespoły chorobowe.

W przypadku braku wstępnych sugestii, co do rodzaju zatrucia /wywiad od chorego lub otoczenia, substancje trujące znalezione przy chorym/, wykrycie nieznanej trucizny w próbce materiału biologicznego wymaga przeprowadzenia bardzo licznych prób chemicznych - jest więc pracochłonne i zajmuje wiele czasu. Zbyt późno dostarczony wynik analizy traci swój sens kliniczny. Dlatego od wielu lat podejmuje się próby takiego usystematyzowania biegu analizy, aby czas niezbędny dla identyfikacji trucizny w materiale biologicznym skrócić do kilku, a co najwyżej kilkunastu godzin. Schematy analityczne nie mogą, rzecz jasna, objąć wszystkich potencjalnych trucizn, których liczbę ocenia się w chwili obecnej na około 70 000. Natomiast można przy ich pomocy potwierdzić, względnie wykluczyć obecność w próbce materiału biologicznego trucizn będących najczęstszymi przyczynami zatruc.

Dużym postępowem w dziedzinie analizy toksykologicznej było wprowadzenie techniki chromatografii cienkowarstwowej na żelu.

Metoda ta, mimo, że pozbawiona już w chwili obecnej blasku świeżości i nie tak atrakcyjna jak chromatografia gazowa czy

system analizy GC-MS, góruje nad innymi postępowaniami swą niesłychaną prostotą. Dzięki tej prostocie proponowany system identyfikacji trucizny w materiale biologicznym drogą chromatografii cienkowarstwowej na żelu, będzie mógł być realizowany nawet w najskromniej wyposażonym laboratorium.

Należy jednak pamiętać, że w przeciwieństwie do pozytywnego wyniku analizy, który poparty wynikami dalszych testów, nabiera mocy dowodu, wynik negatywny, nie może być utożsamiany z wyłączeniem podejrzenia o zatrucie. Wynika to zarówno z faktu, że realizując zaproponowany schemat postępowania uzyskujemy informację tylko do wybranej grupy trucizn, jak również ze stwierdzenia że skład chemiczny analizowanej próbki materiału biologicznego odpowiada tylko czasowemu fragmentowi dynamicznego rozkładu trucizny w ustroju. Substancja toksyczna nieobecna w danej próbce materiału biologicznego np. w moczu może być obecna w próbkach pobranych później. Przenikanie trucizny do moczu, może być bowiem uzależnione od jego kwasności. Możemy nie znajdować w próbce materiału biologicznego wykrywalnych stężeń substancji niezmienionej, przy wysokich stężeniach jej metabolitów. Dlatego doświadczony analityk ogranicza się zawsze do stwierdzenia, że nie udało mu się potwierdzić obecności trucizny w danej próbce materiału biologicznego, pozostawiając ostateczną interpretację wyniku lekarzowi klinicyście.



Zasada metody

Chromatografia cienkowarstwowa jest procesem fizykochemiczny. Cienka warstwa /faza nieruchoma/ składająca się z drobnoziarnistego materiału znajduje się na płytce ze szkła. Mieszaninę przeznaczoną do rozdzielania znajdującą się w roztworze nanosi się punktowo lub pasmowo na linię startu. Po umieszczeniu płytki w szczelnie zamkniętej komorze zawierającej rozpuszczalnik /fazę ruchomą/ następuje rozdział na podstawie właściwości kapilarnych i adsorpcyjnych. Substancje bezbarwne muszą być uwidocznione przez wywoływanie odpowiednim odczynnikiem.

Chromatografia cienkowarstwowa jest stosowana w diagnostyce ostrych zatruc dla:

- 1/ potwierdzenia lub wykluczenia zatrucia konkretną substancją. W zależności od rodzaju badanego związku przygotowuje się ekstrakt alkaliczny lub kwaśny i dobiera odpowiednie układy rozpuszczalników;
- 2/ identyfikacji nieznanej substancji. Należy wówczas wykonać ekstrakcję alkaliczną i kwaśną, a następnie stosować chromatografię jednokierunkową w kilku układach rozwijających; w pewnych przypadkach powstaje konieczność dodatkowego zastosowania techniki chromatografii cienkowarstwowej dwukierunkowej.

Opracowany system postępowania metodą chromatografii cienkowarstwowej dla szybkiej identyfikacji trucizny w przypadku zatrucia nieznaną substancją obejmuje 29 leków najczęściej spotykanych w ostrych zatruciach. Każdy z badanych leków analizowano na płytkach szklanych pokrytych warstwą sorbenta



Kieselgelu G wg Stahla w różnych układach rozpuszczalników.

Dla lokalizacji położenia plam na chromatogramach ogląda się fluorescencję stosując lampę Wooda /długość fali 366nm/, oraz spryskuje się odczynnikami wywołującymi.

Przygotowanie rozpuszczalników i komory chromatograficznej

Rozpuszczalniki:

1. metanol + amoniak 25% /100:1,5/ v/v
2. chloroform + aceton /90:10/ v/v
3. chloroform + metanol + woda /75:25:1/ v/v
4. izopropanol + chloroform + amoniak 25% /60:30:10/ v/v
5. benzen + dioksan + amoniak 25% /75:25:5/ v/v
6. chloroform + metanol + benzen + amoniak 25% /90:5:5:1/ v/v
7. benzen + aceton + amoniak 25% /40:40:5/ v/v
8. metanol
9. benzen
10. benzen + dioksan + etanol + amoniak 25% /50:40:5:5/ v/v
11. chloroform + metanol + amoniak 25% /60:40:3/ v/v
12. benzen + kwas octowy lodowaty /97:3/ v/v

W komorze umieścić pasek bibuły filtracyjnej o wymiarach 11x33cm i zwilżyć rozpuszczalnikiem. Komorę szczelnie zamknąć w celu całkowitego nasycenia parami rozpuszczalnika.

Odczynniki

1. 2% azotan srebra
2. Odczynnik Dragendorffa
 - a. 0,850g zasadowego azotanu bizmutowego rozpuścić w 10ml kwasu octowego lodowatego i 40ml wody
 - b. 8g jodku potasowego rozpuścić w 20ml wody

a i b mieszać. Roztwór do spryskania: 1ml mieszaniny mieszać



z 2ml kwasu octowego lodowatego i 10ml wody.

3. 2,5% p-dwumetyloaminobenzoesowy aldehyd w stęż. kwasie siarkowym

4. 0,1% nadmanganian potasu

5. 1% azotan rtęciawy

6. Jodek potasu ze skrobią

a. 1% jodek potasu

b. 1% skrobia

zmieszać roztwory a i b w stosunku 1:1 ex tempore

7. Jodoplatynian potasowy

a. 1g chlorku platynowego rozpuścić w 100ml wody

b. 10g jodku potasowego rozpuścić w 250ml wody

roztwory a i b mieszać i uzupełnić wodą do 500ml

Roztwór do spryskania: 10ml roztworu jodoplatynianu zmieszać z 0,2ml stęż. kwasu solnego

8. Jod z jodkiem potasowym w kwasie solnym

a. 1g jodku potasowego i 2g jodu rozpuścić w 100ml etanolu 95°

b. 25% kwas solny w etanolu 95°

chromatogram spryskać roztworem a, po 2min. roztworem b

9. 0,5% azotyn sodowy w 1N kwasie solnym

10. 0,2% N-1 naftyloetylenodwuamina w roztworze aceton:woda /3:1/

11. Roztwór siarczanu rtęci:

5g tlenku rtęciowego zawiesić w 100ml wody, dodać 20ml stęż.

kwasu siarkowego, po oziębieniu dopełnić do 250ml wodą i przesączyć

12. Odczynnik Marquisa

10 kropli 40% formaldehydu w 10ml stęż. kwasu siarkowego

13. Odczynnik Mandelina

0,1g wanadynianu amonu rozpuścić w 65ml stęż. kw. siarkowego



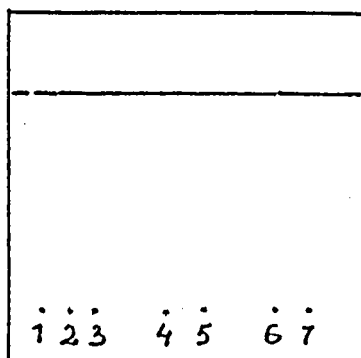
z 35ml wody. Przygotować ex tempore

Postępowanie

W celu wyizolowania substancji badanej z materiału biologicznego, przeprowadza się dwie równoległe ekstrakcje:

1. 50ml moczu doprowadzić do pH około 8 przy pomocy dwuwęglanu sodu, wytrząsnąć z 50ml chloroformu;
2. 50ml moczu zakwasić do pH około 4 1N HCl; wytrząsnąć z 50ml chloroformu.

Następnie ekstrakty osuszyć bezwodnym siarczanem sodu, przesączyć i odparować do sucha. Suchą pozostałość rozpuścić w 0,5ml alkoholu etylowego. Płytke chromatograficzną o wymiarach 170x170mm podzielić na 3 części



Na punkt startowy 1 nanosić zawsze wzorzec ataraxu w celu sprawdzenia odczynnika wywołującego, współczynnika R_f i prawidłowego nasycenia komory

2, 4, 6 - ekstrakt alkaliczny

3, 5, 7 - ekstrakt kwaśny

Ekstrakty наносимы в ilości po 20ul /w przypadku niskiego ciężaru właściwego moczu наносимы po 40ul/; ilości roztworów wzorcowych podano w tabeli I.



Płytkę umieszcza się w komorze chromatograficznej i rozwija w rozpuszczalniku metanol + amoniak 25% /100:1,5/. Po rozwinięciu chromatogramu płytke suszy się na powietrzu i ogląda w świetle lampy Wooda. Fluorescencję dają następujące leki: chinina, reserpina, thioridazina, chloropromazyna, promazyna, insidon i amizepin.

Po zaznaczeniu plam pierwszą część płytki /punkty 1,2,3/ wywołuje się odczynnikami Dragendorffa, zaznacza powstałe plamy i po wysuszeniu chromatogramu ponownie spryskuje 2% azotanem srebra. Powstałe czarne plamy mogą sugerować obecność hydryazydu, piramidonu i pyralginy. Drugą część płytki /punkty 4,5/ spryskuje się jodoplatynianem. Trzecią część /punkty 6,7/ 2,5% p-dwuamino-benzaldehydem w stęż. kwasie siarkowym /p-DABA/. Po zaznaczeniu plam płytke ogrzewa się w suszarce w 110°C w ciągu 20min. Powstałe fioletowe zabarwienie plamy po ogrzaniu może sugerować obecność meprobamatu.

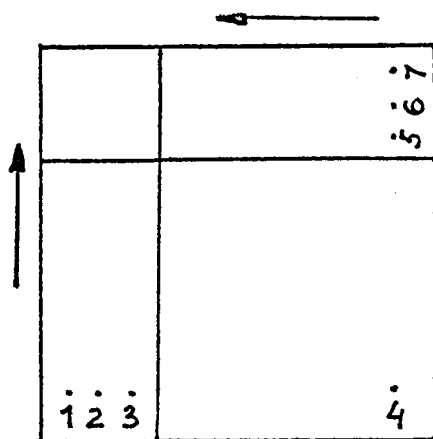
Uzyskane plamy z badanych ekstraktów porównuje się z wartościami wzorcowych R_f, jak również uwzględnia się zabarwienie powstałych plam.

W ekstrakcie alkalicznym mogą występować następujące leki: piramidon, chinina, nozinan, imipramina, saroten, reserpina, atarax, parkopan, propranolol, benectizin, pyralgina, hydrazyd, motolon, prometazyna, thioridazina, chloropromazyna, promazyna, nialamide, syntarpen, sacerno, ketamina, amizepin, insidon, benadryl.

W ekstrakcie kwaśnym mogą występować następujące leki: bromural, fenacetyna, hydantoinal, butapirazol, meprobamat, luminal, weronal, fanodorm, dial, amobarbital, ewipan, ipronal, glimid.

Jeżeli wartości R_f z badanych ekstraktów są zbliżone do wzorco-

wych wartości R_f i mają charakterystyczne zabarwienie plam, co sugeruje obecność danego leku, to w celu potwierdzenia nanosi się na płytkę chromatograficzną o wymiarach 170x80mm odpowiedni wzorzec, ekstrakt i ekstrakt z wzorcem wewnętrznym, rozwija się w rozpuszczalniku specyficznym dla danego leku, stosując charakterystyczne wywoływanie. W przypadku kiedy ekstrakty dają ^{plamy}ciągące się plamy lub o zbliżonych wartościach R_f stosuje się chromatografię dwukierunkową. Na płycie chromatograficznej o wymiarach 170x170mm zakreślamy linie czoła rozpuszczalników. Na otrzymane marginesy nanosimy substancje wzorcowe i ekstrakt



1,4,5 - ekstrakt

2,3,6,7 - wzorce

Punkt startu 4 winien znajdować się w odległości 2cm od brzegu płytki; odległość od punktów startowych do czoła rozpuszczalnika wynosi 10cm. Jako pierwszy rozpuszczalnik stosuje się metanol + amoniak 25% /100:1,5/. Poniżej podano pary leków posiadających zbliżone lub jednakowe wartości R_f w rozpuszczalniku metanol + amoniak 25% /100:1,5/ oraz drugi układ rozpuszczalników pozwalający na dobry rozdział plam, przy zastosowaniu metody chromatografii dwukierunkowej:

leki	I rozpuszczalnik	II rozpuszczalnik
1. propranolol R_f 57 imipramina R_f 58	metanol+amoniak /100:1,5/	amoniak+benzen+diok. /5:75:20/

leki	I rozpuszczalnik	II rozpuszczalnik
2. chinina Rf 62	metanol+amoniak	izopropanol+chloroform
hydrazyd Rf 63	/100:1,5/	amoniak /60:30:10/
3. meprobamat Rf 68	"	amoniak+benzen+dioksan
reserpina Rf 69		/5:75:20/
4. atarax Rf 74	"	benzen+dioksan+amoniak
parkopan Rf 74		/75:20:5/
5. atarax Rf 74	"	benzen+dioksan+amoniak
piramidon Rf 75		/75:20:5/
6. parkopen Rf 74	"	benzen+dioksan+amoniak
piramidon Rf 75		/75:20:5/
7. butapirazol Rf 82	"	benzen+dioksan+amoniak
pyralgin Rf 83		/75:20:5/
8. pyralgin Rf 83	"	chloroform+aceton
motolon Rf 85		/90:10/
9. butapirazol Rf 82	"	benzen+aceton+amoniak
nialamide Rf 80		/40:40:5/
10. syntarpen Rf 73	"	benzen+dioksan+amoniak
atarax Rf 74		/75:20:5/
11. syntarpen Rf 73	"	benzen+dioksan+amoniak
parkopan Rf 74		/75:20:5/
12. syntarpen Rf 73	"	chloroform+metanol+wod
piramidon Rf 74		/75:25:1/
13. sacerna Rf 70	"	chloroform+aceton
reserpina Rf 69		/90:10/
14. ketamina Rf 81	"	benzen+dioksan+amonia
pyralgin Rf 83		/75:20:5/
15. ketamina Rf 81	"	benzen+dioksan+amonia
butapirazol Rf 82		/75:20:5/



16. ketamina Rf 81	metanol+amoniak	benzen+dioksan+amoniak
nialamide Rf 80	/100:1,5/	/75:20:5/
17. amizepin Rf76	"	benzen+dioksan+amoniak
piramidon Rf 75		/75:20:5/
18. insidon Rf 75	"	chloroform+metanol+benzen+amoniak
atarax Rf 74		/90:5:5:1/
19. insidon Rf 75	"	benzen+dioksan+amoniak
parkopen Rf 74		/75:20:5/
20. insidon Rf 75	"	benzen+dioksan+amoniak
piramidon Rf 75		/75:20:5/
21. insidon Rf 75	"	chloroform+aceton
amizepin Rf 76		/90:10/

Dla potwierdzenia lub wykluczenia, obecności takich leków jak: bromural, fenacetyna i hydantoinal należy chromatografować każdą substancję osobno stosując wywoływanie charakterystyczne tylko dla tych leków

Postępowanie dla potwierdzenia lub wykluczenia obecności określonej substancji

Badany mocz poddaje się ekstrakcji alkalicznej lub kwaśnej:

1. 50ml moczu doprowadzić do pH około 8 przy pomocy dwuwęglanu sodu, wytrząsnąć z 50ml chloroformu
2. 50ml moczu zakwasić do pH około 4 1N HCl, wytrząsnąć z 50ml chloroformu

Ekstrakty osuszyć bezwodnym siarczanem sodu, przesączyć i odparować do sucha. Suchą pozostałość rozpuścić w 0,5ml alkoholu etylowego.

Na płytkę chromatograficzną nanieść:

1. ekstrakt alkaliczny
2. wzorzec
3. wzorzec + ekstrakt alkaliczny



lub

1. ekstrakt kwaśny
2. wzorzec
3. wzorzec + ekstrakt kwaśny

Ekstrakty наносimy w ilości po 20ul /w przypadku niskiego ciężaru właściwego moczu наносimy 40ul/; ilości roztworów wzorcowych podano w tabeli I.

Punkty startu znajdują się w odległości 2cm od podstawy płytki; odległość od punktów startowych do czoła rozpuszczalnika wynosi 10cm.

Płytkę umieścić w komorze chromatograficznej i chromatogram rozwijać w odpowiednio dobranych rozpuszczalnikach. Po rozwinięciu chromatogramu płytkę wyjąć z komory, wysuszyć i spryskać odpowiednim wywoływaczem /tabela I/.

Identyfikacja alkaloidów

10ml moczu doprowadzić do pH 9-10 przy pomocy 2,5N NaOH; dodać 3ml K_2HPO_4 /pH 9,6/ i 1-2g NaCl. Następnie wytrząsnąć z 15ml mieszaniny chloroform:izopropanol /9:1/. W przypadku silnej emulsji warstwę organiczną odwirować a następnie odparować do sucha; Sucha pozostałość rozpuścić w 0,3ml alkoholu etylowego. Ekstrakt наносi się na płytkę w ilości 30ul. Płytkę rozwija się w rozpuszczalniku benzen+dioksan+etanol+amoniak 25% /50:40:5:5/. W przypadku atropiny stosuje się rozpuszczalnik metanol+chloroform+amoniak 25% /40:60:3/. Wyniki podano w tabeli IV.

INSTYTUT MEDYCYNY FARMACEUTYK PROF. J. NOFERA



Identyfikacja pochodnych benzodwiazepiny

/relanium, elenium, oxazepam, nitrazepam/

Identyfikację prowadzi się w oparciu o produkty kwaśnej hydrolizy, którymi są:

aminochlorobenzofenon ACB /relanium, elenium, oxazepam/

metyloaminochlorobenzofenon MACB /relanium/

aminonitrobenzofenon ANB /nitrazepam/

Do 5ml moczu dodaje się 5ml stęż. HCl i hydrolizuje na wrzącej łaźni wodnej przez 30min. Następnie próbę alkalizuje się 40% NaOH i ekstrahuje 30ml chloroformu. Ekstrakt odparować do sucha i suchą pozostałość rozpuścić w 0,3ml alkoholu etylowego. Chromatogram można rozwijać w benzenie lub mieszaninie benzen+ kw. octowy lod. /97:3/. Jako odczynniki wywołujące stosuje się: 0,5% roztwór azotynu sodu w 1N HCl, 0,2% N-1 naftyloetylenodwuamina w roztworze aceton:woda /3:1/. Otrzymano niżej podane wartości Rf i zabarwienia plam:

rozpuszczalnik - benzen

MACB Rf 26 /barwa plamy - fioletowa/

Rf 45 /barwa plamy - żółta; przed wywołaniem odczynników

ACB Rf 26 /barwa plamy - fioletowa/

ANB Rf 26 /barwa plamy - fioletowa/

rozpuszczalnik - benzen+kw. octowy lod. /97:3/

MACB Rf 26 /barwa plamy - fioletowa/

Rf 49 /barwa plamy - żółta; przed wywołaniem odczynników

ACB Rf 26 /barwa plamy - fioletowa/

ANB Rf 20 /barwa plamy - fioletowa/



Identyfikacja barbituranów i glimidu

Barbiturany i glimid wykrywa się w ekstrakcie kwaśnym, stosując rozpuszczalnik wg Morrisona - izopropanol + chloroform + amoniak 25% /60:30:10/. Chromatogram spryskuje się roztworem siarczanu rtęci, odczeka 2min. i ponownie spryskuje się 0,1% roztworem dwufenylokarbazydu w chloroformie. Wyniki przedstawia tabela III.



załącznik 1
Rozpuszczalnik: metanol : amoniak 100 : 15/

Nazwa leku	Tłocz. w 100 ml	Rf w 100	UV	Odcz. Dragendorffa	Jodo- platynian	2,5% p-DABA w stęż. H ₂ SO ₄	2% AgNO ₃	0,1% KMnO ₄	Odcz. Mandelina	Odcz. Marquisa	Inne
1. Nozinan	25	42	—	pomarańcz.	fiol.-czarna	j. fioletowa	—	żółta	nieb.- fioletowa	fioletowa	
2. Soroten	25	45	—	"	"	—	—	"	nieb.- fioletowa	brązowa	
3. Promazyna	25	48	c. niebieska	"	"	j. różowa	różowa	—	różowa	różowa	
4. Thioridazyna	25	50	żółto-seledy.	"	fiol.-brąz.	niebieska	niebieska	—	niebieska	niebieska	
5. Chlorpromazyna	25	56	niebieska	"	"	róż.-fioletkowa	różowa	—	różowa	różowa	
6. Prometazyna	25	57	—	"	"	różowa	szara	—	"	fioletkowa	
7. Propranolol	25	57	—	"	fioletowa	pomar.-czarna	—	—	nieb.- granat.	niebieska	
8. Imipramina	30	58	—	"	fiol.-czarna	—	—	żółta	niebieska	"	
9. Chinina	20	62	niebieska	"	"	—	—	brąz.- żółta	—	—	
10. Hydrazyl	20	63	—	—	fioletowa	—	czarna	—	różowa	—	
11. Benadryl	20	65	—	pomarańcz.	"	żółta	—	żółta	żółta	żółt.- brąz.	
12. Meprobamat	25	68	—	—	—	fioletowa ¹⁾	—	—	biała	biała	
13. Reserpina	25	69	seledynowa	pomarańcz.	—	—	—	brązowa	fioletowa	żółta	
14. Sacerno	20	70	—	—	c. różowa	ceglasta	—	żółta	róż.- beżowa	beżowa	Hg ₂ /NO ₃ /2 ⁵⁾
15. Syntarpen	20	73	—	—	fioletowa	—	—	"	—	—	Hg ₂ /NO ₃ /2 ²⁾
16. Atarax	20	74	—	pomarańcz.	fioletowa	—	—	"	—	—	
17. Parkopan	20	74	—	"	"	—	—	—	biała	—	
18. Piramidon	20	75	—	"	brązowa	—	czarna	brąz.- żółta	"	—	
19. Insidon	20	75	żółta	"	fioletowa	—	—	żółta	—	—	
20. Amizepin	20	76	c. niebieska	"	"	ceglasta	—	"	zielona	j. beżowa	
21. Bromural	25	78	—	—	—	—	—	—	—	—	chlor. KJ + skrobia ³⁾
22. Benactizin	20	78	—	pomarańcz.	fioletowa	—	zielonkawa	—	żółta	niebieska	
23. Fenacetyna	40	80	—	—	—	—	—	—	biała	—	J w KJ + HCl ⁴⁾
24. Nialomide	20	80	—	pomarańcz.	fioletowa	beż.- żółta	—	żółta	—	j. beżowa	
25. Hydantoina	25	81	—	—	—	—	—	—	—	—	Hg ₂ /NO ₃ /2 ⁵⁾
26. Ketemina	20	81	—	pomarańcz.	fioletowa	—	—	—	—	—	
27. Butapirazol	20	82	—	—	—	żółta	—	—	brązowa	—	
28. Pyralgin	20	83	—	pomarańcz.	—	fioletowa	czarna	—	—	—	
29. Matoron	20	85	—	"	fioletowa	—	—	—	—	—	

1) na gorąco; 2) czarna; 3) fioletowa; 4) brązowa; 5) biała

Tabela II

	1	2	3	4	5	6	7	8
Nazwa leku	Metanol: amoniak (100:1,5) Rf x 100	Chloroform: aceton (90:10) Rf x 100	Chloroform: metanol:koda (75:25:1) Rf x 100	Isopropanol: chlorof:amoniak (60:30:10) Rf x 100	Amoniak:benzen: dioksan (5:75:20) Rf x 100	Chlorof:metanol: benzen:amoniak (90:5:5:1) Rf x 100	Benzen:aceton: amoniak (40:40:5) Rf x 100	Metanol Rf x 100
1. Nozinan	42	0	66	83	54	56	83	56
2. Saroten	45	0	62	88	37	45	79	43
3. Promazyna	48	0	47	79	20	38	74	34
4. Thioridazina	50	0	62	86	15	41	78	41
5. Chloropromazyna	56	0	55	84	25	46	81	45
6. Prometazyna	57	0	63	84	19	45	74	49
7. Propranolol	57	0	35	71	9	14	51	44
8. Imipramina	58	0	56	89	29	40	70	38
9. Chinina	62	0	56	86	0	9	36	51
10. Hydrazyd	63	0	43	51	0	0	62	62
11. Benadryl	65	0	49	75	46	64	0	33
12. Meprobamol	68	0	70	87	10	0	48	77
13. Reserpina	69	20	74	93	30	0	76	85
14. Sacerno	70	50	80	82	59	36	73	84
15. Syntarpen	73	0	59	31	0	0	0	73
16. Atarax	74	0	79	86	13	44	62	79
17. Parkopan	74	0	75	88	79	70	94	63
18. Piramidon	75	20	80	87	30	48	67	76
19. Insidon	75	0	57	63	0	16	34	59
20. Amizepin	76	36	74	75	26	43	54	81
21. Bromural	78	25	78	75	30	0	51	84
22. Benactizin	78	0	76	89	47	0	83	62
23. Fenacetyna	80	28	74	0	30	9	60	85
24. Nialamide	80	0	89	66	0	0	9	84
25. Hydantoinal	81	16	78	0	14	11	68	77
26. Ketamina	81	0	83	81	55	76	77	71
27. Butapirazol	82	45	85	81	0	55	87	91
28. Pyralgin	83	0	79	84	14	0	49	82
29. Motolon	85	60	90	90	62	88	85	86



TABELA III

Nazwa leku	ilość wzorca w ul	Rf x 100	Barwa plamy
1. Luminal	20	42	fioletowa
2. Weronal	20	50	fioletowa
3. Fanodorm	20	65	fioletowa
4. Dial	20	52	biała z fiol. ob.
5. Amobarbital	20	73	fioletowa
6. Nembutal	20	77	biała
7. Ewipan	20	77	fioletowa
8. Ipronal	20	23	niebieska
9. Glimid	20	89	niebieska



TABELA IV

Nazwa leku	ilość wzorca w ul.	R _f x 100 w rozpuszczalnikach			Jodo- platynian	Odcz. Dragendorffa	Roztwór jodu w kwasie solnym	Odcz. Mandolina	Odcz. Marquisa
		I	II	III					
1. Morfina	20	10	64	36	granatowa	pomarańcz.	-	j. fiolet.	fioletowa
2. Kodeina	20	24	83	35	fioletowa	pomarańcz.	-	j. fiolet.	fioletowa
3. Kokaina	20	79	91	67	granatowa	pomarańcz.	-	j. fiolet.	fioletowa
4. Strychnina	20	29	84	20	granatowa	pomarańcz.	-	czerwona	-
5. Skopolamina	20	41	90	68	fioletowa	pomarańcz.	-	żółta	-
6. Fyzostygmina	20	49	91	63	fioletowa	pomarańcz.	-	różowa	-
7. Nikotyna	20	52	94	60	granatowa	pomarańcz.	-	-	-
8. Papaweryna	20	68	94	79	fioletowa	pomarańcz.	-	niebieska	-
9. Kofeina	20	46	0	66	-	-	fiol.-brązowa	-	-
10. Akonityna	20	72	94	46	-	pomarańcz.	-	-	-
11. Pilocarpina	20	23	85	69	granatowa	pomarańcz.	-	-	-
12. Atropina	20	9	52	16	fioletowa	pomarańcz.	-	-	-

I - benzen + dioksan + etanol + amoniak 25% /50:40:5:5/

II - chloroform + metanol + amoniak 25% /60:40:3/

III - metanol + amoniak 25% /100:1,5/



PISMIENNICTWO

1. Berry D. J., Grove J.: J. Chromatog. 61, 111 /1971/
2. Berry D. J., Grove J.: J. Chromatog. 80, 205 /1973/
3. Clarke E. G. C.: Isolation and ident. of Drugs, Pharm.
Press /1969/ London
4. Greenblatt D. J., Shader R.I.: Benzodiazepines in clinical
practice, Raven Press /1974/ New York
5. Kaistha K. K., Jaffe J. H.: J. Chromatog 60, 83, /1971/
6. Morrison J. C., Chatten L. G.: J. Pharm. Pharmacol. 17,
655, /1965/
7. Múle S. J.: J. Chromatog. Sci. 10, 275, /1972/
8. Stolman A.: Prog. Chem. Toxicol., Academic Press, New York,
London, 2, 321, /1965/
9. Stolman A.: Prog. Chem. Toxicol., Academic Press, New York,
London, 4, 59, /1969/



MATERIAŁY DLA LABORATORIÓW TOKSYKOLOGICZNYCH

pod redakcją Doc. dr hab. J. Hanke

Krystyna Antczak

METODY IDENTYFIKACJI I POMIARU STĘŻENIA TRUCIZN
ELIMINOWANYCH Z USTROJU DROGĄ HEMODIALIZY

Część III

INSTYTUT MEDYCyny PRACY w ŁODZI

1 9 7 6



W S T E P

W przypadku zatrucia nieznaną substancją duże znaczenie ma szybka identyfikacja trucizn, które mogą być eliminowane z ustroju metodą hemodializy. Do liczby takich substancji zalicza się następujące związki chemiczne: glimid, elenium, dwufenylohydantoina, imipramina, meprobumat, acenol, fenacetyna, hydrazyd kwasu izonikotynowego, salicylany, sulfonamidy, barbiturany /średnio i długodziałające/, glikol etylenowy, metanol, etanol, czterochlorek węgla, wodzian chloralu, anilina, rodanki, arsen, rtęć, ołów, żelazo, chrom.

Wskazaniem do dializy pozaustrojowej jest w niektórych przypadkach wysokie stężenie substancji toksycznej w ustroju.

Tabela

Nazwa związku	Stężenie we krwi
Metanol	50 mg%
Etanol	300 mg%
Weronal	30 mg%
Luminal	20 mg%
Glimid	3 mg%
Żelazo	750 mg%

Załączone metody umożliwiają identyfikację większości takich substancji oraz ich pomiar ilościowy we krwi lub w moczu. Określenie stężenia substancji w płynie fizjologicznym ma poza wskazaniem do dializy pozaustrojowej umożliwić odróżnienie zatruc omawianymi substancjami od stanów klinicznych w



których obecność leku w ustroju jest tylko wynikiem przyjęcia dawki terapeutycznej. Oznaczanie stężenia substancji toksycznej we krwi ma tę przewagę nad pomiarem w moczu, że umożliwia uchwycenie wcześniejszej fazy zatrucia. Nie jest ono jednak we wszystkich przypadkach możliwe. Zestawienie metodyk jest przeznaczone głównie dla tych ośrodków ratownictwa ostrych zatruc, które dysponują jedynie technikami klasycznymi takimi jak: kolorymetria, spektrofotometria, technika miareczkowa.

Zgodnie z naszym rozeznanieniem większość laboratoriów obsługujących ośrodki ratownictwa ostrych zatruc w Polsce nie korzysta jeszcze z takich technik jak chromatografia gazowa, atomowa spektrofotometria absorpcyjna czy spektrofotometria IR.



OZNACZANIE GLIKOLU ETYLENOWEGO W SUROWICY

Zasada metody: glikol etylenowy zostaje działaniem kwasu nadjodowego utleniony do formaldehydu, który ulega kondensacji z odczynnikiem acetyloacetonowym tworząc związek kompleksowy o barwie żółtej, posiadający maksimum absorpcji przy λ fali 412 nm.

Odczynniki

1. 20% roztwór 5-ciowodnego siarczanu miedzi: 20,0 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ rozpuścić w wodzie destylowanej uzupełniając do 100 ml.
2. 25% wodna zawiesina wodorotlenku wapnia: odważyć 25,0 g Ca(OH)_2 i dodać 75 ml wody destylowanej.
3. 0,05 M roztwór kwasu nadjodowego: 2,13 g NaJO_4 rozpuścić w 200 ml 0,3 N roztworu kwasu siarkowego. Przechowywany w lodówce w ciemnej butelce, trwały około miesiąca.
4. Jodek potasu w tiosiarczanie sodu: 41,5 g KJ i 28,0 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ rozpuścić w wodzie i uzupełnić do 1000 ml.
5. Odczynnik acetyloacetonowy: 150,0 g octanu amonu, 3 ml kwasu octowego lodowatego i 2 ml acetyloacetonu rozpuścić w wodzie destylowanej i rozcieńczyć do 1000 ml. Roztwór przechowywany w lodówce w butelce z ciemnego szkła, trwały około 2 tygodni.
6. Roztwór wzorcowy glikolu etylenowego: przygotować roztwór podstawowy w wodzie o stężeniu 10 mg/ml, z którego sporządzić należy rozcieńczenie w zakresie stężeń 1 - 25 $\mu\text{g/ml}$.

Postępowanie

1 ml surowicy rozcieńczyć wodą do objętości 5 ml. Następnie dodać do tej objętości po 2 ml odczynników: siarczanu miedzi /1/, wodorotlenku wapnia /2/ i uzupełnić wodą do objętości 25 ml. Wytrzą-



nać przez 15 minut /korzystając z wytrząsarki/. Próbę sęczyć.
Do 1 ml przesącza dodać 0,25 ml kwasu nadjodowego /3/ i po odstawieniu próby na 10 minut w temperaturze pokojowej dodać 1 ml jodku potasou /4/. Po odbarwieniu próby dodać 2 ml odczynnika acetyloacetonowego /5/ i ogrzewać próbę przez 10 minut na łaźni wodnej o temperaturze 58° . Po oziębieniu próby dokonać pomiaru absorpcji w stosunku do wody jako odnośnika, przy dł fali 412 nm $/A_1/$ i 520 nm $/A_2/$.

Przygotowanie wykresu kalibracyjnego

Do 1 ml surowicy dodać takie objętości rozcieńczonego roztworu wzorcowego glikolu etylenowego /6/, aby otrzymać próby o stężeniach 2 - 16 ug/na objętość próby. Dalsze postępowanie jak opisano wyżej. Wykres kalibracyjny sporządzić w układzie: zależność różnicy absorpcji $A_{412} - A_{520}$ od stężenia glikolu w próbce.

Obliczanie wyników

Od uzyskanej różnicy absorpcji $/A_{412} - A_{520}/$ odjąć standartową absorpcję surowicy fizjologicznej $/A_S = 0,140/$; dla tak skorygowanej wartości absorpcji znajduje się odpowiednie stężenie z wykresu kalibracyjnego $/c/$, które należy podstawić do wzoru:

$$\text{stężenie glikolu w mg\%} = c \times 25 \times 100$$



OZNACZANIE FLUORKÓW W MOCZU

Zasada metody: wyodrębnianie fluoru z moczu dokonuje się metodą mikrodyfuzji. Pomiar stężenia przeprowadzany jest na zasadzie odbarwiania przez fluor kompleksu cyrkonu z kwasem p-sulfofenyloazochromotropowym /Zr-SPADNS/.

Odczynniki

1. 1% roztwór alkoholowy wodorotlenku sodu: 1,0 g NaOH rozpuścić w alkoholu etylowym /96%/ i uzupełnić do objętości 100 ml.
2. 0,04 N roztwór wodorotlenku sodu: 1,6 g NaOH rozpuścić w wodzie destylowanej i uzupełnić do objętości 1000 ml.
3. Roztwór SPADNS: 0,306 g soli sodowej kwasu p-sulfofenyloazochromotropowego rozpuścić w 55 ml wody destylowanej.
4. Roztwór chlorku cyrkonylu /ZrOCl₂/: 0,0133 g ZrOCl₂·8 H₂O rozpuścić w 5 ml wody destylowanej, dodać 35 ml stężonego kwasu solnego i dopełnić wodą do objętości 50 ml.
5. Roztwór Zr-SPADNS: zmieszać 50 ml roztworu SPADNS /3/ z 50 ml roztworu chlorku cyrkonylu /4/ i dopełnić wodą destylowaną do objętości 550 ml.
6. Roztwór odczynnikowy: do 5 ml odczynnika SPADNS /3/ dodać 101,5 ml wody destylowanej i 3,5 ml stężonego HCl.
7. Stężony kwas nadchlorowy /HClO₄/
8. Roztwór podstawowy: 0,221 g NaF cz.d.a. rozpuścić w niewielkiej objętości 0,04 N roztworu NaOH /2/ i dopełnić do objętości 100 ml tym samym roztworem wodorotlenku sodu. Stężenie fluoru w tym roztworze wynosi 1 mg/ml.
9. Roztwór wzorcowy: 1 ml roztworu podstawowego /8/ rozcieńczyć 0,04 N NaOH /2/ do objętości 100 ml. Stężenie fluoru w tym roztworze wynosi 10 ug/ml.



Postępowanie

Na płytkę Petriego o średnicy 9 cm pokrytą równą warstwą parafiny wlać po jej przeciwległych stronach: 2 ml moczu i 2 ml stężonego kwasu nadchlorowego /7/. Przykryć płytkę Petriego o średnicy 10 cm, której strona wewnętrzna została powleczone 1% roztworem alkoholowym wodorotlenku sodu /1/, a alkohol został odparowany w temperaturze 60°. Po połączeniu płytek należy wolno ruchem kołowym doprowadzić do tego, aby naniesione roztwory połączyły się ze sobą. Płytkę odstawić na 24 godziny w temperaturze pokojowej /około 22°. Po upływie tego czasu zdjąć przykrywkę, a powłokę alkaliczną rozpuścić w 10 ml wody destylowanej. Roztwór przenieść do cylinderka, do którego następnie wlać 10 ml roztworu Zr-SPADNS /5/. Po dokładnym wymieszaniu mierzyć absorpcję próby badanej /A₃/ przy dł fali 570 nm, w stosunku do odczynnika /6/ jako odnośnika. Następnie mierzyć absorpcję w stosunku do roztworu odnośnikowego /6/:

- a/ roztworu zawierającego: 10 ml 0,04 N roztworu NaOH /2/ i 10 ml roztworu Zr-SPADNS /5/ - A₁
- b/ próby kontrolnej: próbę przygotować przez rozcieńczenie roztworu wzorcowego /9/ 10-krotną objętością roztworu 0,04 N NaOH /2/, a następnie zmieszać z równą objętością roztworu Zr-SPADNS /5/ - A₂

Uwaga: Różnica A₁ - A₂ powinna wynosić 0,32 - 0,34

Wartość A₃ powinna być wyliczona jako średnia z dwóch próbek moczu.

Przygotowanie wykresu kalibracyjnego

Postępowanie jak opisano wyżej, przy czym w miejsce próby badanej



nakropić na płytkę Petriego stężenia wzorcowe otrzymane drogą przygotowania następujących rozcieńczeń:

Roztwór wzorcowy /g/ /ml/	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
Woda destylowana /ml/	0,8	0,6	0,4	0,2	-
Mocz /ml/	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Stężenie fluoru /ug w próbce/	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0

Wykres kalibracyjny sporządzić w układzie: zależność różnicy absorpcji ΔA uzyskana z odczytu $A_1 - A_3$, od stężenia fluoru.

A_1 - odczyt absorpcji odczynnika bez fluoru

A_3 - odczyt absorpcji roztworów wzorcowych fluoru/

Obliczanie wyników

Dla uzyskanej różnicy absorpcji $A_1 - A_3$ / A_3 - wartość absorpcji próby po dyfuzji/ odczytać z wykresu kalibracyjnego stężenie fluoru w próbce badanej /c/ i obliczyć wg wzoru:

$$F \text{ mg/l} = c \times 500$$



OZNACZANIE MEPROBAMATU W SUROWICY

Zasada metody: meprobamat w środowisku stężonego kwasu siarkowego daje z hydrochinonem połączenie, które posiada maksimum absorpcji przy dł fali 403 nm, minimum przy dł fali 370 nm i "plateau" przy 475 nm.

Odczynniki

1. Chloroform cz.d.a.

2. Odczynnik hydrochinonowy:

a/ oczyszczanie hydrochinonu: 100,0 g hydrochinonu rozpuścić w 150 - 200 ml alkoholu etylowego absolutnego. Następnie dodać 3,0 g węgla aktywowanego. Sączyć przez średni sączek bibułowy i pozostawić do odparowania alkoholu.

b/ przygotowanie odczynnika: 0,2 g oczyszczonego hydrochinonu rozpuścić w 8,5 ml stężonego kwasu siarkowego cz.d.a. i dodać 1,5 ml wody destylowanej. Roztwór przygotować bezpośrednio przed analizą zachowując wyżej wymienioną kolejność mieszania składników.

3. Przygotowanie próby zerowej: zmieszać 4 ml kwasu siarkowego stężonego i 1 ml wody destylowanej.

4. Podstawowy roztwór meprobamatu o stężeniu 100 mg%: 100 mg meprobamatu rozpuścić w 1 - 2 ml etanolu, objętość uzupełnić do 100 ml wodą destylowaną.

5. Roztwór wzorcowy meprobamatu o stężeniu 20 mg% przygotować przez 5-krotne rozcieńczenie roztworu podstawowego /4/.

Postępowanie

Do dwóch rozdzielaczy odmierzyć po 1 ml surowicy i dodać 10 ml chloroformu do każdego rozdzielacza, następnie wytrząsnąć przez



3 minuty. Po oddzieleniu się warstwy chloroformowej przesączyć ją przez bibułę do probówek. Chloroform odparować, a do pozostałości dodać kolejno: 4 ml odczynnika hydrochinonowego /2/ - do probówki pierwszej /próba badana/; 4 ml roztworu /3/ do probówki drugiej /próba zerowa/. Obie probówki po zakryciu korkiem wstawić na 25 minut do wrzącej łaźni wodnej. Następnie po oziębieniu dokonać rejestracji widma w zakresie 350 - 600 nm w stosunku do próby zerowej /3/.

Przygotowanie wykresu kalibracyjnego

Przygotować następującą serię rozcieńczeń:

Roztwór wzorcowy /5/ /ml/	0	0,25	0,50	0,75	1,0
Woda destylowana /ml/	1,0	0,75	0,50	0,25	-
Surowica /ml/	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Stężenie meprobamatu /mg%/	0	5,0	10,0	15,0	20,0

Tak przygotowane roztwory wzorcowe ekstrahować 10 ml chloroformu - dalsze postępowanie jak opisano wyżej.

Wykres kalibracyjny sporządzić w układzie: zależność różnicy absorpcji $A_1 - A_2$ zmierzonej przy λ fali 403 nm i λ fali 475 nm od stężenia meprobamatu.

Obliczanie wyników

Stężenie meprobamatu /mg%/ w próbce badanej odczytuje się z wykresu kalibracyjnego dla uzyskanej różnicy absorpcji $A_1 - A_2$.
gdzie: A_1 - wartość absorpcji przy λ fali 403 nm

A_2 - wartość absorpcji przy λ fali 475 nm

OZNACZANIE GLIMIDU W SUROWICY

Zasada metody: W wyniku alkalicznej hydrolizy glimidu następuje obniżenie absorpcji mierzonej przy dł fali 235 nm, proporcjonalne do stężenia glimidu. W ściśle określonych warunkach po 5 minutach ulega hydrolizie 50% obecnego glimidu; po 20 minutach następuje całkowita hydroliza.

Przemywanie ekstraktu chloroformowego pozwala na eliminację metabolitów glimidu oraz barbiturenów i salicylanów, które mogą interferować.

Odczynniki

1. Chloroform cz.d.a.
2. Roztwór chlorku amonu: 16,0 g NH_4Cl rozpuścić w wodzie destylowanej, a objętość dopełnić do 100 ml.
3. 3 N roztwór wodorotlenku sodu: 12,0 g NaOH rozpuścić w wodzie destylowanej i objętość uzupełnić do 100 ml.
4. 1 N roztwór wodorotlenku sodu: 4,0 g NaOH rozpuścić w wodzie destylowanej i uzupełnić objętość do 100 ml.
5. 0,5 N roztwór wodorotlenku sodu: 20,0 g NaOH rozpuścić w wodzie destylowanej, a następnie objętość uzupełnić do 1000 ml.
6. 0,5 N roztwór kwasu solnego: 43,0 ml kwasu solnego o c.wł. 1,18 zmieszać z 250 ml wody destylowanej i objętość uzupełnić do 1000 ml.
7. Roztwór podstawowy glimidu: 100 mg glimidu rozpuścić w wodzie destylowanej i objętość uzupełnić do 100 ml.
8. Roztwór wzorcowy glimidu o stężeniu 0,1 mg/ml otrzymuje się przez 10-krotne rozcieńczenie wodą destylowaną roztworu podstawowego /7/.

Postępowanie

2 ml surowicy umieścić w rozdzielaczu o pojemności 50 ml. Dodać 25 ml chloroformu i wytrząsąć. Ekstrakt chloroformowy przesączyć przez bibułę filtracyjną Whatman Nr 41. Przesącz przemyc dwukrotnie 5 ml porcjami 0,5 N roztworu NaOH /5/, jeden raz 5 ml 0,5 N roztworu HCl /6/, a następnie 5 ml wody destylowanej. Warstwę chloroformową ponownie sączyć przez bibułę filtracyjną Whatman Nr 41. 20 ml przesączu przenieść do kolbki na 50 ml i odparować w temperaturze 70°. Suchą pozostałość rozpuścić w 5 ml wody destylowanej, ogrzewać około 2 minut na łaźni wodnej, dobrze mieszając. Następnie doprowadzić do temperatury pokojowej. Do próbki oznaczonej jako "odnośnik" odmierzyć 1,5 ml roztworu wodnego i dodać 0,1 ml roztworu chlorku amonu /2/ oraz 0,2 ml 1 N roztworu NaOH /4/. Do drugiej próbki oznaczonej jako "próba badana" odmierzyć 1,5 ml roztworu wodnego i dodać 0,3 ml 3 N roztworu NaOH /3/.

Natychmiast rejestrować widmo absorpcyjne w zakresie UV. Powtórzyć rejestrację widma przeprowadzić dokładnie po upływie 5 minut.

Przygotowanie wykresu kalibracyjnego

Przygotować kolejno rozcieńczenie wzorców:

Roztwór wzorcowy glimidu /8/ /ml/	0	0,1	0,2	0,4	0,6
Surowica /ml/	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Chloroform /ml/	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0
Stężenie glimidu w próbce /ug/	0	10,0	20,0	40,0	60,0

Wykres kalibracyjny sporządzić w układzie: zależność różnicy wartości absorpcji $/A_1 - A_2/$ przy λ fali 235 nm, od stężenia glimidu w próbce.

gdzie: A_1 - wartość absorpcji próby odczytana natychmiast po dodaniu NaOH /3/

A_2 - wartość absorpcji próby odczytana po 5 minutowej hydrolizie

Obliczanie wyników

Wynik otrzymuje się ze wzoru:

$$\text{stężenie glimidu w mg\%} = c \times 50$$

gdzie: c - stężenie glimidu w próbce badanej odczytane z wykresu kalibracyjnego.



OZNACZANIE HYDRAZYDU KWASU IZONIKOTYNOWEGO W MOCZU

Zasada metody: hydrazyd kwasu izonikotynowego tworzy z metawanadynianem amonu barwne połączenie.

Odczynniki

1. 1,0 g metawanadynianu amonu rozpuścić w 200 ml 1 N roztworu kwasu siarkowego i dopełnić wodą destylowaną do objętości 1000 ml.
2. Roztwór podstawowy hydrazidu kwasu izonikotynowego: 100 mg hydrazidu kwasu izonikotynowego rozpuścić w wodzie destylowanej i objętość uzupełnić do 100 ml.
3. Roztwór wzorcowy hydrazidu kwasu izonikotynowego o stężeniu 0,1 mg/ml otrzymuje się przez 10-krotne rozcieńczenie wodą destylowaną roztworu podstawowego /2/.

Postępowanie

Próbkę moczu 0,25 ml uzupełnić wodą destylowaną do objętości 5,0 ml i dodać 2,5 ml metawanadynianu amonu /1/. Po wymieszaniu odczytać wartość absorpcji przy dł fali 440 nm w stosunku do próby zerowej zawierającej 5 ml wody destylowanej i 2,5 ml odczynnika /1/.

Przygotowanie wykresu kalibracyjnego

Przygotować niżej podaną serię rozcieńczeń roztworu wzorcowego:

Roztwór wzorcowy /3/ /ml/	0,1	0,2	0,3	0,4	0,6	0,8	1,0
Woda destylowana /ml	4,9	4,8	4,7	4,6	4,4	4,2	4,0
Stężenie hydrazidu /ug w próbce/	10	20	30	40	60	80	100

Dalsze postępowanie jak opisano wyżej.

Wykres kalibracyjny sporządzić w układzie: zależność absorpcji od stężenia hydrazynu kwasu izonikotynowego.

Obliczanie wyników

Stężenie hydrazynu kwasu izonikotynowego w próbce otrzymuje się z wykresu kalibracyjnego, a wynik podaje w mg/l względnie w przeliczeniu na objętość dobową moczu.



OZNACZANIE ALKOHOLU METYLOWEGO WE KRWI

Zasada metody: po odbiałczeniu krwi metanol utleniany jest nadmanganianem potasu do formaldehydu, który daje reakcję barwną z kwasem chromotropowym.

Odczynniki

1. Roztwór kwasu siarkowego: rozcieńczyć H_2SO_4 stężony /c.wł. 1,84/ w stosunku 1 : 1 wodą destylowaną.
2. 2% roztwór nadmanganianu potasu: 2,0 g $KMnO_4$ rozpuścić w wodzie destylowanej i uzupełnić do objętości 100 ml.
3. Nasycony roztwór wodny siarczynu sodu: około 28,0 g soli bezwodnej Na_2SO_3 lub około 56,0 g soli 7-miowodnej rozpuścić w 100 ml wody destylowanej.
4. Kwa siarkowy stężony /c.wł. 1,84/
5. 2% roztwór kwasu chromotropowego: 2,0 g kwasu chromotropowego rozpuścić w wodzie destylowanej i uzupełnić do objętości 100 ml.
6. 20% roztwór kwasu tróchlorooctowego: 20,0 g CCl_3COOH rozpuścić w wodzie destylowanej i uzupełnić do objętości 100 ml.
7. Roztwór podstawowy alkoholu metylowego: 1,26 ml CH_3OH rozcieńczyć wodą destylowaną do objętości 100 ml.
8. Roztwór wzorcowy metanolu o stężeniu 1 mg/ml otrzymuje się przez 10-krotne rozcieńczenie wodą destylowaną roztworu podstawowego /7/.

Postępowanie

Do 4 ml kwasu tróchlorooctowego /6/ dodać 2 ml krwi. Po 5 minutach przesączyć zawartość probówki przez bibułę filtracyjną



Whatman Nr 1. Odmierzyć 0,2 ml przesącza do probówki umieszczonej w zlewce z lodem. Uzupełnić objętość wodą destylowaną do 1 ml i dodawać kolejno: 0,2 ml kwasu siarkowego /1/, 5 kropli roztworu nadmanganianu potasu /2/. Zawartość probówki dobrze wymieszać. Po 5 minutach dodać 2 - 3 krople nasyconego roztworu siarczynu sodu, do odbarwienia roztworu, a następnie 0,2 ml kwasu chromotropowego /5/ i 4 ml stężonego kwasu siarkowego /4/. Odczytać absorpcję w stosunku do próby zerowej przy λ fali 570 nm. Próbę zerową wykonać dodając do 1 ml wody destylowanej wszystkie odczynniki jak podano wyżej.

Przygotowanie wykresu kalibracyjnego

Przygotować serię wzorców wg niżej podanej tabeli:

Roztwór wzorcowy metanolu /8/ /ml/	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
Roztwór kwasu trójchlorooctowego /8/ /ml/	4,0	3,8	3,6	3,4	3,2	3,0
Krew /ml/	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Stężenie metanolu w próbce /mg/	0,	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0

Po wymieszaniu i przesączeniu postępować w sposób opisany wyżej.

Wykres kalibracyjny przygotować w układzie: zależność absorpcji od stężenia metanolu w próbce.

Obliczanie wyników

Stężenie metanolu w mg% otrzymuje się mnożąc wartość otrzymaną z wykresu kalibracyjnego przez 50.



OZNACZANIE ELENIU W SUROWICY

Zasada metody: wyekstrahowane elenium daje po hydrolizie kwaśnej, dwuazowaniu i sprzęganiu z N-1-naftyloetylenodwuaminą barwne połączenie.

Odczynniki

1. 0,1% roztwór wodny azotynu sodu: 1,0 g NaNO_2 rozpuścić w wodzie destylowanej i uzupełnić objętość do 100 ml. Uzyskany roztwór rozcieńczyć 10-krotnie bezpośrednio przed użyciem.
2. 0,5% roztwór amidosulfonianu amonu: 0,5 g $\text{NH}_4\text{SO}_3\text{NH}_2$ rozpuścić w wodzie destylowanej i uzupełnić objętość do 100 ml.
3. 6 N roztwór kwasu solnego: 51,0 ml HCl stężonego /c.wł. 1,18/ wlać do 40 ml wody destylowanej i po oziębieniu objętość uzupełnić wodą do 100 ml.
4. 2 N roztwór kwasu solnego: 17 ml HCl stężonego /c.wł. 1,18/ wlać do 50 ml wody destylowanej i po oziębieniu uzupełnić wodą destylowaną do objętości 100 ml.
5. 0,1% roztwór dwuchlorowodoru N-1-naftyloetylenodwuaminy: 100 mg $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{NH-CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2 \cdot 2 \text{HCl}$ rozpuścić w wodzie destylowanej i uzupełnić objętość do 100 ml.
6. Eter etylowy
7. Węglan potasu in subst.
8. Bezwodny siarczan sodu in subst.
9. Podstawowy roztwór: 0,1 g elenium rozpuścić w wodzie destylowanej o objętości około 10 ml, dodać 1 ml 2 N roztworu kwasu solnego i uzupełnić wodą do 100 ml.
10. Roztwór wzorcowy: roztwór elenium o stężeniu 50 ug/ml otrzymu-

je się przez 20-krotne rozcieńczenie wodą destylowaną roztworu podstawowego /9/.

Postępowanie

2 ml surowicy uzupełnić wodą do objętości 5 ml, zalkalizować 0,5 g węglanu potasu /7/, dodać 15 ml eteru etylowego /6/ i wytrząsać przez 30 minut /korzystając z wytrząsarki/. Oddzieloną warstwę eterową przemyć 2 ml wody destylowanej, a następnie osuszyć bezwodnym siarczanem sodu /8/ w ilości 0,5 g. Oddzielić 10 ml warstwy eterowej i dodać 3 ml 6 N kwasu solnego /3/. Wytrząsać przez 10 minut. Oddzielić kwaśną fazę wodną i ogrzewać przez 30 minut w temperaturze 125° . Po oziębieniu do temperatury pokojowej uzupełnić objętość wodą destylowaną do 5 ml i dodać 0,5 ml azotynu sodu /1/. Po 3 minutach dodać 0,5 ml roztworu amonu amidosulfonianu /2/ zaś po 10 minutach 0,5 ml roztworu dwuchlorowodoru N-1-naftyloetylenodwuaminy /5/. Po 15 minutach odczytać absorpcję przy λ 550 nm w stosunku do próby zerowej. Próbę zerową przygotować przez zmieszanie 3 ml 6 N roztworu HCl /3/, 2 ml wody destylowanej i wszystkie pozostałe odczynniki jak w próbie badanej.

Przygotowanie wykresu kalibracyjnego

Przygotować następujące rozcieńczenia:

Roztwór wzorcowy /10/ /ml/	0,2	0,5	1,0	2,0
Woda destylowana /ml/	2,8	2,5	2,0	1,0
Surowica /ml/	2,0	2,0	2,0	2,0
Stężenie elenium w próbce /ug/	10,0	25,0	50,0	100,0

Dalsze postępowanie jak opisano wyżej.

Wykres kalibracyjny sporządzić w układzie: zależność wartości absorpcji od stężenia elenium w próbce.

Obliczanie wyników

Stężenie elenium w próbce znajduje się z wykresu kalibracyjnego i stosując odpowiednie przeliczenia zależne od stopnia rozcieńczenia surowicy, wynik podaje się w mg%.



WYKRYWANIE FENACETYNY W MOCZU

Zasada metody: oznaczanie fenacetyny oparte jest na powstawaniu barwnego połączenia i na charakterystycznej zmianie barwy po zakwaszeniu kwasem solnym.

Odczynniki

1. 10% wodny roztwór azotynu sodu: 10,0 g NaNO_2 rozpuścić w wodzie i uzupełnić do objętości 100 ml.
2. 5% alkoholowy roztwór alfa-naftolu: 5,0 g alfa-naftolu rozpuścić w alkoholu i uzupełnić do 100 ml.
3. 15% wodny roztwór wodorotlenku sodu: 15,0 g NaOH rozpuścić w wodzie destylowanej i uzupełnić objętość do 100 ml.
4. Kwas solny stężony cz.d.a. /c.wł. 1,18/

Postępowanie

10 - 20 ml moczu zakwasić 1 kroplą kwasu solnego /4/ i zagotować. Następnie probówkę umieścić w zlewce z lodem i oziębować do temperatury 5° . Dodać 2 - 3 krople roztworu azotynu sodu /5/, mieszać, a następnie dodać 2 krople 5% roztworu alfa-naftolu /2/. Roztwór alkalizować ługiem sodowym /3/. W przypadku obecności fenacetyny pojawia się czerwone zabarwienie, które po zakwaszeniu kwasem solnym /4/ przechodzi w fioletowe.



WYKRYWANIE IMIPRAMINY W MOCZU

Zasada metody: wykrywanie imipraminy oparte jest na powstawaniu charakterystycznego połączenia barwnego.

Odczynniki

1. 0,2% roztwór wodny dwuchromianu potasu
2. 20% roztwór kwasu nadchlorowego
3. 50% roztwór kwasu azotowego
4. 30% roztwór kwasu siarkowego

Odczynniki mieszać w ~~razach~~ równych objętościach bezpośrednio przed wykonaniem oznaczenia.

Postępowanie

1 ml moczu mieszać z 1 ml świeżo przygotowanej mieszaniny w przypadku obecności imipraminy pojawia się natychmiast zielone zabarwienie.



OZNACZANIE RODANKÓW W MOCZU

Zasada metody: oznaczanie rodanków w moczu oparte jest na pomiarze absorpcji utworzonego kompleksu rodanku żelaza $/A_1/$ przy dł fali 440 nm, którego wartość absorpcji spada po dodaniu azotanu rtęci $/A_2/$. Różnica absorpcji $/A_1 - A_2/$ jest proporcjonalna do stężenia rodanków w próbce.

Odczynniki

1. Wolframian albuminy: około 10,0 g albuminy lub 100 ml świeżego białka kurzego i 88,0 g $Na_2WO_4 \cdot 2 H_2O$ rozpuścić w 200 ml wody destylowanej.
2. Roztwór siarczanu żelazowo-amonowego: 25,0 g $Fe/NH_4//SO_4/2$ i 1 ml stężonego kwasu azotowego rozcieńczyć wodą do objętości 100 ml i przesączyć.
3. 18 N roztwór kwasu siarkowego: mieszać 100 ml stężonego kwasu siarkowego i 100 ml wody destylowanej.
4. Nasycony roztwór azotanu rtęci $/Hg/NO_3/2/$
Uwaga: nasycony roztwór przygotowywać na zimno!
5. Roztwór wzorcowy rodanków o stężeniu 20 $\mu g/ml$

Postępowanie

Do 12,5 ml moczu dodać 10 ml odczynnika wolframianu albuminy /1/, 45 ml wody destylowanej i 6 ml 18 N roztworu kwasu siarkowego /3/. Odstawić na 30 minut. Następnie roztwór przesączyć przez twardy sącze bibułowy. Do 10 ml klarownego przesącza dodać 1 ml roztworu siarczenu żelazowego /2/. Po wymieszeniu zmierzyć wartość absorpcji przy dł fali 440 nm w stosunku do próby zerowej.

Następnie dodać 1 kroplę nasyconego roztworu azotanu rtęci /4/

i ponownie zmierzyć wartość absorpcji przy tej samej dł fali.
Podstawę dla obliczeń stanowi różnica absorpcji w obu pomiarach.
Próbę zerową przygotować w sposób opisany wyżej zastępując mocz
wodą destylowaną.

Przygotowanie wykresu kalibracyjnego

Przygotować następujące rozcieńczenia wzorców:

Roztwór wzorcowy /5/ /ml/	0	5,0	10,0	15,0	25,0
Woda destylowana /ml/	45,0	40,0	35,0	30,0	20,0
Mocz /ml/	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
18 N roztwór H_2SO_4 /3/ /ml/	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
Stężenie rodanków w próbce /ug/	0	100,0	200,0	300,0	500,0

Dalsze postępowanie jak opisano wyżej.

Wykres kalibracyjny sporządzić w układzie: zależność różnicy
absorpcji $A_1 - A_2$ od stężenia rodanków.

A_1 - absorpcja próby przed dodaniem azotanu rtęci

A_2 - " " po dodaniu azotanu rtęci

Obliczenie wyników

Stężenie rodanków w próbce odczytujemy z wykresu kalibracyjnego
przeliczając na objętość moczu 1000 ml.

Interpretacja wyników

Rodanki w moczu mogą występować u osób palących papierosy.

Stężenia te kształtują się następująco:

osoby niepalące - zero

palacze - około 1,0 mg/l

nałogowi palacze - do 10,0 mg/l

OZNACZANIE CHROMU W MOCZU

Zasada metody: oznaczanie polega na przeprowadzeniu związków chromu w chrom III-wartościowy /aby zapobiec tworzeniu się w czasie mineralizacji lotnego chlorku chromylu/, a dopiero bezpośrednio przed pomiarem przeprowadza się w chrom VI-wartościowy, który tworzy barwny związek kompleksowy z dwufenylokarbazydem.

Odczynniki

1. Kwas azotowy stężony cz.d.a.
2. 0,5 N kwas siarkowy: 14,0 ml kwasu siarkowego stężonego /c.wł. 1,84/ zmieszać z 200 ml wody destylowanej, uzupełnić objętość do 1000 ml.
3. 30% roztwór nadtlenku wodoru cz.d.a.
4. Nadmanganian potasu cz.d.a. in subst.
5. 5% wodny roztwór azydku sodu: 5,0 g azydku sodu rozpuścić w wodzie destylowanej i uzupełnić do objętości 100 ml.
6. 0,25% roztwór dwufenylokarbazydu: 4,0 g bezwodnika kwasu ftałowego rozpuścić w 70 ml alkoholu etylowego i zmieszać z roztworem dwufenylokarbazydu w alkoholu /0,25 g/20 ml alkoholu/ uzupełnić alkoholem do objętości 100 ml.
7. Roztwór podstawowy chromu: 0,283 g $K_2Cr_2O_7$ cz.d.a. rozpuścić w 1000 ml wody destylowanej. 1 ml roztworu zawiera 0,1 mg Cr.
8. Roztwór wzorcowy o stężeniu chromu 10 ug/ml przygotowuje się przez rozcieńczenie 10 ml roztworu podstawowego /7/ wodą destylowaną do objętości 100 ml.

Postępowanie

50 ml moczu umieścić w kolbie Kjeldahla o objętości 100 ml.



Dodać 10 kropli 30% roztworu nadtlenku wodoru /3/ i 2,5 ml stężonego kwasu azotowego /1/. Próbę odstawić na 30 minut. Następnie dodać 7 ml stężonego kwasu azotowego i ogrzewać aż do odparowania płynu. Dodawać małymi porcjami kwas azotowy do chwili całkowitego spalenia. Ogrzewanie przerwać i dodać 2 ml stężonego kwasu azotowego. Ogrzewać ponownie przez 1-2 minut, a następnie dodać 10 ml wody destylowanej i kontynuować ogrzewanie, aż do całkowitego jej odparowania. Suchą pozostałość rozpuścić w 20 ml 0,5 N roztworu kwasu siarkowego /2/. Po wymieszaniu dodać 3 krople nasyconego roztworu nadmanganianu potasu i ogrzewać na łaźni wodnej przez 25 minut. Po zdjęciu z łaźni wodnej dodać kilka kropli roztworu wodnego azydku sodu /5/. Zawartość kolby oziębić i przenieść do kolbki na 25 ml. Dodać 2 ml roztworu dwufenylokarbazydu i zawartość kolbki uzupełnić wodą destylowaną do kreski. Wymieszać i odczytać absorpcję przy dł fali 540 nm w stosunku do próby zerowej.

Próbie zerową przygotować przez zmieszanie 20 ml 0,5 N roztworu kwasu siarkowego /2/ i 2 ml roztworu dwufenylokarbazydu, uzupełniając objętość wodą destylowaną do 25 ml.

Przygotowanie wykresu kalibracyjnego

Przygotować następujące rozcieńczenia wzorców dodawanych do moczu osób nienarażonych na związki chromu:

Roztwór wzorcowy /ml/	0	0,1	0,4	0,8	1,2	1,6
Mocz /ml/	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0
Stężenie Cr w próbce /ug/	0	1,0	4,0	8,0	12,0	16,0

Po zmieniarnalizowaniu moczu dalsze postępowanie jak opisano wyżej.

Wykres kalibracyjny sporządzić w układzie: zależność absorpcji od stężenia chromu w próbce.

Obliczanie wyników

Z wykresu kalibracyjnego uzyskuje się stężenie chromu w objętości próby badanej /50 ml/. Uzyskaną wartość z wykresu mnożymy przez 20 i wynik podajemy w stężeniu na 1000 ml moczu.



OZNACZANIE ALKOHOLU ETYLOWEGO WE KRWI

Zasada metody: Reakcja jest oparta na redukcji dwuchromianu $/Cr^6/$ do jonów chromu III-wartościowego, co pociąga za sobą zmianę barwy z pomarańczowej na zieloną.

Odczynniki

1. Nasycony roztwór węglanu potasu
2. Roztwór dwuchromianu potasu: 3,7 g $K_2Cr_2O_7$ rozpuścić w 150 ml wody destylowanej, a następnie dodawać bardzo ostrożnie 280 ml stężonego kwasu siarkowego i chłodząc dopełnić wodą destylowaną do objętości 650 ml.
3. 2% roztwór szczawianów: 1,2 g szczawianu amonu i 0,8 g szczawianu potasu rozpuścić w wodzie destylowanej i uzupełnić objętość do 100 ml; 0,2 mililitrowe porcje przelewać do buteleczek o pojemności 10 ml i zawartość odparować w temperaturze 37° .
4. Roztwór wzorcowy alkoholu etylowego 1%: 1,26 ml alkoholu etylowego absolutnego rozcieńczyć wodą destylowaną do objętości 100 ml.

Postępowanie

a/ Pobranie krwi: krew pobiera się z żyły łokciowej w ilości 2 ml po uprzednim odkażeniu skóry 0,1% roztworem oksycyjanu rtęci. Naczynko ze szczawianami, do którego przelewamy krew szczelnie zamknąć korkiem, ewentualnie pokryć warstwą parafiny. Przechowywać próbę w lodówce.

b/ Oznaczanie: do części środkowej naczynka Conway'a wlać 2 ml 2 ml roztworu dwuchromianu $/2/$, a do części zewnętrznej 0,8 ml

krwi i 1 ml nasyconego roztworu węglanu potasu /1/. Brzegi naczynka smaruje się wazeliną. Po wymieszaniu zawartości naczynko przykryć i odstawić na 2 godziny w temperaturze pokojowej lub na 1 godzinę w temperaturze 37°.

Zmiana zabarwienia roztworu dwuchromianu z pomarańczowej na zieloną świadczy o obecności lotnych substancji redukujących /etanol, metanol, aldehyd mrówkowy, aldehyd octowy lub aceton/. Roztwór z części środkowej naczynka przenieść ilościowo do cylinderka. Środkową część naczynka przemyć kilkakrotnie wodą destylowaną. Roztwory połączyć z zawartością cylinderka i objętość uzupełnić wodą do 15 ml. Równolegle przygotować próbę kontrolną: uzupełniając objętość 2 ml roztworu dwuchromianu /2, do 15 ml wodą destylowaną.

Dokonać odczytów absorpcji próby badanej /A₁/ i próby zerowej /A₂/ w stosunku do wody.

Przygotowanie wykresu kalibracyjnego

Przygotować następujące rozcieńczenia wzorców:

Roztwór wzorcowy etanolu /4/ /ml/	0,1	0,2	0,3	0,4
Krew /ml/	0,7	0,6	0,5	0,4
Stężenie etanolu /mg%/	100	200	300	400

Dalsze postępowanie jak opisano wyżej. Wykres kalibracyjny sporządzić w układzie: zależność różnicy absorpcji A₂ - A₁ od stężenia wzorców etanolu. /A₂ - absorpcja próby kontrolnej

A₁ - " " badanej/



Obliczenie wyników

Stężenie etanolu w próbce badanej odczytuje się z wykresu kalibracyjnego w mg%.



OZNACZANIE DWUFENYLOHYDANTOINY W SUROWICY

Zasada metody: oznaczanie dwufenylohydantoiny polega na pomiarze różnicy absorpcji mierzonej przy dł fali 235 i 260 nm, która jest proporcjonalna do stężenia.

Odczynniki

1. Chloroform cz.d.a.
2. 0,3 M roztwór fosforanu jednosodowego NaH_2PO_4 /
3. 0,1 M roztwór boranu sodu $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ / o pH 8,8
4. 0,05 M roztwór fosforanu sodu Na_3PO_4 / o pH 11,5
5. Roztwór wzorcowy dwufenylohydantoiny o stężeniu 6,0 mg%

Postępowanie

Do 2 ml surowicy dodać 1 ml roztworu 0,3 M fosforanu jednosodowego /2/ i 5,5 ml chloroformu w rozdzielaczu na 25 ml. Wytrząsać przez 5 minut, po czym oddzielić warstwę chloroformową. Następnie do 4 ml warstwy chloroformowej dodać 4 ml buforu boranowego /3/ i wytrząsać przez 2 minuty. Po rozdzieleniu warstw 3,5 ml roztworu chloroformowego ekstrahować 3 ml buforu fosforenowego /4/ przez 2 minuty, a następnie oddzielić fazę wodną przez wirowanie. Dokonać rejestracji widma absorpcyjnego w zakresie UV 200 - 300 nm w odniesieniu do buforu fosforenowego /4/.

Przygotowanie wykresu kalibracyjnego

Przygotować roztwory wzorcowe dwufenylohydantoiny w następujący sposób:



Roztwór wzorcowy /5/ /ml/	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
Woda destylowana /ml/	1,0	0,8	0,6	0,4	0,2	0
Surowica /ml/	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Roztwór fosforanu /2/ /ml/	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Stężenie dwufenylohydantoiny w próbie /ug/	0	12,0	24,0	36,0	48,0	60,0

Dalsze postępowanie jak opisano wyżej.

Wykres kalibracyjny sporządzić w układzie: zależność różnicy absorpcji $A_{235} - A_{260}$ od stężenia dwufenylohydantoiny w próbie.

Obliczanie wyników

Obliczenie wykonuje się na podstawie niżej podanego wzoru:

$$c \text{ mg\%} = \frac{C \times 3 \times 100}{2}$$

gdzie: C - stężenie dwufenylohydantoiny w próbie odczytane z wykresu kalibracyjnego

Uwaga: w przypadku obecności w surowicy obok dwufenylohydantoiny, barbituranów /luminal/ należy zmierzoną różnicę absorpcji obniżyć o wartość 0,04.



OZNACZANIE ARSENU W MOCZU

Zasada metody: arsen pod wpływem wodoru in statu nascendi ulega redukcji do arsenowodoru, który w pirydynowym roztworze dwuetylodwutiokarbaminianu srebra daje czerwone zabarwienie.

Odczynniki

1. Kwas siarkowy stężony cz.d.a.
2. Kwas solny stężony cz.d.a /wolny od As/
3. Kwas azotowy stężony cz.d.a.
4. Nasycony roztwór szczawianu amonu
5. 15% roztwór jodku potasu: 15,0 g KJ rozpuścić w wodzie destylowanej i uzupełnić objętość do 100 ml.
6. 40% roztwór chlorku cynawego w stężonym kwasie solnym: 40,0 g SnCl_2 rozpuścić w stężonym kwasie solnym i uzupełnić objętość do 100 ml.
7. Cynk w granulach /wolny od As/
8. Wata nasycona roztworem octanu ołowiu: 10,0 g octanu ołowiewego rozpuścić w niewielkiej ilości wody, dodać 20,0 g gliceryny i dopełnić wodą do objętości 100 ml. Watę nasyconą tym roztworem osuszyć w średniej temperaturze i przechowywać w szczelnie zamkniętym naczyniu.
9. 0,5% roztwór dwuetylodwutiokarbaminianu srebra w redestylowanej pirydynie: 0,5 g dwuetylodwutiokarbaminianu srebra rozpuścić w pirydynie uzupełniając objętość do 100 ml.
/Przygotowanie dwuetylodwutiokarbaminianu srebra: zmieszać równe objętości: 2,25% wodny roztwór dwuetylodwutiokarbaminianu sodu i 1,7% wodny roztwór azotanu srebra. Mieszanina winna być oziębiona do temperatury poniżej 20° , aż do chwili



zdekantowania żółtego osadu, który przemywa się wodą i osusza w eksykatorze próżniowym/.

10. Roztwór podstawowy arseninu sodu: 0,1920 g As_2O_3 rozpuszczonego w 1 ml 10% roztworu wodorotlenku sodu i dopełnić do objętości 500 ml wodą destylowaną.
11. Roztwór wzorcowy o stężeniu As 10 ug/ml: 5,0 ml roztworu podstawowego /10/ rozcieńczyć w kolbie miarowej wodą destylowaną do objętości 100 ml.

Postępowanie

50 ml moczu umieścić w kolbie Kjeldahla i dodać 15 ml kwasu azotowego stężonego /3/, 5 ml stężonego kwasu siarkowego /1/ i pozostawić na godzinę. Następnie powoli ogrzewać. Po zmniejszeniu do małej objętości dodać 5 ml stężonego kwasu azotowego i ponownie ogrzewać. Dodawanie kwasu azotowego powtarza się kilkakrotnie, aż do uzyskania bezbarwnej pozostałości. Po ostudzeniu dodać 10 ml wody destylowanej i 5 ml nasyconego roztworu białego amonu /4/. Następnie ogrzewać aż do ukazania się białego oparów kwasu siarkowego. Po ostudzeniu przenieść ilość do kolby miarowej na 25 ml i dopełnić wodą do objętości 25 ml. Pobrać 5 ml roztworu, który przenieść do kolby aparatu /przerycina/ i dodawać kolejno: 15 ml wody destylowanej, 2 ml nasyconego kwasu solnego /2/, 2 ml jodku potasu /5/ i 5 ml roztworu chlorku cynawego /6/. Po wymieszaniu odstawić na 15 minut. Po rurki aparatu wkłada się watę nasaloną octanem ołowiu, a do odbieralnika wlewa 3 ml pirydynowego roztworu dwustyrodwuchloru minianu srebra /9/.

Po ustawieniu aparatury wrzucić do kolbki około 3 granulek opalku metalicznego wolnego od arsenu i przez godzinę pochłaniać wydzielany arsenowodór. Wydzielanie arsenowodoru winno być równo-

mierne i niezbyt wolne w szczególności na początku reakcji. W momencie ustania wydzielania się arsenowodoru dodaje się kilka kropli kwasu solnego. Natężenie zabarwienia mierzy się przy dł fali 560 nm.

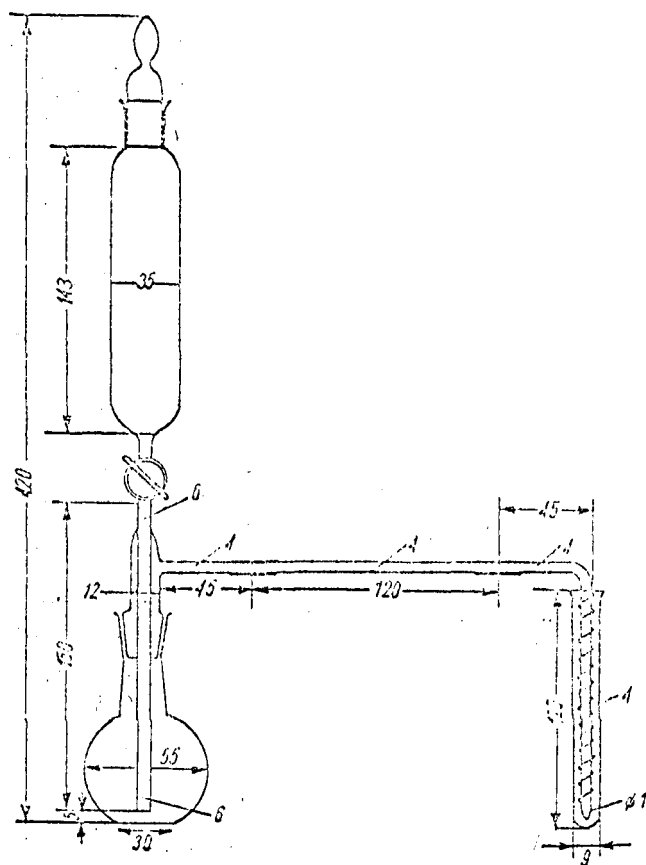
Przygotowanie wykresu kalibracyjnego

Do kolby aparatu dodaje się kolejno wzrastające objętości roztworu wzorcowego arsenu /11/ odpowiadające ilości As od 0,5 - 15,0 µg. Każdorazowo objętość rozcieńczyć wodą destylowaną do 20 ml i postępować dalej identycznie jak w przypadku próby badanej. Wykres kalibracyjny sporządzić w układzie: zależność absorpcji od stężenia arsenu w próbce badanej.

Obliczanie wyników

Stężenie arsenu w próbce badanej odczytuje się z wykresu kalibracyjnego. Wynik przelicza się na stężenie arsenu w moczu w mg% względnie w mg/litr.





Zestaw do oznaczania arsenu /wg Dutkiewicza i wsp./



OZNACZANIE BARBITURANÓW W SUROWICY

Zasada metody: różnica absorpcji przy λ fali 260 /maksimum/ i 240 /minimum/ jest proporcjonalna do stężenia barbituranów.

Odczynniki

1. Chloroform cz.d.a.
2. 16% wodny roztwór chlorku amonu: 16,0 g chlorku amonu rozpuścić w wodzie destylowanej i uzupełnić do objętości 100 ml.
3. 1 N roztwór wodorotlenku sodu: 40,0 g NaOH rozpuścić w wodzie destylowanej i uzupełnić do objętości 1000 ml.
4. 3 N roztwór wodorotlenku sodu: 120,0 g NaOH rozpuścić w wodzie destylowanej i uzupełnić do objętości 1000 ml
5. Bufor fosforanowy o pH 7,3: 1,816 g KH_2PO_4 i 7,579 g Na_2HPO_4 rozpuścić w wodzie destylowanej i uzupełnić objętość do 1000 ml.
6. Roztwory wzorcowe barbituranów: przygotowuje się roztwory wzorcowe poszczególnych barbituranów wg niżej podanych zakresów:
 - 1 - 3 mg%: amobarbital, nembutal, dial
 - 1 - 4 mg%: weronal
 - 1 - 6 mg%: fenodorm, luminal

Postępowanie

Do 3 ml surowicy dodać 3 ml buforu fosforanowego /5/ i wytrząsać przez 3 minuty z 50 ml chloroformu. 40 ml warstwę chloroformu przesaczyć. Chloroform odparować, a suchą pozostałość rozpuścić w 7 ml wody destylowanej i ogrzewać na łaźni wodnej o temperaturze 70° , przez 2 minuty. Po ochłodzeniu do temperatury pokojowej odmierzyć po 1,5 ml roztworu do dwóch probówek.

Do pierwszej próbki dodać ponadto 0,1 ml roztworu chlorku amonu /2/ i 0,2 ml 1 N roztworu wodorotlenku sodu /3/. Do drugiej próbki dodać 0,3 ml 3 N roztworu wodorotlenku sodu /4/. Dokonać zapisu widma absorpcyjnego próby badanej /próbówka druga/ w stosunku do odnośnika /próbówka pierwsza/ w zakresie λ fal 200 - 300 nm.

Przygotowanie wykresu kalibracyjnego

Wykresy kalibracyjne należy przygotować dla poszczególnych barbituranów w zakresie stężeń: 1 - 3 mg% dla amobarbitalu, dialu i nembutalu; 1 - 4 mg% dla weronalu; od 1 - 6 mg% dla fanodormu i luminalu. Do 3 ml surowicy dodaje się odpowiednią objętość roztworu wzorcowego /6/ i stosuje się dalsze postępowanie jak opisano wyżej. Wykres kalibracyjny sporządza się w układzie: zależność różnicy absorpcji przy λ fali 260 i 240 nm $/\Lambda_{260} - \Lambda_{240}/$ od stężenia barbituranu.

Obliczanie wyników

Stężenie barbituranu w próbce badanej odczytuje się z wykresu kalibracyjnego odpowiedniego barbituranu.

Uwaga: Jeżeli obok barbituranów występuje glikid absorpcję próby należy odczytywać po upływie 20 minut od chwili dodania odczynników /jest to czas wymagany dla całkowitej hydrolizy glikidu/.



OZNACZANIE RTECI W MOCZU

Zasada metody: jony rtęci dają barwny związek kompleksowy z dwufenylotiokarbazonem /ditizon/

Odczynniki

1. Kwas siarkowy stężony cz.d.a.
2. 1 N roztwór kwasu siarkowego
3. Nadmanganian potasu in subst.
4. Kwas szczawiowy in subst.
5. Chlorowodorek hydroksylaminy in subst.
6. Roztwór wodny czerwieni krezolowej
7. 10% roztwór wodorotlenku sodu
8. Roztwór dwufenylotiokarbazonu /ditizon/ w chloroformie:
40 ml chloroformowego roztworu ditizonu o stężeniu 12 mg/l rozcieńczyć chloroformem do objętości 100 ml bezpośrednio przed użyciem.
9. Podstawowy roztwór rtęci: 0,0216 g tlenku rtęciowego rozpuścić w 100 ml 1 N roztworu kwasu siarkowego /2/.
10. Wzorcowy roztwór rtęci o stężeniu 2 ug/ml: 1 ml podstawowego roztworu rtęci /9/, bezpośrednio przed użyciem, uzupełnić do objętości 100 ml 1 N roztworem kwasu siarkowego /2/.

Postępowanie

50 ml moczu wlać do kolbki stożkowej na 250 ml i dodać 5 ml kwasu siarkowego stężonego /1/, po czym w otwór kolby wstawia się lejek szklany służący jako chłodnica zwrotna i kolbę umieszcza na wrzącej łaźni wodnej. Następnie dodawać małymi porcjami sproszkowany nadmanganian potasu /3/, aż do całkowitego odbarwienia roztworu. Nadmiar nadmanganianu potasu usuwa się dodając niewielką ilość kwasu szczawiowego /4/. Tak zmineralizowany

mocz chłodzić i doprowadzić jego pH do wartości 1 dodając roztwór wodorotlenku sodu /7/, przy zastosowaniu jako wskaźnika czerwieni krezolowej /6/. Następnie dodać około 1,0 g chlorowodoru hydroksylaminy /5/ i po 5 minutach przenieść roztwór do rozdzielacza. Zawartość wytrząsać z niewielką objętością chloroformu. Po odrzuceniu warstwy chloroformowej dodawać po 1 ml roztworu ditizonu w chloroformie /8/. W przypadku obecności rtęci warstwa chloroformowa zmienia barwę na łososiową. Każdą porcję chloroformowego roztworu ditizonianu rtęci usuwa się z rozdzielacza i dodaje kolejno następne porcje roztworu ditizonu, tak długo aż przestanie się zmieniać zabarwienie ditizonu.

Ustalenie miana roztworu ditizonu

Do rozdzielacza zawierającego 40 ml 1 N roztworu kwasu siarkowego /2/ dodać 10 ml wzorcowego roztworu rtęci /10/, 1,0 g chlorowodoru hydroksylaminy. Doprowadzić pH do wartości 1, następnie miareczkować roztworem ditizonu. Ustalić liczbę mililitrów roztworu ditizonu, po dodaniu których utrzymywała się jeszcze barwa łososiowa. Obliczyć miano roztworu ditizonu.

Obliczanie wyników

Każdy mililitr zużytego ditizonu odpowiada w przybliżeniu 1 ug rtęci w próbie. Poprawkę wprowadzamy w wyniku dokładnego ustalenia miana roztworu ditizonu. Wynik podaje się w mg rtęci na litr moczu lub w przeliczeniu na objętość dobową moczu.



OZNACZANIE OŁOWIU W MOCZU

Zasada metody: ołów ekstrahowany jest w postaci czerwonego ditizonianu ołowiu i oznaczany kolorymetrycznie.

Odczynniki

1. Chloroform cz.d.a.
2. Roztwór ditizonu /dwufenyloctiokarbazon/: 500 ml chloroformu wytrząsnąć z 50 ml wody, zawierającej 0,5 g chlorowodoru hydroksylaminy, po zalkalizowaniu amoniakiem wobec czerwienie fenolowej. Chloroform oddzielić i rozpuścić w nim 6 mg ditizonu. Dodać 5 ml alkoholu etylowego absolutnego.
3. Roztwór cytrynianu sodu: 250,0 g cytrynianu sodu rozpuścić w wodzie destylowanej i uzupełnić do objętości 1000 ml.
Roztwór ten wytrząsać z roztworem ditizonu /2/, aż ten ostatni nie będzie zmieniał zabarwienia. Nadmiar ditizonu usuwa się przez wytrząsanie roztworu cytrynianu z chloroformem.
4. Roztwór chlorowodoru hydroksylaminy: rozpuścić 10,0 g chlorowodoru hydroksylaminy w małej ilości wody, przenieść do rozdzielacza, lekko zalkalizować amoniakiem i wytrząsać z roztworem ditizonu /2/, przemyć czystym chloroformem. Oddzielić fazę wodną do zlewki, zakwasić roztwór kwasem solnym. Następnie przez ogrzewanie usunąć resztki chloroformu, a roztwór uzupełnić do objętości 100 ml.
Roztwór cyjanku potasu: rozpuścić 50,0 g cyjanku potasu w 100 ml wody destylowanej i wytrząsać go z roztworem ditizonu /2/ w celu usunięcia ~~zanieczyszczeń~~ zanieczyszczeń ołowiem.
Rozpuszczony ditizon w roztworze wodnym usunąć przez kolejne



ekstrakcję chloroformem. Następnie roztwór cyjanku uzupełnić wodą destylowaną do objętości 500 ml.

6. Roztwór czerwieni fenolowej: 0,1 g czerwieni fenolowej rozetrzeć z 28,2 ml 0,01 N roztworu wodorotlenku sodu i rozcieńczyć wodą do objętości 250 ml.
7. Roztwór do ekstrakcji nadmiaru ditizonu: 5 ml stężonego amoniaku dodać do 5 ml roztworu cyjanku potasu /5/ i uzupełnić wodą do objętości 500 ml.
8. Podstawowy roztwór ołowiu: 1,5984 g azotanu ołowiu $\text{Pb}/\text{HNO}_3/2/$ rozpuścić w 1% kwasie azotowym i uzupełnić objętość tymże kwasem do objętości 1000 ml.
9. Wzorcowy roztwór ołowiu o stężeniu 0,01 mg/ml: 1 ml roztworu podstawowego /8/ rozcieńczyć do objętości 100 ml wodą destylowaną.

Postępowanie

50 ml moczu wlać do kolby Kjeldahla i dodać 5 ml stężonego kwasu siarkowego. Ogrzewać aż do chwili gdy zawartość kolby zocernieje i pojawią się białe dymy. Po ostygnięciu próby dodać 5 ml kwasu azotowego i ponownie ogrzewać aż do chwili gdy przestaną wydzielać się brunatne dymy. Próbę odstawić i z chwilą ostygnięcia dodać ponownie stężonego kwasu azotowego i ogrzewać. Postępowanie powtarza się tak długo, aż po kolejnym dodaniu kwasu azotowego i ogrzaniu próba ulegnie rozjaśnieniu, zółknie i staje się w końcu bezbarwna. Wtedy do kolby dodać 25 ml wody destylowanej i ogrzewać na małym płomieniu, aż do momentu rozpuszczenia się zawartości. Dodać 5 ml roztworu cytrynianu sodu /3/, 1 ml roztworu chlorowodoru hydroksylaniny /4/ i 1 kroplę roztworu czerwieni fenolowej /6/. Następnie dodając amoniaku doprowa-



dzić roztwór do pH = 9,5. Zawartość kolby przelać do rozdzielacza na 250 ml i dodać: 5 ml roztworu cyjanku potasu /5/, a następnie z biurety po 1 ml chloroformowego roztworu ditizonu /6/. Po każdej dodanej porcji ditizonu zawartość rozdzielacza wytrząsnąć i obserwować zabarwienie warstwy chloroformowej. Roztwór ditizonu dodawać tak długo, aż po jednominutowym wytrząsaniu warstwa chloroformowa przybierze zabarwienie lekko fioletkowe. Z drugiej biurety dodać wówczas taką objętość chloroformu, aby warstwa chloroformowa miała końcową objętość 10 ml. Po wytrząśnięciu i rozdzieleniu warstw przenieść warstwę dolną do drugiego rozdzielacza w którym znajduje się 20 ml roztworu do ekstrakcji /7/, wytrząsać przez dwie minuty. Warstwę chloroformową przenieść do probówki i mierzyć wartość absorpcji przy dł fali 510 nm w stosunku do chloroformu.

Próbie zerową przygotować w sposób opisany wyżej zastępując mocz wodą destylowaną.

Przygotowanie wykresu kalibracyjnego

Do kilku próbek moczu /50 ml/ dodać różne objętości wzorcowego roztworu ołowiu /9/, tak aby stężenie ołowiu w poszczególnych próbach wahało się w granicach 2 - 10 ug.

Dalsze postępowanie jak w przypadku próby badanej. Wykres kalibracyjny sporządzić w układzie: zależność absorpcji od stężenia Pb w próbce badanej.

Obliczanie wyników

Stężenie ołowiu w próbce badanej obliczamy wg wzoru:

$$\text{Pb ug/l} = \frac{A_p - A_o}{a} \cdot 20$$

gdzie: A_o - absorpcja próby zerowej; A_p - absorpcja próby badanej
 a - współczynnik kalibracji

OZNACZANIE PRODUKTÓW PRZEMIANY ANILINY I ACENOLU W MOCZU

Zasada metody: pomiar oparty jest na oznaczaniu p-aminofenolu w moczu, który w środowisku amoniakalnym daje z fenolem połączenie barwne.

Odczynniki

1. Kwas solny stężony cz.d.a.
2. 5% wodny roztwór fenolu: 5,0 g fenolu rozpuścić w wodzie i uzupełnić objętość do 100 ml
3. Roztwór amoniaku stężony cz.d.a.
4. Wzorcowy roztwór p-aminofenolu: 100 mg p-aminofenolu cz.d.a. rozpuścić w 3 ml stężonego kwasu solnego, po czym uzupełnić objętość do 100 ml wodą destylowaną.

Postępowanie

Do 10 ml moczu dodać 5 ml stężonego kwasu solnego /1/ i ogrzewać na wrzącej łaźni wodnej przez pół godziny. Roztwór sączyć do kolbki na 100 ml i objętość uzupełnić wodą destylowaną. 2 ml roztworu mieszać z 5 ml wody destylowanej i dodać 1 ml roztworu fenolu /2/ i 2 ml roztworu amoniaku /3/. Mieszać i pozostawić przez 30 minut. Pomiaru absorpcji dokonać przy dł fali 620 nm w stosunku do próby zerowej, w której w miejsce moczu badanego dodaje się mocz osoby nienarażonej na kontakt z aniliną i jej pochodnymi.



Przygotowanie wykresu kalibracyjnego:

Przygotować następujące rozcieńczenia wzorców p-aminofenolu:

Roztwór wzorcowy /4/ /ml/	0	0,1	0,3	0,5	0,7	1,0	1,5
Mocz /ml/	10	10	10	10	10	10	10
Kwas solny stęż. /1/ /ml/	5	5	5	5	5	5	5
Stężenie p-amino- fenolu w mg/l	0	10	30	50	70	100	150

Dalsze postępowanie jak opisano wyżej.

Wykres kalibracyjny sporządzić w układzie: zależność absorpcji od stężenia p-aminofenolu w próbce badanej.

Obliczanie wyników

Stężenie p-aminofenolu oblicza się na podstawie wzoru:

$$\text{p-aminofenol mg/l} = 5 \times C$$

gdzie: C - stężenie p-aminofenolu w próbce badanej odczytane z wykresu kalibracyjnego.



OZNACZANIE SULFONAMIDOW WE KRWI

Zasada metody: sulfonamidy ulegają dwuazowaniu i sprzęganiu z chlorowodorkiem N-1-naftyloetylenodwuaminy na barwne połączenie.

Odczynniki

1. 15% roztwór kwasu trójchlorooctowego: 15,0 g kwasu trójchlorooctowego rozpuścić w wodzie i uzupełnić objętość do 100 ml.
2. 0,1% roztwór wodny azotyny sodu: przygotowuje się ex tempore przez 10-krotne rozcieńczenie 1% roztworu azotynu sodu.
3. 0,5% roztwór wodny amonu amidosulfonianu: 0,5 g amonu amidosulfonianu rozpuścić w wodzie i uzupełnić objętość do 100 ml.
4. 0,1% roztwór wodny chlorowodoru N-1-naftyloetylenodwuaminy.

Postępowanie

Do probówki wirowniczej odmierzyć 7,5 ml wody destylowanej i 0,5 ml krwi pobranej na szczawiany. Zawartość dobrze wymieszać i odstawić na 10 minut. Dodać 2 ml 15% kwasu trójchlorooctowego /1/ wymieszać i po 5 minutach wirować przez 5 minut. 5 ml płynu z nad osadu zmieszać z 0,5 ml świeżo przygotowanego 0,1% roztworu azotynu sodu /2/ i po 3 minutach dodać 0,5 ml roztworu amonu amidosulfonianu /3/. Zawartość starannie wymieszać i następnie po 2 minutach odmierzyć 0,5 ml roztworu chlorowodoru N-1-naftyloetylenodwuaminy /4/.

Dokładnie po 2 minutach dokonać odczytu absorpcji przy dł fali 545 nm w stosunku do próby zerowej, którą przygotowuje się z 4 ml wody destylowanej i 1 ml kwasu trójchlorooctowego z dodaniem wszystkich odczynników jak w próbie badanej.

Przygotowanie wykresu kalibracyjnego^{x/}

Przygotować roztwór podstawowy o stężeniu 100 mg% rozpuszczając 500 mg sulfatiazolu w 0,1 N roztworze kwasu solnego i dopełnić wodą destylowaną do objętości 500 ml. Z tego roztworu podstawowego przygotować roztwory wzorcowe o stężeniu 1 - 20 mg% rozcieńczając roztwór podstawowy wodą destylowaną. Do próbek krwi o objętości 0,5 ml dodać 0,5 ml roztworu wzorcowego o stężeniu 1, 3, 5, 7, 10 i 20 mg%. Objętość uzupełnić wodą destylowaną do 8 ml, a następnie dodać wszystkie odczynniki jak podano wyżej. Odczytu absorpcji dokonać w stosunku do próby zerowej sporządzonej jak próba badana zastępując krew wodą.

Wykres kalibracyjny sporządzić w układzie: zależność absorpcji od stężenia sulfatiazolu w próbce badanej.

Obliczanie wyników

Z wykresu kalibracyjnego odczytuje się stężenie sulfonamidu w mg%.

x/

dla różnych sulfonamidów przygotowuje się różne wykresy kalibracyjne.



OZNACZANIE SALICYLANÓW W SUROWICY

Zasada metody: kwas salicylowy z jonem żelazowym tworzy połączenie o zabarwieniu fioletowym.

Odczynniki

1. Odczynnik Trindera: 40,0 g $\text{Fe/NO}_3/3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$, 4,0 g HgCl_2 i 12 ml 1 N roztworu kwasu solnego rozpuścić w wodzie destylowanej i uzupełnić objętość do 100 ml. Odsączyć.
2. Roztwór wzorcowy kwasu salicylowego o stężeniu 10 mg%.
100 mg kwasu salicylowego lub 116 mg salicylanu sodu rozpuścić w wodzie destylowanej i uzupełnić objętość do 1000 ml.

Postępowanie

0,5 ml surowicy dodać do 4,5 ml wody destylowanej, wymieszać i dodać równą objętość odczynnika Trindera. Odstawić na 5 minut odwirować, względnie przesączyć. Odczytać absorpcję płynu z nad osadu lub przesączu przy dł fali 540 nm w stosunku do próby zerowej. Próbę zerową przygotowuje się przez zmieszanie równych objętości odczynnika Trindera i wody.

Przygotowanie wykresu kalibracyjnego

Odmierzyć roztwór wzorcowy /2/ w następujących objętościach:

1, 2, 3, 4, 5 i 6 ml dodać 1 ml surowicy i uzupełnić wodą destylowaną do 10 ml. Zmieszać równe objętości roztworu i odczynnika Trindera /1/. Odczytać absorpcję w stosunku do próby zerowej.

Wykres kalibracyjny wykonać w układzie: zależność absorpcji od stężenia salicylanu w próbce.

Obliczanie wyników

Stężenie salicylanów w mg% odczytuje się z wykresu kalibracyjnego.

OZNACZANIE METABOLITÓW WODZIANU CHLORALU W MOCZU

Zasada metody: pomiar oparty jest na oznaczeniu kwasu trójklorooctowego reakcją Fujiwary.

Odczynniki

1. Pirydyna redestylowana
2. 20% roztwór wodorotlenku sodu: 20,0 g NaOH rozpuścić w wodzie destylowanej i uzupełnić do objętości 100 ml.
3. Roztwór podstawowy kwasu trójklorooctowego: 0,1 g wysuszonego kwasu trójklorooctowego rozpuścić w 100 ml wody destylowanej.
4. Roztwór wzorcowy o stężeniu 100 $\mu\text{g/l}$ otrzymuje się przez rozcieńczenie 10-krotne roztworu podstawowego /3/

Postępowanie

2 ml moczu zalkalizować dodając 5 ml roztworu wodorotlenku sodu /2/ i po wymieszaniu dolać 8 ml pirydyny. Zawartość probówki dobrze wymieszać. Po zamknięciu probówki korkiem umieścić ją na łaźni wodnej o temperaturze 70° na okres 15 minut. Po ochłodzeniu pod bieżącą wodą odmierzyć 7,5 ml warstwy pirydynowej i zmieszać z 3 ml wody destylowanej. Odczytać absorpcję w stosunku do próby zerowej przy λ fali 530 nm.

Próbę zerową otrzymuje się zastępując w postępowaniu powyższym mocz wodą destylowaną.



Przygotowanie wykresu kalibracyjnego

Przygotować następujące rozcieńczenia wzorców:

Roztwór wzorcowy /4/ /ml/	0	0,2	0,4	0,7	1,0	1,5	2,0
Woda destylowana /ml/	2,0	1,8	1,6	1,3	1,0	0,5	0
Roztwór NaOH /2/ /ml/	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Stężenie kwasu trójklorooctowego w próbce /ug/	0	20,0	40,0	70,0	100,0	150,0	200,0

Dalsze postępowanie jak opisano wyżej.

Wykres kalibracyjny sporządzić w układzie zależność absorpcji od stężenia kwasu trójklorooctowego.

Obliczanie wyników

Wynik oblicza się na podstawie wzoru:

$$C_{\text{ kwasu}} = \frac{a \times 1000}{2}$$

gdzie: a - zawartość kwasu trójklorooctowego w próbce odczytana z wykresu kalibracyjnego

C - stężenie kwasu trójklorooctowego w mg/l moczu.



PISMIENNICTWO

1. Oznaczanie glikolu etylenowego w surowicy:
E.W.Russel, L.Goldberg: *Fd.Cosmet.Toxicol.* 7, 107, 1969
w modyfikacji W.Bolanowskiej: *Chemia Analityczna* 20, 413, 1975
2. Oznaczanie fluorków w moczu:
A.Ciosek i współautorzy: *Medycyna Pracy* 6, 585, 1972
3. Oznaczanie meprobamatu w surowicy
Allgen i wsp.: *Svensk Läkartidning* 31, 2113, 1959
4. Oznaczanie glimidu w surowicy
D.W.Dain, T.D.Trainer: *Clin.Chem.* 16, 318, 1970
5. Oznaczanie hydrazydu kwasu izonikotynowego w moczu
Wolenberg: *Klin.Wschr.* 30, 906, 1952
6. Oznaczanie alkoholu metylowego we krwi
K.Antczak: *Diagnostyka Laboratoryjna* 10, 457
7. Oznaczanie elenium w surowicy
L.O.Randall i V.Iliev: cyt. za:
A.Stolman: *Progress in Chemical Toxicology*, Academic Press,
New York - London, vol. I, 1963
8. Wykrywanie fenacetyny w moczu
G.Ahrens: *Die Urinanalyse*, J.A. Barth - Leipzig, 1966
9. Wykrywanie imipraminy w moczu
A.Stolman: *Progress in Chemical Toxicology*, Academic Press
New York - London, vol. I, 1963
10. Oznaczanie rodanków w moczu:
T.Dutkiewicz i wsp. *Chemiczne badania materiału biologicznego
w toksykologii przemysłowej*, PZWL, W-wa, 1964

11. Oznaczanie chromu w moczu

T. Dutkiewicz i wsp.: Chemiczne badania materiału biologicznego w toksykologii przemysłowej, PZWL, W-wa, 1964.

12. Oznaczanie alkoholu etylowego we krwi

J.Hanke, K.Antczak, H.Kieres: Badania laboratoryjne w zatruciach /materiały na prawach skryptu, Łódź, 1970/

13. Oznaczanie dwufenylohydantoiny w surowicy

1. O.Vendelin Olsen: Scand.J.Clin.Lab.Invest. 20, 63, 1967
 2. Ole Svensmark i wsp.: Acta Pharmacol.et Toxicol.16,331,1960
- w adaptacji H. Kieresia - praca niepublikowana

14. Oznaczanie arsenu w moczu

Vasak V., Sedivec V.: Chem.listy 46, 341, 1952

w adaptacji H. Kieresia - praca niepublikowana

15. Oznaczenie barbituranów w surowicy

D.W.Dain, T.D. Trainer: Clin.Chem. 16, 318, 1970

w adaptacji H. Kieresia - praca niepublikowana

16. Oznaczanie rtęci w moczu

T. Dutkiewicz i wsp.: Chemiczne badania materiału biologicznego w toksykologii przemysłowej PZWL, W-wa, 1964

17. Oznaczanie ołowiu w moczu

T.Dutkiewicz i wsp.: Chemiczne badania materiału biologicznego w toksykologii przemysłowej, PZWL, W-wa, 1964

18. Oznaczanie produktów przemiany aniliny i acenolu w moczu

T.Dutkiewicz i wsp.: Chemiczne badania materiału biologicznego w toksykologii przemysłowej, PZWL, W-wa, 1964.



19. Oznaczanie sulfonamidów we krwi

A.C.Bratton, E.K.Marshall - J.Biol.Chem. 128, 537, 1939

20. Oznaczanie salicylanów w surowicy

L. Tomaszewski: Mikrometody Biochemiczne w Laboratorium
Klinicznym, PZWL, W-wa, 1964

21. Oznaczanie metabolitów wódzianu chloralu w moczu

T. Dułkiewicz i wsp.: Chemiczne badania materiału biologicznego
w toksykologii przemysłowej, PZWL, W-wa, 1964



MATERIAŁY DLA LABORATORIÓW TOKSYKOLOGICZNYCH

pod redakcją Doc. dr hab. J. Hanke

Hanna Radzikowska

POSTĘPOWANIE IDENTYFIKACYJNE METODĄ CHROMATOGRAPHII
GAZOWEJ W PRZYPADKU ZATRUĆ NIEKTORYMI ROZPUSZCZALNIKAMI
ORGANICZNYMI

Część IV

INSTYTUT MEDYCyny PRACY w ŁODZI

1 9 7 6



W s t ę p

W ostatnich latach, w związku ze zwiększoną chemizacją kraju, wzrosła liczba zatruć różnymi substancjami chemicznymi, wśród nich także lotnymi związkami organicznymi. Związki te znajdują bowiem obecnie szerokie zastosowanie jako środki czystościowe w gospodarstwie domowym oraz jako substancje do wywabiania plam z odzieży.

Lotne związki organiczne wprowadzone do ustroju, w sposób przypadkowy lub w celach samobójczych, nawet w przypadku dość znacznej ich dawki, nie są łatwe do zidentyfikowania w materiale biologicznym / krew, mocz / osoby zatrutej. Wynika to z faktu, że znaczny odsetek substancji, po jej przeniknięciu do krwi, zostaje wydalać wraz z powietrzem wydechowym. Pozostała we krwi substancja ulega przetworzeniu na drodze przemian biochemicznych.

Powstałe w ten sposób "rodniki" organiczne, w przypadku wielu substancji np. czterochlorku węgla, wiążą się tak silnie ze składnikami ustrojowymi, że nie przenikają do moczu. Dlatego jak materiał analityczny stosuje się głównie krew i powietrze wydechowe pacjenta.

Metody analityczne, dla identyfikacji lotnych związków organicznych, muszą być bardzo czułe i wysoce swoiste. Taką metodą jest chromatografia gazowa. Umożliwia ona w sposób szybki i pewny identyfikację nieznaną związków na podstawie ich indeksów retencji lub też w wyniku stwierdzenia jednorodności piku substancji badanej i wzorca. W niektórych przypadkach wskazane jest potwierdzenie zgodności badanej substancji z wzorcem na podstawie widm spektrofotometrycznych, zarejestrowanych w podczerwieni.

Metoda chromatografii gazowej umożliwia w niektórych przypadkach



określenie stężenia lotnej substancji organicznej we krwi osoby zatrutej, co może być pomocne przy ocenie ciężkości zatrucia.

W przypadku wypicia nieznanej substancji toksycznej np. rozpuszczalnika, pewne wstępne informacje o przyczynie zatrucia można uzyskać analizując próbkę materiału dostarczoną wraz z chorym.

Opracowany system analizy, w oparciu o chromatografię gazową, umożliwia szybką identyfikację 31 rozpuszczalników, a także bardzo upraszcza bieg analizy dla oceny składu mieszaniny kilku rozpuszczalników.



Zasada metody

Opiera się na:

- 1/ znalezieniu wartości indeksu retencji Kovatsa
- 2/ stwierdzeniu identyczności piku badanej substancji i wzorca.

Aparatura

Można stosować dowolny chromatograf gazowy wyposażony w podwójny detektor płomieniowo-jonizacyjny. Dwie kolumny szklane lub metalowe. Kolumny wypełnia się fazami silikonowymi o różnej polarności. W stosowanej przez nas praktyce korzystano z chromatografu gazów firmy Varian 2100, wyposażonego w podwójny detektor płomieniowo-jonizacyjny oraz integrator elektroniczny Varian 485.

Dwie kolumny szklane o długości 3,6 m i średnicy 2 mm były wypełnione fazą silikonową niepolarną SE-30 10 % i polarną OV-17 10 % na nośniku Chromosorb W AW DMCS 80-100 mesh.

Dodatkowo stosowano trzecią kolumnę o długości 1,8 m i średnicy 2 mm wypełnioną Porapakem Q 80-100 mesh.

Stosowano strzykawki:

- a/ gazoszczelne z teflonowym tłokiem firmy Hamilton o pojemności 2,5 ml
- b/ mikrostrzykawki firmy Hamilton o pojemności 10 μ l.

Warunki pomiaru

Można stosować różne gazy nośne.

W naszym przypadku stosowano jako gaz nośny azot o prędkości przepływu 30 ml/min, oraz wodór o prędkości przepływu 30 ml/min powietrze: 300 ml/min.

Temperatury kolumn /SE-30, OV-17/ 100°C; 70°C;

Porapak Q 170°C

W warunkach powyższych czułość aparatu wynosiła 32×10^{-9} amp/mv

Postępowanie wstępne

Obliczanie wartości indeksu retencji Kovatsa /1,2,3,4/ dla substancji wzorcowych.

Indeks retencji danej substancji równy jest ilości atomów węgla hipotetycznej n-parafiny o tym samym zredukowanym czasie retencji co badana substancja, pomnożonej przez 100.

Zgodnie z definicją indeks retencji dla n-parafin jest taki sam, niezależnie od rodzaju fazy ciekłej i temperatury.

Wartość indeksów retencji Kovatsa dla substancji innych niż n-parafiny są różne, dla różnych faz ciekłych zależnie od ich polarności /5,6/.

a/ Obliczanie czasu martwego

Do butli o pojemności 1 litra zamkniętej membraną z gumy silikonowej wprowadza się po 5 ul n-heksanu, n-heptanu, n-oktanu i ogrzewa łaźni wodnej. 0,5 ml mieszaniny pobranej z butli wstrzykuje się na kolumnę.

Czas martwy kolumny / sek / oblicza się w oparciu o uzyskane całkowite czasy retencji z następującego wzoru / 7 /:

$$t_M = \frac{a c - b^2}{a + c - 2b}$$

gdzie: a - całkowity czas retencji n-heksanu

b - całkowity czas retencji n-heptanu

c - całkowity czas retencji n-oktanu

t_M - czas martwy kolumny

b/ Obliczanie zredukowanego czasu retencji

Zredukowany czas retencji t'_R / stanowi różnicę między całkowitym czasem retencji t_R / i czasem martwym t_M / dla danej kolumny:

$$t'_R = t_R - t_M$$

c/ Obliczanie wartości indeksu retencji określonej substancji:
Badany materiał nanosi się na kolumny i dokonuje się pomiaru całkowitego czasu retencji.

Następnie oblicza się wartości logarytmów zredukowanych czasów retencji wzorcowych węglowodorów alifatycznych i substancji badanej. Dla wzorcowych węglowodorów alifatycznych sporządza się wykres zależności logarytmów zredukowanych czasów retencji od ilości atomów węgla / ryc. 1 /.

W oparciu o wartość logarytmu zredukowanego czasu retencji substancji badanej odczytuje się z wykresu odpowiadającą jej wartość indeksu retencji.

Wartość indeksu retencji można również wyliczyć ze wzoru:

$$I = 100 z + 100 \frac{\log t'_{R/x/} - \log t'_{R/z/}}{\log t'_{R/z+1/} - \log t'_{R/z/}}$$

gdzie: x - analizowana substancja

z - n-parafina o "z" atomach węgla, o czasie retencji krótszym od czasu retencji substancji analizowanej

z+1 - n-parafina o "z+1" atomach węgla, o czasie retencji dłuższym od czasu retencji analizowanej substancji

t'_R - zredukowany czas retencji

I - indeks retencji badanej substancji

Uzyskane przez nas wartości indeksów retencji dla 31 lotnych substancji organicznych na aparacie Varian 2100 w wyżej opisanym warunkach zostały zebrane w tabelach I - III i mogą służyć jako wzór do przygotowania własnych odnośników.

Pierwszym etapem identyfikacji jest wyznaczenie indeksów retencji na kolumnach SE-30 i OV-17 w temp. 100°C. W przypadku uzyskania indeksów retencji ponad 700, dane te mogą stanowić podstawę identyfikacji / tabela I /. Dla związków o wartości indeksów retencji

od 515 do 700 celowe jest powtórzenie analizy w temp. 70°C / tabela II /.

Dla otrzymanych pików źle wykształconych, tworzących "ogony", o niskich wartościach indeksów retencji / metanol, etanol, aceton eter etylowy, izopropanol / konieczne jest przeprowadzenie analizy dodatkowej na kolumnie wypełnionej Porapakem Q /tabela III /.

Dodatkowe postępowanie identyfikacyjne

Do butli o pojemności 1 litra wprowadza się po 5 ul substancji wzorcowej i nanosi się łącznie z badaną próbą / przygotowanie patrz wyżej /. Warunkiem stwierdzenia identyczności jest uzyskanie jednorodnego pików na dwu kolumnach o różnej polarności.

Przygotowanie próbek materiału biologicznego

a/ Powietrze wydechowe pobiera się do woreczków aluminiowych powleczonych folią polietylenową / 8 /. Torebki te służą do jednorazowego użytku, co wyklucza możliwość kontaminacji.

2 ml powietrza z torebki nanosi się na kolumny przy pomocy strzykawki.

b/ 5 ml krwi pobiera się do 10-ml probówek z doszlifowanym korkiem zawierających 0,5 ml 2 % odczynnika szczawianowego / 1,2 g szczawianu amoniu i 0,8 g szczawianu potasu /. Wyodrębnienie badanego związku z krwi lub popłuczyn żołądkowych przeprowadza się metodą "heads space" /9,10,11 /. W tym celu 2 ml krwi lub 2 ml popłuczyn żołądkowych umieszcza się w kolbce okrągłodennej na 20 ml. Zamknięcie kolbki stanowi membrana z gumy silikonowej umocowana gwintowaną nakrętką / dobrą szczelność układu uzyskuje się stosując nakrętkę i gwinty firmy Quickfit /. Następnie dodaje się około 1 g chlorku sodowego i po zamknięciu kolbkę wytrząsa się przez 15 minut w temp. 60°C w łaźni wodnej. Na obie kolumny nanosi się po 2 ml powietrza pobranego z krwi.

Identyfikacja składników nieznanego rozpuszczalnika przy pomocy spektrofotometrii w podczerwieni

W przypadku gdy mamy do czynienia z mieszaniną kilku różnych rozpuszczalników możemy po ich rozdzieleniu techniką chromatografii gazowej dokonać pełnej identyfikacji rejestrując widma spektrofotometryczne w zakresie podczerwieni.

Aparatura

Chromatograf gazowy wyposażony w katarometr np. Giede 18.3
Kolumna metalowa o długości 3m i średnicy 4mm /lub podobna/,
wypełniona fazą silikonową polarną OV-17 3% na nośniku Chromosorb
W AW DMCS 80-100 mesh.

Spektrofotometr w zakresie podczerwieni np. AccuLab 6 f-my
Beckman.

Warunki pomiaru

Gaz nośny /wodór/ prędkość przepływu 20ml/min. Temperaturę
kolumny dobierać zależnie od badanego składnika, tak aby czas
od rozpoczęcia do zakończenia pików mieścił się w granicach
około 20 sekund.

Postępowanie

Fazy gazowe odpowiadające pojedynczym pikom pobiera się do kuwe
gazowej o długości 120mm i średnicy 12mm z okienkiem z bromku
potasu. Kuvetę podłącza się bezpośrednio u wylotu katarometru.
Po pobraniu próbki gazu kuvetę zamyka się i dokonuje rejestracji
widma w zakresie $4000 - 300 \text{ cm}^{-1}$ /2,5 - 40 μm /.

Uzyskane widmo porównuje się z widmem wzorcowym.



Oznaczanie ilościowe metanolu i etanolu we krwi metodą chromatografii gazowej /12 /

Metodę tą można stosować również dla oznaczania innych alkoholi / propanol, izopropanol / oraz acetonu.

Aparatura:

Chromatograf gazowy firmy Giede GCHF 18.3 wyposażony w detektor płomieniowo-jonizacyjny. Kolumna metalowa o długości 1 m i średnicy 4 mm wypełniona Porapakem Q 80-100 mesh.

Warunki pomiaru:

Prędkość przepływu azotu 60 ml/min

Prędkość przepływu wodoru 30 ml/min; powietrza 300 ml/min

Temperature kolumny 150°C

Temperature detektora 170°C, parownika 140°C

Czułość aparatu $10^9 \times 3$ oma

Odczynniki

Roztwór podstawowy metanolu 100 mg %

Roztwór podstawowy etanolu 500 mg %

Roztwór podstawowy izopropanolu 100 mg %

Sporządzenie krzywej kalibracyjnej

Do kolejnych probówek dodać roztwory wzorcowe metanolu, etanolu, oraz wody w następujących ilościach:

metanol /ml/	etanol /ml/	woda /ml/
0,2	0,2	1,6
0,4	0,4	1,2
0,6	0,6	0,8
0,8	0,8	0,4
1,0	1,0	0,0

Do kolejnych probówek dodać po 4 ml roztworu izopropanolu w wodzi / standardu wewnętrznego /.

Do komory nastrzykowej chromatografu gazowego wprowadzić kolejno po 1 ul poszczególnych roztworów wzorcowych. Po otrzymaniu chromatogramu zmierzyć wysokości pików metanolu, etanolu, izopropanolu. Następnie sporządzić krzywą kalibracyjną dla metanolu i etanolu, w oparciu o zależność pomiędzy stężeniem metanolu i etanolu, a stosunkiem wysokości pików tych związków do wysokości pików izopropanolu.

Postępowanie

Do 1 ml krwi pobranej na szczawiany dodać 2 ml roztworu wodnego alkoholu izopropylowego o stężeniu 100 mg %.

1 ul roztworu wprowadzić do komory nastrzykowej kolumny^{X/}.

Następnie obliczyć stosunki wysokości pików odpowiadających metanolowi i etanolowi do wysokości pików izopropanolu.

Na podstawie otrzymanych wartości, obliczyć z krzywej kalibracyjnej stężenie metanolu i etanolu we krwi.

X/ Uwaga - Dobre wyniki daje uwzględnienie następujących zaleceń

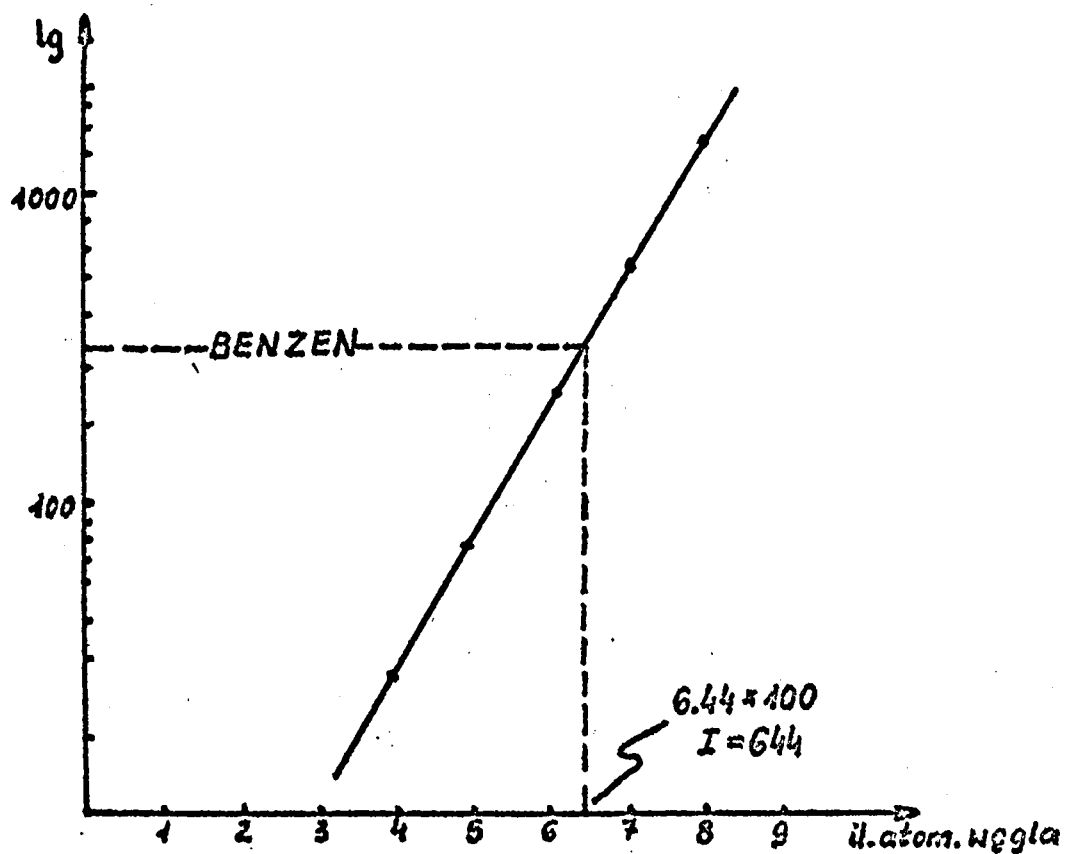
a/ strzykawkę, którą наносimy materiał na kolumnę kilkakrotnie przepłukać wodą destylowaną i pozostawić w strzykawce w bezpośrednim sąsiedztwie tłoka około 2 ul wody destylowanej

b/ następnie odciągnąć tłok wprowadzając do strzykawki około 2 ul powietrza

c/ naciągnąć 1 ul krwi, a następnie odciągnąć tłok tak, aby do strzykawki weszło dalsze 2 ul powietrza

d/ przed wprowadzeniem próbki na kolumnę przepłukać igłę strzykawki tak, aby nie dopuścić do zmieszania się wody z krwią

e/ woda w bezpośrednim sąsiedztwie tłoka w czasie wstrzykiwania próbki na kolumnę przepłukuje igłę chroniąc ją przed zaklejeniem s:



Ryc. 1 Przykład obliczania wartości indeksu retencji dla benzenu na podstawie szeregu homologicznego n-parafin przy stosowaniu fazy ciekłej Skwalanu



TABELA I

Wartości indeksów retencji dla kolumn
SE-30 i OV-17 w temp. 100°C

L.p.	Związek	SE-30	OV-17
1.	Propan	300	300
2.	Butan	400	400
3.	Metanol	401	494
4.	Etanol	454	553
5.	Aceton	495	625
6.	Eter etylowy	508	573
7.	Alkohol izopropylowy	512	595
8.	Dwuchlorometan	515	628
9.	Alkohol propylowy	557	639
10.	Heksan	600	600
11.	Chloroform	610	720
12.	Octan etylu	613	694
13.	Butanol	675	767
14.	Benzen	677	766
15.	Czterochlorek węgla	680	743
16.	Cykloheksan	683	720
17.	Trójchloroetylen	699	736
18.	Heptan	700	700
19.	Octan propylu	720	833
20.	1,4 Dioksen	723	858
21.	Alkohol izoamylowy	745	882
22.	Toluen	772	877
23.	Alkohol amylowy	795	902
24.	Oktan	800	800
25.	Czterochloroetylen	820	907
26.	Octan butylu	820	938
27.	Etylobenzen	867	976
28.	Ksylen	872	973
29.	Styren	892	1058
30.	Nonan	900	900
31.	Cykloheksanol	920	1050



TABELA II

Wartości indeksów retencji dla kolumn

SE-30 i OV-17 w temp. 70°C, Porapak Q w temp. 170°C

L.p.	Związek	SE-30	OV-17	Porapak Q
1.	Dwuchlorometan	499	624	488
2.	Alkohol propylowy	575	668	540
3.	Heksan	600	600	600
4.	Chloroform	609	707	580
5.	Octan etylu	640	691	596
6.	Butanol	655	753	637
7.	Benzen	657	760	627
8.	Czterochlorek węgla	663	731	625
9.	Cykloheksan	668	699	630
10.	Trójkloroetylen	690	783	640
11.	Hepten	700	700	700



TABELA III

Wartości indeksów retencji dla kolumny
Porapak Q w temp. 170°C

L.p.	Związek	Porapak Q
1.	Propan	300
2.	Butan	400
3.	Metanol	325
4.	Etanol	422
5.	Aceton	475
6.	Eter etylowy	505
7.	Izopropanol	499



P i ś m i e n n i c t w o

1. Ettre L.S., Chromatographia, 11, 489-495, 1973
2. Ettre L.S., Chromatographia, 5, 261-268, 1974
3. Kovats E., Helv. Chim. Acta 41, 1915, 1958
4. Kovats E., in Advances in Chromatography vol.1, Dekker M.,
Inc. New York 1965, 229-247
5. Mc Reynolds W.O., J. Chromatog. Sci. 8, 685, 1970
6. Rohrschneider L., J. Chromatog., 6, 22, 1966
7. Haeferkamp M. w Kalner R., Chromatographie in der Gasphase, t.1
Dunnschicht- und Dunnschichtkapillar-GC. 93, 1966
8. Bolanowska W., Gołacka J., Med. Pracy, 23, 109, 1972
9. Leach H., Jones O.P., Ann. Clin. Biochem., 8, 73, 1971
10. Machata G., Mikrochim. Acta 262, 1964
11. Wallace J.E., Dahl E.V., Am. J. Clin. Pathol., 46, 152, 1966
12. Sine H.E., McKenna M.J., Law M.R., Murray M.H., J. Chromatog.
Sci 10, 297-302, 1972

