

**Felicia Loghin
Daniela Popa
Bela Kiss
Rodica Anton**

ANALIZE ȘI EVALUĂRI TOXICOLOGICE

**Editura Medicală Universitară
„Iuliu Hațieganu”
Cluj-Napoca 2003**

© EDITURA MEDICALĂ UNIVERSITARĂ „IULIU HAȚIEGANU” CLUJ-NAPOCA

Felicia LOGHIN, Daniela POPA, Bela KISS, Rodica ANTON

ANALIZE ȘI EVALUĂRI TOXICOLOGICE

ISBN 973 – 8385 – 95 – 4

Toate drepturile asupra acestei ediții sunt rezervate Editurii Medicale Universitare „Iuliu Hațieganu”. Tipărit în România. Nici o parte din această lucrare nu poate fi reprodusă sub nici o formă, prin nici un mijloc mecanic sau electronic, sau stocată într-o bază de date fără acordul prealabil, în scris, al editurii.

Copyright © 2003

EDITURA MEDICALĂ UNIVERSITARĂ „IULIU HAȚIEGANU” CLUJ-NAPOCA

Referenți: Prof. Dr. MARIUS BOJIȚĂ
Conf. Dr. RADU OPREAN

EDITURA MEDICALĂ UNIVERSITARĂ „IULIU HAȚIEGANU” CLUJ-NAPOCA

Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca

3400 Cluj-Napoca, 13, Emil Isac str. Tel. + 40-64-197256, Fax: +40-64-196585

Director: Prof. Dr. Liviu Vlad

Tiparul executat la Tipografia Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu”
Cluj-Napoca, str. Moșilor 33, telefon: + 40-64-198701

PRINTED IN ROMÂNIA

CUPRINS

Capitolul 1	
ANALIZE TOXICOLOGICE: CLASIFICARE, ETAPE	1
1.1. Clasificarea analizelor toxicologice	1
1.2. Etapele unei analize toxicologice generale	16
Capitolul 2	
METODE DE ANALIZĂ TOXICOLOGICĂ SISTEMATICĂ	32
2.1. Metode de izolare pentru gaze și vapori	32
2.2. Metode de izolare a substanțelor toxice minerale	45
2.3. Metode de izolare a substanțelor toxice organice	51
Capitolul 3	
EVALUAREA TOXICOLOGICĂ A MEDICAMENTELOR	69
Partea experimentală	82
Determinarea dozei medii letale a DNOC	82
Testarea mutagenității substanțelor prin testul micronucleilor	89
Capitolul 4	
ANALIZA UNOR SUBSTANȚE TOXICE: FIȘE DE LUCRU	91
4.1. Identificarea unor substanțe toxice prin metode chimice	91
Identificarea alcoolului metilic	91
Identificarea alcoolului etilic	92
Identificarea formaldehidei	93
Identificarea acetonei	93
Identificarea fenolului	94
Identificarea anilinei	95
Identificarea acidului cianhidric	96
Identificarea arsenului	97
Identificarea cadmiului	98
Identificarea mercurului	99
Identificarea plumbului	99
Identificarea dinitro-o-crezolului	100
Identificarea aspirinei din medii biologice	101
Identificarea paracetamolului din medii biologice	102
Identificarea derivaților barbiturici din medii biologice	102
Identificarea benzodiazepinelor din medii biologice	103
Identificarea izoniazidei din medii biologice	104

Identificarea antideprinului din medii biologice	104
Identificarea fenotiazinelor din medii biologice	105
4.2. Identificarea unor substanțe toxice prin cromatografie în strat subțire	108
Identificarea alcaloizilor din pulberi ilicite prin CSS	108
Analiza toxicologică calitativă în cazul unei intoxicații cu substanțe necunoscute	110
4.3. Determinarea cantitativă a unor substanțe toxice din aer și din medii biologice	115
Analiza toxicologică a monoxidului de carbon	115
Determinarea cantitativă din aer prin metoda cu clorură de paladiu	115
Identificarea carboxihemoglobinei prin metoda Wolff	116
Dozarea carboxihemoglobinei prin metoda spectrofotometrică	117
Analiza toxicologică a hidrogenului sulfurat	119
Analiza toxicologică a clorului	120
Analiza toxicologică a dioxidului de sulf	121
Analiza toxicologică a oxizilor de azot	123
Analiza toxicologică a alcoolului metilic	125
Analiza toxicologică a alcoolului etilic	126
Determinarea cantitativă a fenolului total din urină	128
Analiza toxicologică a formaldehidei	130
Analiza toxicologică a etilenglicolului	131
Identificarea cristalelor de oxalat de calciu din urină	132
Analiza toxicologică a anilinei	
Determinarea cantitativă prin formare de azocoloranți	133
Determinarea cantitativă din sânge prin reacția indofenolului	134
Determinarea cantitativă a p-aminofenolului din urină	134
Determinarea metemoglobinei din sânge	135
Analiza toxicologică a acidului cianhidric	
Determinarea cantitativă din sânge prin metoda argentimetrică	138
Determinarea cantitativă a tiocianaților	139
Analiza toxicologică a hidrocarburilor aromatice: indicatori ai expunerii	
Determinarea acidului hipuric prin metoda spectrofotometrică în vizibil	140
Determinarea spectrofotometrică în UV a acidului hipuric	142
Determinarea sulfat indexului prin metoda nefelometrică	143
Analiza toxicologică a metalelor	
Determinarea cantitativă a mercurului din urină	144
Determinarea cantitativă a cadmiului din urină	146

Determinarea cantitativă a plumbului din urină	147
Determinarea cantitativă a acidului Δ -ALA din urină	150
Analiza toxicologică a derivaților barbiturici	
Determinarea cantitativă prin metoda spectrofotometrică în vizibil	151
Determinarea cantitativă prin spectrofotometrie în UV	152
Analiza toxicologică a aspirinei	154
Analiza toxicologică a paracetamolului	156
Analiza toxicologică a antidepresivelor triciclice	157
Analiza toxicologică a fenotiazinelor	159
Analiza toxicologică a izoniazidei	160
Analiza toxicologică a benzodiazepinelor	
Determinarea cantitativă sub formă de azocoloranți	161
Determinarea cantitativă a diazepamului prin spectrofotometrie în UV	163
Analiza toxicologică a morfinei	166
Analiza toxicologică a unor pesticide	167
Determinarea cantitativă a malationului	167
Analiza toxicologică a paraquatului în urină	168
Determinarea cantitativă a DNOC din sângele total	170
Determinarea cantitativă a DNOC din urină	170
Determinarea cantitativă a p-nitrofenolului total din urină	171
Determinarea activității anticolinesterazice din sângele total	173
Capitolul 5	
DIAGNOSTICUL CLINIC AL INTOXICAȚIILOR:	
STUDII DE CAZURI CLINICE	176
Capitolul 6	
ÎNTREBĂRI ȘI PROBLEME	200
ANEXA I: <i>Valori limită de expunere profesională pentru agenții chimici</i>	206
ANEXA II: <i>Limite biologice tolerabile</i>	209
ANEXA III: <i>Concentrații terapeutice, toxice sau letale ale unor substanțe toxice</i>	210
ANEXA IV: <i>Valorile probit corespunzătoare procentelor de letalitate</i>	213
ANEXA V: <i>Reactivi speciali</i>	217
Răspunsuri la întrebări și probleme	220
Bibliografie	229

Capitolul 1

ANALIZE TOXICOLOGICE: CLASIFICARE, ETAPE

O *analiză toxicologică* reprezintă ansamblul de procedee analitice prin care se determină prezența unei substanțe toxice într-o probă de analizat. Aceste analize fac obiectul de studiu al unei ramuri a toxicologiei, *toxicologia analitică*, care cuprinde metodologia fizico-chimică de izolare, identificare și determinare cantitativă a substanțelor toxice din aer, apă, sol, alimente, corpuri delictive și produse biologice, în vederea prevenirii sau diagnosticării intoxicațiilor.

1.1. CLASIFICAREA ANALIZELOR TOXICOLOGICE

Analizele toxicologice pot fi clasificate, în funcție de tipul probelor analizate și de scopul analizelor, în:

- *analize de toxicologie sanitară* (industrială și alimentară), care urmăresc depistarea prezenței substanțelor toxice în mediu și au scop profilactic
- *analize de toxicologie clinică*, care au drept scop diagnosticarea rapidă a intoxicațiilor și controlarea eficienței terapiei instituite
- *analize de toxicologie medico-legală*, care urmăresc confirmarea sau infirmarea intoxicațiilor letale, pentru informarea justiției.

1.1.1. Analizele de toxicologie sanitară

Probele analizate sunt probe de mediu: aer din mediul comunal sau industrial, apă, sol, alimente, care sunt recoltate de toxicolog sau de alt personal sanitar. Astfel de analize se efectuează în cadrul laboratoarelor de toxicologie din întreprinderi sau din Centrele de Medicină Preventivă. În afară de probele de mediu, în aceste laboratoare se mai controlează periodic și nivelele sanguine sau eliminarea renală a toxicilor la persoanele expuse, precum și modificarea unor markeri biochimici care pot permite depistarea intoxicațiilor în faza de debut.

Recoltarea probelor depinde de obiectivele studiului, care pot varia în funcție de tipul de zonă studiată. De exemplu:

a) *zone de mediu înconjurător* (regiuni sălbatice, lacuri, râuri) - probele recoltate pot furniza informații cu privire la concentrația poluanților, gradul de contaminare.

b) zonele urbane - probele recoltate pot furniza informații cu privire la tipurile de poluanți la care locuitorii pot fi expuși pe cale cutanată, inhalatorie sau orală, într-o perioadă de timp.

c) zonele industriale - pot fi detectate situațiile de risc și sursele de poluare.

Principalele probe de mediu analizate sunt cele de aer, sol, apă și țesuturi.

Probele de aer

Majoritatea poluanților din atmosferă provin din arderea combustibililor, procesele industriale și deversarea reziduurilor solide. Alte surse pot fi: exploziile nucleare, incendiile din păduri, vulcanii, emisia de gaze naturale, arderea culturilor, utilizarea pesticidelor. Acești poluanți se găsesc în atmosferă sub formă de gaze, de vapori sau de aerosoli.

Probele de sol

Atunci când poluanții din mediu se depun în zone terestre, comportarea lor ulterioară este complicată de o serie de interacțiuni cu componenții organici și anorganici, fazele lichid-gaz prezente și componentele vii sau nu ale solului. Dependent de structura chimică și fizică, poluantul poate rămâne într-un singur loc pe perioade mai lungi sau mai scurte, poate fi absorbit în țesuturile plantelor sau se poate deplasa în sol prin difuziune. Deplasarea poate fi afectată de dizolvarea sau suspendarea în apă a poluanților, sau de adsorbția pe componentele anorganice sau organice ale solului. Pentru aceste motive, prelevarea probelor de sol pentru determinarea poluanților poate fi simplă sau foarte complicată.

Pentru a obține probe reprezentative, trebuie să fie luate în considerare caracteristicile fizice și chimice ale locului de unde se face recoltarea, posibilele reacții ale poluantului cu componentele din sol, precum și gradul de variabilitate a zonei. Pe baza acestor date, zona poate fi împărțită în sectoare omogene și se colectează numărul necesar de probe.

Există mai multe dispozitive pentru recoltarea probelor de sol. Unele din ele permit determinarea distribuției verticale a poluantului și sunt constituite fie din tuburi de oțel, cu diametru între 2,5 și 7,6 cm și lungimea de 60 până la 100 cm (acționate manual), sau din tuburi de forare cu diametru mare, de 1×200 cm (acționate mecanic).

Probele de apă

Pentru a obține probe reprezentative de apă, trebuie luați în considerare mai mulți factori. Cei mai importanți sunt natura poluantului și locul în care acesta a pătruns în mediul acvatic. Poluanții pot proveni din surse agricole, municipale sau altele, cum ar fi scurgeri din epave sau deraieri de trenuri. Alți factori importanți sunt: direcția și viteza vântului, viteza de curgere a curentului sau a râului, temperatura, stratificarea termică și a salinității, compoziția sedimentului.

Probele din apele de suprafață sunt adesea colectate cu ajutorul unor dispozitive automate, controlate de diferiți senzori. Metoda cea mai simplă constă în scufundarea în apă a unui recipient, clătirea, umplerea și închiderea acestuia.

Pentru obținerea probelor de apă de la adâncimi mari se folosesc dispozitive speciale.

Pentru a reduce numărul și volumul probelor, se pot utiliza colectoare care sunt prevăzute cu membrane cu pori mici (45μm) pentru a reține poluanții care conțin metale, sau coloane cu rășini schimbătoare de ioni sau cu silicagel modificat (C₁₈) pentru a reține poluanții organici; astfel, poluanții din volume de mai mulți litri de apă sunt reținuți pe coloane sau în mici containere.

Recent, a fost dezvoltată o nouă tehnică (ce se bazează pe folosirea unui filtru ce conține o matrice de Teflon în care sunt încastrate lanțuri de hidrocarburi C₁₈) și care constă în concentrarea poluanților prin trecerea apei prin membrană, urmată de reluarea lor cu solvenți corespunzători.

După recoltarea probelor, acestea vor fi înghețate și trimise la laborator. Dacă nu se analizează imediat, vor fi congelate la temperaturi sub -20⁰C pentru a preveni degradarea.

Probele de țesuturi

Atunci când este suspectată poluarea unor zone de mediu, se fac studii pe plante și pe animale. Multe din aceste studii se desfășoară în timpul sezoanelor de vânătoare și de pescuit și constau în determinarea numărului de animale ucise și îndepărtarea organelor și a altor țesuturi pentru analizarea contaminanților suspectați. Recoltarea probelor se face la întâmplare în zona cercetată; analiza poate permite determinarea concentrației, a gradului de contaminare pentru o anumită specie și a zonelor contaminate.

Mulți poluanți din mediu se concentrează în oase, în anumite organe sau țesuturi (ex. țesut adipos). Aceste organe sunt recoltate în vederea analizei, de la animalele ucise recent. Materialul vegetal recoltat pentru analiză este fie împărțit în: rădăcini, tulpini, frunze, flori și /sau fructe, fie se analizează planta în întregime. Plantele recoltate dintr-un anumit loc pot fi amestecate și analizate împreună ca o probă unică.

1.1.2. Analizele de toxicologie clinică

Aceste analize se efectuează în principal pe *probe biologice* (sânge, urină), dar și pe *conținut gastric* sau *produse suspecte*. Probele sunt recoltate de personalul sanitar din secțiile medicale de urgență sau din clinicile de boli profesionale și sunt analizate în laboratoarele de toxicologie, de către un personal calificat.

Pentru ca rezultatele analizei să fie utile, este indispensabil ca între medic și toxicologul analist să existe o colaborare bună. Este ideal ca această colaborare să înceapă înainte de recoltarea probelor, pentru a putea fi îndeplinite cerințele legate de tipul de probe necesare. Poate fi utilă completarea unor formulare de solicitare a unei analize toxicologice care să însoțească probele la laborator.

Transportul și conservarea probelor

Probele trimise la analiză trebuie să fie etichetate, indicându-se numele complet al pacientului, data și ora prelevării, natura probei dacă aceasta nu este evidentă. Acest lucru este foarte important mai ales atunci când este vorba de o intoxicație a mai multor pacienți, sau când s-au recoltat mai multe probe de la același pacient. În laborator se vor nota data și ora recepției fiecărei probe, care va fi înregistrată, atribuindu-se un număr de identificare unic.

Recipientele care conțin produse volatile (ex. solvenți organici) se vor ambala separat de probele biologice, pentru a evita riscul de contaminare reciprocă.

Toate probele biologice se vor păstra, dacă este posibil, la 4°C până în momentul analizei. După efectuarea analizei, probele ar trebui păstrate la 4°C încă 3-4 săptămâni, în caz că este necesară repetarea analizei.

Dacă se prevăd implicații medico-legale (de ex. dacă nu s-a stabilit modul de administrare a substanței toxice, sau dacă pacientul a decedat), toate probele se vor păstra (de preferință la -20°C) până la încheierea anchetei.

Tipuri de probe analizate

Sângele (sânge total, plasmă, ser)

Sângele este singurul tip de probă ce permite obținerea unor rezultate cantitative ce pot contribui la estimarea gravității intoxicației.

În general, concentrațiile substanței toxice în plasmă și în ser nu diferă semnificativ. Totuși, dacă o substanță nu este prezentă într-o cantitate suficient de mare în eritrocite, utilizarea de sânge total hemolizat va conduce la o diluare considerabilă a probei. Alte substanțe, cum ar fi monoxidul de carbon, cianurile, plumbul, staniul, se găsesc fixate în principal în eritrocite, ceea ce face necesară realizarea determinărilor cantitative pe sânge integral.

Deoarece coagularea sângelui și separarea serului pot determina pierderi prin antrenare, este preferabil să se rețină serul pentru determinările enzimatică. De aceea, sângele total și plasma sunt probele cele mai reprezentative.

Ideal este ca laboratorul să primească sânge total, necoagulat și nehemolizat. Pentru a împiedica coagularea se pot folosi heparină sau fluorură de sodiu solidă (5mg/ml). Aceasta din urmă acționează prin sechestrarea calciului, împiedicând coagularea, iar în plus este un inhibitor enzimatic, ceea ce contribuie la reducerea procesului de putrefacție. Ulterior, analistul va decide dacă va utiliza sânge total sau îl va centrifuga pentru a separa plasma, care prezintă avantajul eliminării interferenței pigmentilor sângelui și care nu formează la fel de ușor emulsii cu solvenții organici.

La internarea pacienților se recomandă recoltarea a 10 ml sânge heparinizat, a 2 ml sânge pe fluorură de sodiu și a 10 ml sânge fără conservanți sau coagulanți.

Dacă se suspectează o intoxicație cu etanol, se recoltează 5 ml sânge într-un flacon ce conține NaF (10mg/ml reprezintă cantitatea necesară pentru a inhiba

complet degradarea microbiană). Flaconul trebuie să fie perfect curat și uscat. Se umple complet cu sânge și se închide cu un dop de plută parafinat. Dezinfectarea pielii se face cu soluție de sublimat, apă cu săpun sau apă simplă. Nu se folosesc niciodată alcool, tinctură de iod sau alți solvenți cu fracțiuni volatile. După extracție se efectuează o dezinfectare corespunzătoare.

Eșantionul de sânge trebuie transvazat cu precauție: trecerea rapidă a sângelui prin acul de seringă poate provoca o hemoliză suficient de importantă pentru a afecta dozarea fierului sau a potasiului din ser. Dacă se bănuiește o intoxicație cu monoxid de carbon (CO), spațiul liber din flacon trebuie redus la minim.

Urina

Este o matrice biologică cu care se lucrează ușor, interferențele fiind puține, dar multe xenobiotice se excretă greu pe această cale, analiza putând sau nu să fie reprezentativă. Nu necesită adăugarea de conservanți.

Este o probă deosebit de utilă pentru testele de identificare, deoarece este adesea disponibilă în cantitate mare, iar concentrațiile sunt în general mai mari decât în sânge.

Prezența metaboliților poate fi să faciliteze identificarea, dacă se utilizează tehnici cromatografice, fie să o complice.

Nivelele urinare nu pot fi utilizate pentru a evalua gravitatea intoxicației. Prezența sau absența substanței într-o probă de urină indică doar faptul că aceasta a fost sau nu administrată sau ingerată.

În cazul adulților se recoltează în general o probă de 50 ml, într-un recipient steril care se închide ermetic. Recoltarea se face cât mai repede posibil, de preferință înainte de instituirea unui tratament medicamentos. Totuși, unele medicamente ca antidepressivele triciclice (amitriptilină, imipramină) produc retenție urinară, astfel încât o probă recoltată precoce poate să conțină o cantitate minimă de substanță toxică. Invers, cantitatea prezentă într-o probă recoltată după câteva ore sau zile poate să fie de asemenea foarte redusă, chiar dacă starea clinică a pacientului este gravă, cum ar fi cazul intoxicațiilor acute cu paracetamol.

La pacienții în stare de inconștientă, recoltarea urinei se face de obicei cu ajutorul unui cateter, existând riscul de contaminare cu lubrifianți sau anestezice locale (lidocaină). Dacă s-a încercat provocarea vomei prin administrarea de sirop de ipeca, urina poate conține emetină.

Conținutul gastric

Prin conținut gastric se înțeleg vomismențele sau produsele de aspirare sau de spălătură gastrică. Este important să se recolteze produsul din prima spălătură, deoarece următoarele pot fi prea diluate. Cantitatea minimă necesară pentru mai multe analize este de 20 ml. Nu se adaugă conservanți.

Analiza nu prezintă prea multe inconveniente practice și poate fi rapidă, deoarece separarea xenobiotului este ușoară. În funcție de natura probei, pot fi

necesare operații suplimentare - ex. omogenizare urmată de filtrare și /sau centrifugare.

Dacă proba se obține la puțin timp după ingestie, pot fi prezente cantități importante de substanță toxică, în timp ce metaboliții, care complică adesea analiza, sunt în general absenți. Mirosul poate indica prezența unor compuși, și uneori pot fi identificate comprimatele sau capsulele prin simplă observare. Dacă pentru provocarea vomei s-a administrat sirop de ipeca, în conținutul gastric se poate regăsi emetină.

Analiza completează rezultatele obținute pe probele de urină sau de sânge, dar nu permite aprecierea gravității intoxicației, deoarece cuantifică substanța toxică ce nu a fost absorbită.

Spălătura gastrică poate în unele cazuri să favorizeze absorbția, de exemplu în cazul salicilaților, care trebuie determinați sistematic în această probă printr-o reacție de culoare.

Produsele suspecte

Este important să se păstreze toate flacoanele, recipientele sau materialele suspecte care sunt găsite la pacient sau în apropierea lui, deoarece acestea pot avea legătură cu intoxicația și sunt analizate dacă este necesar.

Comprimatele sau alte preparate farmaceutice pot fi identificate cu ajutorul unor baze de date informatizate pe baza culorii, formei, mărimii, greutății, etc. Deși acest lucru nu intră în sarcina principală a laboratorului de toxicologie, în unele cazuri poate contribui la identificarea rapidă sau la confirmarea cauzei unei intoxicații.

Detectarea rapidă a substanțelor responsabile de producerea unei intoxicații poate fi salvatoare și reprezintă primul scop al unei analize de toxicologie clinică. Această operație mai poartă denumirea de „*screening toxicologic*” și se poate servi de diferite metode de analiză, în funcție de dotarea laboratorului de toxicologie. În tabelul 1.1. sunt prezentate probele biologice analizate pentru identificarea diferitelor substanțe, precum și metodele aplicate în acest sens.

Probele analizate pot fi aruncate la finalul investigației. Rezultatele analizei trebuie comunicate telefonic serviciului de urgență, cât mai rapid. Raportul scris poate fi trimis ulterior, într-o formă relativ concisă, conținând materialele primite spre analiză, metodele utilizate și rezultatele. Interpretarea rezultatelor poate fi utilă pentru clinician, care nu are timp suficient pentru a căuta într-o bibliografie adecvată.

Tabel nr.1.1. Recoltarea probelor pentru screeningul toxicologic

Nr	Probă	Volum	Analiza	Metode aplicate
1.	Sânge integral (anticoagulant, conservant)	2 ml	Alcoolii	GC
2.	Ser	5-10 ml	Screening medicamente: Digoxin, Litiu	Extracție Screening GC-MS Met. imunochimice (Digoxin) Flamfotometrie (Li ⁺)
3.	Sânge total (heparinizat)	2 ml	COHb	Spectrofotometrie
4.	Urină	20-50 ml	Screening medicamente	Teste de culoare (salicilați) Met. imunochimice (droguri) Extr. + GC/MS (confirmare)
5.	Lichid gastric	20-50 ml	Screening medicamente	Teste culoare (salicilați) Examinare vizuală (prezența unor comprimate, capsule) Extracție + GC/MS

1.1.3. Analizele de toxicologie medico-legală

Toxicologia medico-legală se referă la orice aplicație a științei care studiază substanțele toxice, contribuind la elucidarea problemelor care apar în timpul procedurilor judiciare. Analizele de toxicologie medico-legală reprezintă un instrument în investigația unui accident sau a unei crime și trebuie să verifice dacă o substanță toxică este responsabilă de un eveniment sau l-ar fi putut influența. Alte scopuri urmăresc clarificarea faptului că o substanță a putut fi administrată deliberat sau accidental, sau elucidarea derulării în timp a evenimentelor.

Analizele de toxicologie medico-legală se efectuează pe probe reprezentate de *corpuri delictive* (apă, resturi alimentare, obiecte suspecte) sau pe *produse biologice* (sânge, urină, conținut stomacal, organe). Recoltarea acestor probe se face de persoane autorizate (medic legist sau procuratură), păstrându-se în același timp și duplicate, sau *contraprobe*, pentru situația în care rezultatul analizei este contestat și se solicită o contraexpertiză. Probele sunt etichetate corespunzător și sunt însoțite de un raport de necropsie, care conține informații în legătură cu împrejurările în care s-a produs intoxicația și descrierea morfopatologică macroscopică a cazului respectiv. După efectuarea analizei, probele rămase neutilizate se vor păstra o perioadă relativ lungă de timp, care este precizată de autoritățile legale din fiecare țară. Lichidele biologice și țesuturile se păstrează congelate.

Deoarece toxicologia medico-legală analizează în principal cazurile de moarte subită sau neașteptată, numărul substanțelor toxice căutate este foarte mare. De obicei, analistul nu începe examinarea probelor înainte de încheierea studiilor preliminare, inclusiv a necropsiei și a examinării microscopice a tuturor țesuturilor. Astfel, el poate începe analiza cu o ipoteză de lucru. Informațiile care ar trebui furnizate în toate cazurile în care există suspiciunea de intoxicație sau de dopaj sunt următoarele:

Date generale

Numele victimei	Sexul
Vârsta	Greutatea sau înălțimea
Naționalitatea	Dacă a călătorit recent în străinătate?
Ocupația (cu detalii cu privire la produsele care se fabrică sau se folosesc la locul de muncă)	

Istoricul medical

- Dacă victima suferă de hepatită virală sau alte boli infecțioase?
- Dacă victima a suferit recent de o boală sau de o maladie cronică? Care sunt medicamentele care i-au fost prescrise?
- Dacă victima este un alcoolic, un dependent de droguri sau un fumător?
- Ce substanțe toxice sunt suspectate? (Cutiile de medicamente sau seringile găsite la fața locului trebuie de asemenea analizate.)
- Denumirea medicamentelor sau a substanțelor toxice la care victima a avut acces.

Timpi

- Data și momentul în care victima a fost văzută pentru ultima oară în stare de sănătate.
- Data și momentul îmbolnăvirii sau a decesului și locul unde victima a fost găsită (ex. la locul de muncă, în pat, afară).
- Dacă acești timpi nu sunt cunoscuți, unde a fost găsită victima?
- Timpul ultimei mese și detalii despre aceasta.

Tratamente

- S-au acordat îngrijiri medicale după momentul suspectării unei intoxicații sau a dopajului?
- Momentul spitalizării; data și momentul externării.
- Detalii despre tratamentele efectuate (volumul lichidului de spălătură stomacală, momentul recoltării probelor de sânge sau urină).
- Analize efectuate în timpul spitalizării: realizate /neefectuate /care nu au fost disponibile.
- Se notează dintre următoarele simptome cele care au fost observate: diaree, vomă, sete, orbire, constipație, cianoză, icter, pierdere în greutate, frisoane, convulsii, mioză, midriază, delir, comă, transpirații, insuficiență renală.
- Data autopsiei și cauza posibilă a decesului.
- Orice alte informații care pot fi utile laboratorului, de exemplu dacă victima era însărcinată, detalii despre suspect (ocupația și produsele utilizate la locul de muncă, comentarii ale victimei, suspectului sau martorilor).

Probe recoltate

- Dacă victima este în viață: vomă, aspirat gastric sau lichid de spălătură stomacală, sânge sau urină.
- Dacă victima a decedat: conținut stomacal, sânge, urină, probe de organe.

Deoarece recoltarea altor probe necesită de obicei exhumarea, este foarte important ca acestea să fie recoltate și păstrate corespunzător. De exemplu, sângele trebuie să fie recoltat prin puncție cardiacă, niciodată din cavitatea corpului, urina din vezica urinară; bila este colectată intactă, ca parte a vezicii biliare ligaturate. Trebuie să se recolteze cantități suficiente, iar substanțele căutate în diferite probe pot fi:

- în sânge: monoxid de carbon, etanol și alți alcooli, barbiturice, tranchilizante, alte medicamente
- urina: este utilă atât pentru analiza substanțelor toxice cât și a metaboliților - se extrage întreg conținutul vezicii urinare
- ficatul conține frecvent cantități mari de substanțe toxice și / sau metaboliți, iar rinichiul este organul cel mai important pentru analiza medico-legală.

Atunci când nu există nici o suspiciune cu privire la natura toxicului, se procedează la o analiză toxicologică generală și se impune trimiterea spre analiză a următoarelor probe biologice:

1. un flacon cu *stomacul* și conținutul său;
2. un flacon uscat cu *sânge*, în cantitate de *100 ml*;
3. un flacon cu *urină* (cantitatea maximă ce poate fi extrasă);
4. un flacon cu *100 g ficat și vezică biliară*. Este organul cel mai interesant pentru investigarea substanțelor toxice organice și metalice.
5. un flacon cu *~ 100 g creier* - în special în cazul intoxicațiilor cu solvenți organici, anestezice, pesticide organice și produse de curățire la rece;
6. un flacon cu *~100 g rinichi*. Cantitatea trebuie să fie mai mare dacă se suspectează o intoxicație cu metale.
7. un recipient cu *100 g plămân*.

Observații:

1. Atunci când se suspectează intoxicații cu arsen, plumb, beriliu, taliu, stronțiu, uraniu, fluor, se vor trimite spre analiză și probe de unghii, păr, oase.

2. Când se urmărește investigarea toxicilor gazoși sau volatili este important să se evite ca flacoanele să conțină aer; ele trebuie închise ermetic și păstrate majoritatea timpului în frigider.

3. Nu se adaugă agenți conservanți (pot contamina sau pot interfera în analiză), dar se mențin la temperatură scăzută, fără a se congela. Conservanții sunt admiși în:

- sânge, pentru determinarea alcoolemiei (NaF)
- țesuturi, pentru determinări histologice (formol 10%).

4. Toate flacoanele se etichetează, precizându-se conținutul și proveniența. Toate transferurile se marchează pe probe (ora și data) și se semnează de ambele părți. Trebuie verificată securitatea probelor.

Atunci când se bănuiește sau se cunoaște prezența unei anumite substanțe toxice, probele cele mai adecvate pentru analiză sunt cele prezentate în tabelul 1.2.

În cazul în care este necesară recoltarea de probe de la cadavre exhumate, se țin cont de următoarele:

- Dacă înhumarea a fost recentă și se recunosc viscerele, acestea se recoltează ca la o autopsie. Dacă nu, se recoltează resturile vizibile sau magma existentă în zone distincte.
- Probele sunt însoțite de căptușeala sicriului și de pământ de sub sicriu, mai ales atunci când înhumarea s-a făcut direct în sol.
- Toate probele se introduc în flacoane de sticlă, iar cele cu pământ trebuie să conțină 100 g pământ de deasupra sicriului și 100 g pământ de sub sicriu.

Tabelul nr. 1.2. Probele biologice ce se recomandă a fi recoltate pentru analiza diferitelor clase de substanțe toxice

Clasa de substanțe toxice	Sânge	Urină	Conținut stomacal	Creier	Ficat	Ri-nichi	Bilă	Oase Unghii Păr	Subst. suspectă
Droguri	X	X		X	X	X	X	X	X
Alcool etilic	X								
Solvenți organici	X	X	X	X					X
Medicamente	X	X	X	X	X	X	X		X
Pesticide	X	X	X	X	X	X	X		X
Metale	X	X	X	X	X	X		X	X
CO și Gaze	X								
Ciuperci		X	X						X

Probele de păr

Primul caz de determinare a unei substanțe toxice în părul capilar a fost menționat în 1857, când arsenul a fost pus în evidență în părul unui cadavru exhumat după 11 ani. O sută de ani mai târziu, în 1954, a fost detectată pentru prima dată o substanță organică în perii din blana de cobai. În 1979, Baumgartner și colaboratorii au publicat o metodă radioimunologică de detectare a opiaceelor în părul drogaților, introducând ideea de depistare și monitorizare a consumului de droguri. Din acest moment, interesul pentru utilizarea în scop medico-legal a acestei matrici biologice a fost în continuă creștere, iar mai recent se preconizează și folosirea sa în scopul monitorizării terapeutice a unor medicamente. Acest lucru a devenit posibil ca urmare a evoluției procedeeleor de extracție și a creșterii performanțelor analitice, mai ales sub aspectul îmbunătățirii selectivității și al scăderii limitelor de cuantificare. Analiza probelor de păr este tot mai mult utilizată și pentru detectarea expunerii *in utero* la droguri, a expunerii pasive a copiilor în locuințele în care părinții consumă activ droguri, precum și în cazurile criminale, la locurile de muncă, în cazurile de custodie și în clinicile de dezintoxicare. De asemenea, această probă a fost folosită în unele acțiuni juridice care au implicat consumul de anabolizanti în timpul Turului ciclistic al Franței din 1998.

Substanțele toxice pot ajunge în păr pe trei căi:

- calea endogenă – prin captarea în firul de păr a substanțelor prezente în circulația sistemică în timpul procesului de histogeneză;

- calea endo-exogenă – prin transferul în părul cheratinizat a substanțelor absorbite și apoi eliminate prin transpirație, sebum sau excreție transdermică;
- calea exogenă – absorbție prin părul cheratinizat a substanțelor din mediul extern.

Factorii care favorizează încorporarea substanțelor toxice în păr sunt:

- Lipofilia compusului: cu cât este mai mare, încorporarea este mai mare. Acest fapt se explică prin aceea că transferul moleculelor se realizează în principal prin difuzie pasivă.
- Afinitatea melaninei pentru substanța toxică: încorporarea este mai bună în părul pigmentat;
- Bazicitatea compusului: compușii cu caracter bazic sunt mai bine încorporați decât cei cu caracter acid; totuși, datorită concentrațiilor în sânge mai mari ale substanțelor acide, această rată de încorporare mai redusă este compensată.

Avantajele folosirii probelor de păr în analizele toxicologice sunt următoarele:

- Analiza furnizează informații asupra utilizării pe termen lung a substanței, spre deosebire de alte probe biologice, cum ar fi urina, în cazul cărora fereastra de detecție este mai redusă (Tabel 1.3.). Acest lucru este posibil deoarece creșterea părului capilar este relativ constantă, fiind în jur de 1 cm / lună și permițând acumularea substanțelor și a metaboliților lor, iar perioada de creștere este lungă, până la 4-6 ani. Pot fi obținute și informații cu privire la modul de utilizare a unor droguri sau la severitatea abuzului.
- Testul nu poate fi influențat de o abținere temporară sau prin falsificarea probei.
- Părul poate fi recoltat sub supraveghere strictă, fără ca individul să se jeneze.
- Se poate recolta o a doua probă, care poate fi comparată cu prima pe baza aspectului, prin examinare microscopică sau procedee de identificare a ADN-ului.
- Specimenele de păr sunt stabile chiar și în condiții de mediu nefavorabile și pot fi păstrate timp nedefinit, fără a necesita congelare.

Recoltarea probelor de păr se face prin tăiere cât mai aproape de scalp, din regiunea vertexului posterior. Cantitatea optimă este de 200 mg, iar dacă se dorește o analiză secvențială, firele se taie în segmente de 1-1,5 cm, care reprezintă creșterea aproximativă dintr-o lună. Probele se păstrează la temperatura camerei, în plicuri de hârtie sau plastic sau în flacoane de sticlă.

Raportul laboratorului de toxicologie medico-legală trebuie să conțină mult mai multe informații decât în cazul analizelor de toxicologie clinică. Astfel, vor fi descrise probele primite spre analiză, iar toate metodele și etapele analitice, precum și rezultatele obținute, vor fi menționate. Nu toate informațiile chimice pot fi înțelese de către juriști. De aceea, raportul trebuie să cuprindă un rezumat în limbaj

uzual, care să poată fi înțeles de avocați. Totuși, partea analitică a raportului este importantă, deoarece partea acuzată poate încerca, ajutată de un consultant științific, să obiecteze la concluziile toxicologului; acesta trebuie să își poată susține rezultatele pe baza unei documentații analitice complete, care nu trebuie neapărat inclusă în raport, dar care trebuie păstrată în dosar. Toate experimentele efectuate trebuie consemnate în ordine cronologică în registrul laboratorului.

Tipuri de analize toxicologice

Strategia utilizată în analizele toxicologice depinde de tipul de intoxicație. Astfel, există două grupe principale de intoxicații, în funcție de informațiile existente cu privire la natura agentului toxic:

1. Intoxicații de origine cunoscută

Exemple de astfel de intoxicații sunt:

- inhalarea de CO sau HCN în timpul unui incendiu
- absorbția unor produse industriale în timpul unui accident
- supradozarea unui medicament în cursul unui tratament

În aceste cazuri se pot utiliza metode de analiză cantitativă directă, ce nu necesită izolare și purificare, mai ales dacă matricile biologice nu sunt complexe. Astfel de metode sunt: testele de culoare, metodele imunochimice, fotometria (CO), flamfotometria (Li^+). În marea majoritate a cazurilor sunt însă necesare izolarea din mediu, purificarea probei și uneori concentrarea substanței toxice. Dacă se cunoaște natura toxicului, se pot alege procedeele de izolare sau purificare cele mai adecvate naturii chimice a compusului, în scopul obținerii unor randamente de extracție cât mai bune. Acest lucru face posibilă și utilizarea unor cantități minime de probă.

2. Intoxicații de origine necunoscută

În această categorie se încadrează în special intoxicațiile medicamentoase, dintre care multe sunt tentative de sinucidere, iar uneori și intoxicațiile accidentale, dacă pacientul este comatos sau se află în imposibilitatea de a se exprima.

În acest caz se efectuează o analiză toxicologică generală. Pentru acest grup de intoxicații, este recomandabil ca analiza să se realizeze în laboratoare de toxicologie corespunzător echipate, unde este posibilă investigarea sistematică a compușilor necunoscuți cu ajutorul unor metode ce includ etape de izolare, purificare și concentrare, urmate de aplicarea unor tehnici de analiză cantitativă CSS, HPLC, GC-MS.

Tabelul nr.1.3. Fereastra de detecție pentru diferite matrici alternative sau clasice

Matrice	Fereastra de detecție	Utilizare	Observații
Păr	>3 zile – luni/ani	Concentrația compusului părinte după consum cronic	Ușor de păstrat la temperatura camerei
Salivă	1 h – 24 h	Concentrația compusului părinte	Dispozitive speciale de colectare
Sudoare	3 h - 2 zile/1 săptăm	Doar detecția compusului părinte	
Plasmă/Ser	3 h – 2 zile	Concentrația compusului părinte permite evaluarea toxicității pe termen scurt	Păstrare la rece/congelat
Urină	6 h – 3 zile	Doar detecția metaboliților compusului	Păstrare la rece/congelat

Orientarea analizei toxicologice

În situația în care intoxicația este de origine necunoscută, utilizarea unor date orientative permite nu numai reducerea câmpului de studiu și folosirea tehnicilor celor mai potrivite, ci și evitarea testelor de confirmare în cazul în care toxicul identificat corespunde informațiilor primite.

Orientarea analizei toxicologice se poate face pe baza a două grupe de date:

- 1) informații generale
- 2) informații clinice

1) **Informațiile generale** cuprind datele de anamneză care ar putea avea legătură cu intoxicația, cum ar fi:

- profesia pacientului și dacă manipulează substanțe chimice;
- tratamentul medicamentos anterior;
- prezența la locul de producere a intoxicației a unor produse chimice, medicamente sau ambalaje (este util ca aceste substanțe să fie trimise la laborator pentru a servi ca martor sau pentru a determina dacă compoziția lor corespunde cu cea teoretică);
- informații de la familie, vecini sau însoțitori.

2) **Informațiile clinice** sunt obținute de la medicul care îngrijește bolnavul sau de la cel care efectuează necropsia. Acestea cuprind:

- informații cu privire la starea de conștiență (urgenta analizei), tulburările neurologice, cardiace sau respiratorii;
- indici patologici: acidoză metabolică, hiperglicemie, care pot contribui la rezolvarea problemei. Patologiile existente, cum ar fi o afecțiune renală sau hepatică, precum și alte situații paratoxice (căldura sau frigul), pot influența toxicitatea medicamentelor și trebuie luate în considerare.

De asemenea, trebuie specificat orice tratament efectuat înaintea recoltării probei: spălătură gastrică, administrarea unui antidot sau a unui medicament, deoarece acestea ar putea influența toxicocinetica sau toxicodinamica substanței, și deci rezultatul analizei.

Examenul fizic al probelor biologice, în principal urină și conținut gastric, dar și al produselor suspecte, poate contribui la orientarea analizei toxicologice. Astfel, anumite medicamente sau metaboliții lor pot da o colorație caracteristică urinei, dacă sunt prezente în cantități suficient de mari, așa cum se poate observa în tabelul 1.4. Desferalul sau albastrul de metilen, administrate ca antidoturi, pot determina colorarea urinei în roșu, respectiv în albastru.

Tabel nr. 1.4. Colorații caracteristice ale urinei, determinate de diferite substanțe toxice

Colorație	Cauze posibile
maro sau negru (se intensifică în timp)	Nitrobenzen, fenoli
galben sau portocaliu	Fluoresceină, fenolftaleină, nitrofurantoin
roșu sau maro	Fenotiazine, fenitoin, fenolftaleină, chinină, warfarină (hematurie)
albastru sau verde	Amitriptilină, indometacin, fenoli

Substanțele toxice cu miros puternic, cum ar fi camforul sau salicilatul de metil, pot fi uneori recunoscute în urină deoarece se elimină parțial sub formă nemodificată. O urină tulbure poate fi consecința unei patologii asociate (sânge, microorganisme, celule epiteliale) sau prezenței carbonaților, fosfaților sau uraților sub formă microcristalină sau amorfă. Aceste forme nu trebuie ignorate, chiar dacă nu sunt întotdeauna corelate cu o intoxicație. Tratamentul cronic cu sulfamide poate conduce la formarea de cristale de culoare galbenă sau brun-verde într-o

urină neutră sau alcalină. O supradozare a fenitoiniei sau a primidonei poate conduce la apariția de cristale în urină, în timp ce la pH neutru, după ingestia de etilenglicol, apar în urină cristale incolore caracteristice de oxalat de calciu.

În conținutul gastric și în produsele suspecte, unele substanțe pot fi recunoscute după mirosul lor puternic. Astfel de toxici sunt prezentați în tabelul 1.5. Alte substanțe mirositoare sunt cloroformul, salicilatul de metil, paraaldehida, fenelzinul.

De asemenea, un pH foarte scăzut sau foarte ridicat se poate datora ingerării unui acid sau a unei baze, în timp ce o colorație verde /albastră poate indica prezența unor săruri de fier sau cupru.

Tabelul nr. 1.5. Mirosuri specifice ale unor substanțe toxice

Miros	Cauze posibile
Migdale amare	Cianuri
Fructe	Alcoolii (inclusiv etanol), esterii
Usturoi	Arsen, fosfor
Pere	Cloral
Benzină	Distilate de petrol (utilizate și ca diluanți pentru pesticide)
Fenol	Dezinfectante, fenoli
Tutun	Nicotină
Cremă de pantofi	Nitrobenzen
Dulceag	Cloroform sau alte hidrocarburi halogenate

1.2. ETAPELE UNEI ANALIZE TOXICOLOGICE GENERALE

Acestea sunt:

1. Izolarea substanței toxice din proba de analizat

Este etapa esențială a unei analize toxicologice, care poate influența decisiv rezultatul acesteia. Metodologia utilizată depinde de natura probei de analizat, dar și de natura substanței toxice, respectiv de proprietățile fizico-chimice ale acesteia.

Ea este deosebit de importantă în cazul probelor biologice, a căror analiză este dificilă pentru mai multe motive, printre care se pot enumera:

- conținutul ridicat de proteine
- concentrațiile mici

- prezența mai multor compuși interferenți, fie endogeni, fie exogeni, care adesea se găsesc în concentrații mai mari decât ale analitului
- necesitatea obținerii unor probe lichide pentru prelucrarea ulterioară
- riscul de infecție.

Datorită importanței deosebite a acestei etape a analizei, ea va fi discutată într-un capitol special.

2. Purificarea extractului

Această etapă este indispensabilă în cazul analizei probelor biologice și presupune izolarea substanței toxice de alți compuși care pot interfera, putându-se realiza concomitent cu etapa de izolare sau ulterior. Principalii interferenți sunt compuși normali din organism, cei mai importanți fiind proteinele, dar și lipidele sau lecitinele.

Eliminarea proteinelor se poate face prin precipitare cu diferiți reactivi sau denaturare cu ajutorul enzimelor proteolitice. Prin denaturare, proteinele își pierd capacitatea de a lega substanțele toxice, eliberându-le în filtrat. Deproteinizarea se poate realiza prin mai multe procedee:

- *Procedee fizice*: denaturarea prin încălzire, ultrafiltrarea, dializa;
- *Procedee imunologice*: precipitarea selectivă a proteinelor se poate efectua cu ajutorul anticorpilor precipitanți, formându-se complecși antigen-anticorpi insolubili;
- *Deshidratare*: cu ajutorul solvenților organici (metanol, etanol, acetonă, acetonitril) sau a sărurilor minerale (sulfat de sodiu, sulfat de amoniu);
- *Precipitare sub formă de săruri insolubile*:
 - o În mediu neutru – cu sulfat de zinc și hidroxid de sodiu sau de bariu – are dezavantajul de a conduce la adsorbția pe precipitatul de hidroxid metalic a substanțelor neproteice prezente în mediu;
 - o În mediu acid – cu acizi: tricloracetic, percloric, tungstic, picric – dezavantajul principal constă în posibilitatea degradării substanței toxice la pH-ul scăzut.

În tabelul 1.6. sunt prezentate principalele avantaje și dezavantaje ale acestor procedee.

- *Denaturarea cu ajutorul enzimelor proteolitice*: tripsină, subtilizină, papaină – are avantajul de a evita degradarea substanței toxice și este folosită mai ales pentru probele de organe, caz în care faza de purificare precedă faza de extracție.

3. Fraționarea extractului

În cazul unei expuneri concomitente la mai mulți compuși, poate fi necesară fracționarea extractului pe grupe de substanțe: acide, bazice sau neutre. Deoarece

această etapă se realizează concomitent cu extracția sau imediat după aceasta, ea va fi discutată în capitolul destinat metodelor de extracție.

4. Detectia substanțelor toxice

Constă în depistarea rapidă a compușilor în probele analizate și se realizează în general prin teste fizice sau chimice. Este mai importantă în cazul analizei substanțelor toxice din aer, când înainte de izolare este necesară cunoașterea naturii substanțelor din mediu pentru a putea alege condițiile adecvate. În cazul probelor biologice, ea se face în principal prin teste de culoare sau eventual prin metode imunochimice.

Tabel nr. 1.6. Eficiența diferitelor metode de deproteinizare

Metoda	Eficiența
Încălzire 5-15 min. la 90°C	Nu foarte eficientă, poate descompune analitul.
Saturare cu sulfat de amoniu	Eficiență moderată; concentrații crescute de sare în supernatant, pH final în jur de 7.
ZnSO ₄ -hidroxid de sodiu	Eficiență excelentă, precipitat fin, pH final în jur de 7, potrivită la temperaturi scăzute.
Acid metafosforic	Eficiență excelentă, reactivul trebuie menținut la rece, aciditatea (pH < 3) poate descompune analitul.
Acid percloric	Eficiență excelentă; reactivul trebuie păstrat la rece datorită pericolului de explozie. pH-ul final (< 3) poate descompune analitul. Majoritatea compușilor cu caracter bazic pot fi extrași fără probleme.
Acid tricloracetic	Eficiență bună; reactivii trebuie păstrați la rece și pot fi dificil de îndepărtat.
Etanol	Pentru denaturarea completă sunt necesare două volume de etanol pentru un volum de probă; este potrivit pentru substanțele instabile la pH scăzut.
Acetonitril	Pentru denaturare completă sunt necesare 1,5 volume pentru un volum de probă. Precipitatul este puțin dens, ceea ce reduce coprecipitarea analitului.
Clorură de aluminiu	Mai bun decât sulfatul de amoniu sau acidul tungstic pentru compușii bazici.

5. Identificarea substanțelor toxice

Identificarea substanțelor toxice în extractele purificate, sau uneori chiar în probele ca atare, se poate face prin metode chimice (reacții de culoare sau de precipitare), metode fizico-chimice (cromatografice, spectrofotometrice, spectrometrice) sau metode imunochimice.

Metodele chimice, în special teste de culoare, țin mai mult de domeniul trecutului, dar pot fi încă întâlnite în laboratoarele cu o dotare mai puțin sofisticată și la analiza unor corpuri delictive sau a unor probe biologice mai puțin complexe, cum ar fi urina sau conținutul gastric. Astfel, salicilații pot fi identificați cu reactivul Trinder, fenotiazinele cu reactiv FNP, imipramina prin reacția Forrest, iar compușii triclorurați prin reacția Fujiwara. Deoarece multe din aceste metode au atât specificitate cât și sensibilitate redusă, ele nu sunt foarte fiabile și pot fi pozitive doar în prezența unor cantități relativ mari de substanță toxică.

Metodele cromatografice și în special cromatografia în strat subțire, au fost și încă mai sunt mult utilizate în scopul identificării substanțelor toxice, mai ales datorită faptului că permit în același timp și o separare a toxicului de eventualii interferenți extrași concomitent din probe, în special cele biologice.

În Tabelul 1.7. sunt prezentate principalele condiții cromatografice pentru identificarea prin CSS a multor din substanțele toxice frecvent întâlnite. Un progres al aplicării tehnicii CSS în toxicologia analitică îl reprezintă **kitul TOXI-LAB**, care este o trusă de cromatografie comercializată în format standard și ușor de utilizat în screening-ul toxicologic deoarece reduce variabilele din metoda clasică a cromatografiei în strat subțire.

Probe utilizate sunt: urina, care este preferată, dar după modificări adecvate se pot folosi și serul, conținutul gastric sau probe nebiologice.

Kitul a fost conceput să detecteze concentrațiile toxice ale medicamentelor sau drogurilor frecvent întâlnite, iar uneori detectează, pentru anumite substanțe, și concentrațiile terapeutice.

Există două scheme analitice:

- sistemul A cu procedeele de – extracție, cromatografie, colorare - pentru detectarea substanțelor bazice și neutre
- sistemul B – pentru substanțele acide și neutre.

Fabricantul furnizează plăcile cromatografice (TOXI-GRAM), materialele de extracție (lichid-lichid sau extracție pe faze solide) și reactivii de colorare. După dezvoltarea plăcii cu o fază mobilă specifică, spoturile sunt vizualizate prin introducerea plăcii în reactiv și nu prin pulverizare. Pentru facilitarea identificării este furnizată și o bibliotecă CSS în format Rolodex ce conține Rf-ul și colorațiile medicamentelor și metaboliților. Faza staționară este fabricată din hârtie din microfibră de sticlă impregnată cu silicagel, pe care se pot aplica 6 probe sau

standarde. Pentru a vizualiza frontul solventului, în timpul dezvoltării este folosit un marker colorant.

Limitele de detecție sunt în general de 1 µg / ml pentru o probă de urină de 4,5 – 5 ml. Kitul este adecvat pentru determinarea antidepresivelor triciclice (amitriptilină, imipramină, doxepin), a antidepresivelor tetraciclice (maprotilin), a antihistaminicelor (difenhidramină, clorfeniramin), a aminelor simpatomimetice, a analgezicelor neopiacee și a opioidelor sintetice (paracetamol, pentazocin). Determinarea benzoilecgoninei, opiaceelor, benzodiazepinelor, fenciclidinei este problematică, în timp ce salicilații și ibuprofenul nu se pot detecta.

Avantajele acestei truse sunt următoarele:

- toate materialele și reactivii sunt asigurate de producător într-un singur set
- standardele sunt pre-aplicate pe placa TOXI-GRAM
- se asigură un material documentar detaliat
- se asigură o bună documentare asupra substanțelor și metaboliților lor sub aspectul Rf-ului și a culorii spoturilor
- sistemul are o specificitate crescută, asemănătoare cu cea a gaz cromatografiei

Limitele sistemului constau în:

- limitele de detecție insuficient de joase pentru anumite medicamente
- imposibilitatea depistării substanțelor polare sau a metaboliților în timpul screening-ului inițial
- mascarea unor substanțe de către altele prezente concomitent în probă (ex. fenotiazinele pot fi mascate de opiacee).

Rezultatele determinărilor trebuie confirmate pentru a avea certitudinea identificării, dar sistemul este deosebit de util în toxicologia clinică, atunci când viața intoxicatului depinde de rapiditatea cu care se depistează toxicul incriminat.

Performanțele tehnicilor cromatografice pot fi crescute prin cuplarea acestora cu procedee de detecție bazate pe metode spectrofotometrice sau spectrometrice. Astfel, cromatografia în strat subțire poate fi cuplată cu detecția UV prin folosirea unui densitometru, care permite înregistrarea *in situ* a spectrelor UV ale substanțelor separate. Compararea acestor spectre cu cele din bazele de date conferă un plus de certitudine identificării toxicului, realizată anterior pe baza Rf-ului, prin metoda standardului extern.

Cuplarea gaz-cromatografiei cu detecția prin spectrometrie de masă a permis dezvoltarea unei tehnici de identificare și dozare extrem de performante, care a reprezentat o adevărată revoluție în toxicologia analitică, mai ales o dată cu standardizarea tehnicii de ionizare și constituirea unor biblioteci de spectre. Progresele în domeniul informaticii fac posibilă identificarea rapidă și sigură a compușilor necunoscuți prin compararea cu spectrele existente în bibliotecile de spectre.

Cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC) poate fi cuplată cu detectori UV cu șir de diode (DAD), sau chiar cu un detector spectrometru de masă. Detectorul cu șir de diode determină spectrul UV al fiecăruia din compușii separați, acesta fiind apoi comparat cu ajutorul unui soft special cu spectrele din biblioteca de spectre. Tehnica lichid cromatografie-spectrometrie de masă (LC-MS) s-a dezvoltat foarte mult în ultima perioadă, având numeroase aplicații atât în toxicologia medico-legală cât și în cea clinică. Ea combină puterea de separare a HPLC cu sensibilitatea și specificitatea spectrometriei de masă, iar față de GC-MS are avantajul de a putea fi aplicată și la analiza moleculelor polare, termolabile sau cu masă moleculară mare și de a necesita mai puțin timp pentru pregătirea probelor, eliminându-se faza de derivatizare.

Electroforeza capilară reprezintă o tehnică cromatografică relativ nouă, care s-a dezvoltat foarte mult în ultimii ani, având numeroase aplicații și în toxicologia analitică. *Avantajele* acestei metode sunt:

- diversitatea compușilor ce pot fi analizați, de la ioni anorganici, medicamente și droguri, pesticide, molecule aromatice mici, până la aducți ai ADN-ului;
- existența mai multor moduri de separare, cu selectivități diferite (Ex. electroforeza capilară zonală, electroforeza electrocinetică micelară, electrocromatografia capilară, electroforeza capilară în gel, izotacoforeza capilară) ;
- volumele mici de probă necesare pentru analiză, de obicei de ordinul nanolitrilor (dezavantaj: limitarea limitelor de detecție),
- necesarul minim de solvenți și costul scăzut al acestora (sunt soluții tampon), precum și al altor consumabile (capilarele);
- posibilitatea de cuplare cu diferiți detectori;
- robustețea și simplitatea aparaturii de bază.

Aparatele de electroforeză capilară sunt alcătuite dintr-un autosampler, o sursă de curent cu tensiune ridicată (10-30 kV), două rezervoare pentru soluțiile tampon, capilara (cu diametru intern între 20-100 μm și lungime între 20-100 cm) și un detector (Fig.1.1). Teoria separării este simplă. Deoarece capilarele sunt din silice și grupările silanol sunt dispuse pe suprafața internă, ele se pot ioniza pe măsură ce pH-ul tamponului cu care se face eluarea crește. Ionizarea atrage cationii pe suprafața silicagelului, iar la aplicarea unui curent acești cationi vor migra spre catod, antrenând o deplasare a lichidului prin capilară. Fluxul poate fi ajustat prin modificarea tăriei dielectrice a tamponului, prin modificarea pH-ului, prin ajustarea tensiunii curentului sau prin modificarea vâscozității. În aceste condiții, atât cationii cât și anionii sunt separați în timpul unei singure separări, cationii fiind eluați primii. Moleculele neutre (ex. pesticidele) sunt separate prin adăugarea în tampon a unui detergent, cum ar fi dodecil sulfatul de sodiu, ceea ce conduce la formarea de miceli, în care moleculele neutre se vor distribui pe baza hidrofobității lor.

Deoarece miceliile sunt atrase spre anod, ele se vor deplasa spre catod cu o viteză mai mică decât restul lichidului din capilară, ceea ce permite separarea. Procesul poartă denumirea de cromatografie capilară electrocinetică micelară (Fig.1.1.). Majoritatea analizelor se pot efectua în 5-10 minute, sensibilitățile fiind situate în domeniul părților pe bilion (ppb). Detectorul cel mai frecvent utilizat este detectorul UV, dar detectorul de fluorescență indusă de laser poate determina o creștere a sensibilității până la 10^{-7} - 10^{-12} M.

Metodele spectrofotometrice cele mai folosite sunt spectrofotometria UV, spectrofotometria IR și spectrofotometria de absorbție atomică (în flacără sau fără flacără), aceasta din urmă fiind utilizată la analiza metalelor. Spectrofotometria IR cu transformantă Fourier are avantajul de a permite în anumite condiții (prin intermediul scăderii spectrelor asistate de calculator) identificarea rapidă a unor droguri din amestecuri ilicite, fără a fi necesară separarea acestora; se impune însă confirmarea rezultatelor prin spectrometrie de masă.

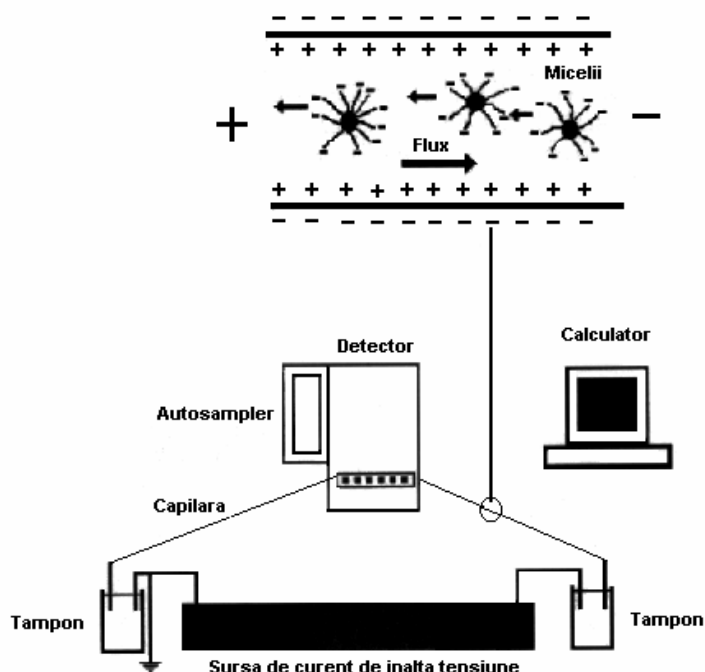
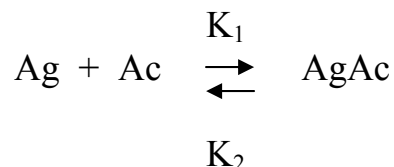


Figura 1.1. Reprezentarea schematică a unui cromatograf de electroforeză capilară și o secțiune prin capilară în timpul analizei electrocinetice micelare

Metoda spectrometrică cea mai utilizată în analiza toxicologică este spectrometria de masă care, pe baza fragmentării caracteristice a moleculei, face

posibilă identificarea cu certitudine a substanțelor. Spectrometrele de masă sunt frecvent cuplate cu metodele cromatografice care asigură separarea componentelor eventual prezenți în probele analizate, iar existența unor vaste librării de spectre favorizează identificarea substanțelor necunoscute.

Metodele imunochimice sunt metode de analiză ce se bazează pe reacția reversibilă dintre un antigen (ligand) și un anticorp (receptor), în urma căreia se formează un complex solubil în apă:



Reacția continuă până la echilibru, când o parte din Ac și Ag se găsesc sub formă legată, restul existând sub formă liberă.

Avantajele acestor metode constau în:

- sensibilitatea și specificitatea mare
- rapiditatea analizelor
- prelucrarea unor cantități mici de probe, fără pregătire anterioară.

Metodele imunochimice se pot clasifica în trei grupe, în funcție de fenomenul final observat și măsurat:

- 1. Metode în care se observă *direct* rezultatul reacției antigen-anticorp, cele mai cunoscute fiind metodele de precipitare și de aglutinare;
- 2. Metode în care rezultatul reacției este observat *indirect*, prin intermediul altui fenomen; este vorba de un fenomen fizico-chimic, corelat cu un marker atașat artificial de antigen sau de anticorp, care permite evidențierea reacției dintre antigen și anticorp;
- 3. Metode în care rezultatul reacției este observat prin intermediul unui *fenomen biologic*, în general celular.

Metodele folosite în analiza toxicologică fac parte în principal din a doua grupă și, în funcție de agentul cu care se face marcarea, se pot distinge:

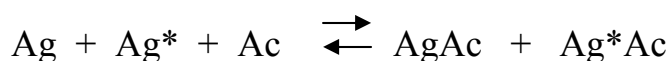
- Radioimunoanaliza (RIA), în care markerii sunt radioizotopi
- Analiza imunoenzimatică, ce folosește drept markeri enzime
- Analiza imunofluorimetrică, în care marcarea se face cu un compus fluorescent
- Dozarea imunoluminometrică, în care marcarea se realizează cu un compus luminiscent
- Imunodozarea radicalilor liberi.

Aceste metode pot fi la rândul lor în *fază heterogenă*, când dozarea se face prin măsurarea distribuției reactivului marcat, fiind necesară separarea fazelor, sau

în fază omogenă, când dozarea se bazează pe modularea activității markerului, nefiind necesară separarea fazelor.

RADIOIMUNOANALIZA (RIA)

Această metodă presupune marcarea antigenului cu un izotop (^{14}C , ^3H , ^{125}I , ^{131}I). Are loc în sistem heterogen, ceea ce înseamnă că este necesară separarea complexului AgAc de fracțiunea de Ag liber. Atât antigenul marcat Ag^* , cât și Ag nemarcat (analitul) se leagă de anticorp (Ac), cele 2 specii fiind în competiție pentru aceeași cantitate limitată de Ac. Deoarece ambele specii au teoretic aceeași afinitate, proporția lor în faza legată și în cea liberă este aceeași, deci distribuția Ag nemarcat (analit) poate fi caracterizată de distribuția Ag^* :



Dacă se folosesc cantități constante de Ac și Ag^* , proporția de fracțiune liberă și fracțiune legată va fi determinată de cantitatea de Ag nemarcat. Cu cât crește concentrația de Ag nemarcat, cu atât radioactivitatea fracțiunii legate scade, deci cantitatea de Ag^* legat este invers proporțională cu cantitatea de Ag nemarcat (analit). Fracțiunea legată se separă de cea liberă prin: reținere pe cărbune activat, folosind un al doilea anticorp, prin reținere pe fază solidă.

ANALIZA IMUNORADIOMETRICĂ (IRMA)

Anticorpul în exces este marcat cu radioizotopi. Se incubează cu antigenul din probă, iar excesul de Ac^* este îndepărtat din sistem prin adăugarea unei faze solide pe care se găsește legată o cantitate de antigen, în final determinându-se radioactivitatea complexului AgAc^* .

ANALIZA IMUNOENZIMATICĂ

Marcarea antigenului se face cu enzime, care pot fi: fosfataza alcalină, galactozidaza, peroxidaza din hrean, glucozo-6-fosfat dehidrogenaza, lactamaza, ureaza.

Tehnica prezintă unele *avantaje* față de marcarea cu izotopi radioactivi:

- folosește compuși marcați enzimatic, ce pot fi determinați prin spectrofotometrie UV-VIS
- enzimele sunt mai stabile decât radioizotopii și nu prezintă riscuri la manipulare
- se poate lucra în sistem omogen, nemaifiind necesară o etapă de separare
- se poate automatiza.

Se poate lucra în – sistem heterogen – ELISA

- sistem omogen EMIT

Tehnica **ELISA** (enzyme – linked – immunosorbent assay) se poate folosi pentru determinarea oricărui antigen. Este o metodă competitivă, în care o cantitate corespunzătoare de anticorp se leagă pe o fază solidă. La suportul solid se adaugă o soluție care conține o cantitate cunoscută din antigenul marcat enzimatic și antigenul standard sau o probă necunoscută. Amestecul de reacție se incubează pentru a permite ca reacția Ag-Ac să ajungă la echilibru. După spălare se adaugă substratul, iar activitatea enzimatică se măsoară după o perioadă de incubare. Concentrația produsului de reacție este invers proporțională cu concentrația standardului sau antigenului din proba necunoscută.

Tehnica **EMIT** (enzyme multiplied immunoassay technique), sau tehnica imunoanalitică cu enzime multiplicare, este limitată în general pentru determinarea haptenelor cu masa moleculară mică. Metoda se bazează pe modificarea activității enzimei atunci când haptena marcată enzimatic se leagă de anticorp. Conjugatul haptenă-enzimă este activat enzimatic înainte de legarea de Ac care, datorită impedimentelor sterice, împiedică accesul spre situsurile active ale enzimei. Haptena din probă se află în competiție cu conjugatul haptenă-enzimă pentru o cantitate limitată de anticorp. O concentrație crescută de haptenă va determina o legare mai redusă a conjugatului haptenă-enzimă de anticorp, deci o activitate enzimatică crescută (Fig. 1.2.).

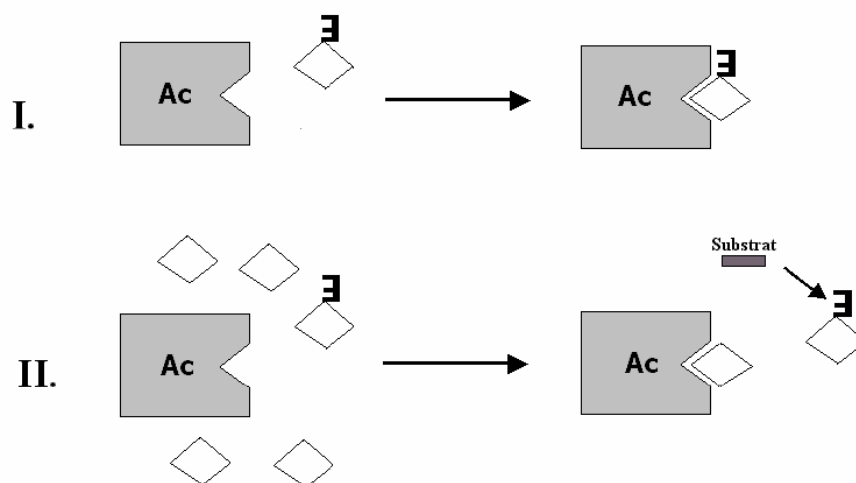


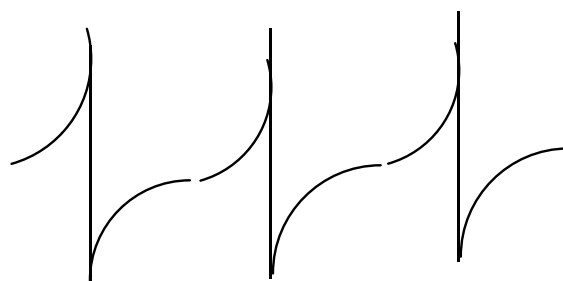
Figura 1.2. Mecanismele de modulare enzimatică în metoda EMIT

- I. Sistemul test în absența analitului. Anticorpul leagă antigenul marcat cu o enzimă: reacția are drept rezultat inactivarea enzimei, datorită unui impediment steric.
- II. Sistemul test în prezența unui exces de antigen liber [analit]. Inhibiția enzimatică este contracarată; cu cât analitul se găsește în cantitate mai mare, cu atât activitatea enzimatică este mai mare și semnalul este mai intens.

TEHNICA FRAT (free radical assay technique) a fost introdusă în 1971 pentru determinarea morfinei. Această metodă se bazează pe analiza spectrului RES al radicalilor liberi. Astfel, un radical liber (ex. nitroxid) aflat în soluție prezintă un spectru simplu din trei linii atunci când este examinat cu ajutorul unui spectrometru RES. Acest spectru se observă chiar și atunci când radicalul este legat de o moleculă de medicament. Dacă însă complexul medicament-radical se leagă de un anticorp, rotația sa în soluție este încetinită, iar spectrul se aplatizează (Fig.1.3.). În absența antigenului nemarcat, tot complexul medicament-radical este legat de Ac și nu se observă semnal RES ascuțit. Dacă se adaugă antigen nemarcat, complexul este deplasat de pe Ac și semnalul ascuțit devine vizibil. Dezavantajul acestei metode constă în necesitatea unui spectrometru RES, care este destul de costisitor.



A
radical legat de Ac



B
radical ce se rotește liber

Figura 1.3. Reprezentarea spectrelor RES observate în determinările prin tehnica FRAT

1. Determinarea cantitativă a substanțelor toxice

Se realizează prin diferite metode fizico-chimice: potențimetrice, voltametrice, spectrofotometrice, spectrometrice, cromatografice sau imunochimice. În funcție de natura substanței și de concentrația în care aceasta se găsește în probă, se aleg acele metode care oferă cea mai bună specificitate și o sensibilitate care să corespundă scopului analizei.

2. Interpretarea rezultatelor analizei

Toate rezultatele trebuie înregistrate în fișe de laborator, menționându-se data, numele analistului, numele pacientului și orice alte informații - în special numărul și natura probelor și analizele efectuate. Este de preferat să se atribuie fiecărei probe un număr de identificare unic în momentul recepției în laborator, acest număr urmând a fi utilizat în toate analizele efectuate. Spectrele UV, curbele de etalonare și alte documente obținute în cursul analizei vor fi păstrate un anumit timp după comunicarea rezultatelor. Dacă se menționează că o substanță nu a fost detectată în plasmă, ser sau urină, trebuie să se cunoască limita de detecție a metodei.

Rezultatele analizelor toxicologice sunt interpretate pentru probele de mediu (aer, apă, alimente) față de concentrațiile maxime admise (CMA) sau concentrațiile medii prevăzute în normele oficiale ale țării respective, iar pentru substanțele toxice din mediile biologice, față de nivelele fiziologice maxime (dacă este vorba de un component normal al organismului, ex. fier), față de nivelele terapeutice maxime (dacă este vorba de un medicament) sau față de nivelele toxice sau letale menționate în literatură și care au fost determinate în cursul unor cazuri de intoxicații.

Variabile care pot influența rezultatele analizelor toxicologice

Numeroși factori pot influența rezultatul unei analize toxicologice. Cei mai importanți sunt legați de:

- A. Momentul de recoltare a probei
- B. Stabilitatea compusului în probă
- C. Reproducibilitatea metodei analitice
- D. Interferențele cu metoda analitică

A. Momentul de recoltare a probei

Când o persoană absoarbe o singură doză de substanță toxică, concentrația acesteia în sânge, urină sau viscere depinde de momentul toxicocinetic în care se recoltează proba sau se produce decesul (pentru probele recoltate post-mortem). Diferențele sunt mai importante pentru substanțele cu timp de înjumătățire scurt.

În cazul unei absorbții cronice, în special atunci când ne interesează monitorizarea unei intoxicații, sau în domeniul toxicologiei profesionale, probele au o valoare redusă atunci când se obțin în momente care nu corespund stării staționare, sau de echilibru. Dacă probele se recoltează în faza de absorbție, atât

concentrațiile substanței cât și valorile parametrilor farmacocinetici calculați vor fi eronate. Starea staționară în absorbția cronică va fi mai bine reflectată de probele de sânge recoltate înaintea următoarei absorbții (administrări).

B. Stabilitatea compusului în probă

Frecvent, substanța suferă modificări în prezența enzimelor plasmaticice; acest inconvenient este mai redus în cazul probelor de sânge total la care s-a adăugat un conservant care împiedică coagularea, cum ar fi fluorura de sodiu.

C. Reproductibilitatea metodei analitice

Metodele analitice trebuie să fie foarte sensibile, astfel încât plecând de la probe de 2 ml să se poată detecta concentrații mai mici de 50-100 μg , dar mai important este ca rezultatele să fie reproductibile ori de câte ori se analizează aceeași probă. Pentru acest motiv este necesar ca laboratorul să participe la programe de control al calității, atât intra-laborator cât și inter-laboratoare.

În general, rezultatul unei analize nu poate fi considerat ca o valoare absolută pentru mai multe motive:

A. *Este posibil ca laboratorul să nu poată detecta agentul etiologic al unei intoxicații* ca urmare a:

a) *unor deficiențe operatorii* cu o recuperare redusă a substanței toxice datorită:

- unei tehnici extractive greșite, unei separări insuficiente din complexe cu proteinele sau a glucuronoconjugatilor, etc;

- unor pierderi excesive în timpul proceselor de purificare sau datorită descompunerii compusului (prin hidroliză, oxidare, piroliză) înainte sau în timpul operațiilor analitice;

- utilizării unor tehnici de detecție cu sensibilitate redusă.

b) *dispariției substanței toxice din corpul intoxicatului* înainte de prelevarea probei biologice. În mod normal, se crede că individul este recuperat atunci când reușește să elimine substanța toxică, dar acest lucru nu este întotdeauna valabil. Astfel, există substanțe care declanșează un proces fiziopatologic care poate continua chiar și după dispariția agentului cauzator din organism. Un exemplu este cel al distrugerii parenchimului pulmonar la 12 zile după absorbția paraquatului, care în realitate se elimină în 24 h.

B. *Se observă numeroase discordanțe între concentrațiile substanțelor toxice în sângele și urina intoxicatului și simptomatologia clinică.* Astfel, tabelele de corelare între nivelurile substanțelor toxice în lichidele biologice și starea clinică a intoxicatului trebuie considerate doar orientative din următoarele motive:

a) *Multe date nu au un suport statistic suficient:* concluziile diferiților autori se bazează pe un număr mic de observații, iar criteriile clinice utilizate sunt uneori

diferite. Cea mai notabilă excepție o reprezintă corelarea alcoolemiei cu starea clinică a pacientului.

b) *Confuzia între valorile corespunzătoare sângelui total, serului sau plasmei*, sau diferențele de concentrație urinară care pot să apară în oligurie față de diureza provocată.

c) *Diferențe individuale* datorate mai multor factori:

- diferențele de sensibilitate a receptorilor (motive genetice, toleranță dobândită, etc)

- capacitate diferită de legare a proteinelor plasmatice

- adaptarea metabolică, ce poate induce toleranță prin eliminarea mai rapidă a unei doze, dar în același timp poate determina devierea metabolismului spre alte căi care pot conduce la metaboliți mai toxici sau mai puțin toxici. În general, în analiza toxicologică se dozează produsul inițial și se ignoră metaboliții activi sau dimpotrivă, în funcție de tehnica folosită, se determină substanța toxică și metaboliții împreună. În mod logic, rezultatele nu vor fi concordante. De exemplu, o aceeași doză de amitriptilină poate produce la indivizi diferiți diferențe plasmatice de până la 40 de ori.

- acțiunea concomitentă a mai multor substanțe când, prin potențare sau antagonism, se poate modifica răspunsul normal al individului la dozele individuale din fiecare substanță

- confuzia între substanțe toxice înrudite chimic, dar diferite sub aspectul metabolismului și excreției

- diferențele de acțiune farmacodinamică în funcție de ora din zi sau de anotimp (cronotoxicologie)

d) *Diferențele de sensibilitate și exactitate a tehnicilor analitice*

e) *Utilizarea unor tehnici (spectrofotometria în UV sau fluorescență, reacții de culoare și CSS) care nu permit diferențierea între substanțele toxice și metaboliții activi sau inactivi*

f) *Utilizarea unor tehnici analitice avansate cu dizolvarea în apă a produsului.*

Pot să apară erori deoarece nu se ține cont de:

- prezența proteinelor și lipidelor în probele biologice

- interferența resturilor organice și a metaboliților.

Tabel nr. 1.7. Sisteme CSS pentru identificarea unor substanțe toxice

SISTEM	GRUP	STANDARDE	DEVELOPARE	REVELARE
S ₁	BARBITURICI	a) aliltiobutilbarbituric b) tiopental	CHCl ₃ : acetona (9:1)	a) general: Hg ₂ (NO ₃) ₂ 1% b) tiobarbiturici: sulfat de cobalt (0,5% în etanol) dietilamină (3%)
S ₂	DERIVATI FENOLICI SI XANTINICI	a) acid salicilic b) fenacetina c) salicilamida d) cafeina	CHCl ₃ : etanol (9:1) Benzen : acetat de etil : acid acetic (85:10:5)	a, b, c) FeCl ₃ 5% d) iodobismutat e) I ₂ (1% în etanol) + KI (1% în etanol și HCl)
S ₃	BENZODIAZEPINE	Diazepam	Acetat de etil : metanol : amoniac (84:10:5)	Iodobismutat
S ₄	CARBAMATI	Meprobamat	CCl ₄ : CHCl ₃ : acid acetic : apa (6:9:10:5) Benzen : metanol : acid acetic (48:8:4)	- furfurol în HCl conc. - Vanilină în H ₂ SO ₄ 50% - Ditiocarbamați - CuCl ₂ (1,5 g) + NH ₄ Cl (3g) + NH ₃ (3ml) + apă (50 ml). Înainte de utilizare se amestecă 1:1 cu hidroxilamina (20% în apă) - sau b) de la S ₁
S ₅	FENOTIAZINE SI METABOLITI (SULFOXIZI)	a) clorpromazina b) imipramina	Metanol : amoniac (100:1,5)	FNP a) o-Tolidina b) și a) H ₂ O ₂

S ₆	ALCALOIZI SI DIFERITE AMINE	a) stricnina b) morfina c) sulpirid	Metanol : amoniac (100:1,5)	a), b) iodoplatinat, iodobismutat b) iodobismutat
S ₇	AMFETAMINE	Amfetamina	n-butanol : acid formic: apa (20:1:2) Placa se usucă la 60°C	Tampon fosfat 0,5 M (pH 5,5)+ Verde de bromcrezol (0,1% în etanol) + apă (1:2:1) Fast B Blue în NaOH 0,1N
S ₈	CANABINOIDE	THC	Benzen : hexan : n- dietilamina (25:5.0,5) Benzen : cloroform (4:1)	
S ₉	ORGANOCLOPURATE	DDT	Ciclohexan : cloroform (4:1)	o-tolidina (5% în etanol) + UV
S ₁₀	ORGANOFOSFORICE	Paration	Eter de petrol : acetona (4:1)	Brom + roșu de Congo Dianisidina-molibdat sodic, încălzire Albastru de bromfenol + α - naftilacetat, incubare la 37°C Fast B Blue (în apă)

Capitolul 2

METODE DE ANALIZĂ TOXICOLOGICĂ SISTEMATICĂ

Substanțele toxice pot fi clasificate, în funcție de procedeele folosite pentru izolare și de proprietățile lor fizico-chimice în 3 grupe principale:

1. Substanțe toxice separate sub formă de gaze sau de vapori
2. Substanțe toxice minerale
3. Substanțe toxice organice nevolatile.

În afară de aceste clase principale, mai există substanțe toxice diverse, care necesită tehnici de extracție speciale, cum ar fi extracția pe coloane cu schimbători de ioni, formarea de derivați sau de perechi de ioni sau extracție continuă cu un solvent polar.

Datorită numărului mare de substanțe de interes toxicologic, într-o analiză toxicologică generală trebuie să se încerce succesiv metode specifice pentru separarea și identificarea fiecărui toxic. Dacă, pe baza antecedentelor sau a altor indicații, nu se caută o substanță concretă, este necesar să se aplice procedee metodologice programate în mod logic, care să permită izolarea și detectarea prezenței fiecărui grup de substanțe cu caracteristici fizico-chimice similare.

Conform clasificării anterioare a substanțelor toxice, există trei grupe de metode de analiză toxicologică :

- Metode pentru gaze și vapori
- Metode pentru toxici anorganici
- Metode pentru toxici organici.

Înainte de a începe o analiză toxicologică generală, când nu există indicații cu privire la natura substanței toxice, proba de analizat se împarte în 4 porțiuni: 3 destinate celor 3 metode menționate, iar a 4 a se păstrează pentru operațiunile ulterioare sau pentru confirmare, iar dacă este necesar pentru determinarea cantitativă.

2.1. METODE DE IZOLARE PENTRU GAZE ȘI VAPORI

Metodele de izolare care se utilizează pentru substanțele toxice gazoase și volatile depind de natura probei care este supusă analizei. Astfel, reținerea gazelor și a vaporilor din aer se face în medii absorbante lichide sau direct în aparatul de analiză, în timp ce din medii biologice, aceste substanțe se pot izola prin difuzie simplă, antrenare cu un curent de aer, antrenare cu vapori de apă sau distilare.

2.1.1. Izolarea substanțelor toxice gazoase și volatile din aer

Detecția substanțelor toxice în aer

Poluarea atmosferei a devenit o problemă cotidiană a societății moderne, motiv pentru care supravegherea calității aerului reprezintă un obiectiv central al asigurării sănătății publice. Acest lucru se realizează prin evidențierea periodică sau continuă a substanțelor toxice în aerul industrial sau comunal. Metodele de detecție se pot clasifica în metode chimice, metode fizico-chimice și metode biologice.

a) Metodele chimice de detecție se bazează pe reacții chimice care au loc între substanța chimică și diferiți reactivi de culoare, care sunt impregnați pe hârtii, creioane sau tuburi indicatoare.

- Hârtiile indicatoare sunt benzi sau rondule de hârtie de filtru îmbibate cu un reactiv adecvat, care se expun în atmosfera poluată sau prin care se aspiră aerul de analizat. Prezența substanței toxice este indicată de modificarea culorii, care survine în urma reacției dintre aceasta și reactivul de impregnare. Determinările pot fi și semicantitative, prin aprecierea concentrației pe baza timpului necesar pentru apariția culorii sau pe baza lungimii porțiunii colorate sau a intensității culorii în funcție de volumul de aer aspirat.
- Creioanele indicatoare conțin reactivul inclus într-un material de umplură amestecat cu un liant. În atmosfera analizată, se trasează o linie cu acest creion pe hârtie sau lemn și se apreciază prezența sau chiar concentrația aproximativă a substanței toxice prin modificarea colorației liniei trasate.
- Tuburile indicatoare conțin reactivul impregnat pe o pulbere adsorbantă, cel mai adesea de silicagel, care este introdusă în tuburi de sticlă gradate, cu diametru uniform. Tuburile indicatoare sunt specifice pentru fiecare substanță toxică și sunt comercializate sub formă de truse. Pentru a putea fi utilizate, se taie la ambele capete și fie că sunt lăsate un anumit timp în atmosfera poluată, fie că sunt adaptate la dispozitive de tip Dräger, care permit aspirarea unui anumit volum de aer. În acest caz, determinarea este semicantitativă, concentrația fiind proporțională cu lungimea stratului colorat.

b) Metodele fizico-chimice de detecție se bazează pe măsurarea unor constante fizice sau chimice ale substanțelor prezente în aer, folosind aparate speciale, printre care se numără și analizoarele de gaze.

c) Metodele biologice de detecție utilizează animale mici, cum ar fi vrăbiile, canarii, șoarecii, care au o frecvență respiratorie mare și o sensibilitate mare la substanțele toxice gazoase. Acestea reacționează mult mai repede decât omul și previn asupra poluării atmosferei, în special în locurile de muncă închise, cum ar fi galeriile din mine.

Recoltarea probelor de aer

În afară de detecția rapidă a substanțelor toxice, de cele mai multe ori se recomandă și recoltarea de probe de aer în vederea unei analize precise în laborator, care permite nu numai determinarea concentrației toxicului, dar și determinarea compoziției atmosferei la locul unui accident. Recoltarea probelor de aer se realizează prin mai multe procedee.

a) Recoltarea în recipiente închise (Procedeul de moment)

Procedeul este indicat pentru recoltarea substanțelor toxice care se găsesc în atmosferă în concentrație mare, pentru analiză fiind suficiente volume mici de aer (până la 1 litru). Se utilizează recipiente cu volum cunoscut, de diferite forme sau capacități, cum ar fi:

- pipetele de gaz (tonometre), care sunt tuburi de sticlă de 200-500 ml, prevăzute la ambele capete cu robinete (Fig.2.1.)
- flacoane de sticlă prevăzute cu dopuri cu tubulatură de tip sifon (a) sau în formă de T (b), care permit vidarea (Fig.2.2.)
- baloane sau camere de cauciuc sau material plastic, care au însă o utilizare limitată, deoarece unele substanțe pot difuza prin material (dioxidul de carbon), iar altele pot fi adsorbite de acesta (dioxidul de sulf).

Recoltarea se face prin dislocuire de lichid sau aer, sau prin creare de vid.

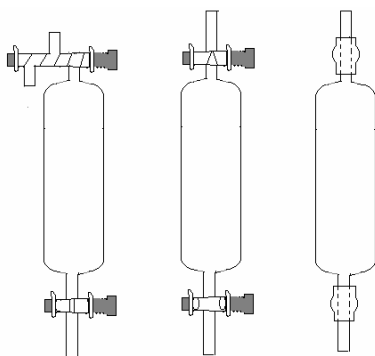


Figura 2.1. Tonometre

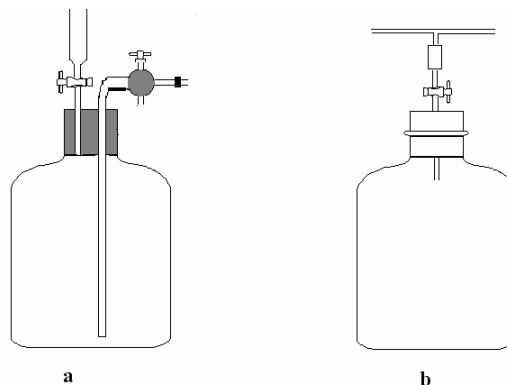


Figura 2.2. Flacoane de recoltare

b) Recoltarea prin aspirare (Procedeul continuu)

Procedeul este indicat pentru recoltarea substanțelor toxice ce se găsesc în atmosferă în concentrație mică, pentru analiză fiind necesare volume mari de aer. Aerul este aspirat continuu printr-un mediu absorbant, în care toxicul este concentrat. Aparatura necesară pentru recoltare este alcătuită din trei tipuri de dispozitive: dispozitive de aspirare, dispozitive de măsurare a volumului de aer aspirat și dispozitive de reținere a substanței toxice.

1. *Dispozitivele de aspirare* au rolul de a crea o depresiune în sistemul de reținere, care antrenează pătrunderea aerului în acesta. Ele pot fi aspiratoare hidraulice sau aspiratoare mecanice, în funcție de modul de funcționare și de volumele de aer recoltate.

Aspiratoarele hidraulice se folosesc atunci când la locul recoltării există doar o sursă de apă, nu și una de curent electric, iar volumele de aer sunt relativ mici și se recoltează cu viteză redusă. În această clasă se încadrează:

- **Vasele comunicante** (Fig.2.3.), care sunt confecționate din sticlă sau metal, au capacități egale, sunt asamblate prin intermediul unui tub de cauciuc prevăzut cu o clemă și sunt gradate din 100 în 100 cm³. Vasele comunică între ele printr-un dispozitiv de sifonare sau prin orificii laterale. Vasul superior este atașat la dispozitivul de reținere, se umple cu apă și se deschide cleva. Datorită diferenței de nivel, apa va curge în vasul inferior, făcând vid în vasul superior și antrenând astfel aspirarea aerului din exterior prin mediul absorbant din dispozitivul de reținere. Se pot recolta și volume de aer mai mari decât capacitatea vaselor, dacă se schimbă poziția lor de mai multe ori între ele.
- **Trompa de apă** se poate utiliza în locurile unde există o conductă de apă sub presiune, cu debit mare și uniform.

Aspiratoarele mecanice sunt utile pentru recoltarea unor volume mari de aer. Ele pot fi:

- **Pompe de vid** manuale sau electrice, care prezintă dezavantajul că sunt grele și sunt sensibile la coroziunea prin vapori acizi sau alcalini.
- **Aspiratoarele de praf**, care sunt pompe electrice de vid modificate, cu debit mare și ușor de manipulat.
- **Pompele cu aer comprimat** sunt indicate pentru locurile de recoltare cu risc de explozie și unde există o instalație de aer comprimat.
- **Ejectoarele** sunt aparate electrice care recoltează aerul pe mai multe canale cu debite reglabile, măsurând în același timp și volumul de aer aspirat.

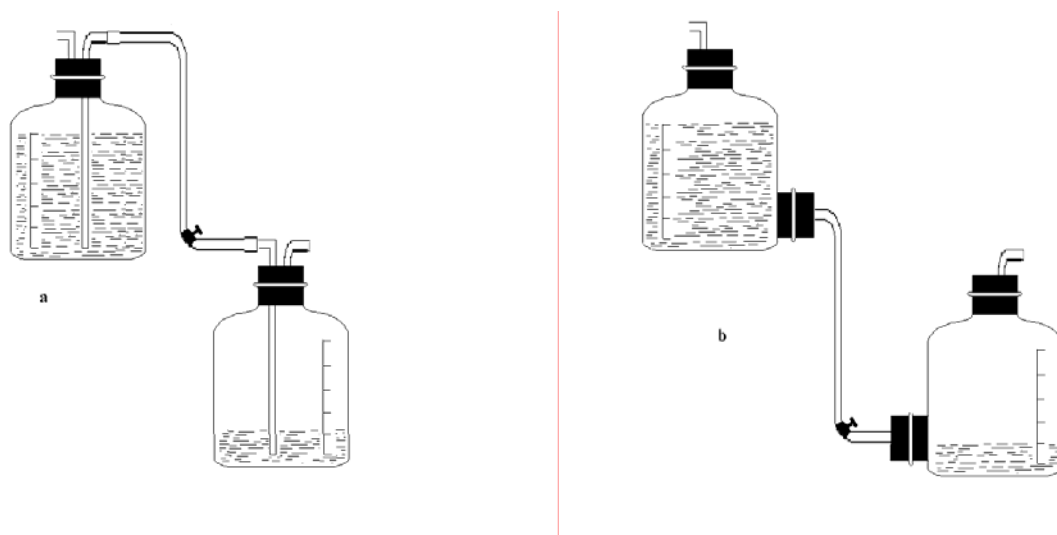


Figura 2.3. Tipuri de vase comunicante

2. Dispozitivele de măsurare a volumului de aer pot fi gazometre sau debitmetre.

- **Gazometrele** (contoare de gaz) măsoară volume mari de aer prin sistemul unor camere separate de membrane speciale, iar volumul aspirat este indicat direct pe cadran.
- **Debitmetrele** măsoară debitul de aspirare, deci volumul de aer aspirat în unitatea de timp. Pentru a se calcula volumul, este necesară notarea timpului cât a durat aspirarea. Ele pot fi rotametre sau reometre.

3. Dispozitivele de reținere a substanțelor toxice poartă denumirea de absorbitoare, barbotoare sau vase spălătoare și conțin soluții ce se numesc soluții absorbante, în care reținerea toxicului se face prin fenomene fizice (dizolvarea) sau chimice (reacții de precipitare, reacții redox, etc.). Soluția absorbantă se alege în funcție de natura substanței toxice, iar volumul necesar se stabilește ținând cont de capacitatea barbotorului, de concentrația toxicului și de sensibilitatea metodei de dozare utilizată.

Absorbitoarele sunt recipiente de sticlă astfel construite încât la trecerea aerului prin soluția absorbantă să aibă loc o barbotare lentă, care să permită un contact prelungit între aer și lichid, cu transferul de masă al toxicului. În același timp, ele nu trebuie să aspire lichidul în exterior.

În funcție de capacitatea lor, absorbitoarele se clasifică în microabsorbitoare, care au capacitate redusă (1-5 ml soluție absorbantă) și permit determinarea concentrațiilor mici de substanțe toxice deoarece favorizează concentrarea și

macroabsorbitoare, cu capacitate de 50-100 ml, care sunt indicate pentru reținerea toxicilor aflați în concentrații mari.

În funcție de construcția lor, absorbitoarele sunt de diferite tipuri (Fig. 2.4.), dar trebuie să asigure pătrunderea aerului în recipient printr-un sistem care să permită dispersarea sa: un tub cu extremitatea efilată, o bulă de sticlă perforată, o placă poroasă, etc.

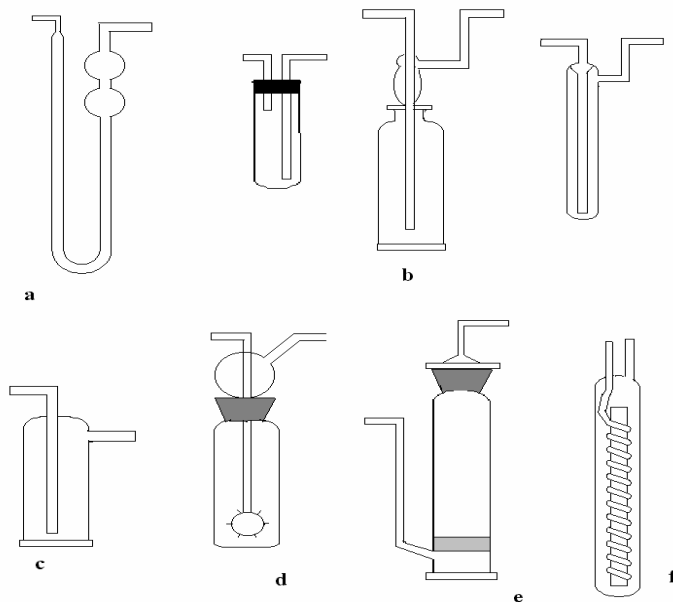


Figura 2.4. Diferite tipuri de absorbitoare

Un tip special de absorbitor este impingerul, prin care aerul pătrunde în jet puternic și izbindu-se de fundul recipientului se divizează, favorizând reținerea substanței toxice (Fig. 2.5.).

Dacă substanțele toxice din aer se găsesc sub formă de aerosoli sau pulberi, cum este cazul substanțelor minerale sau a pesticidelor, reținerea lor se poate face atât în medii lichide introduse în impingere de capacitate mare, cât și pe medii solide adsorbante. Acestea pot fi membrane filtrante din fibră de sticlă, material plastic și chiar hârtie de filtru, cu porozitate între 0,01 și 20 μm , sau mai nou, spume poliuretaneice sau cărbune activat condiționate în tuburi de sticlă ce pot fi adaptate la dispozitive de aspirare a aerului (Fig. 2.6.). Tuburile cu spume poliuretaneice, datorită facilităților de manipulare și a desorbției rapide a compușilor, au fost avizate de către Agenția Americană de Protecție a Mediului (EPA) pentru detectarea pesticidelor și a bifenililor policlorurați.



Figura 2.5. Impinger

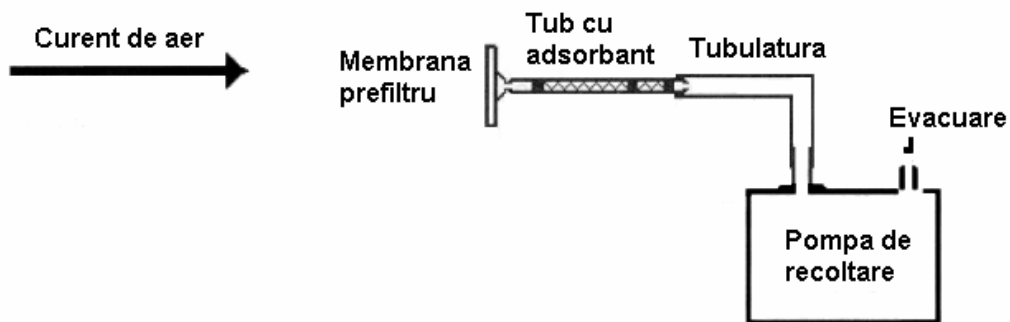


Figura 2.6. Instalații de recoltare a aerului

c) Recoltarea direct în aparatul de analiză

Poluanții gazoși din atmosferă pot fi determinați direct din mediul poluat cu ajutorul unor aparate ce poartă denumirea de *analizoare de gaze* și care asigură recoltarea, depistarea și dozarea substanțelor, individual sau în amestec. Aceste aparate pot fi prevăzute cu dispozitive de înregistrare automată a concentrației de toxic și cu semnalizatoare acustice sau optice ale depășirii concentrațiilor maxime

admisibile. Principiile de funcționare ale analizoarelor pot fi optice, termochimice sau electrochimice.

Analizoarele optice de gaze măsoară absorbția luminii de către substanța toxică sau de către produsul de reacție al acesteia cu mediul absorbant. Măsurarea absorbției se poate face în domeniul vizibil, UV sau IR, folosind celule fotoelectrice. Foarte frecvent se utilizează spectroscopia IR, care permite monitorizarea cantităților mici de poluanți gazoși (ex. dioxid de carbon, acid azotic) cu ajutorul unor instrumente cu citire directă.

Analizoarele termochimice de gaze măsoară energia calorică rezultată în urma reacțiilor chimice ale substanțelor toxice și au fost folosite la determinarea oxidului de carbon, a metanului sau a vaporilor de benzină.

Analizoarele electrochimice de gaze măsoară variația conductivității electrice a soluției absorbante după reținerea toxicului din amestecul gazos și pot fi utilizate la monitorizarea dioxidului de sulf, a oxizilor de carbon, a acidului clorhidric sau a vaporilor de benzină.

Condiții de recoltare a substanțelor toxice din aer

La analiza toxicologică a substanțelor din aer, trebuie să fie îndeplinite câteva condiții esențiale:

- volumul de aer recoltat trebuie să fie suficient
- reținerea toxicului trebuie să fie eficientă
- debitul de recoltare trebuie să fie adecvat, pentru a asigura o reținere eficientă.

Alegerea aparaturii și a procedului de recoltare se fac în funcție de volumul de aer ce trebuie recoltat, de caracteristicile metodei de analiză și de natura substanței analizate.

În timpul recoltării se ține cont de viteza și de direcția de mișcare a aerului, de umiditatea atmosferică, de presiune și de temperatură.

Înălțimea la care se așează dispozitivele de recoltare este de 1,5-1,8 m, aproximativ la nivelul căilor respiratorii ale unei persoane adulte.

Debitul de recoltare se va regla în funcție de capacitatea de reținere a toxicului în soluția absorbantă și de concentrația acestuia în mediul respectiv.

Volumul minim de aer recoltat se stabilește în funcție de concentrația în care se găsește substanța toxică și de sensibilitatea metodei analitice utilizate pentru determinarea cantitativă.

Exprimarea concentrațiilor substanțelor toxice din aer

Aceasta se poate face în unități de:

- greutate / volum, de exemplu în mg/m^3 sau mg/l
- volum / volum, de exemplu în procente de volum (% vol.), părți pe milion (ppm) sau părți pe bilion (ppb).

2.1.2. Izolarea substanțelor toxice gazoase și volatile din medii biologice și din alte produse

a) Microdifuzia

Această metodă se poate utiliza pentru izolarea din medii biologice a unor substanțe foarte volatile (acetona), sau care eliberează compuși foarte volatili, cum este cazul acidului cianhidric pus în libertate de către cianuri. Izolarea se realizează într-un dispozitiv special, cum este celula de microdifuzie Coway (Fig. 2.7.). Proba biologică se plasează într-unul din compartimentele celulei, se adaugă un reactiv care eliberează compusul foarte volatil, iar acesta difuzează în celălalt compartiment, unde este fixat de un reactiv potrivit (ex. soluție de hidroxid de sodiu în cazul acidului cianhidric). În acest mod poate fi determinat și monoxidul de carbon din sânge. Astfel, sângele se plasează în compartimentul central al celulei, unde se tratează cu o soluție de saponină-fericianură care, prin hemoliza sângelui, eliberează monoxidul de carbon. Acesta difuzează în compartimentul periferic, unde reacționează cu clorura de paladiu. Operația poate dura între 2 și 5 ore la temperatura camerei, pentru a ne asigura că difuzia este completă. Concentrația substanței poate fi apoi determinată spectrofotometric, prelucrându-se paralel o scară de etaloane preparată în mod identic.

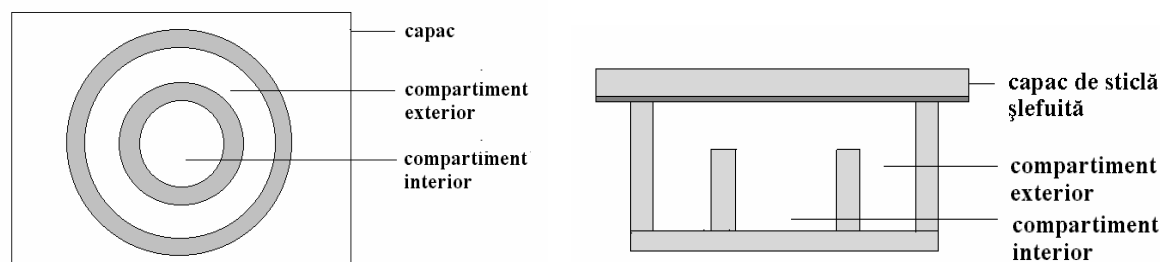


Figura 2.7. Celula de microdifuzie Conway

b) Antrenarea cu un curent de aer

Metoda se poate aplica la izolarea din medii biologice a unor substanțe toxice gazoase (hidrogen sulfurat, hidrogen arseniat) sau volatile (benzen, acid cianhidric). Instalația este compusă din (Fig. 2.8.):

- recipientul cu produsul de analizat (A)
- absorbitoarele ce conțin soluțiile absorbante specifice pentru toxicul analizat (B)

- dispozitivul de aspirare (C)
- dispozitivul de purificare a aerului, montat înaintea recipientului cu produsul de analizat (D).

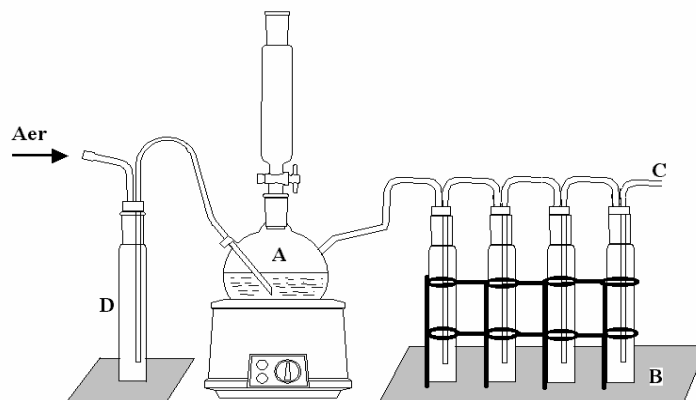


Figura 2.8. Instalație de antrenare cu curent de aer

c) Distilarea

Această metodă se utilizează pentru izolarea substanțelor volatile și se bazează pe volatilitățile diferite ale componentelor probei. Sub acțiunea căldurii, faza lichidă trece în stare de vapori. Vaporii obținuți sunt condensați prin răcire într-un refrigerent, iar lichidul recoltat poartă denumirea de distilat.

Instalația de distilare (Fig. 2.9.) este alcătuită dintr-un balon de distilare prevăzut cu un termometru, adaptat la un refrigerent descendent terminat cu o alonjă al cărei capăt este introdus în recipientul de colectare, de preferință un balon cotelat ce conține câțiva ml de apă distilată sau un alt lichid adecvat.

Distilarea simplă poate separa doar compușii care au diferențe mari de volatilitate (de ex. diferențe între punctele de fierbere de mai mult de 50°C). Pentru distilarea simplă la presiune atmosferică, separarea obținută este de obicei incompletă.

În cazul unei analize toxicologice generale, atunci când toxicul nu este cunoscut, se efectuează două distilări: o distilare din mediu acid, când se separă substanțele cu caracter acid și neutru, și o distilare din mediu alcalin, când se separă compușii cu caracter bazic. Culegerea distilatului se face pentru toxicii acizi și neutri în apă distilată sau în soluții cu caracter bazic, iar pentru toxicii alcalini în soluții acide.

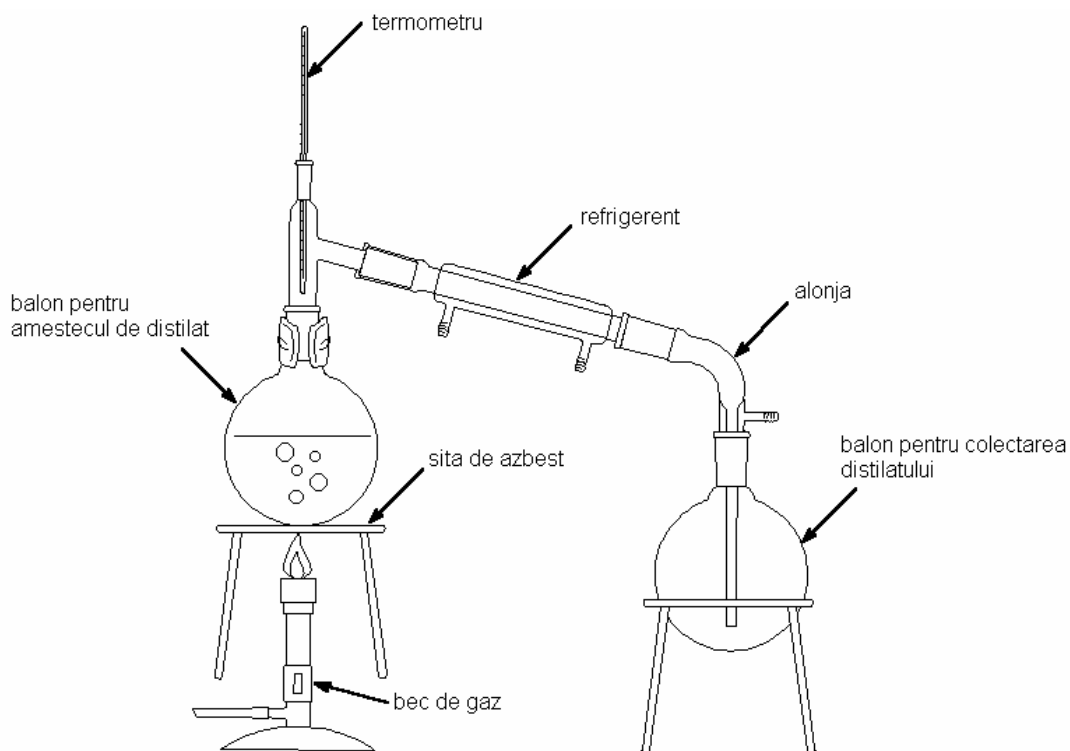


Fig.2.9. Instalație de distilare

O variantă a distilării este distilarea fracționată, care permite izolarea unui compus în stare pură și poate fi utilizată în cazul amestecurilor cu mai multe componente. În această variantă, vaporii vin în contact cu o parte din condensat într-o operație în contracurent care generează mai multe talere teoretice comparativ cu distilarea simplă, permițând o separare mai bună. Pentru distilarea fracționată, la balonul de distilare se adaptează un cap de distilare reprezentat de o coloană de tip Vigreux (Fig. 2.10.), care asigură un contact mai bun între vaporii și lichid.

Vaporii de la partea superioară a coloanei sunt condensați, fiind parțial îndepărtați. Viteza de curgere a lichidului și a vaporilor este adaptată în așa fel încât în orice punct al coloanei lichidul să aibă o concentrație mai mare de substanțe volatile decât cea care corespunde echilibrului cu vaporii cu care se află în contact. În consecință, compușii mai volatili vor trece din lichid în faza de vaporii, iar cei mai puțin volatili, din faza de vaporii în faza lichidă. Pe măsură ce urcă în coloană spre refrigerent, vaporii devin mai bogăți în compuși mai volatili, iar lichidul devine mai concentrat în componenții mai puțin volatili, pe măsură ce curge în coloană către balonul de distilare.

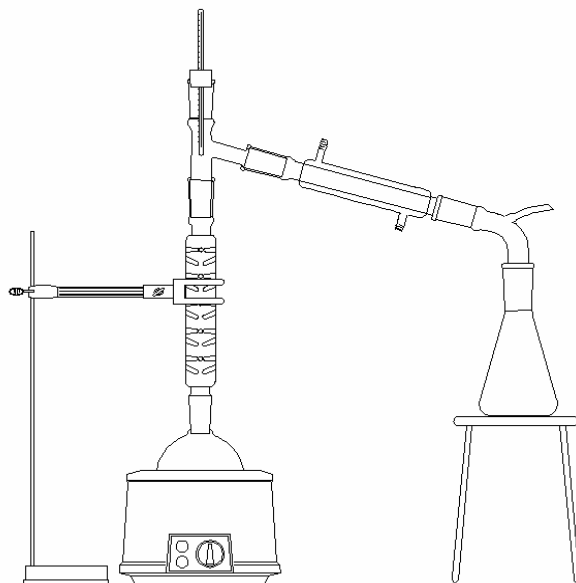


Figura 2.10 Instalație de distilare fracționată

Pentru substanțele care nu sunt stabile la temperatura de fierbere se poate utiliza o altă variantă, și anume distilarea în vid, care prin scăderea presiunii conduce la o creștere a volatilității compușilor. Operația se realizează cu ajutorul unui aparat ce poartă denumirea de *rotavapor* (Fig.2.11.).

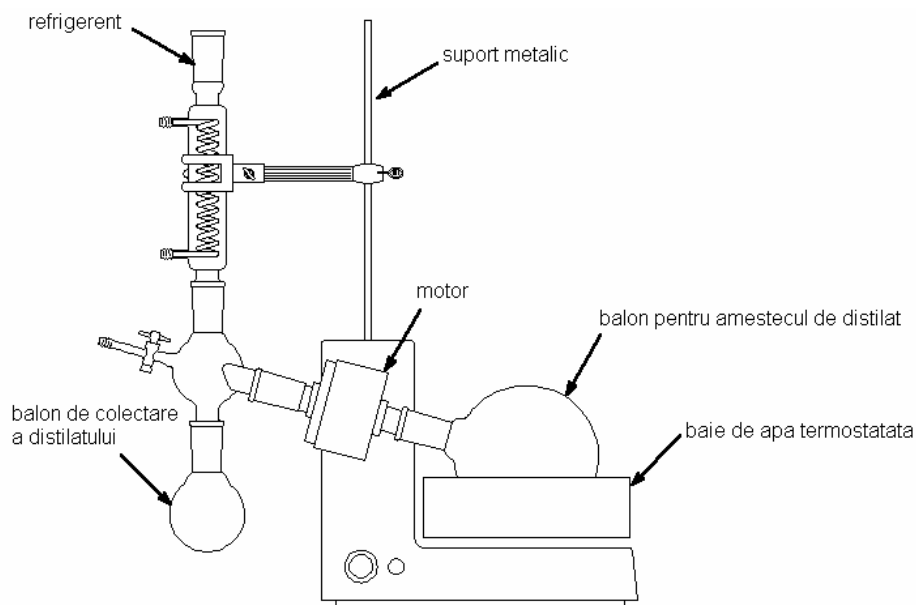


Figura 2.11. Rotavapor

d) Antrenarea cu vapori de apă

Această metodă se poate aplica atunci când substanța de analizat are punctul de fierbere superior celui al apei, sau când se descompune la temperatura sa de fierbere. Ea se bazează pe principiul conform căruia două substanțe volatile în amestec emit vapori în cantități direct proporționale cu tensiunea de vapori a fiecăreia din acestea. Prin încălzire, tensiunea de vapori a fiecărei substanțe crește, independent de cealaltă. Când tensiunea de vapori a amestecului egalează presiunea atmosferică, amestecul începe să fiarbă și substanțele distilă. Deoarece suma tensiunilor de vapori ale componentelor amestecului este egală cu presiunea atmosferică, fiecare component distilă la o temperatură mai mică decât propria temperatură de fierbere. O instalație de antrenare cu vapori de apă este prezentată în Fig. 2.12.

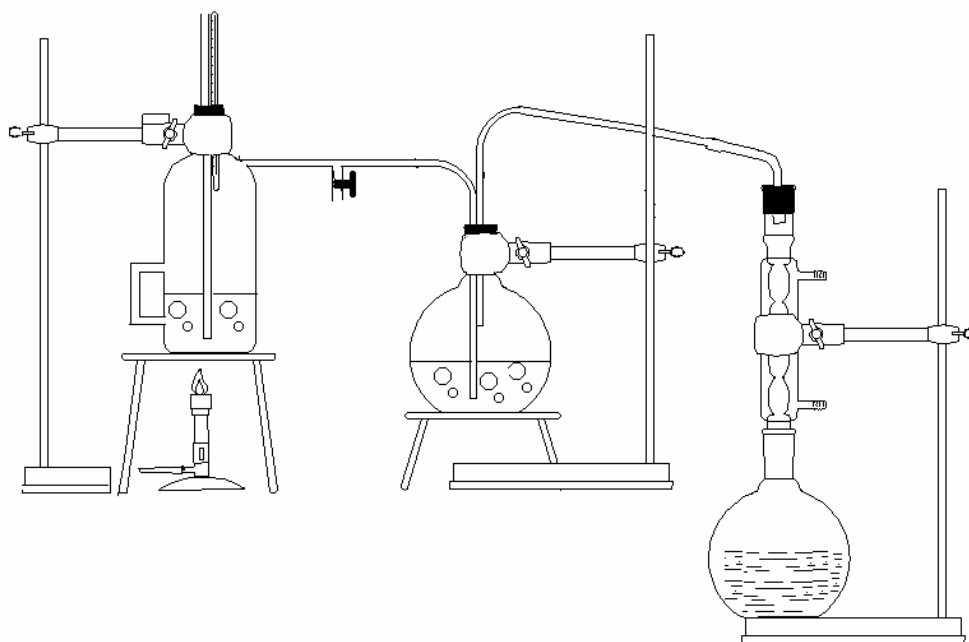


Figura 2.12. Instalație de antrenare cu vapori de apă

2.2. METODE DE IZOLARE A SUBSTANȚELOR TOXICE MINERALE

Substanțele toxice minerale pot exista în organism sub formă ionică sau sub formă de proteinate ale metalelor grele, care sunt puțin sau deloc ionizabile. În consecință, vor exista metode diferite de izolare a celor două grupe de substanțe din produsele biologice sau din alte probe.

2.2.1. Izolarea substanțelor minerale ionizabile

a) Dializa

Substanțele toxice minerale ionizabile sunt acizi, baze sau săruri, ce se pot izola din resturi alimentare, conținut stomacal, vomă, prin macerare cu apă urmată de dializă. Aceste substanțe se izolează mai rar din țesuturi, deoarece la acest nivel ele se găsesc parțial legate sub formă de proteinate. Operația se realizează într-un *dializor*, care este un tub de sticlă cu diametru de 3-4 cm, prevăzut la partea inferioară cu o membrană semipermeabilă de celofan sau colodiu. În dializor se introduce produsul de analizat, macerat și filtrat în prealabil, iar tot ansamblul este imersat într-un cristalizor cu apă distilată, în care se menține 3-6 ore, pentru a avea loc difuzia substanței toxice. Pentru o izolare cât mai completă, lichidul din cristalizor se poate schimba de mai multe ori, urmărindu-se menținerea gradientului de concentrație.

Dializatele obținute se reunesc și, dacă proprietățile substanței toxice permit acest lucru, se concentrează prin evaporare până la un volum mai mic. Pentru determinarea cantitativă, dializatul se aduce la un anumit volum, din care se prelucrează o cotă parte.

b) Electrodializa

Această metodă este utilă pentru izolarea ionilor, fie că sunt anorganici (fluoruri, bromuri) sau organici (derivați barbiturici, alcaloizi). Separarea este favorizată de trecerea curentului electric, care determină migrarea ionilor spre anod sau spre catod, în funcție de polaritatea lor, și care în plus favorizează și eliberarea toxicului din proteinate. Metoda are avantajul izolării cantitative a substanțelor în stare pură.

Aparatura necesară constă dintr-un electrodializor (Fig. 2.13.), compus din trei recipiente separate prin membrane semipermeabile. În recipientul central (B) se plasează produsul de analizat, mărunțit și triturat cu apă distilată și adus la pH-ul optim de disociere. Recipientele A (anodic) și C (catodic) conțin apă distilată și electrozii corespunzători. Operația poate dura între 24 și 48 de ore.

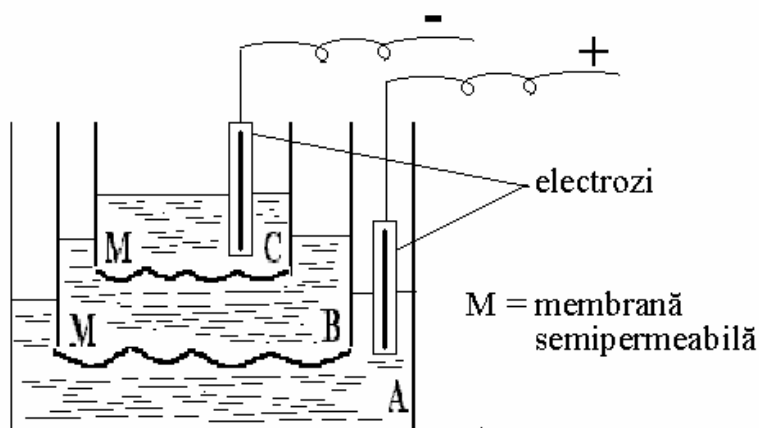


Figura 2.13. Electrodializor

2.2.2. Izolarea substanțelor minerale neionizabile (fixe)

Substanțele toxice minerale neionizabile nu pot fi depistate direct în probele de analizat, ruperea legăturilor dintre metal și proteine realizându-se prin distrugerea materiei organice, adică prin mineralizare. Mineralizarea se poate face pe cale uscată (calcinare) sau pe cale umedă, alegerea metodei depinzând de volatilitatea compuşilor obţinuţi în cursul procesului.

a) Mineralizarea pe cale uscată

Mai poartă denumirea de calcinare și, în funcție de natura agentului oxidant, se clasifică în:

- **Calcinare simplă** sau directă, care constă în încălzirea probei în cuptoare de calcinare, la temperaturi ridicate, agentul oxidant fiind oxigenul din aerul atmosferic. Ea are avantajul obținerii unei cenuși fără reziduu organic, în care metalul se găsește mai ales sub formă de carbonat și este concentrat. Dezavantajele constau în durata lungă a procesului și în pierderile de toxic prin umflare și debordare, mai ales dacă proba nu a fost uscată corespunzător înainte de a fi introdusă în cuptor, dar în special prin volatilizarea metalelor (Hg, Zn, Cd), a oxizilor metalici (oxid de arsen) sau a sărurilor (clorură de arsen sau de stibiu).
- **Calcinearea cu amestecuri de oxidanți** reduce la maxim formarea de metale care pot fi volatile, precum și timpul de calcinare. Se pot folosi ca amestecuri oxidante: azotatul de potasiu împreună cu carbonatul de sodiu, oxidul de

magneziu singur sau în prezența azotatului sau a acetatului de magneziu. Acest amestec din urmă are avantajul de a micșora temperatura de combustie și de a reduce pierderile, mai ales în cazul metalelor oxiacide cum este arsenul, care în absența oxidului de magneziu ar trece în săruri volatile.

- **Calcinarea în curent de oxigen** asigură o mineralizare mai rapidă, dar necesită o aparatură specială și prezintă riscul pierderii unor substanțe prin volatilizare.

Calcinarea cu amestec de oxid de magneziu și azotat de magneziu.
Tehnica de lucru:

1-2 g produs de analizat mărunțit se tratează cu o cantitate dublă de oxid de magneziu și se adaugă în porțiuni mici soluție de azotat de magneziu 20% până se obține o pastă omogenă. Aceasta se introduce într-un creuzet, se usucă în etuvă la 110°C și apoi se calcinează în cuptorul de calcinare la 500-600°C. Se îndepărtează azotatul prin încălzire cu acid sulfuric concentrat (1-2 ml). Reziduul obținut după răcire se dizolvă în acid clorhidric 10% și se filtrează. Soluția se folosește pentru identificarea și dozarea substanței toxice, inclusiv a arsenului.

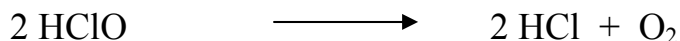
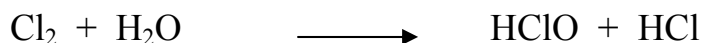
b) Mineralizarea pe cale umedă

Folosește diferite substanțe cu caracter oxidant: clor, acizi tari, peroxid de hidrogen, permanganat de potasiu, etc., și se realizează în mediu apos. În funcție de natura oxidantului, se cunosc mai multe metode:

- **1. Mineralizarea cu clor** (Metoda Fresenius-Babo-Ogier-Stepanov)

Clorul este preparat *ex-temporae* din clorat de potasiu și acid clorhidric. Durata mineralizării este lungă, între 5 și 24 de ore, în funcție de conținutul proteic al probei. Grăbirea distrugerii prin creșterea temperaturii sau prin mărirea concentrației de acid clorhidric sau a cantității de clorat poate determina pierderi datorită formării unor cloruri volatile, cum ar fi clorura de As (III).

Principiul metodei. Clorul liber, datorită caracterului oxidant, distruge materia organică și pune în libertate metalele sub formă ionică:



Tehnica de lucru. Produsul de analizat solid (fin divizat) sau lichid (eventual concentrat prin evaporare) se introduce într-un balon Würtz. Deoarece în prezența alcoolului etilic clorul poate produce explozii, produsele de analizat care conțin etanol vor fi în prealabil supuse distilării, pentru îndepărtarea acestuia. La probele solide se adaugă acid clorhidric 12,5%, până la obținerea unei mase semifluide. Dacă produsul de analizat este lichid, se adaugă acid clorhidric concentrat, în așa fel încât concentrația finală în acid să fie de 12,5%. Se adaugă apoi 1-2 g clorat de potasiu cristale și se fixează balonul pe o baie de apă cu temperatura de 50-70°C. Balonului i se adaptează o pâlnie de separație în care se găsește o soluție 5% de clorat de potasiu. Pentru fixarea excesului de clor, tubul lateral al balonului Würtz se conduce, prin intermediul unei tubulaturi de cauciuc, într-un flacon care conține soluție 10% de hidroxid de sodiu.

După încălzire, din pâlnia de separație se adaugă picătură cu picătură soluție de clorat de potasiu 5%, agitând puternic conținutul balonului din când în când. În varianta Stepanov, mineralizarea se poate efectua cu cristale de clorat de potasiu, care se adaugă repetat, în porțiuni mici, într-un balon prevăzut cu un refrigerent de aer și montat pe o baie de apă.

Mineralizarea se consideră terminată atunci când produsul din balon are aspect de flocoane galben-verzui.

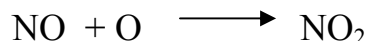
După răcire, materialul se transvazează într-o capsulă de porțelan, se diluează cu apă până la obținerea unei concentrații de acid de 2-5% și se încălzește pe baie de apă sub nișă, până la îndepărtarea completă a clorului liber, care se verifică cu ajutorul unei hârtii indicator iod-amidonate. Adăugarea bisulfidului de sodiu poate favoriza eliminarea clorului.

Pentru precipitarea unor metale, cum ar fi bariul și plumbul, se adaugă 1-2 ml acid sulfuric diluat și se continuă încălzirea pe baie de apă la 50°C încă 20-30 de minute. Apoi se filtrează, iar pe filtru se separă precipitatele de clorură de argint, sulfat de bariu și sulfat de plumb, în cazul în care aceste metale sunt prezente în probă, precum și materii organice rămase nedistruse (grăsimi, celuloză). În filtrat, substanțele toxice se regăsesc sub formă ionică, ca sulfati sau cloruri solubile, și pot fi determinate prin metodele analitice uzuale.

- 2. Mineralizarea sulfonitrică (Metoda Denigés)

Agenții de mineralizare sunt acidul azotic și acidul sulfuric, iar metoda are avantajul de a distruge complet substanțele organice, indiferent de natura lor, în interval de câteva ore.

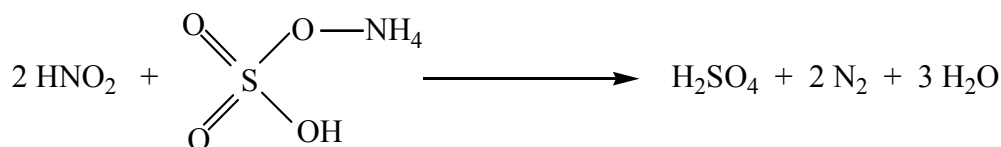
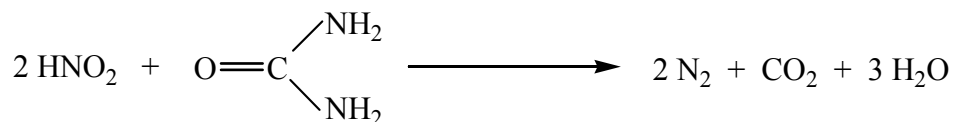
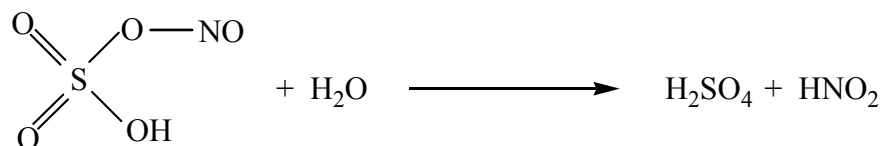
Principiul metodei. Sub acțiunea acidului sulfuric concentrat, care este un deshidratant puternic, și a acidului azotic concentrat, care are proprietăți oxidante, materia organică este descompusă, transformându-se în dioxid de carbon, apă, sulfat de amoniu, iar substanțele minerale trec în formă ionică:



Tehnica de lucru. Dacă produsul de analizat este lichid sau conține alcool, se concentrează prin evaporare; dacă este solid se mărunțește.

50-70 g produs biologic proaspăt sau 10-15 g produs biologic uscat se introduc într-un balon Kjeldahl, se adaugă 8-16 ml acid sulfuric concentrat și câteva perle de sticlă. Balonul se încălzește pe sită de azbest la flacără mică sau pe baie de nisip electrică, până la carbonizare. Se adaugă apoi, dintr-o pâlnie de separație montată la partea superioară a balonului, acid azotic concentrat în picături. Mineralizarea este considerată a fi terminată atunci când lichidul din balon își păstrează culoarea galben-pai și claritatea timp de 10-15 minute de la întreruperea adăugării acidului azotic, continuându-se încălzirea. Prezența eventualelor substanțe organice se verifică pe sticlă de ceas, prin reacție cu 1-2 picături de soluție de permanganat de potasiu 2%. Dacă mineralizarea este completă, lichidul rămâne colorat în roz, în caz contrar se decolorează.

Purificarea probei urmărește îndepărtarea oxizilor de azot legați sub formă de acid nitrozilsulfuric. Aceasta se realizează prin diluarea lichidului din balon cu 50 ml apă, când în urma hidrolizei rezultă acidul sulfuric și acidul azotos. Acidul azotos se elimină prin adăugare de uree, de sulfamat de amoniu, de azidă de sodiu, sau prin încălzire 10-15 minute. Operația se repetă până când reacția cu difenilamină este negativă. În mineralizat substanțele toxice se găsesc sub formă de sulfați și uneori în stare de oxidare superioară.



- 3. Mineralizarea sulfonitroperclorică (Metoda Kahane)

Principiul metodei. Metoda se bazează pe capacitatea puternic oxidantă a amestecului de acid azotic și acid percloric la temperatura de fierbere a acidului sulfuric, după carbonizarea produsului organic cu amestec sulfonitric.

Dezavantajul metodei constă în pericolul de explozie, motiv pentru care trebuie evitat excesul de acid percloric sau supraîncălzirea.

Pentru izolarea metalelor din compușii organometalici folosiți ca medicamente sau pesticide, se poate utiliza o semimicrometodă care este foarte rapidă.

Tehnica de lucru a semimicrometodei Kahane. Într-o eprubetă se introduc 0,1-0,2 g produs de analizat, se adaugă 1-2 ml acid sulfuric concentrat și se încălzește în baie de apă la fierbere. Se adaugă cu atenție 1-2 ml amestec de acid azotic concentrat și acid percloric concentrat (1:1) și se încălzește în continuare 5-10 minute. Lichidul galben deschis se diluează cu 8-10 ml apă, se filtrează și se analizează.

- 4. Mineralizarea nitroperclorică

Utilizează drept agenți oxidanți acidul azotic și acidul percloric și se aplică la mineralizarea probelor de sânge sau de urină, mai ales la izolarea unor metale cum ar fi plumbul sau manganul. Tehnica de lucru este asemănătoare cu cea de la metoda sulfonitrică.

- **5. Mineralizarea cu acid sulfuric și perhidrol**

Distrugerea materiei organice este favorizată de prezența perhidrolului, care este un oxidant foarte bun și se recomandă pentru mineralizarea unor cantități mici de probe biologice.

- **6. Mineralizarea cu acid sulfuric sau acid azotic și permanganat de potasiu**

Metoda este indicată pentru mineralizarea probelor de urină, în vederea determinării plumbului (mineralizare cu acid azotic și permanganat de potasiu) sau a mercurului (mineralizare cu acid sulfuric și permanganat de potasiu).

Metoda are dezavantajul de a dura destul de mult în cazul urinelor concentrate (20-36 ore) și de a necesita asigurarea unui exces de agent oxidant pe tot parcursul procesului.

- **7. Mineralizarea cu acid sulfuric și azotat de amoniu**

Metoda se pretează pentru izolarea metalelor din produse biologice sau din compuși organometalici, atunci când cantitățile de probe sunt reduse.

- **8. Mineralizarea cu acid azotic și bisulfid de potasiu**

Metoda este indicată în special pentru izolarea cromului.

2.3. METODE DE IZOLARE A SUBSTANȚELOR TOXICE ORGANICE

Aceste metode permit separarea majorității toxicilor organici, atât a celor organici nevolatili, cât și a celor volatili, care pot fi izolați și sub formă de vapori, cum este cazul unor baze organice ca nicotina sau amfetamina. Deoarece în această clasă se încadrează foarte multe din substanțele de interes toxicologic întâlnite la ora actuală: medicamente, droguri, pesticide, micotoxine, aditivi alimentari, etc., majoritatea progreselor în domeniul tehnicilor de izolare s-au realizat în cadrul acestui grup de metode. Evoluțiile au fost dictate nu numai de numărul mare de substanțe interesate, ci și de particularitățile acestora, legate în principal de dozele mici în care sunt utilizate sau care pot produce toxicitate, precum și de dezvoltarea rapidă a unor tehnici analitice performante, cu sensibilitate ridicată.

Pretratamentul probelor: Hidroliza conjugărilor și deproteinizarea

Aceste substanțe sunt analizate frecvent din produse biologice, iar analiza ridică probleme importante, care sunt determinate de faptul că la acest nivel toxicii se găsesc sub formă metabolizată, iar atât compusul părinte cât și metaboliții pot fi

legați de lipide sau de proteinele celulare sau de transport, sau se pot găsi sub formă de conjugați. Uneori se urmărește numai determinarea compusului liber, care poate fi separat prin dializă sau ultrafiltrare, dar de cele mai multe ori este necesară dozarea cantității totale de substanță toxică din probă și în acest caz se impun deproteinizarea și hidroliza conjugatilor.

Conjugarea poate avea loc cu acid glucuronic, grupări sulfat, grupări metil, grupări acetyl, aminoacizi sau glutatyon, dar cel mai des este întâlnită conjugarea cu acid glucuronic.

Glucuronidele sunt de mai multe tipuri, în funcție de natura atomului prin care se face legarea toxicului de acidul glucuronic (Fig.2.14.). Hidroliza acestora se realizează prin metode chimice sau enzimatic, dar selectivitatea metodei este dependentă de tipul de glucuronidă.

Astfel, **ester glucuronidele** sunt hidrolizate de enzima β -glucuronidază, sau prin tratament alcalin ușor. Hidroliza enzimatică poate fi împiedicată datorită „migrării grupării acil”, care reprezintă o transesterificare intramoleculară la nivelul grupărilor hidroxilice ale acidului glucuronic, ce conduce la obținerea unor derivați rezistenți la β -glucuronidază. Poate fi utilizată și o hidroliză acidă, dar aceasta nu este selectivă.

Eter glucuronidele pot fi hidrolizate enzimatic cu β -glucuronidază. Ele sunt stabile în mediu alcalin, dar sunt hidrolizate de acizi.

N-glucuronidele se formează prin reacția dintre acidul glucuronic și compuși ce conțin grupări aminice aromatice sau alifatice, sulfonamide sau un atom de azot heterociclic. Stabilitatea N-glucuronidelor în soluții acide depinde de natura agliconului și de modul și poziția în care se atașează restul de acid glucuronic la aglicon. Conjugatii aminelor aromatice sunt labili în mediu acid, în timp ce aceia ai sulfonamidelor sunt stabili în mediu acid. Aminele terțiare se pot conjuga cu acidul glucuronic prin intermediul perechii de electroni ai atomului de azot, formând compuși cuaternari de amoniu. Tratatamentul cu beta-glucuronidază hidrolizează astfel de conjugați în măsură mai mică decât un tratament alcalin la cald.

S-glucuronidele se formează pornind de la compuși ce conțin grupări tiol sau grupări de acid ditionic. Informațiile cu privire la susceptibilitatea lor la diferite procedee hidrolitice sunt limitate și indică o variabilitate considerabilă între compuși.

C-glucuronidele sunt formate de compuși cum ar fi THC, fenilbutazonă, sulfinpirazonă. În această reacție de conjugare, un atom de carbon din nucleul benzenic sau ciclul pirazolidinic se atașează direct de acidul glucuronic prin intermediul unei legături carbon-carbon, rezultând un conjugat rezistent la beta-glucuronidază.

Conjugații acizilor carboxilici cu aminoacizii sunt stabili din punct de vedere chimic și pot fi separați prin CSS sau HPLC.

Sulfoconjugății. Majoritatea fenil-sulfatilor vor fi hidrolizați de aril-sulfataze, deși unii sunt foarte rezistenți. Un contaminant important al preparatelor de aril-sulfataze disponibile comercial este β -glucuronidaza, care trebuie inhibată cu zaharo-1,4-lactonă înainte ca utilizarea în scop de diagnostic a acestor sulfataze să fie acceptată. Esterii aril-sulfat sunt labili în mediu acid și pot fi hidrolizați în mediu apos în condiții acide, în timp ce esterii alchil sulfat sunt mai rezistenți.

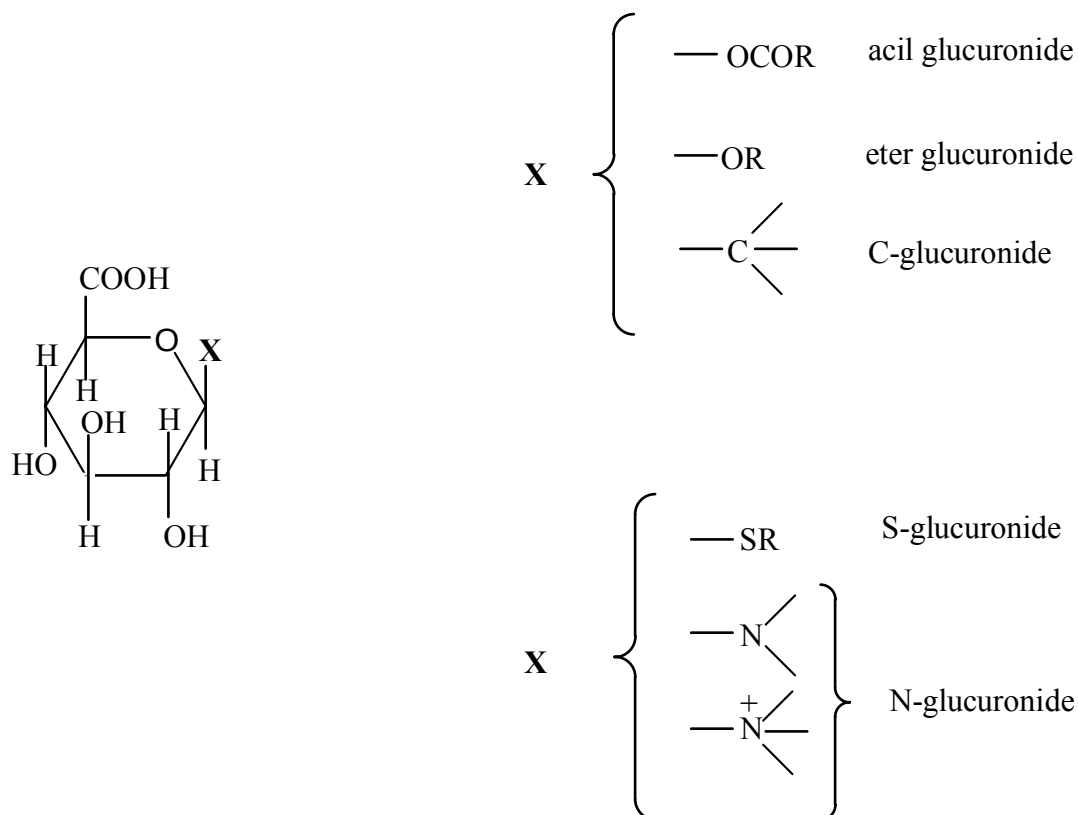


Figura 2.14. Tipuri de glucuronide

Deoarece hidroliza enzimatică durează mult, în toxicologia de urgență se preferă clivajul conjugăților prin hidroliză acidă rapidă. Doar ester conjugății pot fi clivați prin hidroliză alcalină. Hidroliza chimică poate conduce însă la formarea unor artefacte. Un compromis între cele două metode îl reprezintă utilizarea unor coloane umplute cu glucuronidază/ arilsulfatază imobilizată, care combină avantajele celor două tehnici: rapiditatea hidrolizei acide și clivajul blând al hidrolizei enzimice.

Principala metodă de izolare a substanțelor organice nevolatile este:

- a) **Extracția cu solvenți organici**, capabili să antreneze compusul și să îl separe din probă. Această metodă are mai multe variante, dintre care unele au fost dezvoltate relativ recent.

1. Extracția lichid-lichid (EL-L) este tehnica extractivă cea mai utilizată.

Această extracție implică separarea analiților de interferenți prin partiția probei între două lichide (faze) nemiscibile. În majoritatea cazurilor, una din fazele lichide este apoasă, cealaltă fiind reprezentată de un solvent organic.

Conform *Legii distribuției* lui Nernst, orice specie moleculară se va distribui între doi solvenți nemiscibili în așa fel încât raportul concentrațiilor în cele două faze este constant:

$$K = C_o / C_a$$

unde: K este coeficientul de distribuție, C_o este concentrația substanței în faza organică, iar C_a concentrația în faza apoasă.

O expresie mai utilă este fracția de analit extrasă (E):

$$E = C_o V_o / (C_o V_o + C_a V_a) = KV / (1 + KV)$$

unde V_o este volumul fazei organice, V_a este volumul fazei apoase, iar V este raportul dintre volumele celor două faze V_o / V_a .

Această expresie permite calcularea randamentului de extracție: $\eta = E \times 100$.

Selectivitatea și eficiența procesului de extracție pot depinde de mai mulți factori:

- Selectia celor două lichide nemiscibile. În cazul cuplurilor de solvenți apoși și organici, compușii hidrofilii vor prefera faza apoasă, în timp ce aceia mai hidrofobi se vor regăsi în faza organică. De obicei se preferă izolarea analiților în solventul organic, deoarece acesta poate fi îndepărtat, permițând concentrarea substanței prin evaporare. Dacă pentru separare și analiză se utilizează metoda HPLC cu faze inverse, analitul de interes poate fi extras în faza apoasă, pentru a putea fi injectat direct în coloana cromatografică.
- Alegerea aditivilor folosiți pentru influențarea procesului de echilibru. Astfel, modificarea pH-ului fazei apoase poate favoriza extracția substanțelor cu caracter slab acid sau slab bazic în solventul organic. Pentru extracția compușilor cu caracter slab acid (ex. derivați barbiturici, paracetamol, aspirină, THC, majoritatea pesticidelor) se procedează la acidularea fazei apoase cu o soluție diluată de acid mineral, cu un acid organic sau cu un tampon cu pH acid, favorizându-se astfel trecerea substanței în forma neionizată, solubilă în solventul organic. În cazul bazelor slabe (alcaloizi, amfetamină, unele medicamente), faza apoasă este alcalinizată cu o soluție de hidroxid alcalin, amoniac sau un tampon cu pH alcalin.

De asemenea, adăugarea de agenți de cheletare, de complexare sau de formare de perechi de ioni, poate modifica echilibrul de dizolvare.

- Raportul dintre cele două faze nemiscibile (V) poate influența randamentul de extracție. Astfel, cu cât acesta este mai mare, cu atât extracția este mai eficientă. Pentru o extracție cantitativă ($\eta > 99\%$), raportul dintre faze trebuie menținut într-un interval convenabil: $0,1 < V < 10$.

Solvenții organici folosiți trebuie să aibă anumite caracteristici:

- o solubilitate în apă redusă (mai mică de 10%)
- să fie volatili, pentru a putea fi ușor îndepărtați după extracție
- să aibă proprietăți de solubilizare care să asigure recuperarea analiților în faza organică
- să fie compatibili cu tehnicile analitice utilizate în continuare.

Cei mai folosiți solvenți organici sunt: hidrocarburile alifatice, eterul etilic și alți eteri, clorura de metilen, cloroformul, acetatul de etil și alți esteri, cetonele alifatice cu mai mult de 6 atomi de carbon, alcoolii alifatici cu mai mult de 6 atomi de carbon, toluenul și xilenii, sau combinații de doi sau mai mulți dintre aceștia. Solvenții organici miscibili cu apa, cum ar fi alcoolii cu masă moleculară mică, cetonele, aldehydele, acetonitrilul, dioxanul, nu pot fi utilizați pentru extracția lichid-lichid.

Extracția lichid-lichid se realizează prin agitare puternică a celor două faze puse în contact, care se face de obicei în pâlnii de separare. Această etapă are rolul de a asigura un contact intim între cele două faze, creând o suprafață interfacială enormă, care favorizează transferul de masă. Dacă probele conțin surfactanți sau lipide, este posibilă formarea emulsiilor în timpul agitării, ceea ce împiedică separarea fazelor și deci a substanței ce urmează a fi izolată. Emulsiile pot fi „sparte” prin:

- adăugarea de sare în faza apoasă
- filtrarea emulsiei prin vată de sticlă
- filtrarea emulsiei printr-o hârtie de filtru pentru separarea fazelor
- centrifugare
- adăugarea de cantități mici din diferiți solvenți organici
- utilizarea unui aparat de extracție ce permite încălzirea-răcirea.

Clasificarea metodelor de extracție lichid-lichid se poate face în funcție de:

- a) eficiența extracției, în extracție prin echilibrare și extracție exhaustivă
- b) solventul folosit, în extracție generală și extracție selectivă.

Extracția prin echilibrare se bazează pe agitare produsului de analizat cu solventul organic până la realizarea unui echilibru de partiție a substanței toxice între cele două faze. Tehnica poate fi aplicată atunci când se urmărește doar identificarea toxicului, nu și dozarea sa.

Extracția exhaustivă urmărește epuizarea produsului de analizat de substanța toxică, deci o extracție cu un randament peste 99%, când soluția extractivă poate fi

utilizată pentru determinări cantitative. Aceasta se poate realiza fie prin extracții multiple succesive, fie prin reînnoirea solventului, în aparate Soxhlet sau în aparate de extracție lichid-lichid continuă, în care solventul proaspăt, cu densitate mai mare decât a apei, este reciclat continuu, sub formă de picături ce trec prin faza apoasă ce conține substanța toxică. Extracția în contracurent poate asigura și ea o regăsire corespunzătoare.

Extracția generală se realizează cu solvenți organici care au capacitatea de a dizolva o gamă largă de substanțe toxice, cum ar fi eterul etilic. Metoda este indicată în analizele toxicologice generale, în care natura toxicului nu este cunoscută.

Extracția selectivă este aplicabilă atunci când natura substanței toxice este cunoscută și presupune utilizarea acelor solvenți organici în care toxicul are solubilitate maximă.

Metode moderne de extracție lichid-lichid sunt *microextracția*, în care raportul dintre cele două faze este situat între 0,001 și 0,01 și care, deși are un randament scăzut, permite o concentrare importantă a analitului în faza organică, precum și *extracția pe coloane*. Aceasta din urmă presupune utilizarea, în locul pâlniilor de separare, a unor coloane de extracție în care una din fazele lichide este încorporată într-un mediu inert. Cea de-a doua fază lichidă nemiscibilă este percolată prin faza imobilă, în mod asemănător cromatografiei. Suportul inert este constituit din pământ de diatomee calcinat, de puritate ridicată, introdus în cartușe de polipropilenă.

Limitele extracției lichid-lichid sunt:

- cantitățile mari de solvenți organici utilizați
- randamentele mici de extracție
- necesitatea unor extracții multiple care durează mult
- obținerea unor extracte diluate care necesită o concentrare după extracție
- prelungirea timpului de extracție cu durata fazei de evaporare
- posibilitatea apariției unor descompuneri mediate de solvent
- formarea de emulsii
- obținerea de extracte impure
- prezența în solvent a unor impurități care pot interfera în analiză
- riscul de mediu datorită vaporilor toxici de solvenți organici degajați în timpul extracției și evaporării.

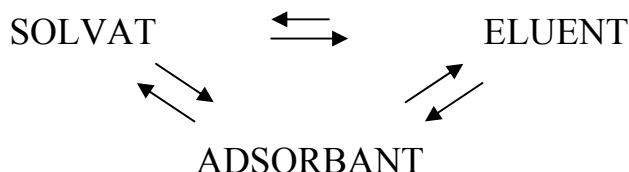
Aceste dezavantaje au impus dezvoltarea unor noi tehnici de extracție, dintre care cea mai importantă este:

2. Extracția pe faze solide (EFS), care s-a dezvoltat foarte mult în ultimii ani, devenind una din cele mai utilizate metode de pregătire a probelor. *Avantajele* acestei tehnici sunt:

- obținerea unor randamente crescute de extracție comparativ cu extracția lichid-lichid

- realizarea simultană a izolării substanței toxice din probă și a preconcentrării probei, ceea ce asigură o sensibilitate crescută și limite de detecție mici
- reducerea consumului de solvenți
- evitarea formării emulsiilor
- obținerea unor extracte clare
- manipularea ușoară și posibilitatea automatizării procesului de extracție în determinările de rutină
- costul redus
- timpul mult mai scurt al analizei.

Extracția pe faze solide se bazează pe adsorbția analitului care este dizolvat în probă pe un adsorbant, de pe care este apoi eluat cu un solvent corespunzător. Adsorbția reprezintă fixarea unui gaz, a unui lichid sau a unui solid pe o suprafață solidă. Pentru ca această fixare să fie utilizabilă în scopuri separative, ea trebuie să fie reversibilă. Eluția, sau desorbția, constă în extracția substanței adsorbite pe faza solidă cu ajutorul unui solvent, care în acest caz poartă denumirea de eluent. Are loc ruperea legăturilor dintre adsorbant și moleculele fixate inițial, care sunt înlocuite pe locurile de adsorbție de către moleculele eluentului. Între aceste interacțiuni se stabilește un echilibru:



Adsorbția este influențată de unele proprietăți ale moleculelor de substanțe toxice, cum ar fi: caracterul ionic, polaritatea, polarizabilitatea și configurația structurală.

Adsorbânții folosiți pot fi:

- adsorbânți minerali, ca alumina, silicatul de magneziu, aluminosilicații sau silicagelul
- alți adsorbânți, cum sunt polimerii reticulați derivați de stiren sau silicagelul modificat prin legare chimică.

Acești adsorbânți trebuie să posede anumite *proprietăți*, care sunt esențiale pentru utilizarea lor în tehnicile extractive:

1. insolubilitatea în solvenții folosiți și inerția față de substanțele adsorbite
2. suprafața specifică importantă, care să asigure o adsorbție corespunzătoare
3. activitatea, care este dependentă de conținutul de apă și care trebuie să fie constantă pentru a se asigura o reproductibilitate bună; activarea se face prin încălzirea adsorbantului în etuvă la temperaturi ridicate (100-300°C).

Mecanismele pe care se bazează reținerea pe faza solidă pot fi:

- interacțiuni apolare, când reținerea se face în mediu polar, iar eluarea în mediu nepolar
- interacțiuni polare, când reținerea se realizează în mediu apolar, iar eluarea în mediu polar
- schimburi ionice, când se folosesc schimbători de cationi (acid propilsulfonic, benzensulfonic grefați pe silicagel) pentru reținerea substanțelor cu sarcină pozitivă, sau schimbători de anioni (ex. amine cuaternare) pentru reținerea analiților anionici.

Ca și în cazul extracției lichid-lichid, reținerea substanțelor toxice poate fi influențată de **pH**, mai ales atunci când faza solidă este reprezentată de silicagel modificat sau de schimbători de ioni. Pentru silicagelul modificat pH-ul soluției de condiționare și cel al probei trebuie să fie cel la care compusul nu este ionizat, iar pentru schimbătorii de ioni, pH-ul probei trebuie să fie unul la care analitul și grupările funcționale de pe suprafața schimbătorului au sarcini opuse.

Dispozitivele de condiționare a fazei solide pentru EFS sunt cartușele sau discurile de extracție (Fig.2.15.).

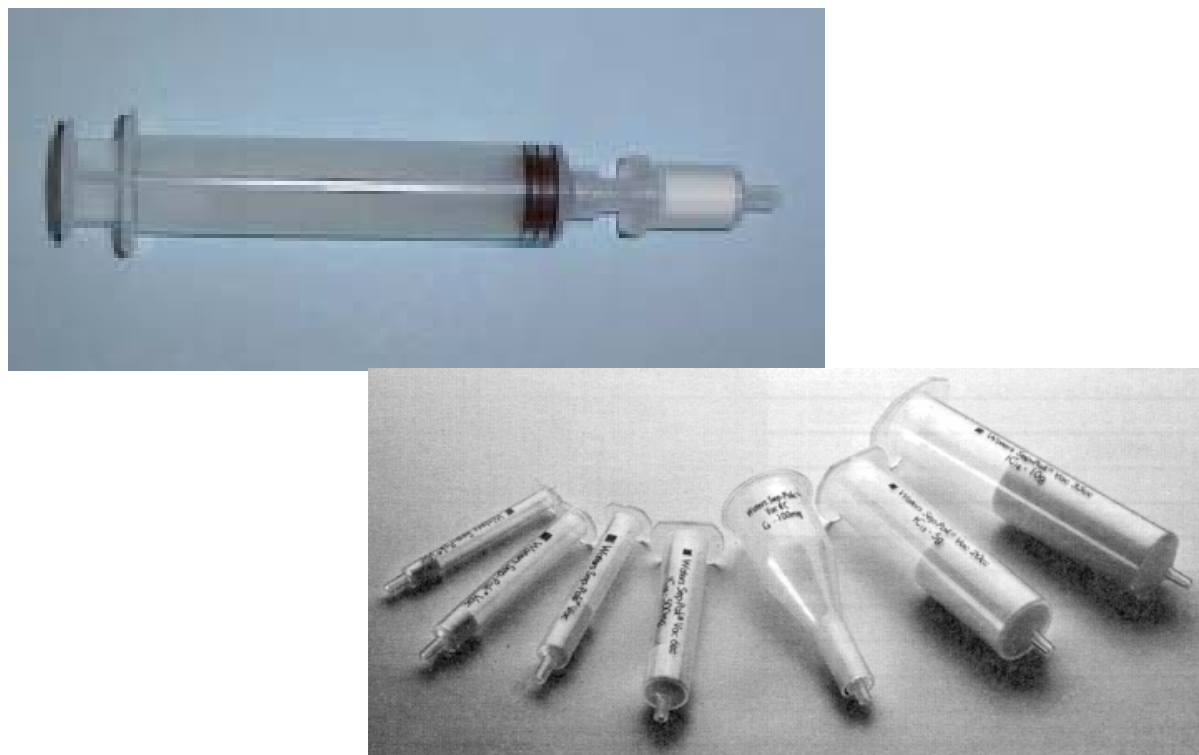


Fig.2.15. Cartușe de extracție de diferite tipuri

Cartușele sunt coloane de polipropilenă sau de sticlă în care se introduce faza solidă și prin care proba sau solventul sunt forțate să treacă prin aplicarea unei presiuni cu ajutorul unei seringi sau prin aspirare, folosind o instalație pentru creat vacuum (Fig. 2.16.).



Fig.2.16. Dispozitiv de creat vacuum folosit în EFS

Etapele unei extracții pe fază solidă sunt:

- 1. Condiționarea cartușului
- 2. Trecerea probei prin cartuș
- 3. Spălarea cartușului (pentru îndepărtarea interferențelor)
- 4. Eluarea analiților.

Foarte importante pentru obținerea unui randament bun sunt *alegerea cartușului și a solvenților* folosiți pentru eluare. Mărimea cartușului este dependentă de volumul probei de analizat, cantitatea de adsorbant depinde de capacitatea de reținere a acestuia, iar tipul de solvent de matricea probei, apoasă sau organică. Pentru matricile apoase, alegerea adsorbantului depinde de solubilitatea analitului în apă sau în solvenți organici, iar pentru matricile organice de polaritatea și de miscibilitatea solventului cu apa.

În tabelul 2.1. sunt prezentați principalii adsorbanti folosiți în EFS și analiții reținuți pe aceștia.

Tabelul nr. 2.1. Tipuri de adsorbanti utilizați în extracția pe faze solide

<i>Tipul de extracție</i>	<i>Adsorbant</i>	<i>Analizii reținuți</i>	<i>Matricea</i>	<i>Eluenții</i>	<i>Aplicații</i>
<i>Extracție apolară</i>	C18 – octadecil C8 – octil CH – ciclohexil PH - fenil	Grupări hidrofobe: cicluri aromatice, catene alchilice	Apă, soluții tampon, lichide biologice	Metanol, acetonitril, acetat de etil, cloroform, hexan	Droguri, pesticide, substanțe medicamentoase
<i>Extracție polară</i>	CN – cianopropil 2OH – diol Si – silicagel NH₂ - aminopropil	Grupări hidrofile: -OH, NH₂, heteroatomi	Hexan, uleiuri, cloroform, lipide	Metanol, izopropanol, acetonă	Separarea lipidelor, aditivilor uleioși, fenolilor, hidraților de carbon
<i>Extracție cu schimbători de cationi</i>	SCX – acid benzen sulfonic PRS – acid propil sulfonic CBA – acid carboxilic	Cationi: amine, pirimidină	Apă, soluții tampon acide, lichide biologice	Soluții tampon alcaline, soluții tampon cu tărie ionică mare	Catecolamine, ierbicide, substanțe medicamentoase
<i>Extracție cu schimbători de anioni</i>	SAX – amină cuaternară NH₂– aminopropil DEA- dietilaminopropil	Anioni: acizi carboxilici, acizi sulfonici, fosfați	Apă, soluții tampon alcaline, lichide biologice	Soluții tampon acide, soluții tampon cu tărie ionică mare	Acizi organici, vitamine, acizi grași, fosfați
<i>Extracție mixtă</i>	Bond Elut Certify Clean Screen DAU	Droguri cu caracter bazic, substanțe medicamentoase	Apă, soluții tampon acide, lichide biologice	Acizi puternici, baze puternice, amestecuri de solvenți organici cu acizi sau baze	Substanțe medicamentoase cu caracter neutru și bazic

b) Extracția cu fluide supercritice

Extracția cu fluide supercritice este o nouă tehnică de separare care a fost introdusă în 1988 pentru a înlocui extracția Soxhlet. Această extracție se realizează în condiții speciale de temperatură și presiune, care permit atingerea unui punct critic în care materialul nu este nici lichid, nici gazos. Peste acest punct există un domeniu, denumit domeniu supercritic, în care creșteri atât ale presiunii cât și ale temperaturii nu au efect asupra materialului, care nici nu va condensa, nici nu va fierbe. Acest fluid, denumit supercritic, are proprietăți comune atât gazelor cât și lichidelor, adică difuzează prin materiale ca și cum ar fi un gaz și are capacitate de dizolvare asemănătoare unui lichid. Fluidul de elecție pentru această metodă este dioxidul de carbon, ai cărui parametri critici pot fi ușor controlați și care în plus este ușor disponibil în formă pură și la un cost acceptabil. În unele cazuri, pentru a crește randamentul de extracție al unor compuși, în dioxidul de carbon supercritic se pot adăuga modificatori, cum ar fi metanolul. Metoda de extracție este considerată a fi selectivă, acest lucru asigurându-se prin ajustarea presiunii, a temperaturii, a compoziției fluidului, a fluxului sau a timpului.

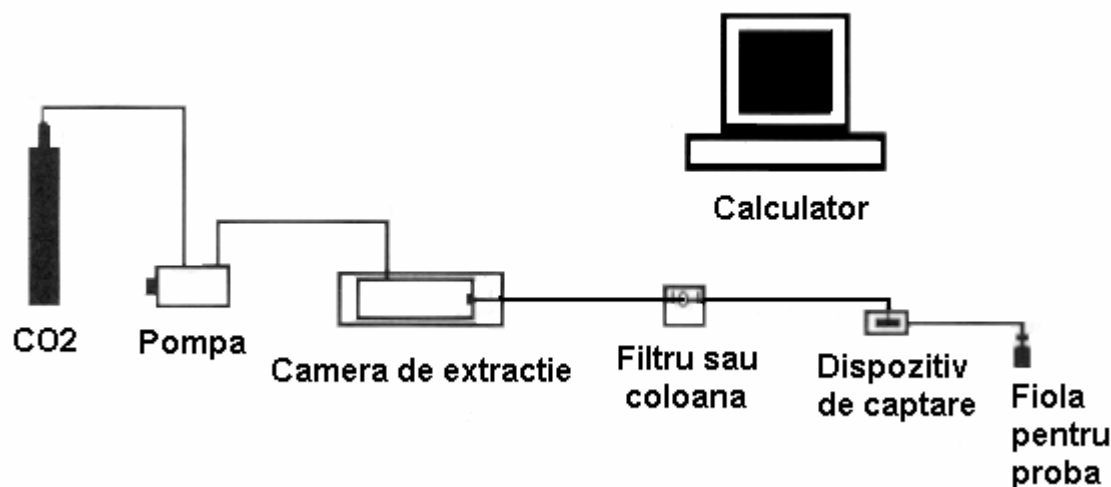


Fig.2.17. Aparat pentru extracție cu fluide supercritice

Un aparat de extracție cu fluide supercritice (Fig.2.17.) este alcătuit în principiu dintr-o butelie cu dioxid de carbon, o pompă, o cameră de extracție, un restrictor sau cameră de decompresie și un flacon în care se recoltează proba. Dacă substanțele izolate sunt foarte volatile, reținerea lor se face într-un dispozitiv de captare cu un adsorbant în fază solidă, care este răcit în timpul colectării și încălzit apoi pentru a promova desorbția.

Astfel de aparate de extracție pot fi cuplate cu diferite coloane sau detectori, permițând analiza probelor complexe; un exemplu de cuplare este cel cu un gaz cromatograf. Metoda este utilă pentru analiza probelor solide, iar în domeniul toxicologiei se aplică în special la analiza probelor de mediu sau a pesticidelor din produsele alimentare.

În funcție de modul de solubilizare a substanțelor toxice și de agenții folosiți pentru precipitarea proteinelor, de-a lungul timpului au fost dezvoltate mai multe metode de izolare a substanțelor organice nevolatile.

1. Metoda Stas-Otto-Ogier este prima metodă eficientă de extracție cu solvenți organici, care a fost elaborată de Stas în 1850, în cursul unei expertize pentru izolarea nicotinei. Ea a fost ulterior modificată de Otto și apoi de Ogier, iar tehnica utilizată în prezent se bazează pe solubilizarea substanțelor toxice în amestec hidroalcoolic slab acidulat, urmată de îndepărtarea impurităților cu alcool concentrat. După îndepărtarea alcoolului, toxicii sunt extrași cu solvenți organici, întâi în mediu acid, apoi în mediu alcalin.

Tehnica de lucru. 50-100 g (ml) produs de analizat, bine mărunțit și omogenizat, se introduc într-un balon cu fund rotund prevăzut cu un refrigerent. Se acidulează cu o soluție de acid tartric 5% până la pH 4 și se adaugă un volum dublu de alcool de 95°. Volumul de alcool adăugat depinde de consistența produsului, el alegându-se în așa fel încât concentrația alcoolică finală să fie în jur de 40-50%. Se macerează pe baia de apă, timp de 6-12 ore la 50°C, sau 3-6 ore la 70°C, apoi conținutul balonului se răcește și se filtrează.

Filtratul se purifică, îndepărtând substanțele care ar putea deranja analiza. Astfel alcoolul, care este miscibil atât cu apa cât și cu solvenții organici și care poate reduce extracția toxicilor deoarece o parte din ei ar putea rămâne în faza alcoolică, se îndepărtează prin distilare sub presiune scăzută, încălzind baia la 50°C, sau prin evaporare într-o capsulă, până la obținerea unui lichid siropos. Lichidul se răcește și se tratează sub agitare continuă cu un volum de 3-4 ori mai mare de alcool de 95°, pentru precipitarea proteinelor. Se lasă să se aglomereze precipitatele floconoase, apoi se filtrează, iar precipitatul se spală cu alcool. Se repetă operația de 3-4 ori, în final folosindu-se alcool absolut. Purificarea este completă atunci când nu se mai formează flocoane proteice la adăugare de alcool absolut. Se filtrează, se îndepărtează alcoolul și se diluează cu 50 ml apă.

Lichidul apos acid astfel obținut este prelucrat în continuare pentru îndepărtarea lipidelor sau a coloranților. În acest scop, el este extras într-o pâlnie de separație cu un volum egal de eter de petrol, operația repetându-se dacă este cazul. Extractul de eter de petrol poate conține, pe lângă impurități, și substanțele toxice care sunt solubile în acest solvent, cum ar fi acidul salicilic, camforul, glutetimida, insecticidele organoclorurate. Dacă se bănuiește prezența în probă a acestor compuși, se renunță la purificarea prin extracție cu eter de petrol, pentru a evita pierderile sau obținerea unor extracte impurificate și greu de analizat. Pentru o purificare mai avansată se îndepărtează lecitinele prin precipitare cu acetonă, filtrare și eliminarea acestora prin distilare și evaporare.

Lichidul apos acid obținut conține majoritatea substanțelor toxice sub formă de tartrați (alcaloizi, medicamente cu caracter bazic), sub formă liberă (glucozizi, cantaridină, etc.), sau ca acizi neionizați (derivați barbiturici, acid salicilic, etc.).

În continuare, se procedează la fracționarea extractului, care urmărește separarea toxicilor în trei grupe: substanțe cu caracter acid, substanțe cu caracter bazic și compuși neutri. Această fracționare nu este absolută, deoarece există substanțe, cum ar fi cafeina sau alte xantine, care au caracter amfoter și se pot regăsi în oricare dintre primele două faze; de asemenea, metaboliții unor substanțe cu caracter bazic se pot separa și în fracțiunea acidă, cum este cazul sulfoxizilor fenotiazinelor, al derivațiilor fenolici ai fenacetinei, al metaboliților benzodiazepinelor, etc.

Fracționarea după Stas-Otto se realizează astfel: soluția apoasă acidă obținută după extracție și purificare se agită într-o pâlnie de separare cu solventul organic. Deși s-a propus folosirea cloroformului, a acetatului de etil, a diclormetanului, etc., solventul de elecție este eterul etilic, chiar dacă unii autori îl contestă datorită formării de peroxizi cu caracter exploziv; acești peroxizi se pot îndepărta prin tratare cu sulfat feros sau pe coloană de alumina. Extractul sau fracțiunea eterică obținută conține substanțele cu caracter acid (acid salicilic, barbiturice, pirazonă) și neutre (carbamații). Această fracțiune poate să necesite purificare, după care este fracționată la rândul ei. Astfel, ea se extrage cu soluție de bicarbonat de sodiu 5%, când se separă acizii tari (fracțiunea A₁); eterul se reextrage cu soluție de hidroxid de sodiu 0,1N, care reacționează cu acizii slabi și compușii fenolici (fracțiunea A₂). Eterul rămas va conține doar compușii neutri și lipidele. Se evaporă la sec și reziduul se dizolvă în acid sulfuric 0,1N, obținându-se fracțiunea C, a substanțelor organice neutre (Fig. 2.18.).

Faza acidă inițială se neutralizează cu hidroxid de amoniu sau cu carbonat acid de sodiu până la un pH alcalin (Fig. 2.19.). Teoretic, trebuie întâi efectuată o

alcalinizare cu hidroxid de amoniu, urmată de extracție cu eter, după care se alcalinizează cu carbonat acid de sodiu și se extrage, acoperindu-se astfel toate posibilitățile de extracție a compușilor amfoteri. În practică se face însă o singură alcalinizare pentru substanțele bazice, unii autori preferând hidroxidul de amoniu, iar alții carbonatul acid de sodiu.

După alcalinizarea soluției apoase și extracție cu eter (sau diclormetan, sau cloroform), se obține fracțiunea alcalină, care conține substanțele cu caracter bazic cum ar fi: alcaloizii, bazele cuaternare de amoniu, fenotiazinele, benzodiazepinele, amfetaminele, etc. Această fază eterică se extrage cu acid sulfuric 0,1N și rezultă fracțiunea B. Pentru purificare se pot reextrage fracțiunile cu solvent organic, după modificarea pH-ului, și apoi din nou cu soluție acidă pentru substanțele bazice sau alcalină pentru substanțele cu caracter acid.

Fracțiunile A, B, C sunt astfel pregătite pentru identificare prin spectrofotometrie în UV, de fluorescență, GC, CSS. În primul rând se aplică spectrofotometria în UV, prin înregistrarea spectrelor la pH-ul la care se găsesc probele și apoi la pH invers și se compară cu bibliotecile de spectre cunoscute.

Observații:

- Dacă la aplicarea metodei Stas-Otto-Ogier alcalinizarea s-a făcut cu hidroxid de sodiu, morfina rămâne în faza apoasă sub formă de fenolat hidrosolubil, neextractibil în solvenți organici. În acest caz se acidulează cu acid clorhidric 10%, apoi se alcalinizează la pH 8,0-8,3 cu soluție de carbonat acid de sodiu sau cu soluție de hidroxid de amoniu și se extrage cu cloroform sau amestec de cloroform-alcool amilic (9:1).
- La izolarea stricninei se adaugă întâi solventul organic (eter, sau de preferință cloroform) și apoi se alcalinizează, sub agitare continuă, deoarece stricnina eliberată prin alcalinizare trece în forma cristalină, greu extractibilă în solvent. Dacă se alcalinizează concomitent cu agitarea, alcaloidul este extras pe măsură ce trece în forma bazică, evitându-se formarea cristalelor.

La analiza substanțelor toxice volatile (nicotină, amfetamină), extractul eteric alcalin se acidulează înainte de evaporare cu acid sulfuric 10% sau acid clorhidric 10%, pentru a evita pierderile prin evaporare.

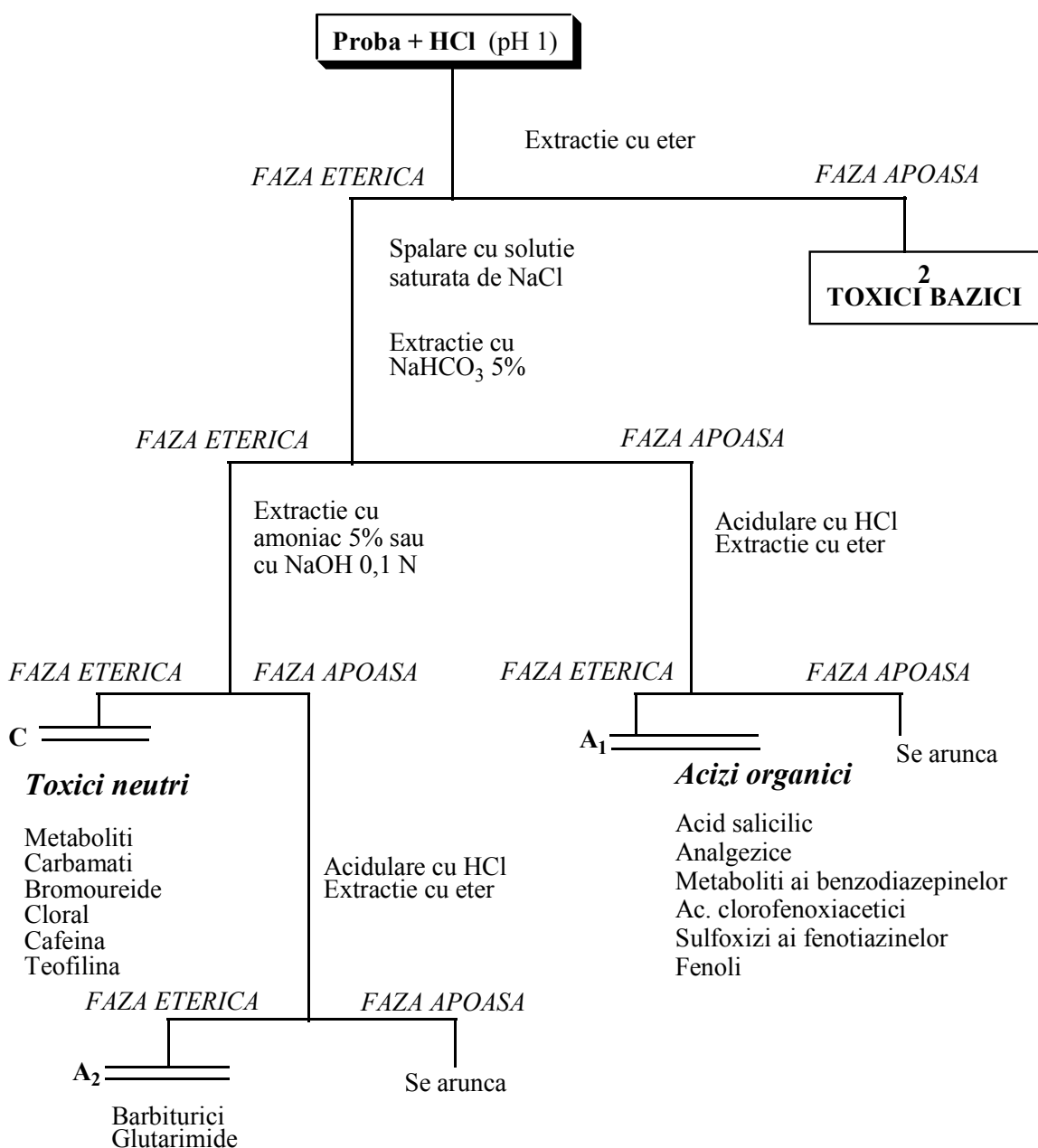


Figura 2.18. Fraționarea toxicilor acizi și neutri

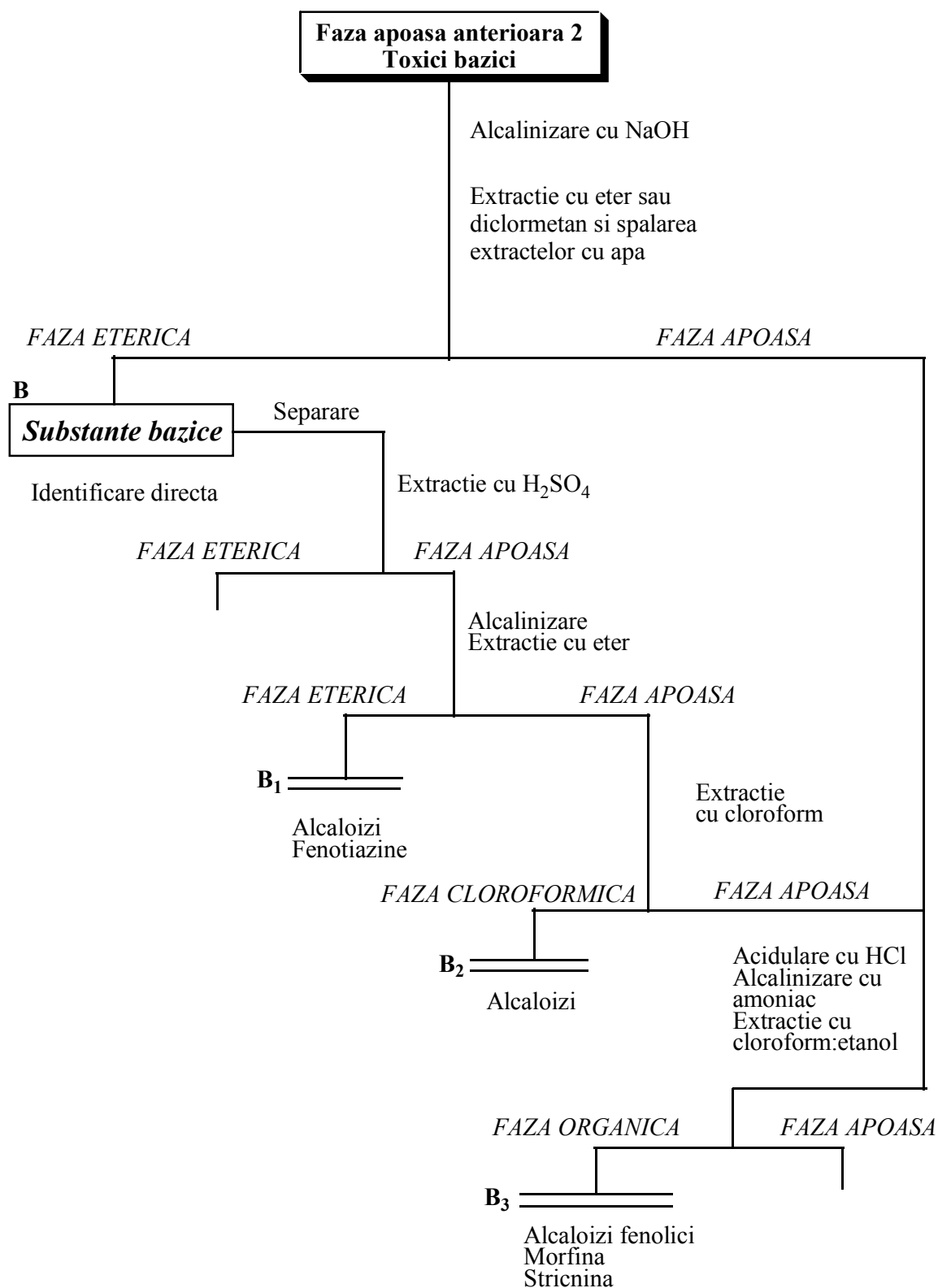


Figura 2.19. Fraționarea toxicilor cu caracter bazic

Alte metode sunt:

2. Metoda Dragendorff, care se bazează pe solubilizarea substanțelor toxice în apă acidulată cu acid sulfuric și precipitarea proteinelor cu alcool, urmate de extracția selectivă cu solvenți organici, la un pH optim.

3. Metoda Florance constă în solubilizarea toxicilor în apă și precipitarea proteinelor cu acid tricloracetic, care asigură și ionizarea bazelor organice. Din filtratul acid se extrag substanțele toxice la pH-ul optim. Metoda nu asigură un randament suficient de bun, deoarece precipitatul format poate reține o parte din compușii de interes. Ea se pretează pentru izolarea morfinei, stricninei, sulfamidelor, derivaților barbiturici, dar nu și a heterozidelor sau a unor alcaloizi ușor hidrolizabili în mediu acid (atropina, cocaina).

4. Metoda Fabre (metoda proteolizei), se bazează pe degradarea proteinelor pe cale enzimatică, cu tripsină sau pancreatină, până la peptide și aminoacizi, după care se face extracția substanțelor toxice și a metaboliților lor la un pH optim. Metoda este ușor de aplicat, conduce la obținerea unor extracte foarte pure și substanțele toxice ușor hidrolizabile nu sunt afectate.

5. Metoda digestiei acide presupune macerarea pe baie de apă a produsului de analizat cu acid clorhidric, când are loc precipitarea proteinelor, urmată de extracția cu solvenți organici a substanțelor toxice, din mediu alcalin. Prin această tehnică se izolează substanțele și metaboliții cu caracter alcalin, concomitent având loc și hidroliza conjugărilor. Metoda este contraindicată pentru substanțele ușor hidrolizabile.

6. Metoda cu tungstat de sodiu se bazează pe precipitarea proteinelor cu tungstat de sodiu și extracția din filtrat a substanțelor toxice la un pH optim. Ea este rapidă, filtratele obținute sunt limpezi și este indicată pentru izolarea compușilor cu caracter acid sau neutru.

7. Metoda cu acetonă și sulfat de amoniu (metoda Nicolls) constă în deproteinizarea produsului cu sulfat de amoniu și acetonă, urmată de extracția cu solvenți organici la pH optim.

8. Metoda Griffon-Le Breton se bazează pe solidificarea produsului de analizat cu sulfat de sodiu anhidru și extracția selectivă cu solvenți organici la pH optim. Ea se pretează bine pentru izolarea substanțelor toxice din organe și din sânge.

Tehnica de lucru: 10-20 g produs de analizat se triturează într-un mojar cu puțin nisip purificat și cu o cantitate dublă sau triplă de sulfat de amoniu anhidru. În funcție de natura toxicului, se adaugă fie 5 g oxid de magneziu (pentru substanțele alcaline), fie 1 g acid tartric (pentru substanțele acide). Masa obținută trebuie să fie solidă, omogenă și neaderentă și se prelucrează în una din următoarele variante:

- se trece conținutul într-un flacon conic cu dop rodat, se adaugă un volum dublu sau triplu de solvent organic și se agită energic 15-20 minute. Se lasă în repaus și, după separarea fazelor, se filtrează faza organică. Extracția se repetă de 2-3 ori. Fazele organice separate și reunite se evaporă la sec pe baie de apă;
 - se trece conținutul într-un cartuș filtrant al aparatului Soxhlet și se extrage exhaustiv cu eter sau cloroform; soluția organică obținută se evaporă pe baie de apă;
 - se trece conținutul pe o coloană specială, care la partea inferioară are oxid de magneziu, sulfat de sodiu anhidru și uneori cărbune activ și se epuizează cu solvent organic; soluția organică se evaporă pe baia de apă.
- În funcție de pH-ul necesar, alcalinizarea se poate face și cu hidroxid de sodiu 10% sau cu amoniac concentrat, dar în acest caz, pentru a asigura solidificarea, se adaugă un exces de sulfat de sodiu anhidru.

Extracția directă cu solvenți organici se poate folosi atunci când se cunoaște natura substanței toxice și când se analizează o probă puțin complexă, cum este de exemplu proba de urină.

Tehnica de lucru: 5-50 ml produs de analizat lichid se acidulează cu acid clorhidric 2N. Se introduce un volum exact măsurat din proba acidulată într-o pâlnie de separație și se extrage de cel puțin două ori cu un volum de eter etilic sau cloroform de 2-5 ori mai mare când volumul de probă este mare, sau de 5-10 ori mai mare când volumul de probă prelucrat este mic. Se agită energic 1-5 minute. Fazele organice separate și reunite se filtrează printr-un filtru uscat ce conține puțin sulfat de sodiu anhidru și se evaporă pe baie de apă. În reziduul obținut se vor identifica substanțele toxice și metaboliții cu caracter acid.

Faza apoasă rămasă în pâlnia de separație se alcalinizează cu hidroxid de amoniu 2N și se extrage cu solvenți organici în același mod ca și în cazul substanțelor cu caracter acid. În reziduul obținut după evaporarea solventului de extracție se vor identifica toxicii cu caracter bazic.

Capitolul 3

EVALUAREA TOXICOLOGICĂ A MEDICAMENTELOR

De la sinteza unui nou medicament până la administrarea sa la bolnavi se scurge o perioadă de 7-12 ani, timp în care se realizează evaluarea sa sub aspectul calității, securității utilizării și eficacității. Costurile acestei evaluări sunt ridicate, în jur de 200 milioane dolari pentru o singură substanță (la nivelul anului 1997) și doar una din 1000 de molecule ajunge să fie comercializată. Această perioadă poate fi divizată în trei etape:

- etapa preclinică
- etapa clinică
- etapa administrativă.

Etapa preclinică urmărește studierea noii molecule sub toate aspectele și experimentarea sa pe animal, ceea ce conduce la o expertiză farmaceutică și la o expertiză farmaco-toxicologică.

Etapa clinică are drept scop studierea la om a eficacității și a toleranței produsului, conducând la o expertiză clinică ce permite aprecierea raportului beneficiu / risc.

Etapa administrativă conduce la înregistrarea medicamentului și la obținerea autorizației de punere pe piață.

La nivel european, legislația referitoare la expertiza medicamentelor a fost armonizată progresiv, concretizându-se în 1995 în crearea Agenției Europene pentru Evaluarea Medicamentelor, cu sediul la Londra. Agenția Europeană a elaborat un format standard unic al dosarului pentru înregistrare, care a fost adoptat și de Agenția Națională a Medicamentului din România.

A) Perioada preclinică

1. STUDIUL FARMACEUTIC

Acesta are drept obiectiv garantarea calității constante a viitorului medicament și se referă la

1.1. Studiul analitic, care urmărește:

- definirea caracteristicilor fizico-chimice ale viitorului medicament, prin metode validate de identificare, dozare și control de puritate
- studiul de stabilitate, care permite stabilirea duratei de conservare și a condiționării care asigură o bună conservare
- demonstrarea absenței contaminării bacteriene și virale prin teste biologice de inocuitate „in vitro”

1.2. Studiul farmacotehnic, care are drept obiectiv realizarea rapidă a unei forme farmaceutice ce prezintă calitățile corespunzătoare în vederea realizării primelor experimente pe animal.

2. EXPERIMENTAREA PE ANIMAL

Are drept scop:

- crearea unei baze de date cu privire la metabolismul și la eficacitatea substanței
- oprirea în această etapă a acelor compuși ale căror efecte dăunătoare la animal lasă să se întrevadă lipsa securității de administrare la om
- identificarea organelor asupra cărora substanța ar putea să aibă acțiuni toxice la om.

Studiile efectuate sunt:

- Studii de toxicologie, care au drept scop verificarea securității compusului
- Studii de farmacodinamie, care verifică eficacitatea substanței
- Studii de farmacocinetică, care se referă de asemenea la eficacitatea viitorului medicament.

2.1. STUDIILE DE TOXICOLOGIE

Aceste studii constituie prima etapă a evaluării securității unui medicament și trebuie să furnizeze răspunsuri la trei întrebări:

- 1. Care sunt dozele maxime tolerate?
- 2. Care sunt organele, țesuturile, celulele sau funcțiile fiziologice afectate de viitorul medicament?
- 3. Care este riscul ca substanța să inducă alterări genetice sau carcinogeneză chimică?

Studiile de toxicitate se clasifică în trei grupe:

- *I. Studii de toxicitate convențională*, care evaluează toxicitatea acută, toxicitatea la termen scurt după doze repetate, toxicitatea subcronică și toxicitatea cronică a substanțelor;
- *II. Studii de toxicitate specială*, care evaluează mutagenitatea, carcinogenitatea și toxicitatea asupra funcției de reproducere;
- *III. Studii de toxicitate alternativă*, care prevăd reducerea numărului de animale folosite și a suferințelor induse acestora prin utilizarea unor sisteme „in vitro”, dar care încă nu au fost acceptate de instanțele de reglementare.

2.1.1. Studiile de toxicitate acută urmăresc evaluarea toxicității acute, adică a efectelor adverse produse pe termen scurt, în urma administrării unei doze unice de substanță, sau a mai multor doze, în interval de 24 de ore.

Obiectivele acestor studii sunt:

- definirea toxicității produsului și identificarea organelor țintă

- prevederea simptomelor intoxicației acute la om
- facilitarea selectării dozelor utilizate în studiile de farmacologie sau în celelalte studii de toxicologie.

Principalul parametru determinat este **doza medie letală (DL₅₀)**, definită drept doza unică de substanță, determinată prin metode statistice, care produce moartea a 50% din animalele de experiență. Ea nu este o constantă biologică, precizia sa fiind influențată de numeroși factori, în principal de condițiile experimentale și a fost utilizată pentru compararea toxicității compușilor chimici.

Animalele folosite pentru determinarea dozei medii letale se aleg în funcție de:

- facilitatea și condițiile de creștere pentru specia respectivă
- rapiditatea dezvoltării
- ușurința manipulării în timpul experimentelor
- datele de toxicitate disponibile pentru specia respectivă.

Cel mai frecvent se folosesc specii de rozătoare: șobolani, șoareci, iepuri, cobai. Normativele europene prevăd testarea pe două specii de rozătoare, în general șobolani și șoareci, în timp reglementările din SUA și Japonia presupun folosirea a trei specii, dintre care una de nerozătoare.

Animalele trebuie să fie de aceeași rasă, aceeași origine, aceeași vârstă, aceeași greutate, sau eventual cu variații ale greutății corporale de maxim $\pm 20\%$ față de medie, și cu o stare de sănătate bună. Ele sunt menținute în condiții standard de vivariu pe toată durata experimentului. Pentru fiecare nivel de doză se utilizează câte 10 animale, în loturi fiind incluși un număr egal de masculi și de femele. În cazul evaluării toxicității acute pe cale cutanată, animalele preferate sunt iepurii, șobolanii și cobaii.

Calea de administrare a substanțelor poate fi orală, cutanată, respiratorie, parenterală, și se alege în funcție de calea de expunere a omului. Reglementările europene prevăd administrarea substanțelor pe două căi, una fiind cea prevăzută a fi utilizată la om, iar cealaltă trebuind să asigure o biodisponibilitate de 100%, sau cât mai apropiată de aceasta.

Nivelurile de doze testate sunt în număr de trei, ele trebuind să încadreze valoarea DL₅₀ ce se așteaptă a fi obținută. Dacă nu s-a observat letalitate la o doză de 5000 mg/kg, în general nu se recomandă determinarea DL₅₀, ci doar determinarea dozei maxime tolerate, adică a dozei celei mai mari care produce fenomene toxice, fără a induce însă decesul animalelor.

Observarea animalelor constă într-un examen clinic și un bilanț al mortalității imediat după administrare, frecvent în primele 4 ore și apoi cel puțin o dată pe zi, pentru un interval minim de 14 zile. Se observă în special modificările la nivelul pielii, blănii, membranelor mucoase, sistemului circulator, sistemului nervos central, comportamentului. Animalele decedate pe parcursul experimentului și cele rămase în viață la sfârșitul acestuia sunt autopsiate, iar ficatul, rinichiul

precum și organele care prezintă modificări macroscopice sunt supuse unui examen histopatologic.

Bilanțul mortalității servește pentru calcularea DL_{50} , prin metode clasice (Bliss, Litchfield și Wilcoxon, etc.) sau cu ajutorul unor programe informatice. Doza medie letală este exprimată în mg/kg greutate corporală, precizându-se specia și eventual rasa pe care s-a făcut determinarea și calea de administrare.

2.1.2. Studiile de toxicitate după administrare repetată

Obiectivele acestor studii sunt:

- determinarea potențialului toxic după o expunere mai îndelungată la doze care permit supraviețuirea
- determinarea relației doză-răspuns, inclusiv a nivelului la care nu se observă efecte adverse (NOAEL)
- identificare organelor țintă
- furnizarea de informații cu privire la diferențele între specii
- furnizarea de informații pentru evaluarea riscului
- stabilirea criteriilor de evaluare utilizate în alte studii de toxicitate.

Tipuri de studii:

- studii de toxicitate pe termen scurt, când administrarea compusului testat se face zilnic, timp de 14 sau 28 de zile
- studii de toxicitate subcronică, în care substanța este administrată 90 de zile
- studii de toxicitate cronică, ce prevăd o administrare îndelungată, de minim 10% din durata de viață a speciei respective, de 6 sau chiar de 12 luni.

Durata studiului efectuat depinde de durata preconizată a administrării la om (Tabel 3.1.).

Tabel 3.1. Durata studiilor de toxicitate după administrări repetate

Durata preconizată pentru administrarea clinică	Durata recomandată pentru studiul de toxicitate
Una sau mai multe doze, într-o singură zi	14 zile
Doze repetate, până la 7 zile	28 zile
Doze repetate, până la 30 de zile	3 luni
Doze repetate, mai mult de 30 de zile	6 luni, sau chiar 12 luni

Animalele folosite trebuie să fie din două specii, una de rozătoare și alta de nerozătoare. Dintre rozătoare, cel mai frecvent se utilizează șobolanul, iar dintre nerozătoare câinele, primatele sau mini-porcul. Alegerea speciei se face în primul

rând în funcție de exigențele agenților de înregistrare, de sensibilitatea acestora, care trebuie să fie mare, de metabolismul similar cu al omului, dar și de experiența laboratorului.

Nivelele de doze sunt de minim trei, iar mărimea acestora și numărul de animale per doză trebuie să fie suficiente pentru a evidenția: 1) efectul toxic, 2) reversibilitatea sau nu a acțiunii toxice, 3) efectul cumulativ sau retard, 4) informații cu privire la organele țintă. În general se folosesc între 10-20 animale/sex/doză pentru rozătoare și 4-6 animale/sex/doză pentru nerozătoare. În experiment se mai includ și un lot control negativ și un lot control pozitiv (dacă se urmărește o anumită acțiune).

Calea de administrare este cea preconizată a fi folosită la om. Ea este frecvent cea orală, administrarea făcându-se în alimente, prin gavaj sau în capsule și mai rar în apa de băut.

Evaluarea toxicității se face atât pe animalul viu, cât și post-mortem.

Pe animalul viu se evaluează:

- semnele vizibile de toxicitate sau mortalitatea, modificarea aspectului, funcțiilor vitale, a comportamentului
- greutatea corporală
- consumul de alimente
- rezultatele examenului oftalmologic
- datele de patologie clinică (parametrii hematologici, enzimatici, biochimici, analiza de urină)

Post-mortem se evaluează:

- greutatea organelor
- aspectul histopatologic al organelor.

În cazul studiilor de toxicitate cronică, în plus se mai evaluează și funcția cardiovasculară, precum și absorbția substanței în organism.

2.1.3. Studii de mutagenitate

Aceste studii urmăresc evaluarea potențialului mutagen al substanțelor. La ora actuală sunt disponibile peste 100 de teste, atât *in vivo* cât și *in vitro*, care se realizează pe diferite organisme:

- teste *in vitro*: pe bacterii, culturi de celule de mamifere și culturi de celule umane
- teste *in vivo*: pe *Drosophilla*, mamifere, organisme umane

Deoarece multe substanțe acționează ca mutageni numai după bioactivare și transformare în metaboliți electrofili foarte reactivi, iar multe teste de mutageneză se efectuează *in vitro*, pentru mimarea metabolizării se utilizează o fracțiune a ficatului de șobolan, S9. S9 este supernatantul obținut după centrifugarea timp de 20 de minute la 9000 g a unui omogenat de ficat de șobolan și conține sistemele

enzimatice implicate în metabolizarea xenobioticelor (OFMM). Deoarece enzimele de origine microzomală sunt inductibile, se preferă utilizarea unui omogenat de ficat care provine de la animale tratate în prealabil cu inductori enzimatici (bifenili policlorurați, 3-metil colantren, fenobarbital).

Testele de mutagenză se pot clasifica, după tipul de efect asupra materialului genetic pe care îl evidențiază, în:

- teste care evidențiază mutațiile genice
- teste care evidențiază mutațiile cromozomiale
- teste care evidențiază alterări primare ale ADN-ului, detectând repararea și recombinarea acestuia.

A) Teste care evidențiază mutațiile genice

1) Teste microbiene in vitro

Deoarece mutațiile de acest tip nu sunt vizibile la microscop, aceste teste se bazează pe utilizarea de variante biologice cu un caracter specific, sau pe producerea de mutații letale recesive. Mutațiile la nivelul unui situs specific se pot produce în 2 sensuri:

- În sensul direct: de la un tip sălbatic la un tip mutant; mutațiile sunt puse în evidență prin rezistența lor la un agent toxic, care traduce modificarea unei enzime;
- În sens revers: de la tipul mutant la tipul sălbatic de origine. Se utilizează sușe „auxotrofe”, care necesită un factor de creștere, și care pierd această cerință prin mutație, redevenind „prototrofe”, deci capabile să crească pe un mediu lipsit de acest factor de creștere.

Un exemplu clasic este **Testul Ames**, care măsoară reversia mutantelor histidin-dependente de *Salmonella typhimurium* la tipul sălbatic, histidin-independent. Se incubează sușele mutante cu substanța de testat într-un mediu de cultură sărac în histidină, care nu permite deci dezvoltarea mutantelor. Dacă substanța produce mutații reverse, se formează sușe histidin-independente, care se pot dezvolta în mediul sărac în histidină și pe placă se observă coloniile bacteriene.

2) Teste pe celule de mamifere

Se folosesc celule de limfom de șoarece, limfoblaști umani, celule de plămân sau ovar de hamster chinezesc. De exemplu, se pot folosi linii celulare de fibroblaști de ovar de hamster chinezesc femelă sau linii celulare de fibroblaști de plămân de hamster chinezesc mascul. Aceste două linii celulare au avantajul de a avea un nivel redus de mutații spontane, iar cariotipul lor este bine definit. Celulele prezintă locusul HPRT, care codifică enzima hipoxantin-guanin-fosforibozil transferază ce intervine în fosforilarea guaninei. Celulele care vor prezenta o mutație la nivelul locusului HPRT, își vor pierde activitatea enzimatică, sau aceasta va fi redusă, deci dacă în mediu se introduce 6-tioguanină, din aceasta nu se va sintetiza o nucleotidă letală, iar colonia se va dezvolta. Testul constă în măsurarea

numărului de colonii rezistente la 6-tioguanină, în prezența și în absența agenților mutageni.

Aceste teste pe culturi celulare de mamifere au anumite avantaje:

- permit o mai bună extrapolare la om, comparativ cu testele microbiene
- există o corelație bună cu efectele carcinogene ale anumitor clase de substanțe
- metoda este bine standardizată.

3) Teste microbiene in vivo

4) Teste ce utilizează insecte

Se folosește musca *Drosophilla melanogaster* deoarece:

- este bine caracterizată din punct de vedere genetic
- metabolizează substanțele toxice asemănător cu mamiferele
- timpul de producere a unei generații este doar de 12-14 zile

5) Teste ce evidențiază mutații genice la șoareci

B) Teste care detectează mutațiile cromozomiale

1) Teste pe insecte

2) Studii citogenetice pe celule de mamifere: pot fi teste in vitro sau teste in vivo.

Teste in vitro: Analiza metafazelor

Se utilizează celule de limfom de șoarece, ovar de hamster chinezesc sau limfocite umane.

Substanța se testează paralel cu doi martori pozitivi cu activitate mutagenă cunoscută, unul care acționează direct (sulfonat de etilmetan) iar altul care acționează după bioactivare (dimetilnitrozamină).

După o perioadă de incubare corespunzătoare, diviziunea celulară este oprită prin adăugare de colchicină, celulele sunt preparate și se evaluează anomaliile care apar la nivelul cromatidelor sau cromozomilor (Fig.3.1.).



Fig.3.1. Imaginea unei metafaze

Teste in vivo: Testul micronucleilor se efectuează pe măduvă hematogenă de șoarece și se bazează pe evidențierea unor formațiuni citoplasmice rotunde, asemănătoare ca formă, structură și proprietăți tinctoriale cu nucleul, motiv pentru care au fost denumite micronuclei (Fig.3.2.). Între formarea micronucleilor și aberațiile cromozomiale există o strânsă legătură, deoarece ei pot lua naștere fie din fragmente cromozomiale acentrice, care în anafază nu se mai pot deplasa spre nucleii în formare, fie din cromozomi întregi, care nu mai sunt incluși în nucleii fii datorită retardării anafazice produse prin lezionarea aparatului mitotic.

3) Testul letalității dominante la rozătoare

O mutație letală dominantă este o mutație a unui gamet care provoacă moartea zigoților produși de acest gamet. Individul purtător al acestei mutații nu este viabil, iar mutațiile letale dominante sunt eliminate automat, prin moartea mutantului.

Testul evidențiază efectele toxice asupra celulelor germinale ale masculilor sănătoși (șoareci sau șobolani). Efectele se pot manifesta sub forma unor implantații care nu sunt viabile, sau sub forma pierderii pre-implantațiilor la femelele fecundate de masculii tratați.

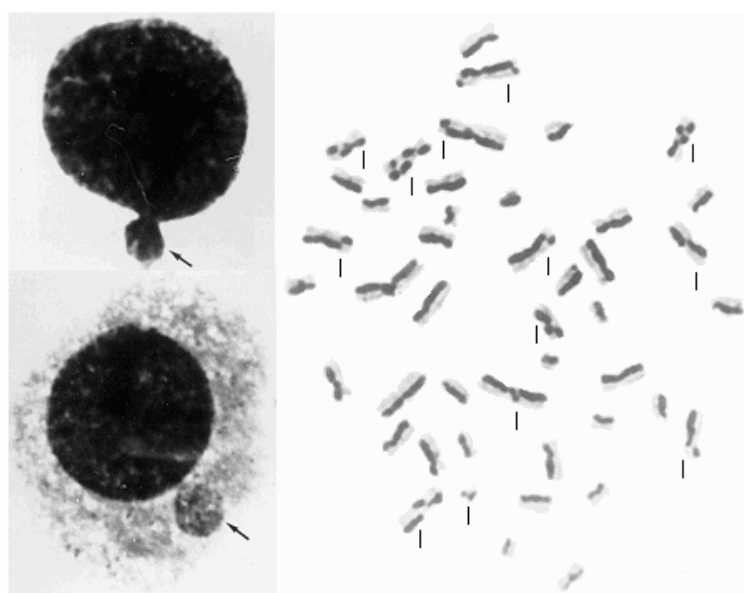


Figura 3.2. Imaginea unor micromuclei și modul lor de formare.

C) Teste care detectează repararea și recombinarea ADN-ului

1) Sinteza neprogramată a ADN-ului

Testul permite o măsurare indirectă a lezării primare a ADN-ului, pe baza reparării prin excizie. Dacă într-o cultură celulară de hepatocite de șobolan se

introduce timidină tritiată, aceasta va fi încorporată doar dacă are loc o reparare a acidului nucleic consecutivă unei leziuni și nu va fi utilizată în procesul de replicare, deoarece celulele aflate în cultură nu se divid. Repararea ADN-ului va fi definită prin cantitatea de timidină radioactivă încorporată per unitatea de greutate de ADN, în raport cu valorile determinate la martori. Măsurarea încorporării timidinei tritiate se poate face prin autoradiografie.

2) Schimbul între cromatidele surori

Măsoară schimbul reciproc de ADN între două cromatide surori ale unui cromozom în timpul duplicației. Celulele sunt marcate cu 5-BRDU (5-bromo-dezoxi-uridină). După două cicluri de replicare, celulele sunt colorate și se analizează și compară frecvența schimburilor per celulă și per cromozom (Fig.3.3.).

Celulele folosite pot fi limfom de șoarece, ovar de hamster chinezesc, limfocite umane.

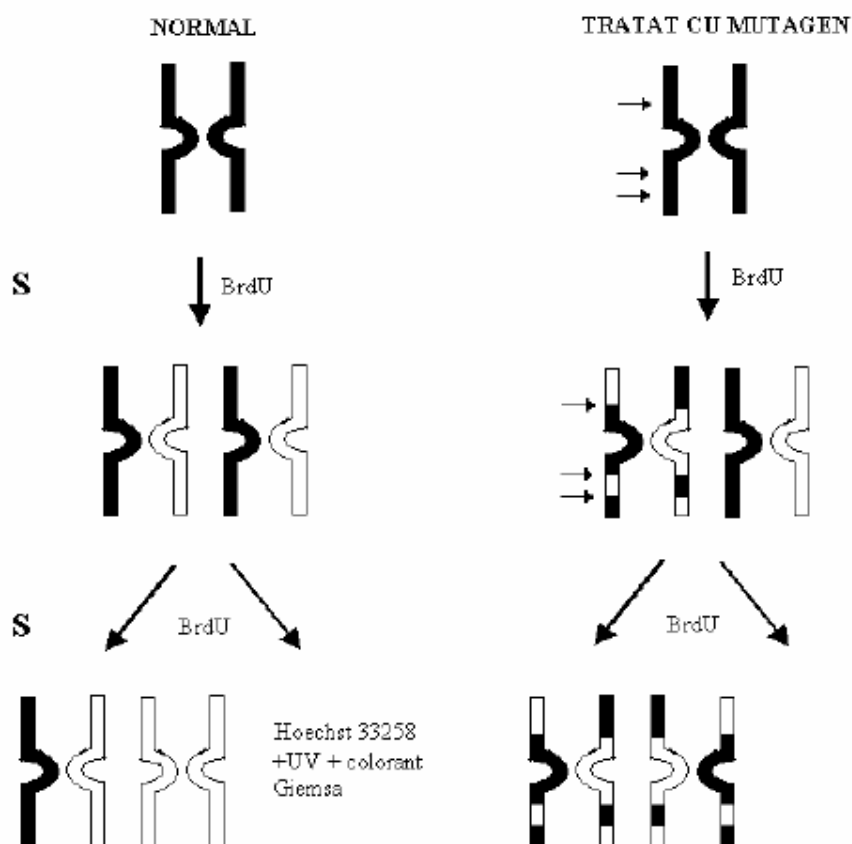


Figura 3.3. Colorarea diferită a cromatidelor surori după două cicluri celulare

3) *SOS Chromotest*

Acest test se bazează pe inducerea sistemului SOS, care are un rol important în răspunsul bacteriei *E.coli* la agenți genotoxici, el fiind un indicator precoce al lezării ADN-ului. În acest răspuns sunt implicate două gene: gena *lexA*, care codifică un represor pentru toate genele sistemului și gena *recA*, care codifică o proteină capabilă să scindeze represorul printr-un semnal activator SOS. Măsurarea inducerii sistemului SOS este posibilă în urma obținerii unei sușe bacteriene în care o altă genă, *lacZ*, care controlează sinteza β -galactozidazei, a fost plasată prin fuziune genică sub controlul operonului „*sfiA*” (o regiune a ADN-ului care reglează sinteza proteinei „*sfiA*”). Represorul *lexA* se scindează în celulele cu ADN lezionat, consecința fiind exprimarea operonului fuzionat (Fig.3.4.). Inducerea operonului „*sfiA*” se traduce prin producerea de β -galactozidază, măsurată colorimetric prin transformarea o-nitrofenil- β -D-galactozidei în o-nitrofenol de culoare galbenă.

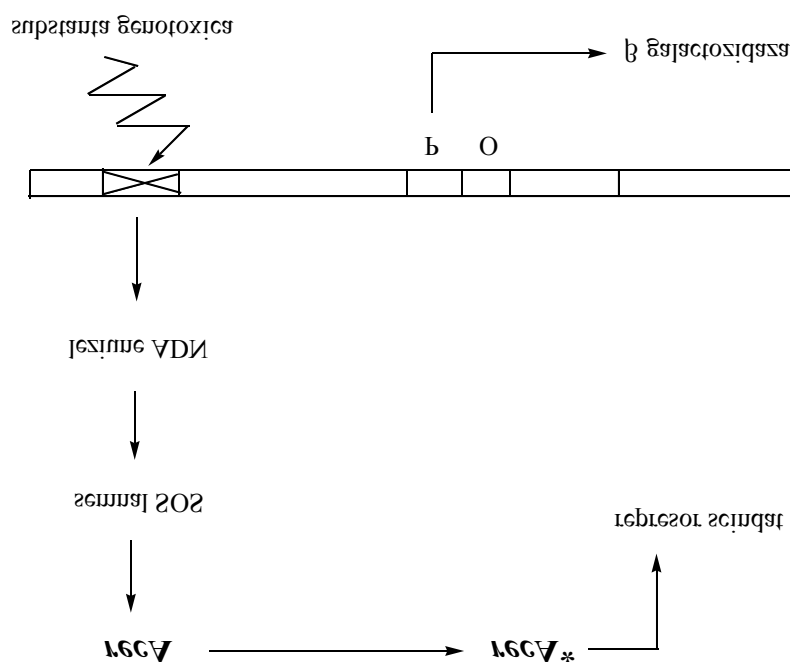


Fig.3.4. Principiul metodei SOS Chromotest

Nici unul din testele cunoscute nu prezintă fiabilitate totală, nefiind capabil să detecteze toate tipurile de mutații. De aceea, se preferă utilizarea mai multor teste din categorii diferite, care sunt grupate în **baterii de teste**. Testele de mutageneză sunt împărțite în 3 niveluri:

Nivelul unu

- 1) un test de mutație genică la Salmonella/ microzomi (Ames + activare)
- 2) un test de mutație genică pe celule de mamifere
- 3) un test care evidențiază rupturi cromozomiale pe celule de mamifere (testul micronucleilor)

Dacă toate testele sunt negative, se presupune absența potențialului mutagen la mamifere.

Nivelul doi: se realizează dacă este pozitiv un singur test din nivelul 1, cu ajutorul testului mutației letale la Drosophilla

Nivelul trei: pentru evaluarea aprofundată a compușilor care ridică semne de întrebare:

- Testul locusului specific (test de mutație genică la șoarece) pentru producții care posedă potențial mutagen pe celule germinale de mamifere
- Testul letalității dominante pentru producții cu efecte cromozomiale.

2.1.4. Studii de carcinogenitate

Deoarece sunt foarte lungi și costisitoare, iar interpretarea lor este dificilă, aceste studii se realizează atunci când:

- structura chimică a compusului sugerează un potențial cancerigen
- molecula ridică probleme datorită acumulării, mecanismului de acțiune toxică, rezultatelor pozitive în studiilor de genotoxicitate sau de toxicitate a reproducerii
- se presupune că molecula urmează a fi administrată o perioadă lungă de timp.

Animalele folosite sunt în general rozătoare (șoareci sau șobolani), care au avantajul de a avea dimensiuni reduse și o durată scurtă de viață, sau mai rar câini și primare. În alegerea speciei, o importanță deosebită o au viteza și modul de metabolizare, care trebuie să fie similare cu ceea ce se observă la om.

Nivelele de doze sunt 2 sau 3, iar în studiu se include și un lot martor. Numărul animalelor per lot este de 50/sex/doză.

Calea de administrare este cea prevăzută a fi utilizată la om.

Durata administrării este de minim 18 luni la șoareci și 24 de luni la șobolani.

Examenele efectuate sunt: clinice, verificarea apariției oricăror mase tisulare neobișnuite, a letalității, autopsie, examen microscopic al tuturor tumorilor.

În afară de testele de carcinogenitate pe termen lung, se mai poate apela la teste in vivo pe termen scurt, cum ar fi testele de mutagenză, testele de detectare a promotorilor sau testele de carcinogenitate localizată.

2.1.5. Studiile de toxicitate asupra reproducerii

Aceste studii se clasifică în:

- I. Studii de fertilitate la femele
- II. Studii de toxicitate a dezvoltării (embriotoxicitate, fetotoxicitate, teratogenitate)
- III. Studii peri-natale și post-natale.

Studiile de teratogeneză sunt printre cele mai importante și se realizează pe 2 specii animale, dintre care una trebuie să fie de ne-rozătoare. Animalele trebuie să fie adulte, tinere, gravide primipare, substanțele administrându-se în perioada organogenezei. Se observă:

- la femelele gravide, semnele de toxicitate, dar și numărul de corpi galbeni, numărul de implantări și numărul de resorbții;
- la fetuși (extrași chirurgical cu o zi înainte de naștere): numărul fetușilor vii și morți, sexul lor, greutatea și dimensiunile, anomaliile existente.

2.2. STUDIILE DE FARMACODINAMIE

Aceste studii urmăresc:

- determinarea dozei eficace
- determinarea duratei și a tipului de efecte farmacologice
- apariția eventualelor efecte secundare
- determinarea dozelor relative responsabile de efectul principal și de efectele secundare.

2.3. STUDIILE DE FARMACOCINETICĂ

Aceste studii furnizează informații cu privire la cantitatea exactă de medicament și/sau metaboliți care pot să ajungă la nivelul țintei biologice și permit optimizarea activității farmacologice, raționalizarea alegerii unei forme farmaceutice, adaptarea posologiei și a modului de utilizare.

B) Perioada clinică

În această perioadă se procedează la testarea clinică a viitorului medicament, urmărindu-se evaluarea corectă a raportului beneficiu / risc și verificarea eficienței sale prin creșterea supraviețuirii bolnavilor, scăderea incidenței evenimentelor morbide și ameliorarea calității vieții pacienților.

C) Perioada administrativă

În această perioadă se solicită autorizarea de punere pe piață, documentația necesară fiind reunită într-un Dosar care are un format standard european. Acesta trebuie să conțină totalitatea datelor fizico-chimice, farmaceutice, toxicologice, farmacologice, farmacocinetice și clinice, împreună cu un rezumat al dosarului în care se găsesc informații administrative și un rezumat al caracteristicilor

produsului. El este însoțit de 3 rapoarte de evaluare critică redactate de experți competenți: raportul de expertiză farmaceutică, raportul de expertiză farmacotoxicologică și raportul de expertiză clinică.

PARTEA EXPERIMENTALĂ

DETERMINAREA DOZEI MEDII LETALE A DNOC

Dinitro-orto-cresolul (DNOC) este un pesticid dinitrofenolic, cu absorbție orală și cutanată bună. Experimentul ce urmează a fi efectuat urmărește determinarea dozei sale medii letale la șoareci, după administrare intraperitoneală, care asigură o absorbție rapidă și deci o apariție rapidă a fenomenelor toxice.

În vederea determinării DL_{50} s-au stabilit, prin tatonări prealabile efectuate pe loturi de câte 2-4 șoareci, DL_0 și DL_{100} . DL_0 este doza cea mai mare la care apar fenomene toxice, fără a se constata decesul animalelor. DL_{100} , sau doza letală absolută, este doza cea mai mică ce determină decesul tuturor animalelor din lotul la care s-a administrat. În cazul DNOC, s-au determinat DL_0 ca fiind 0,2 mg/șoarece de 20 g, adică 10 mg/kg, iar DL_{100} egală cu 0,8 mg/șoarece a 20 g, adică 40 mg/kg.

Se alcătuiesc 7 loturi de câte 10 șoareci cu greutate medie de 20 g, fiecare lot fiind plasat într-o cușcă separată și fiind numerotat. Substanța va fi administrată i.p., sub formă de soluție apoasă, în doze în progresie aritmetică, cuprinse între DL_0 și DL_{100} , conform Tabelului 3.2.:

Tabelul 3.2. Dozele administrate și letalitățile corespunzătoare

Nr. lot	Doza (mg/kg)	Nr. animale în lot	Nr. animale moarte	Nr. animale vii	% Letalitate
1	10	10	0	10	0
2	15	10	1	9	10
3	20	10	2	8	20
4	25	10	4	6	40
5	30	10	6	4	60
6	35	10	9	1	90
7	40	10	10	0	100

După administrarea substanței, animalele vor fi urmărite sub aspectul manifestărilor clinice și al letalității, timp de 14 zile. Numărul animalelor morte din fiecare lot și procentele corespunzătoare de letalitate obținute într-un experiment anterior sunt prezentate în Tabelul 3.2.

Metode de calcul al DL_{50}

Calcularea dozei medii letale se poate face prin diferite metode. La ora actuală se folosesc în acest scop mai ales programele informatice și unele metode statistice, dar trecerea în revistă a primelor metode de calcul poate avea un interes educativ. Ele vor fi aplicate pe datele experimentale din Tabelul 3.2.

1. Metoda Trevan se bazează pe reprezentarea grafică a procentului de letalitate în funcție de doză. Curba obținută redă distribuția sensibilităților individuale față de substanța toxică (Fig. 3.5.). Prin extrapolare de pe curbă, din dreptul letalității de 50%, se obține valoarea DL_{50} .

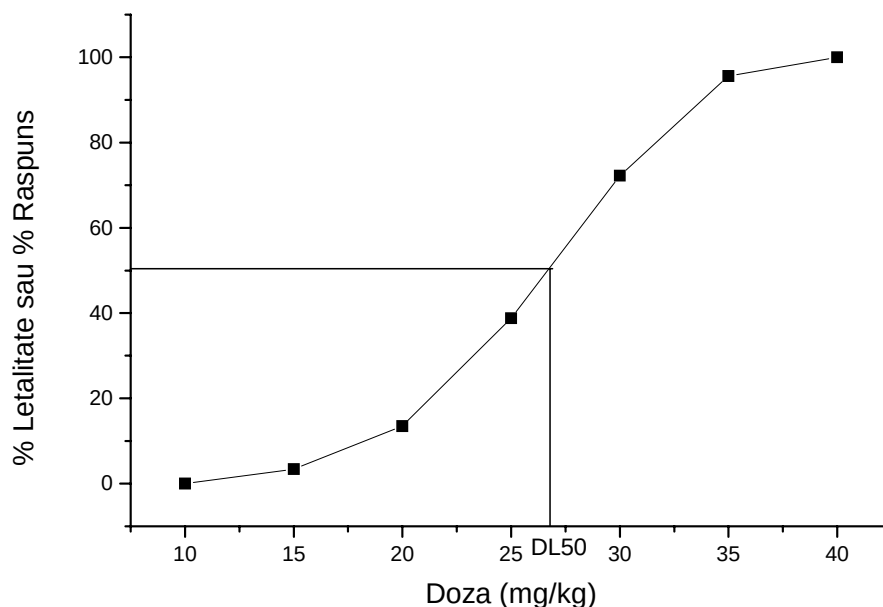


Fig. 3.5. Reprezentarea grafică a procentului de letalitate în funcție de doză

Doza medie letală extrapolată este de 27 mg/kg șoarece, după administrare i.p.

Metoda Trevan este o metodă foarte simplă, dar pentru a asigura exactitatea, numărul de animale pe care se efectuează experimentul trebuie să fie foarte mare.

2. Metoda integrării lui Behrens permite creșterea ipotetică, artificială, a numărului de animale luate în calcul, asigurând o determinare mai precisă a DL_{50} . Metoda se bazează pe ipoteza că, dacă un animal trăiește după administrarea unei doze oarecare (x), atunci el trăiește și după o doză mai mică (x-1), respectiv dacă un animal moare după o doză (x), el va muri și după o doză mai mare (x+1).

Pe baza datelor experimentale prezentate și respectând principiul integrării se vor calcula:

- *numărul ipotetic al animalelor din lot*, care este suma animalelor vii și moarte de la doza luată în calcul, la care se adaugă numărul animalelor vii la doze mai mari decât cea luată în calcul și numărul animalelor moarte la doze mai mici;
- *numărul ipotetic de animale moarte*, care este suma animalelor moarte la doza respectivă și a celor moarte la doze mai mici decât doza luată în calcul;
- *numărul ipotetic de animale vii*, care este suma animalelor vii la doza luată în calcul și a animalelor vii la doze mai mari decât aceasta.

Din aceste date ipotetice se calculează noile procente de letalitate (Tabel 3.3.), care se reprezintă grafic în funcție de doza administrată.

Tabel nr. 3.3. Numărul ipotetic de animale și procentele de letalitate în metoda Behrens

Nr lot	Doza (mg/kg)	Nr. animale moarte	Nr. animale vii	Nr. ipotetic animale în lot	Nr. ipotetic animale moarte	% Letalitate
1	10	0	10	38	0	0
2	15	1	9	29	1	3,4
3	20	2	8	22	3	13,5
4	25	4	6	18	7	38,8
5	30	6	4	18	13	72,2
6	35	9	1	23	22	95,6
7	40	10	0	32	32	100

Ca și în cazul metodei Trevan, valoarea DL_{50} se obține prin extrapolare pe curbă din dreptul letalității de 50%. Valoarea obținută este de 26 mg/kg.

Avantajul acestei metode constă, prin mărirea numărului de animale din loturi, în liniarizarea intervalului DL_{30} - DL_{70} , ceea ce permite calculul mai exact al rezultatelor.

3. Metoda Kärber aritmetică se bazează pe utilizarea unei formule de calcul și poate fi folosită atunci când dozele administrate sunt în progresie aritmetică:

$$DL_{50} = DL_{100} - [\Sigma (a \times b)] / n$$

unde :

a = diferența dintre două doze succesive

b = media animalelor moarte între două doze succesive

n = numărul animalelor din lot

4. Metoda Kärber logaritmică se poate aplica atunci când dozele administrate respectă o progresie geometrică. Formula de calcul folosită este:

$$\log DL_{50} = \log DL_{100} - \{ \Sigma[(p_1+p_2) d + (p_2+p_3) d + \dots + (p_6+p_7) d] \} / 2$$

unde:

$p_1, p_2 \dots p_7$ = raportul dintre numărul animalelor moarte și numărul total de animale din lot

d = diferența între logaritmiile dozelor luate în calcul

5. Metoda probit este încă mult utilizată și se bazează pe transformarea atât a probabilității răspunsului cumulativ, cât și a dozei. Atunci când doza este transformată în log doză (x), frecvența răspunsului față de „log dozei” urmează o distribuție normală gaussiană, dP , unde P este probabilitatea corespunzătoare fiecărei valori a lui x (Fig. 3.6.).

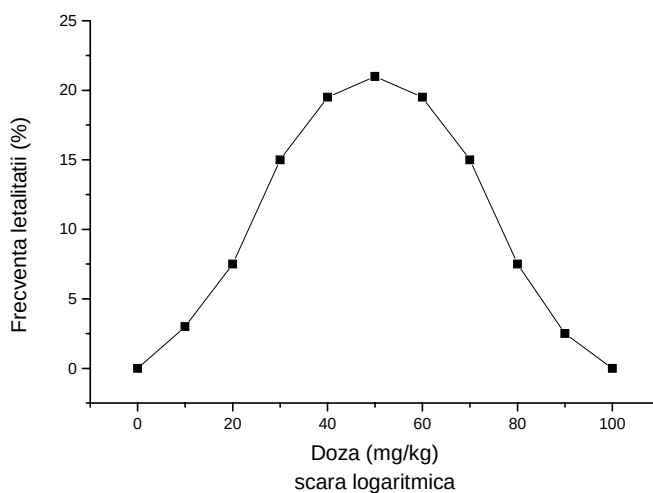


Fig.3.6. Distribuția răspunsului în funcție de doză, normalizată prin transformarea în log doză

Integrarea ecuației care este expresia matematică a acestei distribuții normale (dP) este reprezentată grafic printr-o curbă sigmoidă. Deoarece analiza unei sigmoide este mai dificilă decât cea a unei drepte, s-a încercat transformarea probabilității răspunsului, în așa fel încât relația între aceasta și log dozei să fie caracterizată de o funcție a unei drepte. Probabilitatea (P) este în mod normal exprimată sub formă de procente, sau prin valori cuprinse între 0 și 1. Gaddum a propus o măsurare a probabilității răspunsului pe o scală transformată, denumită

deviația echivalentă normală (DEN), sau deviația standard a distribuției normale, care poate fi descrisă matematic printr-o ecuație. În acest caz, probabilitatea este definită printr-o valoare de pe axa y, relația fiind ilustrată în Fig. 3.7.

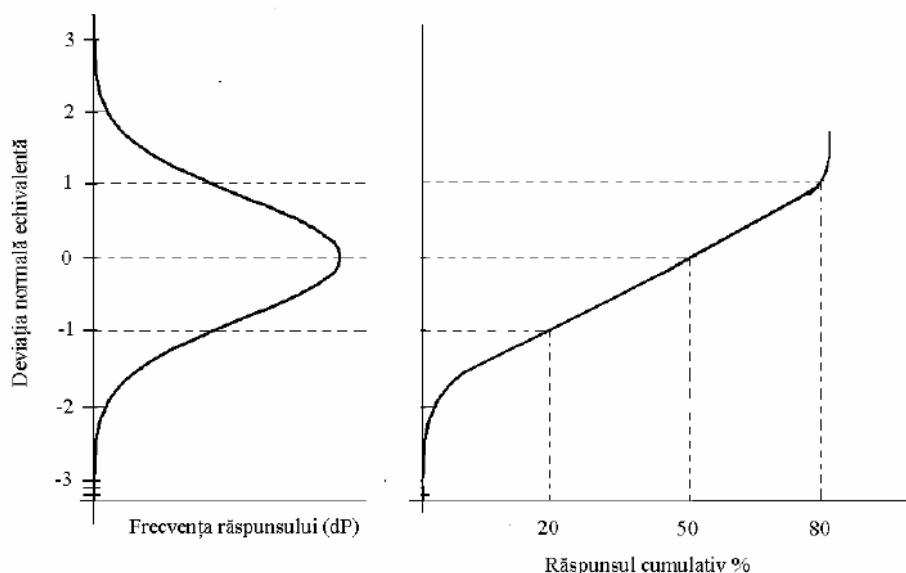


Figura 3.7. Probabilitatea răspunsului exprimată ca procent din populație sau ca deviația normală echivalentă de la o distribuție normală ($\mu = 0$, $\sigma = 1$)

Atunci când se reprezintă grafic x (log dozei) față de y, se obține o dreaptă. Pentru a facilita calculele, Bliss a sugerat utilizarea unei unități DEN diferite, denumită probit, a cărei valoare este:

$$\text{probit} = [(x - \mu) / \sigma] + 5$$

unde:

x = log doză

μ = deviația medie a log dozei

σ = deviația standard a log dozei

Acest procedeu are rolul de a elimina valorile negative ale DEN atunci când valorile P sunt mai mici de 50%, deci probitul este egal cu DEN + 5. Probitul 5 corespunde unei probabilități a răspunsului de 50%, deci log dozei medii letale.

Bliss și Gaddum au întocmit tabele (vezi Anexa IV), din care, pe baza procentului de letalitate, se pot afla direct probiții corespunzători.

Pentru determinarea practică a DL_{50} se calculează logaritmiile dozelor administrate și probiții corespunzători procentelor de letalitate (Tabel 3.4.).

Se reprezintă grafic valoarea probiților în funcție de log dozei (Fig. 3.8.) și $\log DL_{50}$ se determină fie grafic, fie de preferință din ecuația dreptei. Prin antilogaritmare se calculează DL_{50} .

Tabel nr. 3.4. Logaritmiile dozelor și probiții corespunzătoare procentelor de letalitate în experimentul pentru determinarea DL_{50} a DNOC-ului

Nr. lot	Doza (mg/kg)	Log doza	% Letalitate	Unități probit
1	10	1	0	-
2	15	1,17609	10	3.7184
3	20	1,30102	20	4.1584
4	25	1,39794	40	4.7467
5	30	1,47712	60	5.2533
6	35	1,54406	90	6.2816
7	40	1,60205	100	-

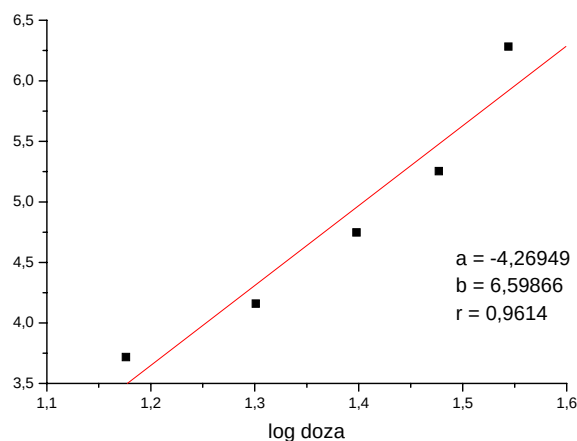


Figura 3.8. Reprezentarea grafică a unităților probit în funcție de log dozei

Din ecuația dreptei: $y = a + bx$ se calculează, pentru probitul 5, care corespunde unei letalități de 50%, „x”, adică $\log DL_{50}$:

$5 = -4,26949 + 6,59866 x$, de unde $x = 1,40475$. Prin antilogaritmare se obține $DL_{50} = 25,39 \text{ mg/kg}$.

Extrapolarea dozelor de la animal la om

Determinarea dozei medii letale se realizează exclusiv pe animale de experiență, dar este evident faptul că ne interesează să cunoaștem gradul de toxicitate al substanțelor la om. Pentru aceasta este necesară extrapolarea rezultatelor experimentale la om, lucru care este dificil de realizat, mai ales dacă în studiile pe animale de experiență s-au observat diferențe importante între specii.

Extrapolarea se realizează utilizând așa numiți *factori de securitate*, iar în cazul substanțelor cu potențial cancerigen, pe baza unor modele matematice. Astfel, convențional se apreciază că DL_{50} pentru un câine de 20-25 kg este o doză letală pentru un om de 60-70 kg. Deoarece se consideră că omul este în general de 8-10 ori mai sensibil decât șobolanul, dozele obținute în experimentul pe animal pot fi extrapolate pe baza greutății corporale:

$$DL_{50} / \text{kg om} = (DL_{50} / \text{kg șobolan}) / 10$$

sau

$$DL_{50} / \text{om} = (DL_{50} / \text{kg șobolan} \times 70) / 10.$$

TESTAREA MUTAGENITĂȚII SUBSTANȚELOR PRIN TESTUL MICRONUCLEILOR

Materiale necesare:

- Șoareci albi
- Ciclofosfamidă, soluție injectabilă
- Tampon fosfat salin pH=7,4
- Ser fetal de vițel
- Sticle de ceas
- Seringi și ace
- Eprubete de centrifugă
- Lame de microscop
- Pipete Pasteur
- Bac pentru colorarea lamelor
- Reactiv May-Grünwald
- Reactiv Giemsa
- Ulei de cedru
- Microscop cu obiectiv cu imersie

Prepararea tamponului fosfat salin:

- Soluția A : $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,2 M (2,67 g fosfat monobazic se dizolvă în 100 ml H_2O)
- Soluția B : $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 M (5,36 g fosfat disodic se dizolvă în 100 ml H_2O).

Se amestecă 19 ml soluție A cu 81 ml soluție B și se adaugă clorură de sodiu până la o concentrație de 0,9%.

Tehnica de lucru:

Se administrează intramuscular, unor loturi de câte doi șoareci albi, rasa Swiss albino:

- substanța de testat, în doză de 1/10 din DL_{50} ;
- ciclofosfamidă, în doze de 200 mg/kg și 500 mg/kg (martori pozitivi)
- apă distilată injectabilă sterilă în același volum (martori negativi)

După 24 h se sacrifică șoarecii prin dislocare de coloană cervicală și se recoltează măduva hematogenă din oasele femurale. Aceasta se realizează cu ajutorul unei seringi ce conține 10 ml /șoarece mediu de cultură (tampon fosfat salin cu 20% ser fetal de vițel).

Se suspendă celulele prin amestecare pe o sticlă de ceas și se centrifughează 10 minute la 1500 rpm. Din peletul obținut în urma centrifugării, se etalează pe o lamă de microscop o picătură și se uscă la aer. Se prepară câte două lame pentru fiecare șoarece.

Lamele astfel obținute se colorează cu Reactiv May-Grünwald aproximativ 3 minute, se spală cu apă distilată 1 minut, apoi se colorează 10-15 minute cu Reactiv Giemsa (dilat 1:3), și se spală din nou cu apă distilată.

Pe fiecare lamă se numără 2000 de eritroblaști policromatofili și se identifică celulele care conțin micronuclei, exprimându-se procentual frecvența lor. Sunt considerate micronuclei doar formațiunile cu formă regulată, cu un diametru mai mic de 1/3 din cel al nucleului principal, cu aceeași intensitate de culoare ca și acesta și plasate la o distanță mai mică decât diametrul acestuia. Între micronuclei și nucleul principal trebuie să existe un spațiu de separare.

Interpretarea rezultatelor:

Frecvența apariției eritroblaștilor ce conțin micronuclei este comparată cu valorile determinate la martorii pozitivi și la martorii negativi. În general, se consideră că prezența micronucleilor la mai mult de 1% din eritroblaștii policromatofili indică un potențial genotoxic al substanței.

Capitolul 4
ANALIZA UNOR SUBSTANȚE TOXICE
FIȘA DE LUCRU

4.1. IDENTIFICAREA UNOR SUBSTANȚE TOXICE PRIN METODE CHIMICE

IDENTIFICAREA ALCOOLULUI METILIC

Alcoolul metilic se izolează din aer prin captare în apă distilată, iar din medii biologice prin distilare, cu captarea distilatului în apă distilată.

Pentru identificare, 2 ml soluție de analizat se tratează cu 1 ml acid fosforic 25% și 0,5 ml permanganat de potasiu 2%. După 10 minute se decolorează excesul de permanganat cu sulfid de sodiu soluție saturată (evitând excesul). Formaldehida formată se poate identifica cu:

- R. Schiff;
- Acid cromotropic 1% în acid sulfuric concentrat;
- Acetilacetona sau codeină (vezi reacțiile de identificare de la formaldehidă).

În aceste condiții, etanolul nu interferează în reacțiile de mai sus.

Observații: în cazul prezenței concomitente a formaldehidei, se procedează în felul următor: 10 ml soluție de analizat se tratează cu 5 ml azotat de argint 10% și 5 ml hidroxid de sodiu 30%. Se încălzește amestecul sub refrigerent ascendent timp de 30 minute, apoi se distilă. În aceste condiții va distila metanolul. Formaldehida reduce azotatul de argint formând oglinda de argint, iar acidul formic nu distilă.

Reacții de esterificare:

- 1 ml probă se tratează cu 0,1 g acid salicilic și 1 ml acid sulfuric concentrat; la încălzire se degajă miros de salicilat de metil.
- 2 ml distilat se tratează cu 2-3 picături de clorură de benzil sau cu câteva cristale de acid benzoic și 0,5 ml acid sulfuric concentrat. Se neutralizează cu hidroxid de sodiu 20%; în prezența alcoolului metilic se degajă un miros specific de benzoat de metil.

Identificarea din sânge: 2 ml sânge se tratează cu 2 ml acid tricloracetic 20%, apoi se centrifughează. Peste 1 ml supernatant se adaugă 0,2 ml permanganat de potasiu 1% și 0,1 ml acid fosforic 85%, se agită timp de 1 minut, se reduce excesul de permanganat cu câteva cristale de bisulfid de sodiu. Se adaugă 1 ml acid cromotropic 1% în acid sulfuric concentrat și apoi cu precauție 1,5 ml de acid

sulfuric concentrat. La zona de contact a lichidelor apare un inel colorat în violet, iar la agitare colorația difuzează. În absența alcoolului metilic se formează o colorație brun-deschis.

IDENTIFICAREA ALCOOLULUI ETILIC

Alcoolul etilic se izolează din aer prin captare în apă distilată, iar din medii biologice prin distilare, distilatul captându-se în apă distilată.

- 2 ml distilat se tratează cu 0,5 ml acid sulfuric concentrat și 0,5 ml soluție saturată de acetat de sodiu. Se încălzește la fierbere. În prezența alcoolului etilic se degajă un miros caracteristic de acetat de etil.
- 2 ml distilat se alcalinizează cu carbonat de sodiu 10% sau cu hidroxid de potasiu 10%; se încălzește la cca 40°C, apoi se adaugă în picături soluție Lugol, până la obținerea unei colorații galben-brună. Excesul de iod se decolorează cu câteva picături de hidroxid de potasiu 10%. În prezența etanolului se formează iodoform cu miros caracteristic (la concentrații mari apare chiar precipitat galben).

Observații:

- Reacția este pozitivă și pentru acetonă și metiletilcetonă.
- Pentru a diferenția acetona de etanol, se înlocuiește în reacția de mai sus hidroxidul de potasiu 10% cu amoniac concentrat. În cazul etanolului și al acetaldehidei apare un precipitat cenușiu-negru, iar acetona în aceste condiții formează iodoform.
- Peste 2 ml probă se adaugă o granulă de hidroxid de potasiu și 2-3 picături sulfură de carbon; se formează xantogenat de potasiu. Se acidulează cu acid acetic 1%, se adaugă apoi 2-3 picături acetat de cupru 5%; apare un precipitat negru de xantogenat cupric, care trece în xantogenat cupros de culoare galbenă-cărămizie.
- 2 ml probă se tratează cu câteva picături de bicromat de potasiu 5% și 1 ml acid sulfuric concentrat; se obține o colorație verde datorită sulfatului de crom (III), iar etanolul, în funcție de condițiile de reacție, se oxidează la acetaldehidă sau la acid acetic. Reacția nu este specifică, fiind dată de toți alcoolii, precum și de alte substanțe organice și substanțe reducătoare.

IDENTIFICAREA FORMALDEHIDEI

Formaldehida se izolează din aer prin captare în apă distilată, iar din medii biologice prin distilare sau antrenare cu vapori de apă.

- Având caracter reducător, formaldehida reduce reactivul Tollens, reactivul Fehling, reactivul Nessler.
- La 1-2 ml distilat se adaugă 1-2 picături de fenol 1% (sau rezorcină) și 1 ml acid sulfuric concentrat; la zona de contact apare un inel roșu.
- La 1 ml distilat se adaugă 1 ml hidroxid de sodiu 30% și câteva cristale de rezorcină; prin încălzire și fierbere apare o colorație galbenă, care trece în roșu.
- La 1 ml distilat se adaugă 3 ml acid sulfuric concentrat și câteva cristale de morfină, codeină sau alți alcaloizi; apare o colorație roșie-violetă sau albastră-violetă (reacția Marquis).
- Peste 1-2 ml distilat se adaugă 2 ml soluție proaspăt preparată de fenilhidrazină 1%, 2 ml acid clorhidric concentrat și 1 ml hexacianoferrat (III) de potasiu 2,5%. În prezența formaldehidei apare o colorație roșie. Reacția nu este specifică.
- La 2 ml distilat se adaugă 1 ml reactiv Schiff; în prezența formaldehidei apare o colorație roșie-violetă. Prin adăugare de acid clorhidric, culoarea datorată altor aldehide dispare, iar cea datorată formaldehidei se intensifică spre albastru-violet. Reacția este foarte sensibilă ($0,2 \mu\text{g} / \text{ml}$), dar nu este specifică.
- La 1-2 ml distilat se adaugă 2 ml reactiv acid cromotropic (acid 1,8-dihidroxi-naftalen-3,6-disulfonic) 1% în acid sulfuric concentrat și se menține 15 minute în baia de apă în fierbere; în prezența formaldehidei se obține o colorație violetă.
- 1 ml distilat se tratează cu 2 ml reactiv acetilacetonă și se menține 5 minute în baia de apă în fierbere; în prezența formaldehidei se obține o colorație galbenă. Reacția este foarte sensibilă și specifică.

IDENTIFICAREA ACETONEI

Acetona se izolează din aer prin captare în apă distilată, iar din medii biologice prin distilare sau antrenare cu vapori de apă, după deproteinizare cu wolframat de sodiu 10% și acidulare cu acid sulfuric 2N.

- La 2 ml distilat se adaugă câteva picături de hidroxid de sodiu 10% și se încălzește ușor până la 30°C , apoi se adaugă în picături soluție de iod-iodură, până când soluția rămâne de culoare galben-brună; în prezența acetonei, la încălzire se formează iodoform cu miros caracteristic. Reacția este pozitivă și pentru alcoolul etilic, dar este împiedicată de amoniac.

- La 2 ml distilat se adaugă 2 ml soluție saturată de o-nitrobenzaldehydă și câteva picături de hidroxid de sodiu 30%; apare o colorație galbenă, care trece în verde și după 10-20 minute în indigo.
- La 2 ml distilat se adaugă 2 granule de hidroxid de potasiu și, după dizolvare, 8-10 picături soluție alcoolică de aldehydă salicilică 10%; apare o colorație galben-portocalie care, la încălzire în baie de apă la 60°C, trece în roșu-portocaliu, datorită formării dihidroxidibenzalacetonei (Reacția Frommer).
- La 2-3 ml distilat se adaugă 1 ml Reactiv Imbert. După agitare, se toarnă cu grijă 1 ml amoniac concentrat; în prezența acetonei, la linia de contact se obține un inel violet.
- 1-2 ml distilat se alcalinizează cu hidroxid de sodiu 10% și se adaugă câteva picături de furfural. În prezența acetonei se formează difurfuriliden-acetona, care cu acidul sulfuric dă o colorație violetă.

IDENTIFICAREA FENOLULUI

Fenolul se izolează din aer prin reținere în soluții alcaline (hidroxid de sodiu 0,1 N), iar din medii biologice prin distilare, după o prealabilă hidroliză acidă a metaboliților conjugați. Distilatul se captează în mediu alcalin.

- La 2-3 ml distilat se adaugă câteva picături soluție de clorură ferică 1%; în prezența fenolului, apare o colorație albastră-violetă datorită formării compusului: $C_6H_5OFe^{3+}$. Colorația dispăre la adăugare de acizi minerali, alcool sau glicerină.
- La 2 ml distilat se adaugă câteva picături apă de brom; în prezența fenolului se formează un precipitat alb-gălbui de tribromfenol. Sensibilitatea reacției este de 10 μg/ml. Reacția nu este specifică.
- Tratând 1 ml distilat cu 0,5 ml Reactiv Libermann se obține o colorație roșie-brună, care trece în verde și apoi în albastru datorită formării unor coloranți din clasa indofenolilor.
- La câțiva ml distilat alcalinizat cu amoniac, se adaugă 2-3 picături hipoclorit 10%; se obține, la o ușoară încălzire, o colorație albastră sau verde (în funcție de concentrație) datorită formării clor-iminohinonei (reacția Salkowski-Berthelot). Reacția nu este specifică.
- Dacă amoniacul din reacția precedentă se înlocuiește cu soluție apoasă de anilină 1%, se obține o colorație albastră (se formează indofenol), care la adăugare de acid virează în roșu, iar prin alcalinizare redevine albastră. În absența fenolului, apare o colorație violetă prin oxidarea anilinei (reacția moveinei).

- La câțiva ml distilat se adaugă cu grijă pe pereții eprubetei 2 ml acid sulfuric concentrat și apoi câteva picături de formol; se formează un inel de culoare roșie.
- La 1-2 ml distilat se adaugă câteva picături R. Millon. După 10-15 minute apare o colorație roz-roșie. Prin încălzire pe baie de apă și adăugare de acid azotic, culoarea apare imediat. Sensibilitatea reacției este de 10 $\mu\text{g/ml}$. Reacția este dată și de: crezoli, acid salicilic, tirozina, anilina, acid p-hidroxibenzoic, etc.
- La câțiva ml distilat se adaugă 1 ml reactiv clorură de p-nitrobenzendiazoni. Se alcalinizează apoi cu hidroxid de sodiu 1 N sau carbonat de sodiu 10%. În prezența fenolului va apare o colorație roșie. Sensibilitatea reacției este de 1 $\mu\text{g/ml}$. Reacția nu este specifică, fiind dată de toți fenolii nesubstituiți în para.
- La 1-2 ml distilat se adaugă 1-2 ml tampon borat sau fosfat (pH=10) și apoi 1 ml R. Gibbs (2,6-dibrom-chinon-4-clorimidă 0,1%, în alcool etilic absolut). Se formează o colorație albastră extractibilă în alcool amilic. Sensibilitatea reacției este de 0,2 $\mu\text{g/ml}$. Reacția nu este specifică.
- 1-2 ml distilat se alcalinizează cu carbonat de sodiu 10%, apoi se tratează cu 1ml soluție de 4-aminoantipirină 2% și 0,5 ml soluție hexacianoferat (III) de potasiu 5%; în prezența fenolului apare o colorație roșie.

IDENTIFICAREA ANILINEI

Anilina se izolează din aer prin captare în soluții de acid sulfuric sau acid clorhidric. Din medii biologice se izolează prin distilare sau antrenare cu vapori de apă, după o prealabilă alcalinizare la pH 8-9.

- 1 ml distilat se tratează cu câteva picături de apă de brom; în prezența anilinei se obține tribromanilina, precipitat de culoare roz. Sensibilitatea reacției este de 70 $\mu\text{g/ml}$.
- 1 ml distilat se tratează cu 1 ml soluție de fenol 1%, 0,5 ml hipoclorit de sodiu 10% și 1 ml hidroxid de sodiu 1%. În prezența anilinei se formează fenilchinonimină (indofenol) de culoare albastră. În mediu acid, culoarea virează în roșu (reacția Jacquemin). Dacă se extrage cu eter etilic, stratul de solvent se colorează în roșu.
- 1 ml distilat se tratează cu 0,5 ml soluție de hidroxid de potasiu 10% în etanol și 2-3 picături de cloroform; se fierbe câteva minute. În prezența anilinei se formează fenilcarbilamină (izonitril) cu miros caracteristic (reacția Hoffman).
- 1 ml distilat se tratează cu 2 ml hipoclorit de sodiu. În prezența anilinei apare o colorație albastru-violet, care în exces de reactiv trece în roșu murdar. Dacă se

extrage cu eter etilic, stratul de solvent se colorează în roșu (reacția moveinei). Sulfura de amoniu sau hipocloritul de calciu măresc sensibilitatea reacției.

- 2 ml distilat se tratează cu 0,5 ml acid sulfuric concentrat și 2 picături de bicromat de potasiu 5%. În prezența anilinei apare o colorație albastră la concentrații mici și brun-neagră la concentrații mari.
- 1 ml distilat se tratează cu 1 ml formaldehidă; în prezența anilinei se formează un precipitat alb.
- 2 ml distilat se tratează cu 1 ml acid sulfuric 4 N, 0,1 ml nitrit de sodiu 1 ‰ și 1 ml soluție saturată de β -naftol în amoniac. Dependent de concentrație, apare o colorație sau un precipitat roșu. Pentru cuplare se pot folosi și amine aromatice. Sensibilitatea reacției este de 5 μg / ml.

IDENTIFICAREA ACIDULUI CIANHIDRIC

Acidul cianhidric se izolează din aer prin captare în soluții alcaline, iar din medii biologice prin distilare din mediu acid și captarea distilatului în soluții alcaline.

- 2 ml distilat se tratează cu o picătură de fenolftaleină 1% în etanol și cu acid sulfuric 10%, picătură cu picătură, până la dispariția culorii roșii, apoi se alcalinizează cu soluție de borat de sodiu 2% până la virajul în roz al fenolftaleinei. Se adaugă 5-6 picături sulfat de fier (II) 2%; dacă colorația roz dispare, se mai adaugă borax. Se agită 1-2 minute, se adaugă câteva picături sulfat de fier (III) 1% și se acidulează cu 1 ml acid clorhidric 10%. Reacția este specifică, sensibilitatea reacției fiind de 10 μg /ml.
- 2 ml distilat se tratează cu 5-10 picături polisulfură de amoniu 10%, se fierbe 2 minute (se formează sulfocianură de amoniu); după răcire se acidulează cu acid clorhidric 10%, eventual se filtrează sulful coloidal format. Filtratul tratat cu câteva picături clorură de fier (III) 1% (proaspăt preparată) dă o colorație roșu-sânge datorită formării tiocianatului de fier (III). Reacția este specifică, sensibilitatea reacției fiind de 2 μg /ml.
- 1 ml probă se tratează cu câteva picături azotat de argint 1%; se formează un precipitat alb, insolubil în acid azotic, solubil în cianură alcalină. Dacă se adaugă exces de azotat de argint, se formează un precipitat alb de dicianoargentat (I) de argint.
- 1 ml distilat se tratează cu 5 picături azotat de plumb 2%; în prezența acidului cianhidric se formează un precipitat alb de cianură de plumb, insolubil în exces de cianură alcalină.

- 2,5 ml distilat se tratează cu 1 ml acid picric 1% și se încălzește pe baie de apă, 10 minute la 70-80°C. În prezența acidului cianhidric, în mediu alcalin, se formează izopurpuratul de sodiu, de culoare roșie. Reacția este specifică, sensibilitatea reacției fiind de 1 $\mu\text{g CN}^-/\text{ml}$, dar se desfășoară lent.

IDENTIFICAREA ARSENULUI

Izolarea arsenului din medii biologice se face prin mineralizare.

- 1-2 ml soluție obținută după mineralizare, se tratează cu hidrogen sulfurat în mediu puternic acid. Se formează un precipitat galben de As_2S_3 sau As_2S_5 , în funcție de condițiile de lucru. Sensibilitatea reacției este de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$.
- 1-2 ml soluție care conține ioni AsO_4^{3-} se tratează cu 0,5 ml soluție molidat de amoniu 1% în acid sulfuric 3 N și 1 ml acid azotic concentrat. La încălzire apare o colorație galbenă sau un precipitat galben (la cantități mari de arsen) de arsenomolidat de amoniu. Dacă se adaugă câteva picături de sulfat de hidrazină 0,5% (sau acid ascorbic 1%), va apare o colorație albastră, datorită formării albastrului de molibden. Sensibilitatea reacției este de 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Pentru identificarea prin această reacție a compușilor arsenului în stare de oxidare inferioară, este necesară oxidarea prealabilă (cu apă de brom) la As^{5+} .
- Reacția Bettendorf: 1-2 ml probă se tratează cu 1 ml clorură de staniu (II) 10% în acid clorhidric concentrat. În prezența ionilor de As^{3+} și As^{5+} , va apare o colorație sau un precipitat negru-brun de arsen elementar. Sensibilitatea reacției este de 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$.
- Reacția Bougault: 1-2 ml probă se tratează cu 2 ml reactiv hipofosforos și se ține 20 minute în baia de apă la fierbere. În prezența ionilor de As^{3+} și As^{5+} (formați în mediu puternic acid) va apare o colorație sau un precipitat negru-brun de arsen metalic. Reacția este catalizată de urme de iod.
- Reacția Gutzeit: într-o eprubetă se introduc 1-2 ml soluție de analizat, 2-3 ml acid clorhidric concentrat și câteva granule de zinc; eprubeta se astupă imediat cu un dop de vată îmbibată în prealabil cu o soluție de acetat de plumb și uscată, pentru reținerea hidrogenului sulfurat. Deasupra se așează o hârtie de filtru pe care se pun câteva cristale de azotat de argint. În prezența hidrogenului arseniat degajat, cristalele se colorează în galben-verzui, iar la umectare cu apă, pata se înnegrește. Sensibilitatea reacției este de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$.
- Reacția Cribier: se procedează ca și la Reacția Gutzeit, dar se aplică deasupra dopului de vată o hârtie impregnată cu o soluție de clorură de mercur 5% (uscată în prealabil); se formează colorații galben până la negru, în funcție de raportul

dintre reactanți. Sensibilitatea reacției este de 1 $\mu\text{g/ml}$; ea poate fi mărită prin umectarea hârtiei cu o soluție de iodură de potasiu 10%.

Reacțiile Gutzeit și Cribier nu sunt specifice, putând interfera hidrogenul sulfurat, hidrogenul stibiat și hidrogenul fosforat.

IDENTIFICAREA CADMIULUI

- Soluția care conține ioni de Cd (II), în mediu puternic acid și la tratare cu hidrogen sulfurat, formează sulfură de cadmiu, un precipitat galben cristalin. Sensibilitatea reacției este de 5 $\mu\text{g/ml}$.
- 1-2 ml soluție de analizat, la tratare cu 1-2 ml soluție 8-hidroxichinolină 1,5% în acid acetic, formează în mediu slab acid, neutru sau slab alcalin, un precipitat galben-portocaliu de oxinat de cadmiu.
- Soluția care conține ioni de Cd (II), la tratare cu câteva picături de reactiv format dintr-un amestec în părți egale de iodură de potasiu 10% și sulfat de chinină 2%, formează un precipitat alb-gălbui de iodocadmiat de chinină.
- Soluția care conține ioni de Cd (II), în mediu neutru sau tamponat cu acetat, dacă cu câteva picături de soluție de difenilcarbazidă 3% în alcool etilic, o colorație roșie-violetă. Sensibilitatea reacției este de 10 $\mu\text{g/ml}$. Sensibilitatea crește dacă reacția se execută pe hârtie de filtru, după următoarea tehnică: hârtia de filtru umectată cu soluția de reactiv se usucă, apoi se adaugă 1-2 picături din soluția de analizat și se ține în vapori de amoniac. Va apare o pată intens colorată în violet. Sensibilitatea reacției este de 0,8-1 $\mu\text{g/ml}$.
- O reacție asemănătoare cu cea precedentă se poate efectua prin impregnarea hârtiei de filtru cu reactivul p-nitrofenilcarbazidă 0,1% în alcool etilic. Se obține o colorație albastră-violetă. Sensibilitatea reacției este de 1 $\mu\text{g/ml}$.

IDENTIFICAREA MERCURULUI

- 1-2 ml soluție de analizat (obținută după mineralizare), la tratare cu soluție de iodură de potasiu 1%, formează un precipitat roșu-portocaliu de iodură de mercur (II), solubil în exces de reactiv, cu formarea complexului anionic $[\text{HgI}_4]^{2-}$, incolor.
- În 3-4 ml soluție de analizat, acidulată cu acid clorhidric, se introduce o spirală de cupru, lăsându-se în repaus 2 ore. Se scoate, se spală succesiv cu apă distilată, alcool, eter, se usucă și se introduce într-o eprubetă uscată împreună cu un cristal de iod. Partea superioară a eprubetei se răcește cu un manșon umezit. Eprubeta se încălzește lent la flacără mică; mercurul și iodul sublimă, iar iodura de mercur (II) rezultată se depune pe pereții reci ai eprubetei sub forma unui depozit roșu-portocaliu.
- Spirala de cupru amalgamată, spălată și uscată ca mai sus, se introduce în soluție de iod-iodură, lăsându-se în contact 1-2 ore. La adăugare de reactiv Polajaeve, în prezența mercurului se formează un precipitat roșu-cărămiziu. [Reactivul Polajaeve este preparat dintr-un amestec de sulfat de cupru 10%, sulfid de sodiu soluție saturată, bicarbonat de sodiu 8%, în proporție (1:2:1,5)].
- 2-3 ml soluție de analizat se tratează cu câteva picături soluție proaspătă de clorură de staniu (II) 2%. În prezența Hg (II) apare la început un precipitat alb de clorură de mercur (I), care devine cenușiu-negru prin separarea mercurului metalic.
- 1-2 ml probă se tratează cu câteva picături reactiv Cheramy; se formează un precipitat alb-gălbui. Sensibilitatea reacției este de 1 $\mu\text{g/ml}$.
- 1-2 ml probă se tratează cu câteva picături reactiv Cazaneuve. Se obține o colorație albastră-violetă, prin formarea unei combinații complexe. Sensibilitatea reacției este de 0,5 $\mu\text{g/ml}$.

IDENTIFICAREA PLUMBULUI

- 1-2 ml soluție obținută după mineralizare, prin tratare cu hidrogen sulfurat sau sulfură de sodiu, formează în prezența ionilor Pb (II), un precipitat negru de sulfură de plumb, solubil în acid azotic la cald. Sensibilitatea reacției este de 2 $\mu\text{g/ml}$.

- 2 ml probă se tratează cu 1-2 picături soluție de bicromat de potasiu 10%. În prezența ionilor de Pb (II) se formează un precipitat galben de cromat de plumb, insolubil în acid acetic, solubil în acid azotic și hidroxid de potasiu. Sensibilitatea reacției este de 10 µg/ml.
- 2 ml probă se tratează cu câteva picături soluție de iodură de potasiu 10%; ionii de Pb (II) precipită sub formă de iodură de plumb galbenă, solubilă în exces de reactiv. Iodura de plumb este solubilă în apă la fierbere, iar la răcire se depun cristale sub formă de paiete galbene strălucitoare, care privite la microscop se prezintă sub formă de plăcuțe hexagonale sau stelute. Sensibilitatea reacției este de 0,3 mg/ml.
- 1-2 ml probă se tratează cu 1-2 ml soluție sulfat de sodiu 10%; în prezența ionilor de Pb (II) se formează un precipitat alb cristalin de sulfat de plumb. Sensibilitatea reacției este de 0,5 µg/ml.
- 1-2 ml probă acidulată cu acid clorhidric 10% sau acid azotic 10%, tratată cu 2-3 picături iodură de potasiu 40% și 2-3 picături soluție de cocaină 4%, formează un precipitat alb-gălbui de iodo-plumbat de cocaină. Sensibilitatea reacției este de 1 µg/ml.
- Ionii de plumb formează cu rodizonatul de sodiu 1% o colorație brun-violetă. Sensibilitatea reacției este de 0,1 µg/ml. Reacția nu este specifică; interferează ionii de Ba(II), Sr(II).
- Pe o bucată de hârtie de filtru se pun 2-3 picături de apă oxigenată 3%, se adaugă câte 3 picături soluție care conține ioni Pb (II) și 3 picături de amoniac. Hidroxidul de plumb care se formează este oxidat de către apa oxigenată la PbO₂ brun. Excesul de apă oxigenată se distruge ținând hârtia de filtru câteva minute în vapori de apă. Se adaugă apoi o picătură dintr-o soluție de benzidină 2% în acid acetic glacial, când apare o colorație albastră, datorită oxidării acesteia la difenilchinondiimină, care cu o moleculă de benzidină formează un compus de adiție cunoscut sub numele de albastru de benzidină. Sensibilitatea reacției este de 1,5 µg/ml.

IDENTIFICAREA DINITRO-O-CREZOLULUI

Reacții preliminare:

- 5 ml urină se tratează cu 1 ml acid clorhidric concentrat, se adaugă puțin zinc pulbere și se încălzește 5 minute într-o baie de apă în fierbere. După răcire se filtrează. Se adaugă 2-3 picături soluție sulfat de ceriu (IV) 0,002 N în acid sulfuric 5%. În prezența DNOC-ului se obține o colorație roșie.

- 5 ml urină se tratează cu 1 ml acid sulfuric 10% și 1 ml nitrit de sodiu 0,5%. Se agită, se lasă în repaus 5-10 minute (la întuneric). Se adaugă 2 ml soluție β -naftol 0,5% în amoniac 10%. Se agită, apoi se adaugă 10 ml eter. Stratul eteric se colorează în violet sau în roșu. Prin această reacție se identifică unii metaboliți ai DNOC-ului (aminoderivați).
- 1 ml sânge se tratează cu 5-10 ml metiletilcetonă și 1 g amestec format din clorură de sodiu și carbonat de sodiu (9:1). Se agită bine. În prezența DNOC-ului se obține o colorație galbenă. Reacția poate servi și la determinarea cantitativă, substanța având un maxim de absorbție la 438 nm.

Identificare după extracție (Dinitro-o-crezolul se izolează din medii biologice prin extracție cu solvenți organici din mediu acid):

- O porțiune din reziduu se dizolvă în 2 ml apă, se adaugă 2 ml acid sulfuric 20% și 1-2 granule zinc amalgamat. După 15 minute se filtrează. Filtratul se tratează cu 1-2 picături de soluție de bicromat de potasiu 5%. În prezența DNOC-ului se obține o colorație roșie. În locul soluției de bicromat de potasiu pot fi folosiți și alți oxidanți: nitrit de sodiu 1%, apă oxigenată, cloramină 4%, sulfat de ceriu (IV) 0,2 N. Toate reacțiile anterioare sunt comune și pentru alți dinitrofenoli.
- O porțiune din reziduu se dizolvă în 2 ml acid clorhidric 10%, se adaugă puțin zinc pulbere și se încălzește într-o baie de apă timp de 5 minute. După răcire se filtrează. Filtratul se tratează cu 0,1 ml soluție nitrit de sodiu 0,1%. Se lasă în repaus 5 minute. Se adaugă 1 ml soluție de uree 10%, se agită bine și după 5 minute se adaugă 1 ml soluție de N-naftiletilendiamină 0,1%. Se obține o colorație violacee. Reacția nu este specifică. Interferează parationul și alte substanțe cu grupări nitro sau amine aromatice primare.

IDENTIFICAREA ASPIRINEI DIN MEDII BIOLOGICE

Aspirina se izolează din medii biologice prin extracție cu solvenți organici din mediu acid.

- Reziduul obținut în urma extracției, prin fierbere cu acid sulfuric 2% degajă miros de acid acetic. Dacă reacția se efectuează în prezență de metanol sau etanol se degajă miros caracteristic de acetat de metil sau etil.
- Reziduul se tratează cu 1-2 ml hidroxid de sodiu 1 N și se fierbe 10 minute. După răcire se acidulează cu acid clorhidric 10% și se adaugă două picături de clorură de fier (III) 1%. În prezența aspirinei se obține o colorație violetă.
- Reziduul se dizolvă la cald în 2-3 ml apă, se adaugă 5 picături soluție de nitrit de sodiu 10%, două picături acid acetic glacial și o picătură sulfat de cupru 10%. Se fierbe două minute. În prezența aspirinei apare o colorație roșie.

IDENTIFICAREA PARACETAMOLULUI DIN MEDII BIOLOGICE

Paracetamolul se izolează din medii biologice prin extracție cu solvenți organici din mediu acid.

- reziduul obținut în urma extracției se dizolvă în 2 ml apă, se acidulează cu acid clorhidric 10%, se adaugă 3 picături nitrit de sodiu 1% și 3 picături soluție β -naftol 1% în hidroxid de sodiu 10% (proaspăt preparată). În prezența paracetamolului se dezvoltă o culoare roșie.

Reziduul se hidrolizează prin încălzire cu 2-3 ml acid clorhidric 4 N în baia de apă, timp de 15 minute.

- peste 1 ml soluție hidrolizată se adaugă 0,5 ml nitrit de sodiu 1%, se agită bine și se lasă în repaus 10 minute. Se adaugă 2 ml uree 10%, se agită și după 10 minute se adaugă 0,2 ml N-naftiletildiamină 1%, când apare o colorație violetă.
- 1 ml soluție hidrolizată se tratează cu 2-3 picături bicromat de potasiu 5%, când se dezvoltă o culoare roșie.
- 1 ml soluție hidrolizată se tratează cu 8 ml hidroxid de sodiu 0,2 N, 1 ml fenol 1% și 1 ml soluție hipobromit; se obține o colorație albastră.

IDENTIFICAREA DERIVATILOR BARBITURICI DIN MEDII BIOLOGICE

Derivații barbiturici se izolează din medii biologice prin extracție cu solvenți organici din mediu acid. Reacțiile de identificare se execută fie pe reziduu, fie pe soluțiile obținute prin dizolvarea reziduului în apă sau în alți solvenți organici.

- Soluțiile apoase formează cu sulfat de mercur (II) soluție saturată, un precipitat alb gelatinos, solubil în acid clorhidric 10% sau clorură de sodiu 10%.
- Soluțiile apoase de derivat barbituric dau precipitate colorate în violet cu reactiv Zwiker sau albastru-violet cu reactiv Ioanid.
- Reziduul se dizolvă în puțin metanol, se adaugă 1-2 picături azotat de cobalt (soluție saturată în metanol) și 1-2 picături amoniac concentrat. În prezența derivaților barbiturici se obține o colorație albastră-violet (Reacția Parri). În locul amoniacului se poate folosi soluție alcoolică 2% de dietilamină în metanol (reacția este deranjată de apă sau de excesul reactivilor).

- Reziduul se dizolvă în 1 ml cloroform, se adaugă 3-4 picături de soluție proaspăt preparată de azotat de cobalt 1% în metanol și soluție de hidroxid de litiu 1% în metanol, picătură cu picătură. În prezența derivaților barbiturici apare un inel albastru. (Colorația albastră ce virează repede în verde indică prezența glutetimidei).
- Reziduul se dizolvă în 1 ml amestec cloroform-piridină (10:1) proaspăt preparată și se adaugă câteva picături sulfat de cupru 1%. Stratul cloroformic se colorează în violet, iar cel apos rămâne colorat în albastru. Derivații tiobarbiturici colorează stratul cloroformic în verde închis.
- Reziduul se reia cu acid acetic 10% și se aduce într-o eprubetă. Se adaugă xanthidrol solid în cantitate dublă față de reziduul luat în lucru. Se încălzește eprubeta în baie de apă 1-2 minute; după răcire se depune un precipitat cristalin, care se purifică prin spălări repetate cu etanol (95%) fierbinte. După uscare, identificarea derivaților barbiturici se face pe baza punctelor de topire: Barbitol (Veronal) 245-246°C; Fenobarbital (Luminal) 242-243°C.

IDENTIFICAREA BENZODIAZEPINELOR DIN MEDII BIOLOGICE

Benzodiazepinele se izolează din medii biologice prin extracție cu solvenți organici, la un pH care depinde de natura benzodiazepinei. Astfel, clordiazepoxidul se izolează la pH = 10, în timp ce diazepamul se izolează la pH = 6,8-7,0.

- Reziduul obținut prin extracție directă se hidrolizează prin tratare cu 2 ml acid clorhidric 4 N și încălzire 10-15 minute pe baia de apă în fierbere. Soluția se răcește, se tratează cu 0,1 ml nitrit de sodiu 1%, se lasă în repaus 10 minute, apoi se adaugă 2 ml uree 10% se agită bine, se mai lasă 5 minute în repaus și în final se adaugă 0,1 ml N-naftiletildiamină 1%. În prezența benzodiazepinelor (care prin hidroliză formează benzoaminofenonă), se obține o colorație roz-violacee (nitrazepamul formează un azo-colorant violet). Diazepamul nu dă această reacție.
- Reziduul obținut prin extracție după hidroliză și reluat cu 1 ml acid clorhidric 10%, dă direct reacțiile de mai sus.
- Toate reziduurile dau după dizolvare reacții de precipitare cu unii reactivi generali de precipitare ai alcaloizilor.

IDENTIFICAREA IZONIAZIDEI DIN MEDII BIOLOGICE

Izoniazida se izolează din medii biologice prin extracție cu solvenți organici din mediu alcalin. Din sânge, identificarea se poate face după deproteinizare cu acid tricloracetic și filtrare, iar pentru plasmă nu este necesară izolarea, dacă analiza se efectuează în primele 24 de ore de la producerea intoxicației.

- 2 ml filtrat se tratează cu 2-3 picături soluție alcoolică de vanilină 2%. În prezența HIN-ului apare o colorație galbenă.
- 2 ml filtrat se tratează cu un volum egal de azotat de argint amoniacal. În cazul prezenței unor cantități mari de HIN, va apare un precipitat alb, care trece repede în galben, brun și în final negru. În timp, chiar la rece, se formează oglinda de argint. La cantități mici de HIN, formarea oglinzii de argint are loc la cald, după încălzire în baia de apă.
- 2 ml filtrat se alcalinizează cu hidroxid de sodiu 10%, se adaugă 0,5 ml soluție saturată de hexacianoferat (II) de potasiu. În timp, se observă degajare de bule de azot.
- 1 ml filtrat se tratează cu 0,1-0,2 ml acid acetic 1% și 0,5 ml soluție alcoolică de p-dimetilaminobenzaldehidă 1%; în prezența HIN-ului se obține o colorație galben-portocalie.
- 1 ml filtrat se tratează cu 0,5 ml soluție alcoolică de reactiv fosfomolibdenic 1%. Imediat sau după alcalinizare cu amoniac, se obține o colorație albastră (albastru de molibden).
- Soluția apoasă de HIN precipită cu unii reactivi generali de precipitare ai alcaloizilor.

IDENTIFICAREA ANTIDEPRINULUI DIN MEDII BIOLOGICE

Antideprinul se izolează din medii biologice prin extracție cu solvenți organici din mediu alcalin. Metaboliții săi se izolează de asemenea prin extracție cu solvenți organici, din mediu alcalin sau acid, iar metaboliții conjugați sunt hidrolizați în prealabil.

Teste orientative: la 0,5 ml urină se adaugă 1 ml reactiv FNP. În prezența antideprinului sau a altor derivați de dibenzoazepină apare o colorație galben-verzuie până la verde (la doze terapeutice) sau albastră (la doze toxice). Reacția este interferată de fenotiazine, care dau colorații roșii.

Tratând reziduul obținut în urma extracției cu 1-2 picături din reactivii oxidanți de mai jos, se obțin colorații albastre:

- Acid azotic concentrat;
- Hexacianoferat de potasiu 1% în acid sulfuric 1:2;
- Bicromat de potasiu 2% în acid sulfuric 1:2;
- Sulfat de ceriu (IV) 0,2 % în acid sulfuric 1:2;
- Clorat de potasiu 1% în acid sulfuric 1:2;
- Clorură de fier (III) 1% în acid sulfuric 1:2;
- Metavanadat de sodiu 0,3% în acid sulfuric 1:2;
- Amestec acid azotic:acid percloric (1:1);
- Reactiv Forrest
- Antideprinul precipită cu unii reactivi generali de precipitare ai alcaloizilor.
- Dă pozitivă reacția Vitali.

IDENTIFICAREA FENOTIAZINELOR DIN MEDII BIOLOGICE

Fenotiazinele se izolează din medii biologice prin extracție cu solvenți organici din mediu acid și parțial din mediu alcalin. Metaboliții cu caracter alcalin se izolează alături de substanțele netransformate, metaboliții cu caracter acid se izolează din mediu acid, iar metaboliții conjugați după o hidroliză acidă prealabilă.

- Reziduul obținut în urma extracției, dizolvat în apă acidulată cu acid clorhidric 10%, formează precipitate cu reactivii generali de precipitare ai alcaloizilor.
- Reziduul se dizolvă în 0,2-0,5 ml metanol și se adaugă 1-2 picături acid azotic concentrat. În prezența fenotiazinelor apar colorații diferite, în funcție de derivatul prezent. Dacă peste acest amestec se adaugă 1 ml sulfat de fier (II) 5%, 1 ml acid clorhidric 10% și 0,1 g pulbere de zinc, după fierbere (1-5 minute) apar, în prezența fenotiazinelor, colorații verzi, roșii sau violete (dependent de fenotiazina prezentă).
- Peste reziduul dizolvat în puțin metanol se adaugă 0,2-0,3 ml reactiv FNP; în prezența fenotiazinelor se obțin colorații roșii sau roșii-violet, dependent de derivatul fenotiazinic.
- Peste un amestec format din 0,2 ml acid clorhidric concentrat, 1,5 ml apă și 0,2 ml perhidrol se adaugă reziduul de analizat (dizolvat în puțin metanol). În prezența fenotiazinelor, la încălzire în baia de apă apar colorații roșii sau violete, în funcție de tipul de derivat fenotiazinic prezent.

- Reziduul formează la tratare cu 0,1-0,2 ml reactiv chinhidronă colorații portocalii, roșii sau albastre, dependent de fenotiazina prezentă. Reacția poate fi aplicată și la determinarea cantitativă.
- Reziduul se dizolvă într-un ml amestec acetonă:apă (1:1), se adaugă 1 ml acid clorhidric concentrat și câteva picături clorură de paladiu (II) 1% în acetonă:apă (1:1). În prezența clorpromazinei se obține o colorație albastră, extractibilă în acetat de etil.
- Reziduul formează, la tratare cu sulfat de mercur (II) 1%, o colorație roșie dacă conține prometazină; clorpromazina nu dă această reacție.
- Reziduul, la tratare cu unul din următorii reactivi: acid periodic 1%, acid fosfomolibdenic 1% în metanol, molibdat de amoniu 1% în acid sulfuric (1:2), amestec de acid sulfuric:formaldehidă (3:0,1), bicromat de potasiu 1% în acid sulfuric (1:2), cloramină 2% sau apă de brom, dă colorații diferite, nespecifice.
- Reziduul dă colorații nespecifice la tratare cu unii reactivi de culoare ai alcaloizilor (Mandelin, Erdman, Wasicky etc.).

Reacții de culoare ale fenotiazinelor

Substanța	H₂SO₄ conc.	HNO₃ conc.	FeCl₃ în H₂SO₄	HClO₄	Vanadat de amoniu 1% în H₂SO₄	Molibdat de amoniu 1% în H₂SO₄	Cloramină 2%
Clor- promazina	Roșu	Roșu	Roșu- violet	Roșu-vișiniu	Verde	Violaceu-roșu	Roșu-vișiniu
Prometazina	Roșu	Roșu	Roșu- vișiniu	Roșu-vișiniu	Verde purpur	Violet-negru	Roșu
Levomepro- mazina	Violet	Violet- galben	Violet	Violet	Albastru	Albastru	Roșu-violaceu
Tioridazina	Albastru- verde	Albastru- verde	Verde	Verde- albastru	Albastru- purpur	Albastru-verde	Verde- albastru
Proclorpro- mazina	Roșu- vișiniu	Roșu- galben	Roșu- violet	Roșu	Albastru- purpur	Roșu- portocaliu	Roșu-vișiniu
Trifluopera- zina	Roșu- cărămiziu	Roșu- galben	Roșu- cărămiziu	Roșu-brun	Roșu-brun	Roșu	Roșu-brun

4.2. IDENTIFICAREA UNOR SUBSTANȚE TOXICE PRIN CROMATOGRAFIE ÎN STRAT SUBȚIRE

IDENTIFICAREA ALCALOIZILOR DIN PULBERI ILICITE SUSPECTE PRIN CSS

Drogurile pe bază de alcaloizi opiacei și cocaină sunt frecvent comercializate ilicit. Puritya acestor droguri variază în limite largi, deoarece în laboratoarele clandestine purificarea produselor obținute este rareori eficientă. Morfina, care se obține prin extracție din opiu, conține frecvent cantități semnificative de codeină, noscapină și papaverină, iar heroina, preparată prin acetilarea extractelor de opiu, conține adesea alcaloizi opiacei acetilați. Pe lângă contaminanți, în pulberile comercializate ilicit se identifică adesea substanțe falsificatoare și diluanți. *Substanțele falsificatoare* sunt substanțe farmacologic active, adăugate pentru a mima prezența alcaloidului toxicomanogen. De exemplu, ele pot fi: • substanțe cu gust amar, cum este chinina, pentru pulberile cu heroină sau morfină; • anestezice locale, ca procaina sau dicaina, pentru pulberile cu cocaină; • stimulante ale SNC, cum este cafeina; • analgezice ca paracetamolul; • substanțe care anulează sau reduc unele efecte neplăcute induse, de exemplu manitolul sau sorbitolul, pentru combaterea constipației, barbituricele, benzodiazepinele pentru reducerea efectelor psihodepresive. Ca *diluanți* sunt frecvent utilizați hidrații de carbon - glucoza, zaharoza, lactoza, dar și alte substanțe ca amidonul, creta sau acidul citric. Spre deosebire de contaminanți, a căror proporție relativă în “dozele” diluate rămâne constantă față de “pulberea-mamă” (pentru o șarjă), substanțele falsificatoare și diluanții, care se adaugă ulterior, pot să fie prezenți în cantități diferite sau pot lipsi din unele “doze”. Cunoșcând compoziția chimică a preparatelor ilicite, se poate identifica sursa de furnizare sau originea lor.

Principiul metodei:

Se identifică alcaloizii toxicomanogeni și principalele substanțe impurificatoare din pulberile suspecte comercializate ilicit, după separarea lor prin cromatografie pe strat subțire (CSS), prin vizualizarea spoturilor separate în lumină UV sau prin revelare cu reactivi de culoare.

Tehnica de lucru:

Orientarea analizei toxicologice – prin reacții de culoare:

Într-o capsulă de porțelan se aplică în trei zone diferite câteva cristale din pulberea-probă. Peste cristale se adaugă cu o pipetă Pasteur, 1-2 picături din următorii reactivi generali de culoare ai alcaloizilor: acid azotic concentrat, R. Erdman și R. Marquis.

După cum se observă în Tabelul nr. 1, în prezența alcaloizilor opiacei se obțin colorații predominant galben-portocalii-roșii, în timp ce cocaina nu dă reacții de culoare cu acești reactivi.

Tabel nr. 1:

<i>Alcaloidul</i>	<i>HNO₃</i>	<i>R. Erdman</i>	<i>R. Marquis</i>
<i>Cocaina</i>	-	-	-
<i>Morfina</i>	Roșu-orange, trece în galben roșcat	Roșu, trece în brun închis	Roșcat, trece în albastru-violaceu
<i>Codeina</i>	Galben-verzui	Albastru la cald	Verzui, trece în albastru
<i>Dionina</i>	Galben-verzui	Orange	Galben, trece la cald în verde
<i>Heroina</i>	Galben, la cald trece în roșu	Galben, verde pal, albastru	Verde
<i>Papaverina</i>	Gălbui, trece în roșu-întunecat	Albastru-verzui	Verde-albăstrui, albastru
<i>Chinina</i>	-	-	-

Analiza CSS:

Câteva mg de probă se dizolvă în 0,5 ml metanol și se aplică pe placa cromatografică corespunzătoare (~ 10 μl), în paralel cu standardele externe ale alcaloizilor presupuși a se găsi în probă și ale câtorva din principalele substanțe impurificatoare care apar frecvent în pulberile comercializate ilicit.

Standardele externe și reactivul de revelare se aleg în funcție de natura alcaloizilor existenți în probă, astfel:

a) pentru alcaloizi opiacei:

- placa cromatografică: Silicagel G
- standarde externe: Soluții metanolice de morfină, codeină, cafeină și chinină (~ 10 µl)
- faza mobilă: acetat de etil: metanol: amoniac conc. (85:10:5)
- reactiv de revelare: R. Iodoplatinat (morfină – spot albastru; codeina – spot brun-vișiniu închis; chinină – spot brun)

b) pentru cocaină:

- placa cromatografică: Silicagel G
- standarde externe: Soluții metanolice de cocaină, procaină, cafeină (~10µl)
- faza mobilă: acetat de etil: metanol: amoniac conc. (85:10:5)
- reactiv de revelare: R. Dragendorff (spoturi brune)

După developare, plăcile se usucă și se vizualizează zonele separate:

- în lumina UV, la 254 nm și 365 nm;
- prin revelare cu R. Iodoplatinat sau R. Dragendorff

Se identifică alcaloizii prezenți în probă pe baza valorilor R_f și a culorilor spoturilor.

ANALIZA TOXICOLOGICĂ CALITATIVĂ ÎN CAZUL UNEI INTOXICAȚII CU SUBSTANȚE NECUNOSCUTE

Acest tip de analiză se poate aplica pe probe biologice puțin complexe, cum sunt urina, conținutul stomacal sau produsele suspecte. Separarea substanțelor toxice se realizează prin cromatografie în strat subțire, iar identificarea se face prin metoda standardelor externe. Pentru orientarea analizei toxicologice se poate recurge la reacții de culoare.

Orientarea analizei toxicologice prin reacții de culoare

FENOTIAZINE: reacția cu FNP

Peste 1 ml probă se adaugă 1 ml reactiv FNP și se agită 5 secunde. Apariția unei colorații de la roz la roșu, portocaliu, violet sau albastru, indică prezența fenotiazinelor. Un rezultat pozitiv necesită confirmarea prin CSS.

IMIPRAMINĂ ȘI SUBSTANȚE ÎNRUDITE: Reacția Forrest

Peste 0,5 ml probă se adaugă 1 ml reactiv Forrest și se amestecă timp de 5 secunde. Apariția unei colorații galben-verde, care virează în verde închis și apoi

albastru, indică prezența imipraminei sau a substanțelor înrudite. Un rezultat pozitiv trebuie confirmat prin CSS.

CARBAMAZEPINA

Se adaugă 1 ml acid clorhidric diluat (2 M) peste 5 ml probă și 5 ml cloroform, se agită rapid 1 minut și se centrifughează 5 min la 3000 rpm. După îndepărtarea stratului apos superior, într-o eprubetă se adaugă la 1ml extract cloroformic, 0,2 ml reactiv hipobromit de sodiu și se agită rapid timp de 30 de secunde. Colorarea în albastru-violet a stratului cloroformic indică prezența carbamazepinei. Carbamazepina și metaboliții pot fi detectați și în urină prin CSS, după extracție cu solvenți organici la pH acid. *Sensibilitatea reacției* este de 250 mg/l.

Reactivi și materiale

1. Acid clorhidric diluat (1M)
2. Soluție de hidroxid de sodiu (0,5M)
3. Tampon clorură de amoniu. Soluție apoasă saturată de clorură de amoniu ajustată la pH 9 cu hidroxid de amoniu concentrat.
4. Acid clorhidric (2 ml/l în metanol)
5. Amestec de dezvoltare: acetat de etil / metanol / hidroxid de amoniu concentrat (85:10:5)
6. Plăci CSS (20 cm x 20 cm, diametrul particulelor 20 μm) cu faza staționară silicagel.
7. Etaloane: soluții cloroformice cu concentrație de 0.5 mg/ ml din următoarele substanțe:
 - Amestec de substanțe cu caracter acid: amobarbital, fenobarbital, glutetimidă
 - Amestec de substanțe cu caracter bazic: amitriptilină, nortriptilină, codeină, carbamazepină
 - Amestec de fenotiazine: tioridazină, levomepromazină, clorpromazină

Tehnica de lucru

Extracția la pH acid (extractul A)

- a) Într-o eprubetă de centrifugă, se adaugă peste 5 ml urină 0,5 ml acid clorhidric 1M și 5 ml cloroform.
- b) Se agită 5 minute, apoi se centrifughează 10 minute la 2500 rpm și se separă stratul organic inferior, care se aduce într-o capsulă de porțelan.
- c) Se evaporă extractul pe baie de apă.

Extracția la pH bazic (extractul B)

- a) Într-o eprubetă de centrifugă, se adaugă peste 5 ml urină 1 ml tampon clorură de amoniu și 5 ml amestec cloroform: izopropanol (9:1).

- b) Se agită 5 minute, apoi se centrifughează 10 minute la 2500 rpm și se separă stratul organic inferior, care se aduce într-o capsulă de porțelan.
- c) La extract se adaugă 0,25 ml acid clorhidric în metanol (pentru a evita pierderea bazelor volatile) și se evaporă la sec pe baie de apă.

Identificarea prin cromatografie în strat subțire

- 1) Pe placa cromatografică se definesc 8 culoare verticale, prin trasarea unor linii cu ajutorul unui creion (Fig.1.). Se trasează linia de start, la 1 cm de la partea inferioară a plăcii, iar la 10 cm de la origine se marchează limita de dezvoltare.
- 2) Ambele extracte se reiau în 100 μ l amestec cloroform: izopropanol (9:1) și se aplică pe linia de start 20 μ l extract A și 3 fracțiuni de câte 20 μ l extract B (Fig.1).
- 3) Se aplică pe linia de start câte 20 μ l din amestecurile de etaloane (Fig.1.)
- 4) Se dezvoltă placa cromatografică cu amestecul de dezvoltare constituit din acetat de etil: metanol: hidroxid de amoniu concentrat (85:10:5)
- 5) Se usucă placa cromatografică în curent de aer sub nișă
- 6) Se examinează placa în lumină UV (la 254 și la 366 nm) și se notează prezența eventualelor spoturi fluorescente.
- 7) Se revelează fiecare porțiune a plăcii cu reactivii de revelare indicați în Fig.2. Porțiunile plăcii care nu se pulverizează se acoperă cu o placă de sticlă curată.
- 8) Se examinează placa în lumină UV (la 254 și la 366 nm) și se notează prezența eventualelor spoturi fluorescente, în special în porțiunea pulverizată cu reactiv Mandelin.
- 9) Colorațiile obținute cu reactivul Mandelin se pot accentua prin încălzirea plăcii în etuvă la 100 °C timp de 10 minute.

Observații:

- Derivații barbiturici, după revelare cu fluoresceină alcalină, apar în lumină UV la 254 nm sub forma unor spoturi colorate purpuriu pe fond galben-verzui. Glutetimida este vizibilă în UV, atât la 254, cât și la 365 nm, iar în vizibil, după revelare cu același reactiv, se observă sub forma unui spot colorat în violet, pe fond galben.

- Benzodiazepinele și metaboliții lor pot să apară în lumină UV (la 366 nm) sub forma unor spoturi de culoare verde pal sau galben înainte de pulverizarea cu azotat mercurios (extract acid). Chinina, carbamazepina și metaboliții lor dau spoturi fluorescente (la 254 și 366 nm) după revelarea culoarelor pe care au fost aplicate extractele bazice. În cazurile dificile se poate calcula hR_f -ul ($R_f \times 100$), care se compară cu valorile din literatură (Tabel I.).

Reproductibilitatea analizei cromatografice se poate asigura prin respectarea saturării bacului cromatografic și a concentrației soluției de hidroxid de amoniu

(330 g/l, densitate relativă 0,88). Nu se utilizează faza mobilă mai mult de 5 ori dacă temperatura ambiantă este mai mare de 20-25 °C (se utilizează de mai puține ori dacă temperatura este mai mare).

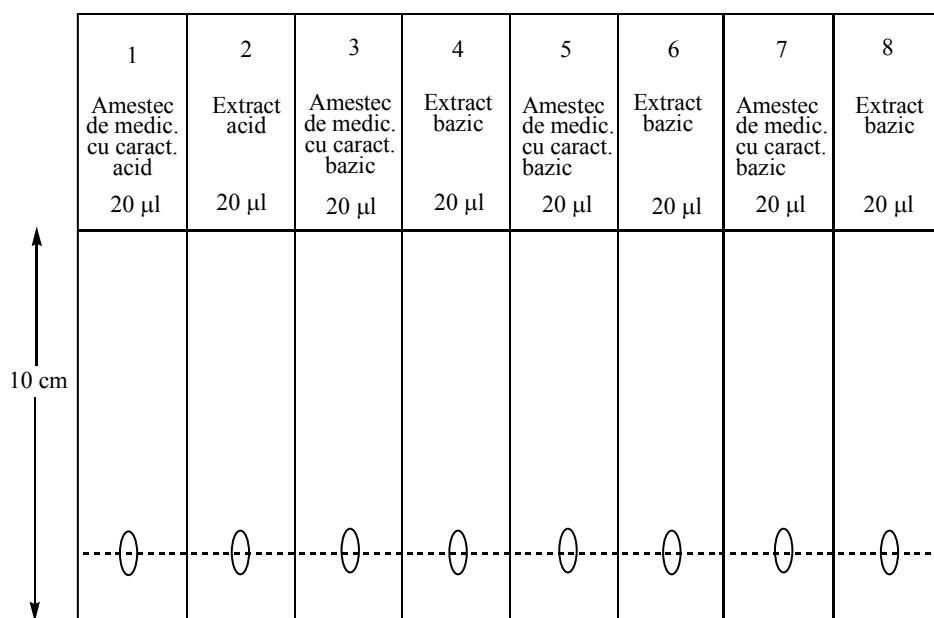


Fig.1. Identificarea prin CSS: pregătirea plăcilor și aplicarea soluțiilor

1	2	3	4	5	6	7	8
Amestec de medic. cu caract. acid	Extract acid	Amestec de medic. cu caract. bazic	Extract bazic	Amestec de medic. cu caract. bazic	Extract bazic	Amestec de medic. cu caract. bazic	Extract bazic
Azotat mercurios (Fluoresceina alcalina)		Iodoplatinat acidulat		Reactiv Mandelin		Acid sulfuric (500 ml/l)	

Fig.2. Identificarea prin CSS: revelarea plăcilor

Tabel cu valorile din literatură ale hRf și colorațiile spoturilor unor substanțe medicamentoase separate prin CSS

Substanța	hRf	Reactiv de revelare				
		Azotat mercuros ^a (Fluoresceină alcalină) ^b	Iodoplatinat acidulat	R. Mandelin (vizibil) ^a	R. Mandelin (UV 366 nm) ^b	Acid sulfuric (500 ml/l)
Amitriptilină	70	-	albastru	albastru-pal	albastru (galben)	-
Amobarbital	40	alb-gri ^a purpuriu ^b	- -	- -	- -	- -
Carbamazepină	57	-	albastru	albastru-pal	verde	-
Clorpromazină	70	-	violet	roșu	-	roșu
Codeină	35	-	negru	albastru-pal	-	-
Fenobarbital	29	alb-gri purpuriu ^b	- -	- -	- -	- -
Glutetimidă	78	alb-gri purpuriu ^b	- -	- -	- -	- -
Nortriptilină	45	-	albastru	albastru-pal	albastru (galben)	-
Tioridazină	67	-	violet-brun	albastru-verzui	-	violet

4.3. DETERMINAREA CANTITATIVĂ A UNOR SUBSTANȚE TOXICE DIN AER ȘI DIN MEDII BIOLOGICE

ANALIZA TOXICOLOGICĂ A MONOXIDULUI DE CARBON

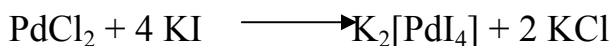
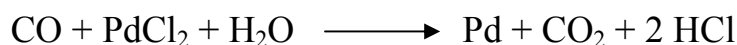
DETERMINAREA CANTITATIVĂ DIN AER PRIN METODA CU CLORURĂ DE PALADIU

Recoltarea probelor:

Vasul de recoltare (cu o capacitate bine determinată), se transportă la locul de recoltare plin cu apă, unde se lasă să se scurgă apa. Înainte de închidere se introduc în vas: o fiolă cu 1 ml soluție sulfat de aluminiu 10% (catalizator) și o fiolă cu 1 ml soluție clorură de paladiu 0,1%. Vasul bine închis se scutură energic pentru ca fiolele să se spargă și reactivii să vină în contact cu oxidul de carbon din aerul recoltat. Apoi se lasă să stea la întuneric minimum 4 ore, până la 24 ore, agitându-l din când în când.

Principiul metodei:

Oxidul de carbon reduce clorura de paladiu (II) la paladiu metalic. Excesul de clorură de paladiu (II) se determină colorimetric cu iodură de potasiu în exces, sub formă de tetraiodopaladat dipotasic, de culoare roșie-brună.



Metoda nu este specifică; interferează substanțele reducătoare din aer (H_2S , SO_2 , aldehide, cetone etc.).

Tehnica de lucru:

Lichidul din vasul de recoltare se trece cantitativ, prin spălări repetate cu apă distilată, într-un balon cotat de 50 ml, astfel ca volumul total al lichidului să nu depășească 30 ml. Se adaugă în porțiuni 10 ml iodură de potasiu 15% (proaspăt preparată), agitând după fiecare adăugare. Balonul cotat se completează la semn cu apă distilată. După 40 minute se măsoară absorbanta probei și a unui standard (format dintr-un ml clorură de paladiu (II) 0,1%, prelucrat în condițiile probei) la spectrofotometru la 470 nm, față de apă distilată.

Calcul:

1 mg PdCl₂ sic corespunde la 0,157 mg CO, iar

1 mg PdCl₂·2H₂O corespunde la 0,131 mg CO.

$$\text{mg CO/m}^3 = \{[(1-a) \times 0,131] / V\} \times 1000$$

unde: a = mg PdCl₂·2H₂O în exces

V = volumul vasului de recoltare (în litri).

IDENTIFICAREA CARBOXIHEMOGLOBINEI (Metoda Wolff)

Principiul metodei

Prin încălzirea la 55°C timp de 5 minute a unei probe de sânge diluat și tamponat la pH 5, oxihemoglobina precipită, în timp ce carboxihemoglobina rămâne în soluție și îi conferă acestuia o colorație roz sau roșie, în funcție de nivelul monoxidului de carbon

Reactivi:

Soluție de tampon aceto-acetic (preparată ex-temporae) din

- acid acetic 5 N: 1 volum
- acetat de sodiu 3 N: 3 volume

Tehnica de lucru

- Sângele se diluează 1/5 cu apă distilată.
- Într-o eprubetă se introduc 1 ml diluție sanguină, măsurată exact, și 4 ml tampon aceto-acetic preparat înainte de utilizare. Se agită și se menține exact 5 minute în baie de apă la 55°C. Se răcește și se filtrează. Se examinează colorația filtratului.

Interpretarea rezultatelor

Această tehnică permite punerea rapidă în evidență a unei intoxicații acute sau subacute și poate fi utilă în analizele de toxicologie clinică.

O probă de sânge ce conține mai mult de 1 ml monoxid de carbon/ml dă un filtrat colorat în roz mai mult sau mai puțin intens. Pentru doze mai mici, filtratul este limpede, cu o ușoară tentă galbenă. Cantitățile de monoxid de carbon din sânge (ml CO / ml sânge) pot fi interpretate astfel:

0-0,4: normal

0,4-0,6: limită normală la muncitori

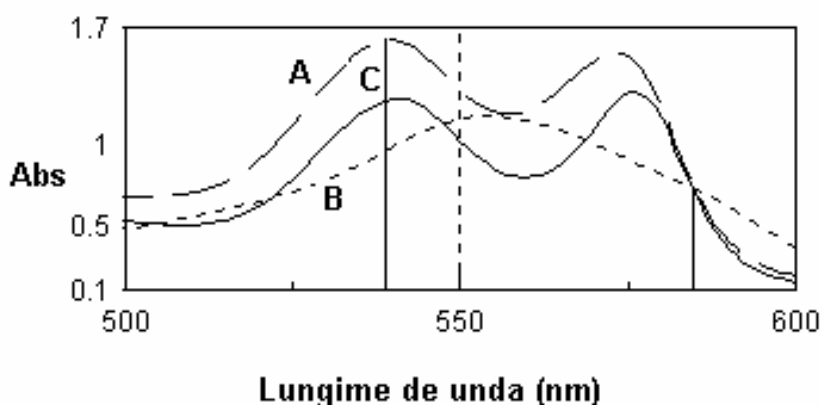
0,6-1: impregnare ușoară

1-2: intoxicație cronică

3: intoxicație.

DOZAREA CARBOXIHMOGLOBINEI PRIN METODA SPECTROFOTOMETRICA

Principiul metodei : Metoda se bazează pe faptul că sângele normal conține mai multe forme de hemoglobină: forma redusă, forma oxigenată și cantități mici de methemoglobină. Dacă se adaugă un reducător, cum ar fi ditionitul de sodiu, atât forma oxigenată cât și methemoglobina sunt convertite în forma redusă (HHb), cu spectrul corespunzător din figură (B). Monoxidul de carbon are o afinitate mult mai mare pentru hemoglobină decât oxigenul și astfel carboxihemoglobina nu va fi redusă de ditionitul de sodiu, păstrându-și spectrul caracteristic cu două maxime de absorbție (COHb) (spectrul A din figură). Lungimea de undă la care diferența de absorbantă între spectrele A și B este maximă, este 540 nm, în timp ce la 579 nm, spectrele au aceeași absorbantă (punctul izosbestic). Procentul de saturare cu monoxid de carbon a probei de sânge poate fi calculat prin măsurarea la aceste lungimi de undă a absorbanțelor probei saturată cu monoxid de carbon (A), probei fără monoxid de carbon (B) și probei provenite de la intoxicați (C), după reducerea acestora cu ditionit de sodiu.



Spectrele carboxihemoglobinei (A), hemoglobinei reduse (B), și a unei probe de sânge provenită de la un pacient intoxicat cu monoxid de carbon (C)

Reactivi: - soluție hidroxid de amoniu 0,4 % (v/v) (se diluează 4 ml amoniac 25% la 280 ml cu apă distilată)

- ditionit de sodiu ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$)

Tehnica de lucru:

0,1 ml sânge se diluează la 10 ml cu hidroxid de amoniu 0,4 %. Se filtrează. Se împarte proba în trei părți A, B și C. [Soluția A se saturează cu monoxid de carbon, proba B se saturează cu oxigen pur, prin barbotare]. În toate cele trei soluții se adaugă câteva cristale (~ 1-2 mg) ditionit de sodiu solid. Se agită și se citesc absorbantele la 540 nm și la 579 nm, față de un martor de soluție hidroxid de amoniu 0,4 %. Se calculează raportul absorbantelor la 540 și 579 nm pentru fiecare soluție: A, B și C.

Calcul:

Procentul de saturare cu carboxihemoglobină pentru proba de analizat se calculează cu ajutorul formulei:

$$\% \text{ saturare} = [(A_{C-540}/A_{C-579}) - (A_{B-540}/A_{B-579})] / [(A_{A-540}/A_{A-579}) - (A_{B-540}/A_{B-579})] \times 100$$

Valorile normale aproximative pentru raporturile absorbantelor sunt: 1,5 pentru carboxihemoglobina saturată (raport A) și 1,1 pentru hemoglobina redusă (raport B).

Interpretarea rezultatelor:

Se face în funcție de concentrația de carboxihemoglobină din sânge, cu ajutorul tabelului de mai jos.

CONCENTRATIA DE CARBOXIHMOGLOBINA IN SANGE (%)	SIMPTOMATOLOGIA
1	Fără simptome
10	Fără simptome sau cu simptomatologie neînsemnată
15-20	Simptome ușoare: cefalee, vasodilatație cutanată
30-35	Simptome severe: oboseală, amețeli, vărsături, tulburări de vedere, tendință de colaps
50-55	Simptome grave: inconștiență, posibil sincopă, care pot duce lent la moarte.
66	Moarte în aproximativ 5 ore, în comă și convulsii
80	Moarte rapidă
100	Moarte fulgerătoare

ANALIZA TOXICOLOGICA A HIDROGENULUI SULFURAT

DETERMINAREA CANTITATIVĂ SUB FORMĂ DE ALBASTRU DE METILEN

Recoltarea probelor:

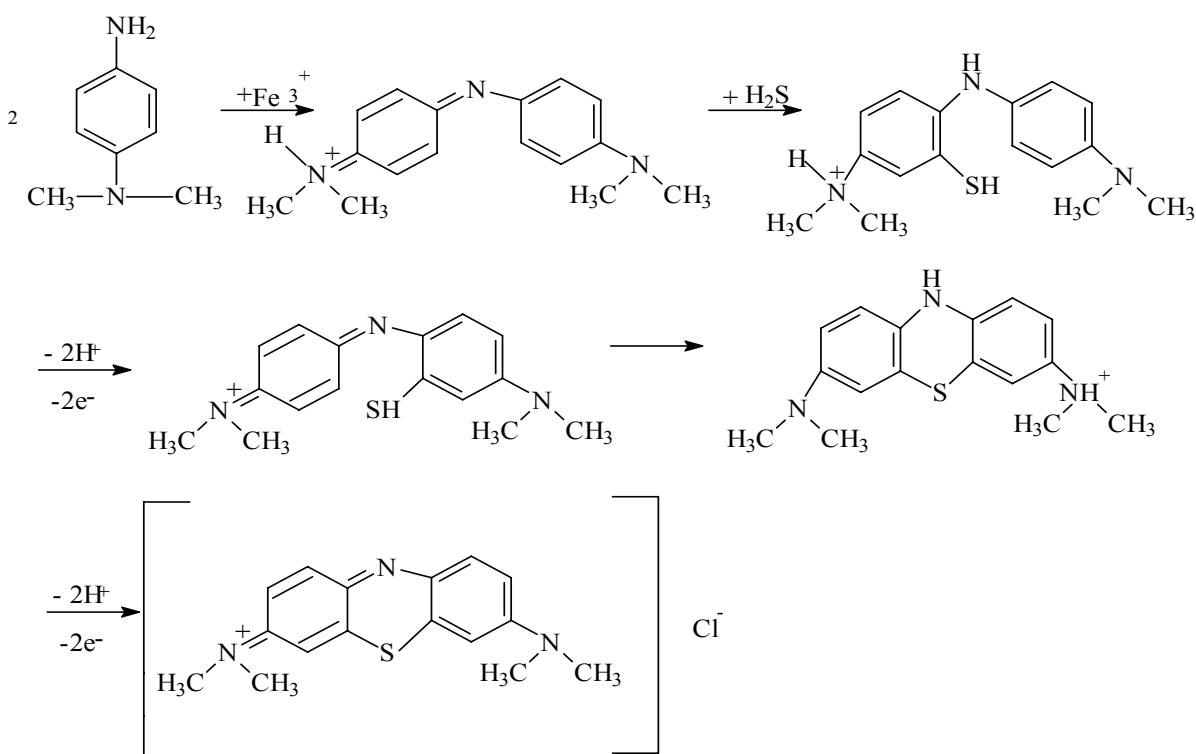
Minim 2 l de aer se aspiră cu un debit de 0,15 l/minut prin 2 absorbitoare care conțin fiecare 10 ml soluție absorbantă. Se prevăd în plus încă 2 absorbitoare cu câte 10 ml soluție absorbantă prin care nu se absoarbe aer, ele constituind probele martor.

Deoarece vaporii nitroși deranjează reacția, în cazul prezenței lor probele se tratează cu 5 ml sulfamat de sodiu 10% sau uree 10% și se încălzesc 15 minute la 40°C; pentru determinare se va ține cont de diluția făcută.

Principiul metodei:

Hidrogenul sulfurat formează cu para-dimetil-fenilendiamina în prezența unui oxidant și în mediu de acid clorhidric, tetra-metilendiaminotiazina (albastru de metilen), compus colorimetric.

Sensibilitatea metodei este de 0,05 μg/ml. Metoda, deși specifică, este deranjată de vaporii nitroși în cantitate mare, care pot diazota amina aromatică.



Tehnica de lucru:

Conținutul celor două absorbitoare și al probelor martor se prelucrează individual. Din fiecare probă, agitată foarte bine, se măsoară imediat 5 ml. Paralel cu probele se prelucrează și o scară de etaloane cu concentrația cuprinsă între 0,5-5 $\mu\text{g H}_2\text{S}$ /5 ml soluție absorbantă (acetat de zinc 1% sau sulfat de cadmiu). În fiecare probă se adaugă câte 1 ml para-dimetilfenilendiamină 0,1% (în acid clorhidric 1:1) și 1 ml azotat de fier (III) 10%. Se agită bine. După 30 minute se măsoară absorbanțele la spectrofotometru la 650 nm, în cuva de 1 cm. Prin raportarea absorbanțelor citite la curba etalon se obțin concentrațiile C_1 și C_2 , în $\mu\text{g H}_2\text{S}$ /probă.

Calcul:

$$\text{mg H}_2\text{S}/\text{m}^3 = 2(C_1 + C_2) / V$$

unde: V = litri aer recoltați.

ANALIZA TOXICOLOGICA A CLORULUI

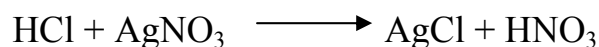
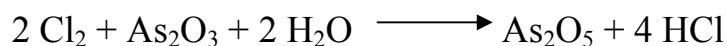
DETERMINAREA CANTITATIVĂ NEFELOMETRICĂ (METODA ALEXEEVA-JITJOVA)

Recoltarea probelor:

Se aspiră 40-50 l aer, cu un debit de 3 l/minut, prin 2 microabsorbitoare (legate în serie), conținând fiecare câte 5 ml soluție absorbantă (arsenit de sodiu 0,004 N). Pe lângă microabsorbitoarele destinate recoltării clorului se mai prevăd încă 2 microabsorbitoare, fiecare cu câte 5 ml soluție absorbantă, prin care nu se aspiră aer, acestea constituind probele martor.

Principiul metodei:

Clorul elementar este redus de acidul arsenios la ion clorură, care în mediu de acid azotic se precipită cantitativ cu azotat de argint. Clorura de argint formată se determină nefelometric:



Sensibilitatea metodei este de 2,5 µg clor/ml. Reacția nu este specifică, interferează alți halogeni și ionul cianură.

Tehnica de lucru:

Conținutul celor 2 microabsorbitoare se reunește prin transvazare cantitativă într-o eprubetă gradată și se completează la semn. În mod similar se procedează și cu probele martor.

Peste 5 ml din probă și martor, și o scară de etaloane cu concentrația cuprinsă între 10-100 µg clor/5 ml soluție absorbantă, se adaugă câte 1 ml acid azotic 10% și 1 ml azotat de argint 10%. După 30 minute se omogenizează (prin agitare energetică), se citește turbiditatea la nefelometru sau la spectrofotometru prevăzut cu un dispozitiv T.K. la 470 nm, în cuva de 1 cm, față de martorul de reactivi. Extincția probei se raportează la curba etalon, obținându-se direct concentrația C în µg; din aceasta se scade concentrația probei martor.

Calcul:

$$\text{mg clor/m}^3 = [2 \times C] / V$$

unde: V = litri aer recoltați.

ANALIZA TOXICOLOGICĂ A DIOXIDULUI DE SULF

DETERMINAREA CANTITATIVĂ A DIOXIDULUI DE SULF DIN AER PRIN METODA EUROPEANĂ OFICIALĂ

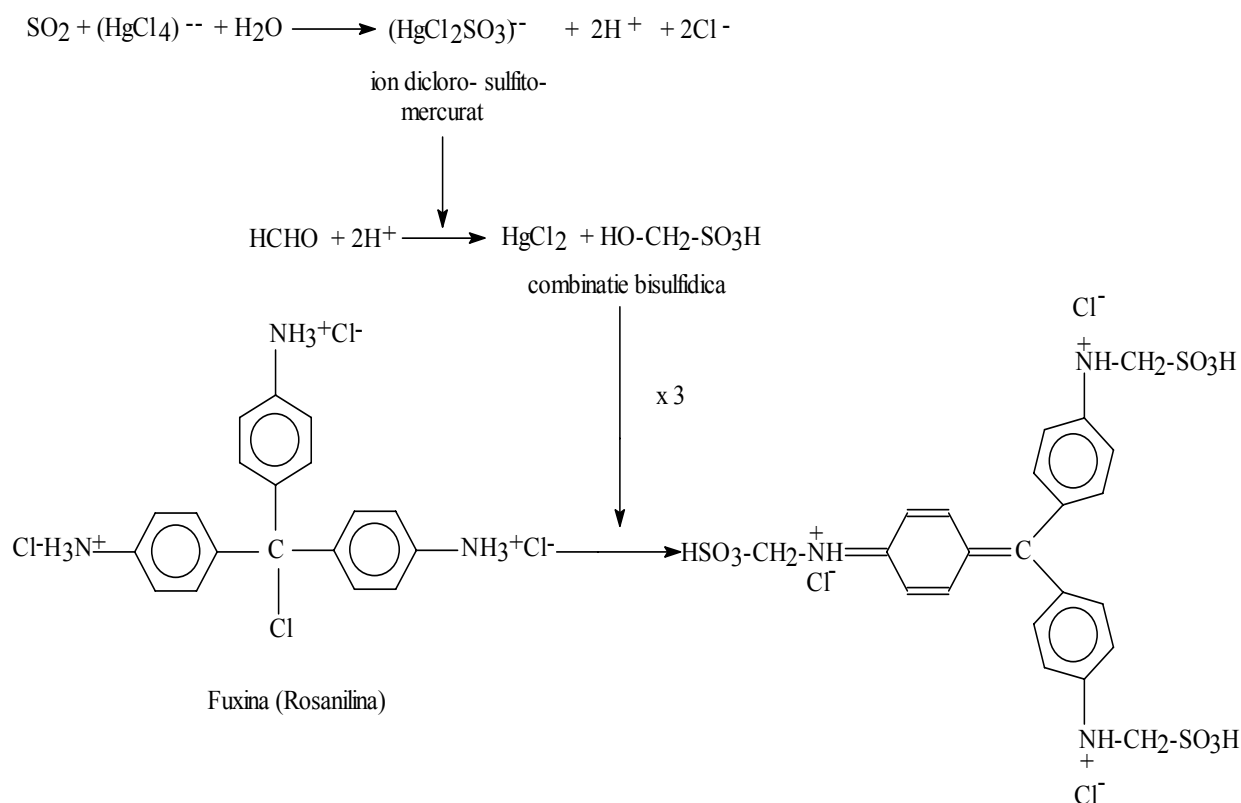
Principiul metodei:

Dioxidul de sulf din aer este reținut într-o soluție absorbantă de tetracloromercuriat de sodiu. Ionul de diclorosulfitomercurat obținut va reacționa cu formol, formând o combinație bisulfidică și apoi cu fuxină (incoloră în mediu acid), formând un compus cu duble legături conjugate de colorație violetă, a cărui absorbantă poate fi citită la spectrofotometru la 540 nm, concomitent cu o scară de etaloane.

Reactivi:

- Tetracloromercuriat de sodiu (toxic): 0,50 g HgCl₂ + 0,20 g clorură de sodiu + apă distilată ad 1000 ml.

- Anhidridă sulfuroasă: soluție standard de bisulfid de sodiu cu concentrația de 0,6g/l SO₂;
- Formol diluat: 1ml formol 35% diluat cu apă distilată la 1000 ml (se prepară proaspăt);
- Rozanilină: Se lucrează cu o soluție diluată astfel: 2ml soluție mamă [vezi anexa V] + 5ml HCl + apă distilată ad 100 ml.
- Proba de dozat: 50 ml soluție de tetracloromercuriat de sodiu prin care s-a barbotat 1 m³ de aer.



Tehnica de lucru:

Se prelucrează în paralel cu o scară de etaloane o probă de 5 ml și o probă diluată 1:1 cu soluție absorbantă (tetracloromercuriat de sodiu), conform schemei de mai jos (volumele sunt exprimate în ml).

Se lasă 45 minute la întuneric și se citește absorbanta la spectrofotometru, la 540 nm.

Nr. eprubetă	1	2	3	4	5	Proba nedil.	Proba dil. 1:1
Probă	-	-	-	-	-	5	2,5
Tetracloromercuriat de sodiu	5	4,8	4,6	4,4	4,2	-	2,5
Sol. Std. SO ₂ (60 mg/l)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	0	0
Formol diluat	1	1	1	1	1	1	1
Sol. dil. rozanilină	1	1	1	1	1	1	1

Rezultate:

Se reprezintă grafic absorbanta în funcție de concentrația în SO₂ și se determină conținutul probei analizate prin extrapolare din grafic. Se calculează cantitatea de SO₂ conținută în aerul barbotat (1 m³), care s-a reținut în cei 50 ml de soluție absorbantă.

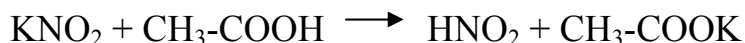
ANALIZA TOXICOLOGICĂ A OXIZILOR DE AZOT**DETERMINAREA CANTITATIVĂ SUB FORMĂ DE AZOCOLORANȚI****Recoltarea probelor:**

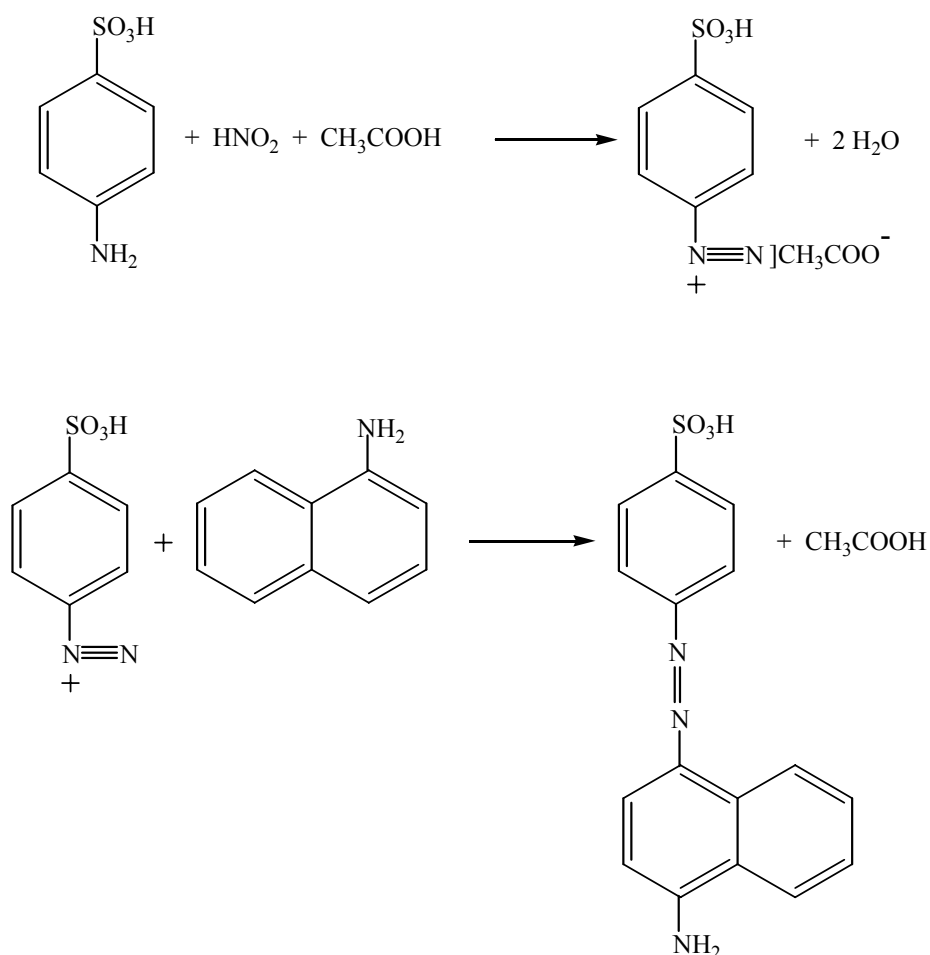
Se poate face după 2 tehnici:

1. Trecând aerul cu un debit de 0,2 l/minut prin două microabsorbitoare legate în serie, conținând fiecare câte 2 ml soluție absorbantă (hidroxid de sodiu 0,01N).
2. În tonometre de 250-500 ml (calibrate în prealabil), prin dislocuirea apei.

Principiul metodei:

Acidul azotos diazotează acidul sulfanilic (sau sulfanilamida), formând o sare de diazoniu care se cuplează cu α -naftilamina sau cu N-naftiletildiamina, dând un azoderivat roșu-violaceu, colorimetricabil.





Sensibilitatea este de $0,05 \mu\text{g/ml}$; reacția nu este specifică oxizilor de azot (NO_2 , N_2O_4 , N_2O_5) și nu este dată de acidul azotic.

Tehnica de lucru:

Când recoltarea s-a făcut în microabsorbitoare, conținutul lor se trece cantitativ, fiecare în câte o eprubetă gradată, și se completează volumul la 10 ml cu soluție absorbantă.

5 ml din fiecare probă se prelucrează paralel cu un martor de reactivi și cu o scară de etaloane cu concentrația cuprinsă între $1\text{-}10 \mu\text{g}/5\text{ml}$ soluție absorbantă.

În fiecare eprubetă se adaugă 1 ml Reactiv Griess (amestec extemporaneu din părți egale de R. Griess I și R. Griess II). După 10 minute se citesc absorbanțele la spectrofotometru la 500 nm, în cuva de 1 cm, față de martorul de reactivi. Prin raportarea extincțiilor probelor la curba etalon se obțin concentrațiile C_1 și C_2 în $\mu\text{g NO}_2/\text{probă}$.

Calcul:

$$\text{mg NO}_2/\text{m}^3 = 2 (C_1 + C_2) / V,$$

unde: V = litri aer recoltați.

ANALIZA TOXICOLOGICA A ALCOOLULUI METILIC

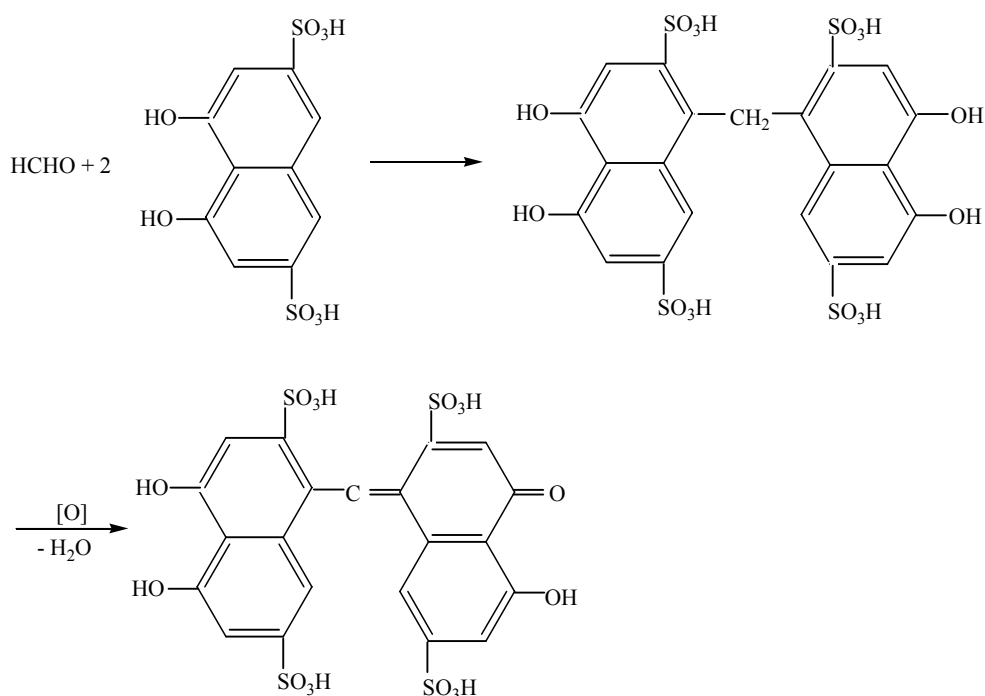
DETERMINAREA CANTITATIVĂ CU ACID CROMOTROPIC

Izolarea din sânge:

10 ml sânge se tratează cu 10 ml soluție saturată de acid picric și 20 ml apă distilată. Amestecul se supune distilării într-o aparatură adecvată. Distilatul se culege într-un balon cotat de 50 ml, care conține 5 ml apă distilată. Înainte de prelucrare se completează balonul la semn.

Principiul metodei:

Alcoolul metilic se oxidează la formaldehidă, care reacționează cu acidul cromotropic (acid 1,8-dihidroxi-3,6-naftalendisulfonic) în mediu acid, formând o colorație violetă, colorimetrabilă. Sensibilitatea reacției este de 1 μg metanol/ml.



Tehnica de lucru:

2 ml probă, un martor de reactivi și o scară de etaloane cu concentrația cuprinsă între 10-100 μg metanol/2 ml apă se aduc în eprubete gradate răcite în gheață. Se adaugă în fiecare 1 ml permanganat de potasiu 2% și 0,5 ml acid fosforic 25%. După 15 minute, excesul de permanganat de potasiu se decolorează cu soluție saturată de sulfat de sodiu, evitând excesul.

Probele (decolorate) se răcesc în gheață, se adaugă 5 ml acid cromotropic 0,1% în acid sulfuric concentrat. Se agită, apoi se încălzesc probele în baie de apă în fierbere timp de 30 minute. După răcire se completează volumul la 10 ml cu acid sulfuric concentrat. Se măsoară absorbanțele la spectrofotometru la 550 nm, în cuva de 1 cm, față de martorul de reactivi. Raportarea absorbanțelor se face pe curba etalon, obținându-se concentrația C în μg metanol/2 ml probă distilat.

Calcul:

$$\text{mg metanol/100 ml s\^ange} = [100 \times V \times C] / [1000 \times n \times p]$$

unde: V = volumul balonului cotat;

n = ml distilat luați în lucru;

p = ml s\^ange distilat.

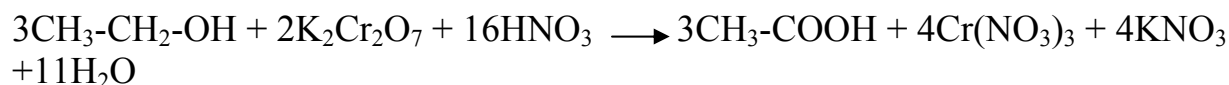
ANALIZA TOXICOLOGICĂ A ALCOOLULUI ETILIC

DETERMINAREA CANTITATIVĂ DIN SÂNGE PRIN METODA CORDEBARD

Izolarea din s\^ange:

10 ml s\^ange se aduc într-un balon de distilare de 250 ml, se adaugă 15-20 ml apă și 20 ml soluție saturată de acid picric, sau 40 ml soluție de acid succinic 5%. Se adaptează balonul la o instalație de distilare, iar distilatul se culege într-un balon cotat de 50 ml care conține 5 ml apă distilată, până aproape la cotă. După terminarea distilării, se completează balonul la semn cu apă distilată.

Principiul metodei: Alcoolul etilic este oxidat la rece cu bicromat de potasiu în mediu de acid azotic, până la acid acetic. Excesul de bicromat de potasiu se titrează iodometric.



Tehnica de lucru:

Într-un flacon cu dop rodat se măsoară 5 ml distilat, 3 ml bicromat de potasiu 0,1333 N și 4 ml acid azotic ($d=1,42$). Se lasă să reacționeze 15 minute, apoi se adaugă 20 ml soluție iodură de potasiu 1%. Se lasă la întuneric 5 minute, apoi se titrează iodul pus în libertate cu tiosulfat de sodiu N/25 (în prezența amidonului ca indicator).

Paralel se prelucrează cel puțin două probe din distilat și două probe martor cu apă distilată.

Calcul:

3 ml $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 0,1333N corespund la 10 ml $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ N/25

Echivalentul alcoolului etilic $=M/4 = 46,06/4 = 11,515$

1 ml $\text{C}_2\text{H}_5\text{-OH}$ N/25 $= 11,515/25,1000 = 0,0004606$ g etanol

1 ml $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ N/25 corespunde la 1 ml I_2 N/25, respectiv la 1 ml $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ N/25.

n = nr. ml tiosulfat de sodiu N/25 consumați la titrarea martorului. Când n este diferit de 10, se calculează factorul F al soluției de tiosulfat de sodiu: $F = 10/n$

n_1 = ml tiosulfat de sodiu N/25 consumați la titrarea probei de distilat (adică a excesului de bicromat de potasiu rămas după oxidarea etanolului din cei 5 ml distilat).

$(n - n_1) \times F = n_2F$ = corespunde la numărul de ml de bicromat de potasiu N/25 consumați de cei 5 ml distilat pentru oxidarea etanolului.

Cantitatea de etanol/1000 ml sânge $= n_2F \times 0,4606$

Observatii: Timpul de 15 minute, necesar oxidării alcoolului etilic, va fi riguros respectat.

Interpretarea rezultatelor: alcoolemia până la 0,37 g ‰ nu este însoțită de manifestări clinice.

Între: 0,37 – 1,12 g ‰ ~ simptomatologie caracterizată prin euforie;

1,12 – 1,50 g ‰ ~ beție ușoară;

1,50 – 2,15 g ‰ ~ beție propriu-zisă;

2,25 – 3,00 g ‰ ~ beție gravă;

3,00 – 4,00 g ‰ ~ beție comatoasă;

> 4,00 g ‰ ~ alcoolemie mortală.

DETERMINAREA CANTITATIVĂ A FENOLULUI TOTAL DIN URINĂ

Determinarea fenolului total din urină se efectuează pentru aprecierea intoxicațiilor cu fenol sau benzen, care se metabolizează în principal la fenol. În ultimul caz, este necesară analiza complementară a benzenului din sânge.

Izolarea din urină:

Fenolul conjugat se hidrolizează în mediu acid și apoi fenolul total se izolează prin distilare. Se diluează 5 ml urină cu 75 ml apă și se acidulează cu acid sulfuric 1:1. Se distilă la flacără mică, culegându-se aproximativ 45 ml distilat într-un balon cotat de 50 ml. Se completează balonul cotat la semn cu apă distilată.

Principiul metodei: Fenolul reduce acidul fosfomolibdenic (reactivul Folin-Ciociu) la albastru de molibden, colorimetric.

Sensibilitatea reacției este de 0,2 µg fenol/ml. Metoda este specifică.

Reactivi:

- 1) acid sulfuric 1:1, v/v
- 2) Reactiv Folin-Ciociu: La întrebuințare, soluția de reactiv se diluează cu un volum egal de apă distilată.
- 3) Carbonat de sodiu 20%
- 4) Soluție standard stoc de fenol:
Se dizolvă 120 mg fenol în acid clorhidric 0,1 N într-un balon cotat de 100 ml. Se determină conținutul exact de fenol: într-un vas conic cu dop rotat se iau 10 ml din soluția stoc și se adaugă 20 ml hidroxid de sodiu 0,1 N. Se încălzește pe baie de apă până la temperatura de 65°C, când se adaugă repede 20 ml soluție de iod 0,1 N. Se închide balonul și se titrează excesul de iod cu tiosulfat de sodiu 0,1 N, folosind ca indicator soluție de amidon (1 ml soluție de iod 0,1 N este consumat de 1,567 mg fenol).
- 5) Soluție standard de lucru: se diluează ex-temporae soluția stoc corespunzătoare, pentru a obține o concentrație de 10 µg/ml.

Tehnica de lucru:

Într-o eprubetă se iau 5 ml distilat și se adaugă 0,25 ml reactiv Folin-Ciociu și 1 ml carbonat de sodiu 20%. În paralel cu proba se prelucrează și un blank de reactivi (5 ml apă). Se agită și se introduc eprubetele într-o baie de apă. Se măsoară absorbanta după 5-10 minute la spectrofotometru, la 720 nm în cuva de 1 cm, față de blankul de reactivi.

Calcul:

Cantitatea de fenol din proba analizată ($C_p = \mu\text{g fenol} / 5\text{ml}$) se calculează din ecuația dreptei de calibrare (Fig.1): $y = A + Bx$, unde:

$$A = 0,033$$

$$B = 0,0168$$

cunoscând absorbanta probei citită la spectrofotometru.

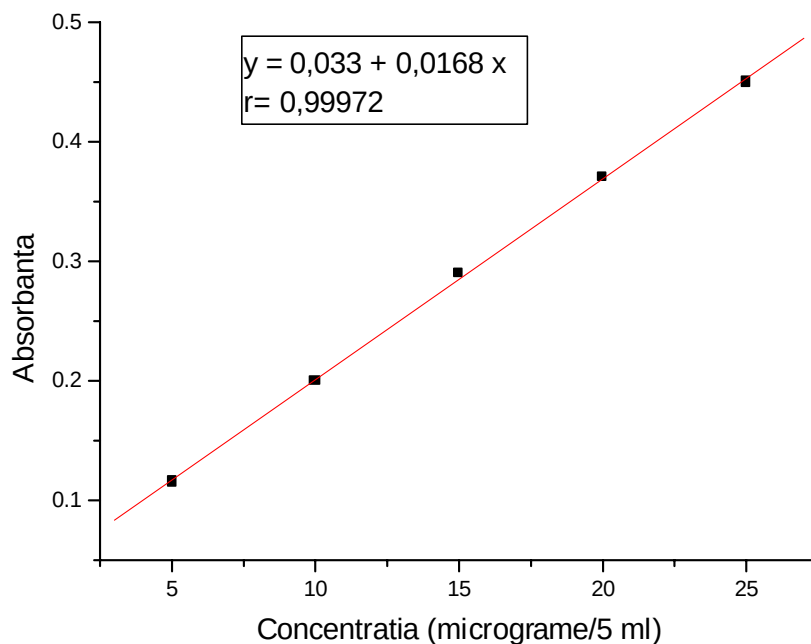


Fig.1. Dreapta de regresie a curbei etalon pentru dozarea fenolilor și parametrii ei caracteristici

$$\text{mg fenol total / l urină} = [C_p \times V] / [n \times p],$$

unde V este volumul balonului cotate, n reprezintă volumul de distilat prelucrat, iar p este volumul de urină supusă distilării.

Interpretarea rezultatelor:

Fenolul urinar reprezintă un indicator sensibil pentru expunerea la fenol și la benzen.

Persoanele neexpuse elimină în mod normal prin urină până la 10-16 mg / 24 ore fenol total. Fenolul urinar crește și după administrare de salicilați.

ANALIZA TOXICOLOGICĂ A FORMALDEHIDEI

DETERMINAREA CANTITATIVĂ CU ACETILACETONĂ

Recoltarea probelor:

Aerul se aspiră cu un debit de 0,5 l/minut prin 2 absorbitoare conținând fiecare câte 10 ml soluție absorbantă (apă distilată).

Principiul metodei:

Formaldehida reacționează cu acetilacetona în prezența acetatului de amoniu, formând 5-diacetil-1,4-dihidrolutină de culoare galbenă. Metoda este specifică. Sensibilitatea reacției este de 0,2 μg/ml.

Tehnica de lucru:

Conținutul celor 2 absorbitoare se unifică și se completează la 25 ml. Din aceștia se măsoară 5 ml, care se prelucrează paralel cu un martor de reactivi și cu o scară de etaloane cu concentrația cuprinsă între 2-20 μg formaldehidă/5 ml. În fiecare eprubetă se adaugă 2 ml reactiv acetilacetona (25 g acetat de amoniu, 2ml acid acetic glacial, 0,2 ml acetilacetona și apă ad 100 ml) și se încălzesc în baie de apă la 100°C.

După răcire, se măsoară absorbanta probei și a etaloanelor la spectrofotometru, la 420 nm în cuva de 1 cm, față de martorul de reactivi. Raportarea absorbantei probei se face pe curba etalon, obținându-se concentrația C în μg/probă.

Calcul:

$$\text{mg formaldehidă/m}^3 = [5 \times C] / V$$

unde: V = litri aer recoltați.

ANALIZA TOXICOLOGICĂ A ETILENGLICOLULUI

Etilenglicolul se analizează din aer și din unele băuturi alcoolice (vin). Din băuturi alcoolice se izolează prin antrenare cu vapori de apă.

Principiul metodei:

Etilenglicolul este oxidat cu acid periodic la formaldehidă. Aceasta se condensează cu fenilhidrazina, formând fenilhidrazona, care prin oxidare cu fericianura de potasiu dă un compus chinoniminic de culoare roșie, colorimetrabil. Sensibilitatea reacției este de 0,1 μg/ml. Metoda nu este specifică.

Tehnica de lucru:

Un volum de 250 ml băutură alcoolică se supune antrenării cu vapori de apă, culegându-se distilatul într-un balon cotat de 100 ml. 5 ml distilat se prelucurează paralel cu o scară de etaloane cu concentrația cuprinsă între 2-30 μg/5ml. În fiecare eprubetă se adaugă 1 ml acid periodic 0,1 N, se agită și după 1 oră (la temperatura camerei) se adaugă 2 ml arsenit de sodiu 0,5 M și se agită bine. După 5 minute se adaugă 5 ml fenilhidrazină hidroclorică 1%. Se lasă în repaus 5 minute, apoi se adaugă 0,5 ml fericianură de potasiu 2% (proaspăt preparată). După 10 minute se adaugă 0,5 ml acid clorhidric concentrat.

După 10 minute se măsoară absorbanțele probei și etaloanelor la spectrofotometru, la 530 nm în cuva de 1 cm, față de apă distilată.

Se calculează concentrația probei Cp în μg etilenglicol/5 ml distilat.

$$\text{mg etilenglicol/1000 ml băutură alcoolică} = [\text{Cp} \times \text{Vb}] / [\text{n} \times \text{p}],$$

unde: Vb = volumul balonului cotat;

n = ml distilat prelucrat;

p = ml băutură alcoolică supusă antrenării cu vapori de apă.

IDENTIFICAREA CRISTALELOR DE OXALAT DE CALCIU DIN URINĂ ÎN INTOXICAȚIILE CU ETILENGLICOL

Analiza sedimentului urinar:

Se realizează pe o probă proaspătă de urină, la 30-60 de minute după recoltare.

Urina se centrifughează la 3000 rpm, timp de 3-5 minute. Se îndepărtează supernatantul, sedimentul se resuspendă și este transferat cu o pipetă Pasteur pe o lamă de microscop, acoperindu-se cu o lamelă. Se examinează la microscop.

Interpretarea rezultatelor

Deoarece oxalatul este un metabolit al etilenglicolului, prezența cristalelor de oxalat de calciu în urină este o trăsătură frecvent întâlnită a intoxicației cu etilenglicol. În urină se întâlnesc două forme de oxalat de calciu:

- cristale octaedrice de dihidrat
- cristale de monohidrat sub formă de prismă

Prima formă (dihidrat) (Figura 1) este instabilă în condiții fiziologice normale; forma de dihidrat apare doar în prezența unor concentrații urinare crescute de calciu și de oxalat, cum este cazul intoxicațiilor cu etilenglicol. Forma dihidrat se poate transforma în monohidrat.

În practica clinică, se verifică sedimentul urinar la fiecare oră timp de cel puțin 5 ore după ingestie, înainte de excluderea unei intoxicații cu etilenglicol. Dacă se identifică cristale de oxalat de calciu după 2 ore de la ingerare, se administrează etanol ca antidot și se începe hemodializa.

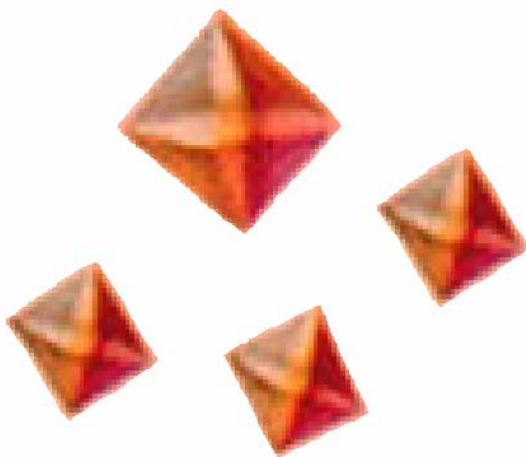


Figura 1. Cristale de oxalat de calciu dihidrat

ANALIZA TOXICOLOGICĂ A ANILINEI

DETERMINAREA CANTITATIVĂ A ANILINEI DIN AER PRIN FORMARE DE AZOCOLORANȚI

Izolarea:

Anilina din aer se captează prin reținere în soluții absorbante de acid sulfuric sau clorhidric.

Recoltarea probelor se face aspirând V l aer cu un debit de 1 l/minut prin două absorbitoare legate în serie, conținând fiecare câte 10 ml soluție absorbantă (acid sulfuric sau acid clorhidric 0,01 N).

Principiul metodei:

Anilina, după diazotare, se cuplează cu 1-N-naftiletildiamina în mediu acid sau cu acidul H (acid 8-amino-1-naftol-3,6-disulfonic) în mediu alcalin și formează un diazoderivat de culoare roșie.

Sensibilitatea reacției este de 1 μg / ml. Reacția nu este specifică, fiind pozitivă și pentru alte amine aromatice primare.

Tehnica de lucru:

Se prelucurează câte 5 ml din fiecare probă, paralel cu un martor de reactivi și o scară de etaloane cu concentrația cuprinsă între 5-25 μg anilină/5 ml. În fiecare eprubetă se adaugă 0,5 ml acid clorhidric 5%, 0,5 ml nitrit de sodiu 1%, se agită și după 15 minute se adaugă 2 ml hidroxid de sodiu 20% și 1 ml soluție de acid H 1%. Se agită și după 10 minute se măsoară absorbanțele probelor și etaloanelor la spectrofotometru, la 490 nm în cuva de 1 cm, față de martorul de reactivi.

Calcul:

Se calculează concentrația celor două probe (C_a și C_b - μg anilină/5 ml probă) prin extrapolare de pe curba de calibrare.

$$\text{mg anilina} / \text{m}^3 \text{ aer} = 2 \times (C_a + C_b) / V,$$

unde V - litri aer recoltați.

DETERMINAREA CANTITATIVĂ A ANILINEI DIN MEDII BIOLOGICE PRIN REACȚIA INDOFENOLULUI

Analiza toxicologică a anilinei din medii biologice (sânge, urină, organe) se efectuează după izolare prin distilare sau antrenare cu vapori de apă din mediu alcalin (pH = 8-9).

Principiul metodei:

Anilina, după oxidare la chinonimină, reacționează cu fenolul formând fenilchinonimina, de culoare albastră în mediu alcalin.

Reacția este deranjată de amoniac, toluidine și alte amine aromatice.

Tehnica de lucru:

Distilatul obținut după izolare se aduce cu apă distilată la volum fix în balon cotate și se prelucurează în continuare 5 ml, în paralel cu un martor de reactivi și o scară de etaloane cu concentrația cuprinsă între 5-25 μg anilină/5 ml. În fiecare eprubetă se adaugă 1 ml cloramină T 4%, se lasă în repaus 5 minute, apoi se adaugă 1 ml fenol 3%. După 10 minute se adaugă 2 ml hidroxid de sodiu 2%.

Se agită, se lasă în repaus 10 minute, apoi se măsoară absorbanțele la spectrofotometru la 615 nm, față de martorul de reactivi.

Calcul:

Se calculează concentrația probei (Cp - μg anilină/5 ml distilat) prin extrapolare pe curba de calibrare.

$$\text{mg anilina} / 100 \text{ ml sânge} = [\text{Cp} \times \text{V} \times 100] / [\text{n} \times \text{p} \times 1000],$$

unde: p = ml sânge analizat

V = volumul balonului cotate

n = ml distilat prelucrat

DETERMINAREA CANTITATIVĂ DIN URINĂ A P-AMINOFENOLULUI

Para-aminofenolul este principalul metabolit al anilinei; se elimină prin urină: liber, acetat și conjugat cu acid glucuronic. Pentru determinare, produsul conjugat se hidrolizează în mediu acid și apoi se distilă.

Principiul metodei:

p-Aminofenolul liber, prin cuplare cu fenol în prezența oxidanților formează indofenol de culoare albastră (în mediu alcalin), colorimetricabil.

Tehnica de lucru:

Într-un balon cu fund rotund se măsoară 10 ml urină (recoltată la ieșirea din lucru sau în primele 48 de ore de la expunere) și 5 ml acid clorhidric concentrat. Se adaptează un refrigerent ascendent și se hidrolizează pe baie de apă în fierbere timp de 90 minute. După răcire se filtrează printr-un filtru cantitativ, într-un balon cotate de 100 ml, spălând de câteva ori balonul și filtrul cu apă distilată. Se completează apoi balonul cu apă la semn.

2 ml filtrat se prelucreează paralel cu un martor de reactivi și cu o scară de etaloane cu concentrația cuprinsă între 2-25 μg p-aminofenol/2 ml. În fiecare eprubetă se adaugă 0,5 ml cloramină T 4% și 1 ml fenol 5%, se agită bine și după 10 minute se adaugă 2 ml amoniac concentrat. După 30 minute se măsoară absorbanta probei și a etaloanelor la spectrofotometru, la 600 nm în cuva de 1 cm, față de martorul de reactivi.

Raportarea absorbantei probei se face pe curba etalon, obținându-se concentrația C în μg p-aminofenol/probă.

Calcul:

$$\text{mg p-aminofenol/1000 ml urină} = [C \times V] / [n \times p]$$

unde: V = volumul balonului cotate;

n = ml probă prelucrată;

p = ml urină prelucrată.

Interpretarea rezultatelor:

În urma expunerii la vapori de anilină, în urină se elimină cantități de ordinul mg/l urină. La persoanele neexpuse, se pot regăsi cantități de ordinul μg/l urină.

DETERMINAREA METHEMOGLOBINEI DIN SANGE

Metoda EVELYN MALLOY

Principiul metodei:

Methemoglobina este o hemoglobină în care fierul se găsește în formă ferică. Ea este incapabilă să fixeze reversibil oxigenul, deci nu poate funcționa ca pigment respirator. În mod normal, mai puțin de 1% din hemoglobina totală (Hb) se găsește

sub formă de methemoglobină (MetHb), dar acest procent crește sub acțiunea unor derivați ca: nitriți, clorați, derivați de anilină și nitrobenzen, sulfamide, substanțe cunoscute sub denumirea de methemoglobinizante.

Dozarea MetHb sanguine se bazează pe absorbția spectrofotometrică a MetHb la 630 nm, lungime de undă la care oxihemoglobina (HbO_2) și cianmethemoglobina (CNMetHb) nu absorb decât foarte puțin. Metoda presupune dozarea pe de o parte a MetHb, iar pe de altă parte a Hb totale. Prin adăugarea de cianură de potasiu la o porțiune de hemolizat sanguin, se transformă toată MetHb prezentă în CNMetHb. Se măsoară absorbanta hemolizatului la 630 nm, înainte de adăugarea de cianură, când se determină absorbanta MetHb din sânge și a altor compuși care pot absorbi la această lungime de undă, și după adăugarea de cianură, când se determină doar absorbanta corespunzătoare celorlalți compuși din sânge. Diferența între aceste două absorbante este proporțională cu cantitatea de MetHb prezentă.

Într-o altă porțiune de hemolizat se adaugă fericianură de potasiu, care transformă toată hemoglobina prezentă în MetHb. Măsurarea absorbantei acestei porțiuni de hemolizat înainte și după adăugarea de cianură de potasiu, permite determinarea hemoglobinei totale.

Rezultatul este exprimat în procente de MetHb în raport cu hemoglobina totală din probă.

- Reactivi:**
- tampon fosfat M/20, pH 6,6
 - soluție apoasă de fericianură de potasiu, 5g/ 100 ml
 - soluție apoasă de KCN 5 g/100 ml, neutralizată cu un volum egal de acid acetic 12%

Tehnica de lucru:

a) Prepararea soluției de hemoglobină

Într-un tub de centrifugă se introduc: 0,2 ml sânge total bine omogenizat (recoltat pe heparină sau EDTA) și 5 ml apă distilată.

Se agită, se așteaptă 10 minute, apoi se adaugă 5 ml tampon fosfat 6,6.

Se centrifughează 5 minute la 4000 rpm, pentru a elimina stroma globulară. Supernatantul trebuie să fie limpede.

b) Determinarea spectrofotometrică

Citirea se face la spectrofotometru la 630 nm, față de tampon fosfat M/20, diluat cu apă distilată 1:1.

	<i>Eprubeta A</i>	<i>Eprubeta B</i>
Supernatant	3 ml	3 ml
Fericianură de potasiu 5%	1 picătură	0
Apă distilată	0	1 picătură
Amestecare. Citire la 630 nm după 5 minute.		
KCN 5%	1 picătură	1 picătură
Amestecare. Citire la 630 nm după 5 minute.		

Absorbția datorată MetHb prezente inițial în sânge este $A_{1B} - A_{2B}$, unde A_{1B} este absorbanta soluției din eprubeta B, prima citire, iar A_{2B} , este absorbanta soluției din eprubeta B, a doua citire.

Absorbția datorată MetHb totale, provenită din oxidarea hemoglobinei și a oxihemoglobinei de către fericianura de potasiu și methemoglobina prezintă inițial în sânge, este $A_{1A} - A_{2A}$, unde A_{1A} este absorbanta soluției din eprubeta A, prima citire, iar A_{2A} este absorbanta soluției din eprubeta A, a doua citire.

Raportul : $[(A_{1B} - A_{2B}) / (A_{1A} - A_{2A})] \times 100$

exprimă cantitatea de MetHb dozată pentru 100 părți de hemoglobină totală.

Observații practice importante: Este interzis să se arunce conținutul cuvelor și eprubetelor în chiuvetă, deoarece există riscul de emanații de acid cianhidric care provoacă intoxicații. Conținutul eprubetelor se aruncă într-un vas cu soluție concentrată de hipoclorit. Dacă pe masa de lucru sau pe degete ajunge cianură de potasiu, se șterge imediat și se spală cu apă.

Interpretarea rezultatelor: La subiecții normali, nivelul de methemoglobină este sub 2%. Acest nivel crește în intoxicații cu: clorat de potasiu, nitriți, anilină, nitrobenzen, ortotoluidină, acetanilidă, antipirină, fenacetină, sulfamide, clorochin, xilocaină, etc.

Methemoglobina este de asemenea prezentă în anumite maladii congenitale ce evoluează cu un deficit al sistemelor de reducere a hemoglobinei. Pancreatita acută hemoragică poate conduce la nivele ridicate de methemoglobină în sânge.

Moartea survine la **nivele de methemoglobină de 66%** din hemoglobina totală.

Dozarea methemoglobinei trebuie să se realizeze cât mai repede posibil, la maxim o oră de la recoltarea sângelui, pentru a evita reducerea methemoglobinei la hemoglobină, iar sângele trebuie recoltat pe heparină sau EDTA, nu pe fluorură de sodiu (risc de formare a unui complex fluor-methemoglobină).

Dozarea MetHb este dependentă de pH. pH-ul reacției trebuie să fie cuprins între 6,6 și 7,2, pentru a evita formarea MetHb alcaline, al cărui spectru diferă de

cel al MetHb. De asemenea, hemolizatul trebuie să fie perfect limpede după centrifugare, pentru a nu altera citirile spectrofotometrice.

Utilizarea cianurii de potasiu permite evitarea interferenței altor substanțe, cum ar fi sulfhemoglobina, care deși prezintă absorbție la 630 nm, nu va fi dozată, deoarece nu reacționează cu cianura de potasiu, iar măsurarea se face prin diferență.

ANALIZA TOXICOLOGICĂ A ACIDULUI CIANHIDRIC

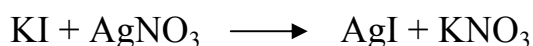
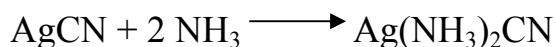
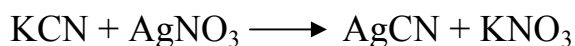
DETERMINAREA CANTITATIVĂ DIN SÂNGE PRIN METODA ARGENTIMETRICĂ

Izolarea din sânge :

10 ml sânge se aduc într-un balon cu fund rotund, se adaugă 20 ml apă distilată și 3 ml acid clorhidric 0,1 N. Se adaptează imediat balonul la o instalație de distilare și se captează distilatul într-un balon cotate de 50 ml, ce conține 5 ml hidroxid de sodiu sau de potasiu 0,1 N. Înainte de prelucrare, balonul cotate se completează la semn cu apă distilată.

Principiul metodei:

Ionul cianură formează cu azotatul de argint cianura de argint, solubilă în amoniac, iar excesul de azotat de argint reacționează cu iodura de potasiu, dând iodura de argint, insolubilă în amoniac. Această opalescență servește drept indicator.



Tehnica de lucru:

Într-un balon Erlenmayer se aduc 15 ml distilat, 2 ml iodură de potasiu 10% și 1 ml amoniac 10%. Se titrează încet cu azotat de argint 0,001 N, până la apariția unei opalescențe gălbui, care persistă prin agitare.

Calcul:

Rezultatele se exprimă în mg HCN/100 ml sânge:

$$\text{mg HCN/100 ml s\ange} = [a \times f \times 0,02701 \times V_b \times 100] / [p \times n]$$

unde: a = ml AgNO₃ 0,001 N folosiți la titrare,
 f = factorul soluției de AgNO₃ 0,001 N,
 V_b = volumul distilatului,
 p = ml s\ange supus distilării,
 n = ml distilat prelucrat.

DETERMINAREA CANTITATIVĂ A TIOCIANAȚILOR

Tiocianații sunt principalii metaboliți ai acidului cianhidric, ușor eliminabili pe cale renală. Determinarea cantitativă se poate face din ser și din urină.

Principiul metodei:

Tiocianții formează cu sărurile de fier (III) tiocianatul de fier (III) de culoare roșie (Reacția Liebig).

Sensibilitatea reacției este de 1 μg/ml. Reacția este specifică.

Tehnica de lucru:

- a) 10 ml **urină** se aduc într-un balon cotat de 25 ml, se tratează cu 5 ml acid tricloracetic 10% (pentru deproteinizare), se agită și după 10-15 minute se completează cu apă la semn. Se filtrează.
- b) 2 ml **ser** se tratează cu 2 ml acid tricloracetic 10% și după 10 minute se completează volumul la 10 ml cu apă distilată, apoi se centrifughează sau se filtrează.

2,5 ml filtrat, obținut prin tehnica a) sau b), se prelucrează paralel cu un martor de reactivi și cu o scară de etaloane cu concentrația cuprinsă între 2-10 μg SCN⁻/2,5 ml astfel: se adaugă 1 ml azotat de fier (III) 5% în acid azotic 1N, se agită bine și după 15 minute se măsoară absorbantele la spectrofotometru, la 470 nm în cuva de 1 cm, față de martorul de reactivi.

Absorbantele probelor se raportează la curba etalon, obținându-se concentrația C în μg SCN⁻/probă.

Observații: dacă proba de urină este intens colorată, se va citi și absorbanta a 2,5 ml din filtrat diluat cu 1 ml apă distilată, față de martorul de referință. Valoarea obținută se va scădea din absorbanta probei de analizat.

Calcul:

$$\text{mg tiocianați/100 ml ser} = [100 \times C \times V] / [n \times p \times 1000]$$

$$\text{mg tiocianați/l urină} = [1000 \times C \times V] / [n \times p \times 1000]$$

unde: V = volumul balonului cotate;

n = ml prelucrați;

p = ml probă biologică luată în lucru.

Interpretarea rezultatelor

Tiocianații se pot găsi în serul provenit de la nefumători în concentrații până la 2 mg/100 ml, iar în serul de la fumători, în concentrații de până la 3 mg/100 ml. În urină, nivelele maxime sunt de 5 mg/1000 ml la nefumători și 16 mg/1000 ml la fumători. Se consideră ca indicatori ai expunerii la acid cianhidric sau compuși ai acestuia, nivele de peste 8 mg/100 ml ser și peste 30 mg/1000 ml urină.

ANALIZA TOXICOLOGICĂ A HIDROCARBURILOR AROMATICE: INDICATORI AI EXPUNERII

DETERMINAREA ACIDULUI HIPURIC PRIN METODA SPECTROFOTOMETRICĂ ÎN VIZIBIL

Toluenul se utilizează ca solvent pentru fabricarea adezivilor, a vopselelor sau a solvenților pentru vopsele. Intoxicația acută este de obicei consecința expunerii accidentale masive sau a inhalării voluntare a adezivilor sau a solvenților.

Aproximativ 80% din doza absorbită este metabolizată la acid benzoic, care este apoi conjugat cu glicina, formând **acid hipuric**. Astfel, măsurarea excreției urinare a hipuratului poate fi utilă pentru evaluarea expunerii cronice la toluen. Deoarece acidul benzoic și benzoatul de sodiu, care se utilizează ca și conservanți alimentari, sunt de asemenea metabolizați la hipurat, rezultatele determinărilor trebuie interpretate cu prudență. Determinarea cantitativă se realizează pe probe de urină.

Reactivi:

1. Acid clorhidric diluat (0,05 mol/l)

2. Reactiv dimetilaminobenzaldehidă [soluție de p-dimetilaminobenzaldehidă (40g/l) în anhidridă acetică ce conține câteva cristale (aproximativ 0,5 g) acetat de sodiu anhidru]
3. Clorură de sodiu
4. Silicagel precipitat

Etaloane

Urină normală (blanc) și urină în care s-a adăugat acid hipuric pentru a obține concentrații de 0,2, 0,5, 1,0 și 2,0 g/l. Toate etaloanele se vor prepara cu aceeași urină. Soluțiile sunt stabile timp de o lună dacă se conservă la 4°C și la întuneric.

Tehnica de lucru:

1. 1 ml probă sau standard se aduce la pH 2 cu acid clorhidric diluat și se adaugă clorură de sodiu până când soluția se saturează.
2. Se adaugă 2 ml amestec eter etilic / metanol (9:1), se agită rapid 1 minut și se centrifughează 5 minute.
3. Se aspiră stratul eteric superior și se transvazează într-o altă eprubetă; se extrage din nou faza apoasă cu 2 ml amestec eter etilic / metanol (9:1).
4. Se reunesc extractele eterice și se adaugă în altă eprubetă aproximativ 0,5 g silicagel precipitat pentru 1 ml soluție eterică.
5. Se evaporă solventul, se adaugă 3 ml reactiv dimetilaminobenzaldehidă și se încălzește la 135°C timp de 5 minute.
6. Se răcește, se adaugă 4 ml metanol, se agită rapid 1 minut și apoi se centrifughează 5 minute.
7. Se aspiră extractul metanolic și se trece în altă eprubetă. Se adaugă 4 ml metanol peste silicagel și se repetă extracția.
8. Se reunesc extractele metanolice și se măsoară absorbanta la 460 nm, față de un extract obținut din urină fără acid hipuric (blanc).

Calcul

Se reprezintă grafic absorbanta soluțiilor etalon în funcție de concentrația în acid hipuric și prin extrapolare se calculează concentrația probei. Este important să se utilizeze aceeași urină pentru prepararea etaloanelor și a blancului, deoarece excreția hipuratului variază în funcție de aportul alimentar de benzoat.

Sensibilitatea reacției: 0,1 g/l hipurat

DETERMINAREA SPECTROFOTOMETRICĂ ÎN U.V. A ACIDULUI HIPURIC

Principiul metodei: acidul hipuric are un maxim de absorbție la 227 nm, în timp ce acidul uric are două maxime de absorbție, la 227 și 287 nm. Deci, în prezența ambilor acizi:

Absorbanța la 227 nm, $A_{227} = \text{ACID HIPURIC} + \text{ACID URIC}$; în timp ce absorbanța la 287 nm, $A_{287} = \text{ACID URIC}$ (singur).

Deoarece raportul absorbanțelor la lungimile de undă corespunzătoare maximelor acidului uric este constant, $A_{227} = 0,73 \times A_{287}$, se poate calcula valoarea absorbției acidului uric la 227 nm și scădea din valoarea absorbției totale (acid uric + acid hipuric), obținându-se absorbția datorată numai acidului hipuric. Determinarea absorbanțelor în UV se face pe eluatul apos obținut din separarea acidului uric de acidul hipuric, pe rășină schimbătoare de ioni.

Sensibilitatea reacției este de 1 μg/ml. Metoda este specifică.

Tehnica de lucru:

Separarea: Rășina Dowex 50 reține substanțele interferente, lăsând să treacă numai acizii uric și hipuric. Se introduce în coloane un strat de rășină de 3 ml. Se așează sub coloane eprubete gradate de 20 ml, pentru culegerea eluentului. Se pipetează în coloane 1 ml urină proaspăt recoltată diluată 1:10 cu apă. După ce a pătruns complet în rășină, se adaugă porțiuni succesive de apă până la recoltarea a aproximativ 19 ml eluent (P) și se completează la 20 ml cu apă. Pe altă coloană se trece 1 ml soluție standard diluată 1:10 cu apă, apoi apă, până când în eprubetă s-au adunat aproximativ 19 ml lichid (S) și se completează la 20 ml cu apă. Pe a treia coloană se trece numai 1 ml apă, obținându-se blancul (B).

Măsurarea absorbanțelor: se face la un spectrofotometru UV în cuve de cuarț de 1 cm, la 227 și 287 nm.

Calcul:

Rezultatele se exprimă în g acid hipuric / litru urină.
Se calculează absorbanța acidului uric la 227 nm:

$$A_{AU-227} = 0,73 \times A_{287}$$

și se scade din A_{227} citită (AU + AH), deci:

$$AP_{AH} = A_{(AU+AH)-227} - 0,73 \times A_{AU-287}$$

Se calculează astfel AP_{AU} și AS_{AH} (pentru standard, A_{287} trebuie să fie zero, deci se ia AS_{227} fără corecție).

Deoarece standardul are concentrația de 1 g acid hipuric / litru urină:

$$\text{g acid hipuric/litru urină} = AP_{AH} / AS_{AH}.$$

Interpretarea rezultatelor

Concentrațiile urinale ale acidului hipuric sunt cuprinse în mod normal între 0,1 și 0,2 g/l; concentrații mai mari de 1 g/l indică o expunere la tolueen, dacă sunt excluse alte surse de benzoat. Trebuie menționat faptul că în cazul intoxicațiilor acute cu tolueen, moartea poate surveni înainte de creșterea excreției de hipurat.

DETERMINAREA SULFAT INDEXULUI PRIN METODA NEFELOMETRICĂ**Principiul metodei:**

Sulfat-indexul este raportul dintre sulful anorganic (eliminat prin urină sub formă de sulfați) și sulful total (anorganic și sub formă de sulfoconjugați). Sulful urinar se dozează măsurând turbiditatea produsă prin reacția sulfaților cu clorură de bariu, în mediu acid.

Tehnica de lucru:

Sulful anorganic: 0,5 ml se tratează cu 1 ml acid clorhidric 1:10, 5 ml apă distilată și 0,5 ml clorură de bariu 10%. Se agită și după 30 de minute se măsoară turbiditatea la 660 nm în cuva de 1 cm, se notează E_1 .

Sulf conjugat + sulf anorganic: 5 ml urină și un martor de reactivi se tratează fiecare cu 2,5 ml acid clorhidric concentrat ($d=1,19$) și 2,5 ml apă. Se mențin probele pe baie de apă în fierbere 15 minute. Se răcesc și se aduc la 25 ml cu apă distilată. Peste 2,5 ml lichid se adaugă 4 ml apă și 0,5 ml clorură de bariu 10%. Se agită și după 30 minute se măsoară turbiditatea probei E_2 , la 660 nm în cuva de 1 cm, în compensație cu martorul.

Calcul:

Nu este necesară o etalonare, întrucât interesează numai raportul turbidităților.

$$\text{Sulfat-index} = E_1 / E_2$$

Compararea probelor se poate face și față de o scară de etaloane cu concentrațiile cuprinse între 10-200 $\mu\text{g}/6,5$ ml, preparată din sulfat de sodiu, peste care se adaugă 0,5 ml clorură de bariu 10%. În acest caz, sulfat-indexul este dat de raportul concentrațiilor:

$$\text{Sulfat-index} = C_1 / C_2$$

Interpretarea rezultatelor:

În mod normal, sulfat-indexul este $\geq 0,85$. El este scăzut în caz de absorbție recentă de benzen sau de alte substanțe care se detoxifică prin sulfoconjugare (cetone ciclice, crezoli, fenoli, naftalină, sulfură de carbon etc.). Pentru o interpretare corectă se recomandă determinarea sulfat-indexului la muncitori înainte și după expunere, deci se recoltează urina de dimineață (înaintea începerii activității) și urina de la sfârșitul activității (până la 3 ore de la expunere).

ANALIZA TOXICOLOGICĂ A METALELOR

DETERMINAREA CANTITATIVĂ A MERCURULUI DIN URINĂ

Analiza toxicologică a mercurului și a compușilor săi din probe biologice și din produse agro-alimentare contaminate se face după izolarea lui prin mineralizare.

Mineralizarea probelor:

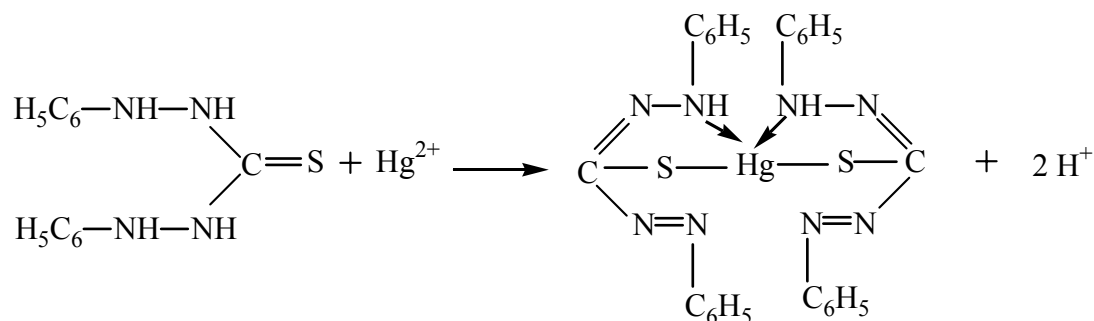
Se măsoară **p** ml urină într-un flacon de 250 ml, se adaugă 5 ml acid sulfuric concentrat și 15 ml permanganat de potasiu, soluție saturată. Se încălzește pe baie de nisip (moderat, astfel încât lichidul să nu ajungă la fierbere), acoperind flaconul cu o sticlă de ceas. Se continuă încălzirea până când lichidul devine limpede, având un precipitat brun la fund. Dacă se consumă tot permanganatul, se mai adaugă câțiva ml și se continuă încălzirea flaconului până când lichidul nu se mai decolorează.

După răcirea lichidului, acesta se filtrează și se aduce volumul la o valoare fixă (**V** - volumul total al mineralizatului) cu apă.

Se prelucrează în continuare **n** ml mineralizat. Se reduce excesul de permanganat adăugând 5 ml acid sulfuric (1:1) și încălzind proba 1-2 minute pe baie de apă. Dacă persistă culoarea roz a permanganatului, se adaugă hidroxilamină 10%, picătură cu picătură, până la obținerea unei soluții incolore. Se lasă proba în repaus cel puțin o oră.

Principiul metodei:

Ionul Hg^{2+} formează cu ditizona (difeniltiocarbazona) la pH 1,5 – 2, un complex de culoare roșie-portocalie.



Sensibilitatea reacției este de 0,1 μg/ml. Specificitatea metodei este asigurată prin chelatarea celorlalte metale cu EDTA-Na₂ la pH 1,5 - 2, condiție în care Hg (II) nu se combină.

Tehnica de lucru:

Proba astfel obținută se trece cantitativ într-o pâlnie de separație, se tratează cu 5 ml EDTA-Na₂ 0,1 N și se agită. Se adaugă apoi 2 ml reactiv ditizona 0,005% (dizolvată în solvent organic - toluen, benzen sau cloroform) și se agită 1-2 minute. Se completează stratul de fază organică cu încă 8 ml de solvent organic, se agită și se separă cele două faze, reținând faza organică colorată, care se spală, prin agitare în pâlnie de separație, inițial cu 10 ml apă distilată, apoi cu 20 ml soluție de spălare (amestec format din 98 ml hidroxid de sodiu 0,02 N și 2 ml hidroxilamină 10%). După separare, stratul de solvent se filtrează într-o eprubetă gradată printr-un filtru uscat și se completează volumul la 10 ml cu solvent.

Paralel se prelucrează, în aceleași condiții ca și proba, o scară de etaloane cu concentrația cuprinsă între 5-20 μg Hg (II) / n ml apă distilată.

Se măsoară absorbanțele probei și etaloanelor la spectrofotometru la 490 nm față de un martor de solvent organic și se calculează concentrația probei (C_p = μg Hg (II) / n ml mineralizat prelucrat).

Calcul:

$$\mu\text{g Hg (II)} / \text{urina din 24 ore} = (\text{C}_p \times \text{V} \times \text{N}) / (\text{n} \times \text{p}),$$

unde N = ml urina recoltată în 24 ore.

Interpretarea rezultatelor:

La persoanele fără expunere profesională la mercur, se elimină prin urină până la 24 μg Hg (II) / 24 ore. Nivele de peste 100 μg / 24 ore sunt considerate semn de impregnare a organismului cu mercur.

DETERMINAREA CANTITATIVĂ A CADMIULUI DIN URINĂ

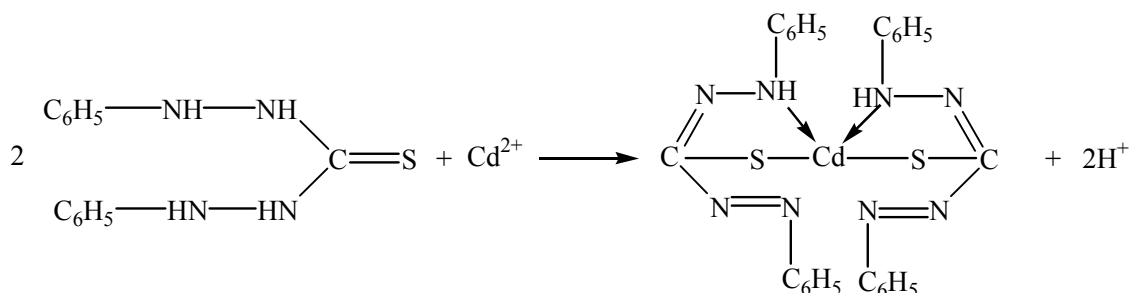
Analiza toxicologică a cadmiului din probe biologice și din alimente se face după distrugerea materiei organice prin mineralizare.

Mineralizarea probelor:

Se supun mineralizării p ml urină, după tehnica prezentată la izolarea prin mineralizare a plumbului din urină. Volumul mineralizatului se aduce în final la o valoare fixă cu apa (V - volumul total al mineralizatului).

Principiul determinării:

Ionul Cd^{2+} formează cu ditizona (difeniltiocarbazona), la pH 9 – 11, un complex de culoare roșie, insolubil în apă și solubil în solvenți organici.



Ditizona se oxidează ușor în contact cu oxigenul din aer la difeniltiocarbodiazonă, care nu formează chelat. Procesul este împiedicat de amoniac.

Ditizona interacționează cu mai multe metale. Selectivitatea reacției este asigurată de pH-ul alcalin și de prezența anumitor complexanți (tartrat, cianură). În prezența unor concentrații de NaOH mai mari de 5%, ditizonații de Pb^{2+} , Bi^{2+} , Sn^{2+} și Zn^{2+} se descompun.

Reactivi:

- 1) Amoniac 25%
- 2) Soluție de tartrat de sodiu și potasiu 20%
- 3) Soluție de hidroxid de sodiu 20%
- 4) Ditizonă 0,005% (se dizolvă într-un solvent organic - toluen, benzen sau clorform)
- 5) Soluție etalon Cd^{2+} (0,2 mg/ml – se dizolvă la 100°C - 0,3262 g clorură de cadmiu în 5 ml HCl 5M și se completează la 1000 ml cu apă deionizată)

Tehnica de lucru:

Se prelucrează n ml mineralizat, care se diluează cu apă distilată la 25 ml. Într-o pâlnie de separație se tratează cu 2 ml soluție tartrat 20%, 0,5 ml amoniac 25% și 5 ml soluție hidroxid de sodiu 20%. Se adaugă apoi 2 ml reactiv ditizonă 0,005% și se agită 1-2 minute. Se completează stratul de fază organică cu încă 8 ml solvent organic, se agită și se separă cele două faze, reținând faza organică, colorată, care se spală, prin agitare în pâlnie de separație, cu 20 ml soluție de spălare. După separare, stratul de solvent se filtrează într-o eprubetă gradată printr-un filtru uscat și se completează volumul la 10 ml cu solvent.

Paralel se prelucrează în aceleași condiții ca proba o scară de etaloane cu concentrația cuprinsă între 4-20 $\mu\text{g Cd}^{2+}$ / 25 ml apă distilată.

Se măsoară absorbanta probei și a etaloanelor la spectrofotometru la 520 nm față de un martor de solvent organic și se calculează concentrația probei ($C_p = \mu\text{g Cd}^{2+} / n$ ml mineralizat prelucrat).

Calcul:

$$\mu\text{g Cd}^{2+} / \text{urina din 24 ore} = (C_p \times V \times N) / (n \times p),$$

unde : N = ml urină recoltată în 24 de ore.

Interpretarea rezultatelor:

Cadmiul nu este un bioelement. În condiții obișnuite, se elimină $\sim 0,025$ mg/litru urină. La persoanele expuse se ating valori $> 0,1$ mg/litru urină.

DETERMINAREA CANTITATIVĂ A PLUMBULUI DIN URINĂ

Analiza toxicologică a plumbului și a compușilor săi din probe biologice și din alimente se face după izolarea lui prin mineralizare.

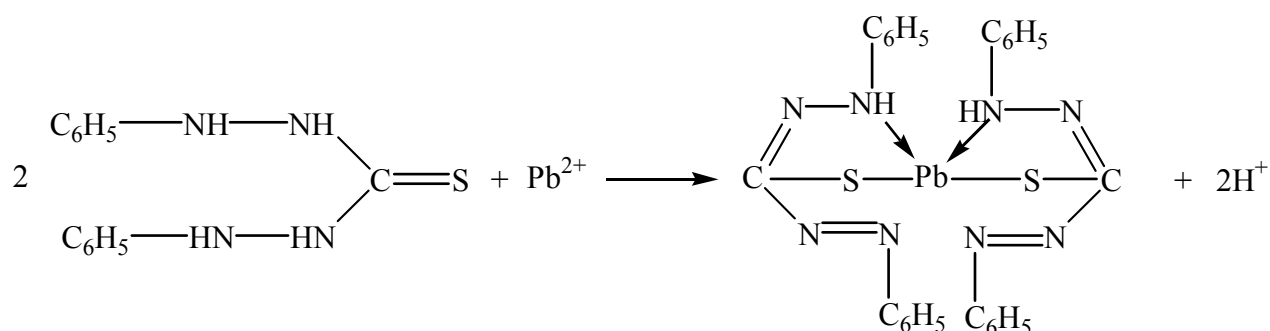
Mineralizarea probelor:

Se măsoară p ml urină într-un flacon de 100 ml, se adaugă 10 ml acid azotic concentrat ($d = 1,42$) și 30 ml permanganat de potasiu soluție saturată. Se încălzește pe baie de nisip (moderat, astfel încât lichidul să nu ajungă la fierbere), acoperind flaconul cu o sticlă de ceas. Se continuă încălzirea până când lichidul devine limpede, având un precipitat brun la fund. Dacă se consumă tot permanganatul (dispare precipitatul brun), se mai adaugă câțiva ml permanganat și se continuă încălzirea flaconului până când lichidul nu se mai decolorează.

După răcirea lichidului, se reduce excesul de permanganat, adăugând hidroxilamină 10%, picătură cu picătură, până la dispariția precipitatului brun, și se adaugă încă 2 ml hidroxilamină. Volumul mineralizatului se aduce în final la o valoare fixă cu apă (V - volumul total al mineralizatului).

Principiul determinării:

Ionul Pb^{2+} formează cu ditizona (difeniltiocarbazona), la pH 9 – 11, un complex de culoare roșie.



Sensibilitatea reacției este de 0,1 μg/ml. Specificitatea metodei pentru ionii Pb^{2+} este asigurată atât de pH-ul alcalin la care se efectuează extracția (9 – 11), cât și prin adăugare de complexanți (citrăt, cianură), care leagă metalele interferente.

Ditizona se oxidează ușor în contact cu oxigenul din aer la difeniltiocarbodiazonă, care nu formează chelat. Procesul este împiedicat de amoniac.

Reactivi:

- 1) Amoniac (d = 0,88)
- 2) Soluție tampon (conține complexanți; se dizolvă 100 g acid citric în 60 ml apă deionizată și se adaugă amoniac în porțiuni mici, răcind sub jet de apă, până la pH 6,8 – viraj în roșu aprins cu roșu de fenol, încercând cu picătura pe o placă de porțelan; se adaugă apoi 2,5 g sulfat de sodiu și 5 g cianură de potasiu și se aduce cu apă deionizată la 500 ml. Se elimină metalele interferente existente în soluție, prin tratare succesivă cu porțiuni mici de ditizonă 0,05%, până când culoarea ditizonei nu se mai modifică. Se spală de 2-3 ori cu câte 10 ml cloroform și se completează volumul la 1000 ml cu amoniac)
- 3) Ditizonă 0,005% (se dizolvă într-un solvent organic - toluen, benzen sau cloroform)

- 4) Soluție de spălare (se dizolvă 0,1 g cianură de potasiu în 1000 ml apă deionizată și se adaugă 10 ml amoniac)
- 5) Soluție etalon Pb^{2+} (1 mg/ml – se dizolvă 1,596 g azotat de plumb în 1000 ml acid azotic diluat 1:100)

Tehnica de lucru:

Se prelucrează n ml mineralizat, care se diluează cu apă distilată la 25 ml. Într-o pâlnie de separație se alcalinizează cu 15 ml soluție tampon, apoi se adaugă 2 ml reactiv ditizonă 0,005% și se agită 1-2 minute. Se completează stratul de fază organică cu încă 8 ml solvent organic, se agită și se separă cele două faze, reținând faza organică colorată, care se spală, prin agitare în pâlnie de separație, cu 20 ml soluție de spălare. După separare, stratul de solvent se filtrează într-o eprubetă gradată printr-un filtru uscat (care conține sulfat de sodiu anhidru) și se completează volumul la 10 ml cu solvent.

Paralel se prelucrează în aceleași condiții ca proba o scară de etaloane cu concentrația cuprinsă între 4-20 $\mu\text{g Pb}^{2+}$ / 25 ml apă distilată.

Se măsoară absorbanta probei și a etaloanelor la spectrofotometru, la 500 nm, față de un martor de solvent organic și se calculează concentrația probei ($C_p = \mu\text{g Pb}^{2+} / n$ ml mineralizat prelucrat).

Calcul:

$$\mu\text{g Pb}^{2+} / \text{urina din 24 ore} = (C_p \times V \times N) / (n \times p),$$

unde N - ml urina recoltată în 24 ore.

Interpretarea rezultatelor:

Diagnosticul intoxicației cu plumb, în special în cazul unei intoxicații cronice, se stabilește pe baza examinărilor clinice și a analizelor toxicologice (plumbemie, plumburie), cât și pe baza unor analize biochimice (coproporfirine, acid delta-aminolevulinic în urină, hematii cu granulații bazofile).

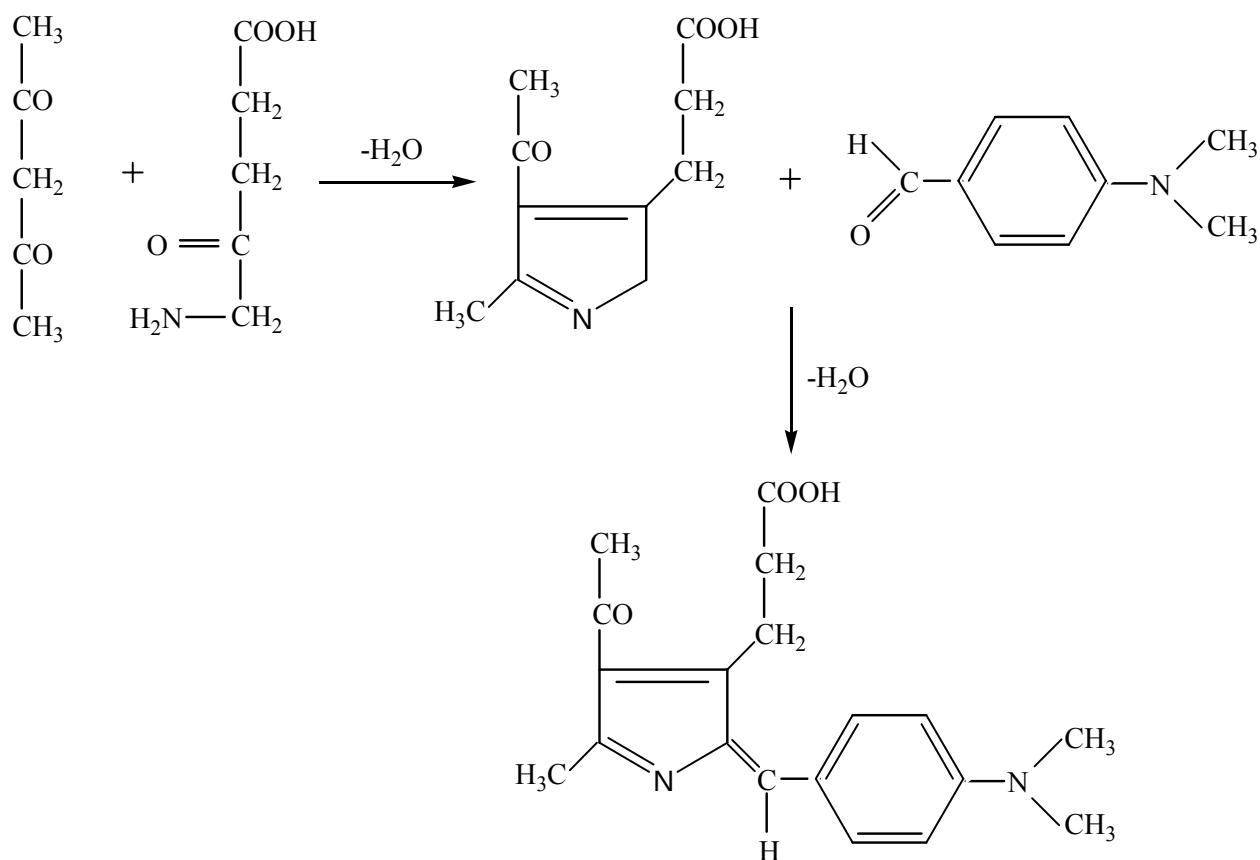
Valorile normale și patologice ale plumburiei sunt:

< 40 $\mu\text{g \%}$	valori normale
< 80 $\mu\text{g \%}$	valori acceptate
80 – 120 $\mu\text{g \%}$	valori excesive
> 120 $\mu\text{g \%}$	valori periculoase

DETERMINAREA CANTITATIVĂ A ACIDULUI Δ -AMINOLEVULINIC DIN URINĂ

Principiul metodei:

Metoda se bazează pe condensarea acidului Δ -aminolevulinic (Δ -ALA) cu acetilacetona, când rezultă un compus cu structură pirolică, care cu p-dimetilaminobenzaldehida formează un compus de culoare roșie, colorimetrabil.



Tehnica de lucru:

La 1 ml urină (din urina recoltată/24 ore) se adaugă 9 ml soluție de diluare (100 ml soluție acetat de sodiu 0,5 N în care se suspendă 0,25 g cărbune medicinal). Se agită de mai multe ori și apoi se filtrează. Din filtrat se măsoară câte 3 ml în două eprubete, una constituind proba, iar cealaltă martorul. În probă se adaugă 0,1 ml acetilacetona și apoi se țin ambele eprubete timp de 20 minute în baia de apă în fierbere. După răcire se adaugă în fiecare 3 ml Reactiv Erlich modificat (1 g p-dimetilaminobenzaldehidă se dizolvă în 35 ml acid acetic glacial,

se adaugă 8 ml acid percloric 70% și se aduce volumul la 50 ml cu acid acetic glacial).

După 15 minute se măsoară absorbanța probei la spectrofotometru, la 553 nm în cuva de 1 cm, față de martorul de reactivi. Această valoare se raportează la curba etalon obținută prin prelucrarea unor standarde cu concentrația cuprinsă între 1-10 μg Δ -ALA/3 ml, obținându-se concentrația C în μg /probă.

Calcul:

$$\mu\text{g } \Delta\text{-ALA/l urină} = [C \times 1000] / 0,3$$

$$\mu\text{g } \Delta\text{-ALA/24 ore} = [C \times V] / 0,3$$

unde: V = volumul de urină recoltată/24 ore (ml).

Interpretarea rezultatelor:

Valorile normale în urină sunt de 0,6 mg%. Valorile acceptate se situează între 0,6-2 mg%, valorile între 2-4 mg% sunt excesive, iar cele peste 4 mg% sunt considerate a fi periculoase, indicând o intoxicație cu plumb.

ANALIZA TOXICOLOGICĂ A DERIVAȚILOR BARBITURICI

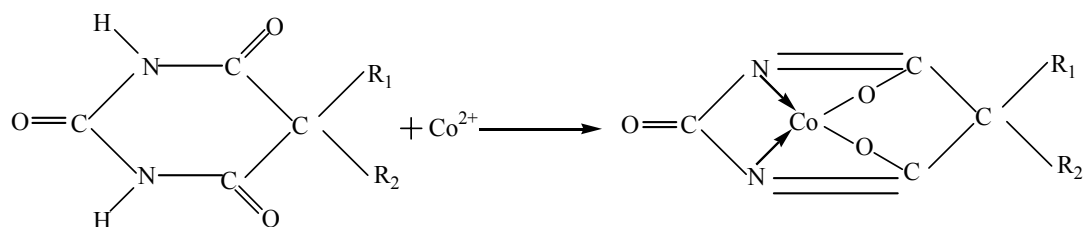
DETERMINAREA CANTITATIVĂ PRIN METODA SPECTROFOTOMETRICĂ ÎN VIZIBIL (REAȚIA PARRY)

Izolarea din urină:

Într-o pâlnie de separație se introduc 25 ml urină, se acidulează la pH 4-5 cu acid acetic concentrat și se extrage de cel puțin două ori cu câte 50 ml eter etilic. Extractele eterice reunite se purifică prin tratare cu cărbune activ și oxid de magneziu. Se filtrează printr-un filtru uscat ce conține puțin sulfat de sodiu anhidru, iar filtrul se spală cu puțin eter. Fazele de solvent se evaporă la sec pe o baie de apă.

Principiul determinării:

Derivații barbiturici, în soluție alcoolică, formează cu azotatul de cobalt în mediu alcalin un complex intern colorat în violet. Sensibilitatea reacției este de 0,1 mg/ml.

**Tehnica de lucru:**

Reziduul obținut prin extracție cu solvenți organici se dizolvă în 2 ml metanol. Soluția se trece cantitativ într-o eprubetă gradată și se completează volumul la 4 ml. 2 ml din această soluție se prelucrează paralel cu un martor de reactivi și cu o scară de etaloane cu concentrația cuprinsă între 0,2-5 mg fenobarbital/2 ml metanol. În fiecare eprubetă se adaugă 2 picături de azotat de cobalt 1% în metanol și 1-2 picături de amoniac concentrat. Absorbanța probei și a etaloanelor se citește la spectrofotometru, la 565 nm în cuva de 1 cm, față de martorul de reactivi. Raportarea absorbanței probei se face pe curba etalon, obținându-se concentrația C în mg derivat barbituric/probă.

Calcul:

$$\text{mg derivat barbituric/1000 ml urină} = [2 \times C \times 1000] / p$$

unde: p = ml produs biologic prelucrat.

DOZAREA DERIVAȚILOR BARBITURICI PRIN SPECTROFOTOMETRIE ÎN UV

Metoda se poate aplica pe sânge total, plasmă sau ser.

Etaloane: soluții de concentrații 5, 10, 25, 40, 50 mg/l barbital, preparate în plasmă umană, prin diluarea unei soluții apoase de barbital sodic (1,12 g/l, echivalent cu 1,00 g/l acid dietilbarbituric).

Tehnica de lucru:**Extracția**

1. 2 ml plasmă (obținuți în urma centrifugării la 2500 rpm timp de 10 min a 3 ml sânge) se tratează cu 0,8 ml HCl 2M și cu 15 ml eter etilic. Se agită 5 min. într-o pâlnie de separație.

2. Se lasă 5 min. în repaus pentru separarea fazelor; se îndepărtează stratul apos inferior.
3. Peste stratul eteric se adaugă 5 ml tampon borat și se agită 5 minute.
4. Se lasă 5 min. în repaus și se îndepărtează stratul apos
5. Peste faza organică se adaugă 5 ml apă distilată, se agită câteva minute, se lasă 5 min. în repaus, apoi se aruncă faza apoasă
6. În pâlnie se adaugă 4 g amestec cărbune activat / sulfat de sodiu anhidru, se agită, și se separă faza eterică într-o capsulă
7. Se evaporă stratul eteric pe baie de apă
8. Reziduul se reia în apă distilată și se filtrează soluția într-o eprubetă

Determinarea cantitativă

1. Se etalonează spectrofotometrul cu apă distilată
2. Într-o cuvă uscată se introduc 4 ml soluție apoasă, peste care se adaugă 50 μ l amoniac concentrat (2 picături), se omogenizează și se verifică dacă pH-ul este egal cu 10
3. Se citește absorbanta la 240 nm față de apă distilată; dacă este necesar, se diluează. Se înregistrează spectrul pe domeniul 190-300 nm (Fig.1).
4. Se adaugă în cuvă 0,1 ml acid sulfuric concentrat (3 picături), se omogenizează și se verifică dacă pH-ul este egal cu 2.
5. Se citește absorbanta la 240 nm și se înregistrează spectrul pe domeniul 190-300 nm (Fig.1). Dacă este necesar, se diluează extractul cu apă distilată.

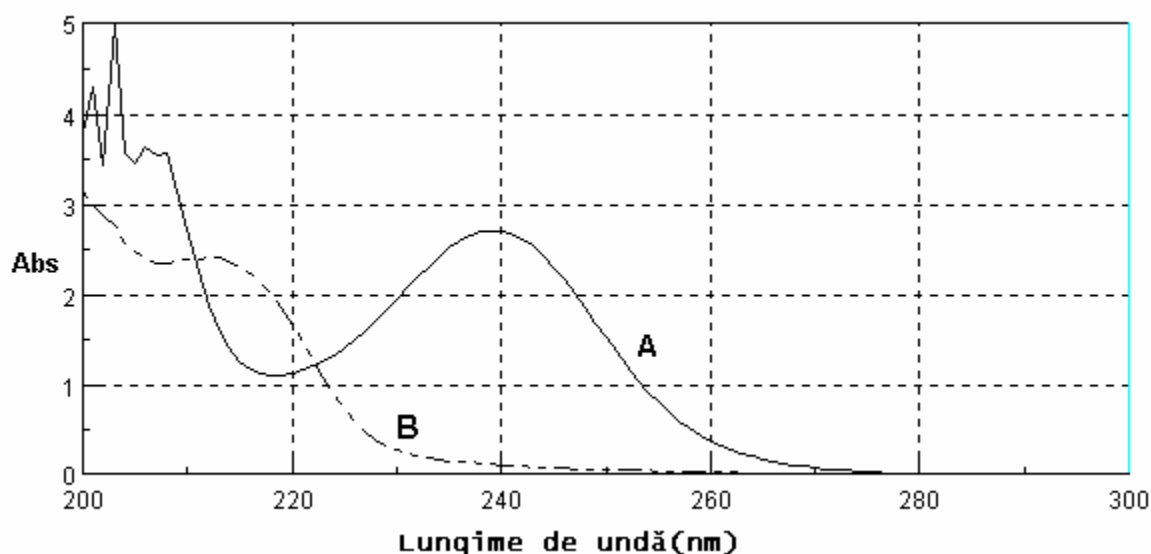


Figura 1. Spectrele UV ale barbitallului la pH 10 (A) și la pH 2 (B)

Pentru a realiza dozarea derivaților barbiturici, se reprezintă grafic diferențele între absorbantele la pH 10 și pH 2 în funcție de concentrația etaloanelor (exprimată în mg/l sânge). Se determină ecuația dreptei de calibrare, care la rândul ei permite

calcularea concentrației probei (x), a cărei absorbantă (y) este citită la spectrofotometru.

Sensibilitatea reacției: 2 mg/l derivați barbiturici.

Interpretarea rezultatelor: concentrații plasmatice de derivați barbiturici mai mari de 10 mg/l (50 mg/l barbital sau fenobarbital) pot produce fenomene toxice grave.

ANALIZA TOXICOLOGICĂ A ASPIRINEI

DETERMINAREA CANTITATIVĂ DIN PLASMĂ

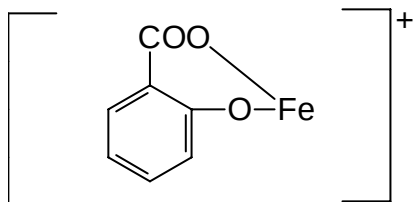
Izolarea:

Acidul salicilic și derivații săi medicamentoși se izolează din corpuri delictive, sânge, urină, conținut stomacal și vomă, prin extracție cu solvenți organici din mediu acid (salicilatul de metil se izolează prin antrenare cu vapori de apă).

Se tratează 2 ml plasmă, într-o pâlnie de separație, cu 0,5 ml acid clorhidric 6 N și cu 50 ml diclorețan. Se agită bine, se separă faza organică și se evaporă la sec.

Principiul determinării:

Aspirina, după hidroliză, formează cu ionul Fe (III) un compus de culoare violetă:



Tehnica de lucru:

Reziduul obținut se tratează cu 10 ml hidroxid de sodiu 1N și se fierbe 10-15 minute la flacără mică. Se neutralizează cu acid clorhidric 10% (evitând excesul) și se aduce cantitativ cu apă într-un balon cotat. Din această soluție, 5 ml se tratează cu 0,2 ml azotat de fier (III) 0,25%.

După 15 minute, se măsoară absorbanta la spectrofotometru, la 530 nm în cuva de 1 cm, față de apă distilată.

Scara de etaloane s-a realizat pentru concentrații cuprinse între 1-5 mg aspirină / 5 ml, de la faza de hidroliză, în aceleași condiții. Reprezentându-se grafic

absorbanța soluțiilor etalon în funcție de concentrație, s-a obținut dreapta de regresie. Din ecuația dreptei de regresie: $y = A + B x$, se calculează concentrația probei analizate: C_p [mg aspirină / 5 ml probă prelucrată din balonul cotate].

Calcul:

Rezultatul se exprimă în mg aspirină / 100 ml plasmă:

$$\text{mg aspirină / 100 ml plasmă} = [C_p \times V_b \times 100] / [n \times p \times 1000],$$

unde: V_b este volumul balonului cotate, n = ml prelucrați din balonul cotate, p = ml plasmă folosită la extracție.

Interpretarea rezultatului:

Se va face conform nomogramei Done (fig.1).

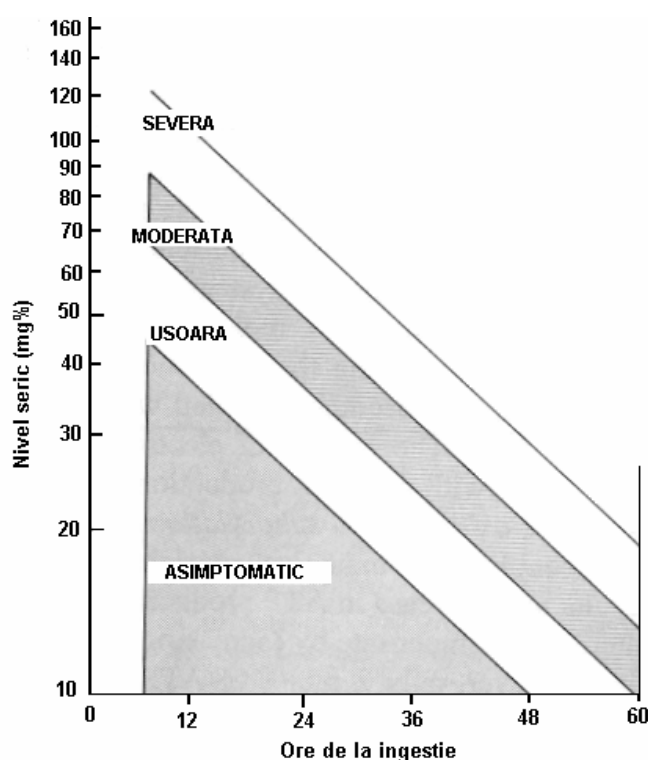


Figura 1. Nomograma lui Done pentru aprecierea gravității intoxicației cu salicilați

Nomograma permite aprecierea gradului de intoxicație cu aspirină pe baza nivelului seric al salicilaților, la diferite intervale de timp de la ingestie. Poate fi folosită numai pentru valorile obținute după 6 ore de la ingestie.

- intoxicație ușoară (hiperpnee moderată fără acidoză, letargie, vomă; eventual ușoară febră);
- intoxicație moderată (hiperpnee severă cu acidoză, letargie marcată sau excitabilitate marcată, dar fără comă sau convulsii, tulburări gastrointestinale marcate);
- intoxicație severă (hiperpnee severă, afectări neurologice severe care includ comă sau convulsii, acidoză metabolică marcată).

ANALIZA TOXICOLOGICĂ A PARACETAMOLULUI

DETERMINAREA CANTITATIVĂ DIN PLASMĂ

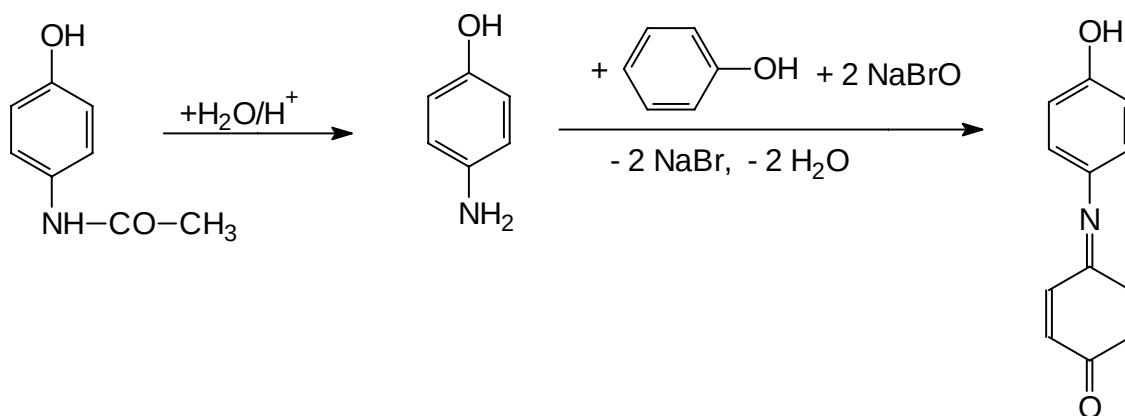
Izolarea:

Paracetamolul se izolează din mediu acid, prin extracție cu solvenți organici (de preferat cloroform).

Se acidulează 2 ml plasmă (20 ml urină) cu acid acetic 5% la pH 5-6 și se extrag de două ori cu câte 20 ml (50 ml) cloroform (eter). Extractele organice se reunesc într-o capsulă și se evaporă la sec; reziduul este reluat cu câțiva ml de acid clorhidric diluat într-un balon cotat, care se completează apoi la semn cu apă distilată.

Principiul metodei:

După hidroliză acidă, din paracetamol rezultă para-aminofenolul, care în prezența fenolului și a hipobromitului formează indofenol:



Tehnica de lucru:

Într-o eprubetă gradată se iau 2 ml probă (din balonul cotate) și 4 ml acid clorhidric 4 N. Se fierbe pe baie de apă la 100° C timp de 30 de minute și se aduce cu apă la 10 ml. Din această soluție (probă hidrolizată) se ia 1 ml, se adaugă 8 ml NaOH 0,2 N, 1 ml fenol 1% și 1 ml soluție hipobromit de sodiu (vezi anexa V). Se lasă la întuneric 30 de minute.

Se citește absorbanta la spectrofotometru, la 630 nm în cuvă de 1 cm, față de un martor de reactivi.

Curba de etalonare se efectuează între 100 și 500 μg / 2 ml , lucrându-se în condiții identice. Valoarea absorbantei pentru probă se raportează la curba etalon și se obține C_p [μg / 2 ml probă prelucrată din balonul cotate].

Calcul:

Rezultatul se exprimă în mg paracetamol / 100 ml plasmă:

$$\text{mg paracetamol / 100 ml plasmă} = [C_p \times V_b \times 100] / [n \times p \times 1000],$$

unde: V_b este volumul balonului cotate, n = ml prelucrați din balonul cotate, p ml plasmă folosită la extracție.

Interpretarea rezultatului:

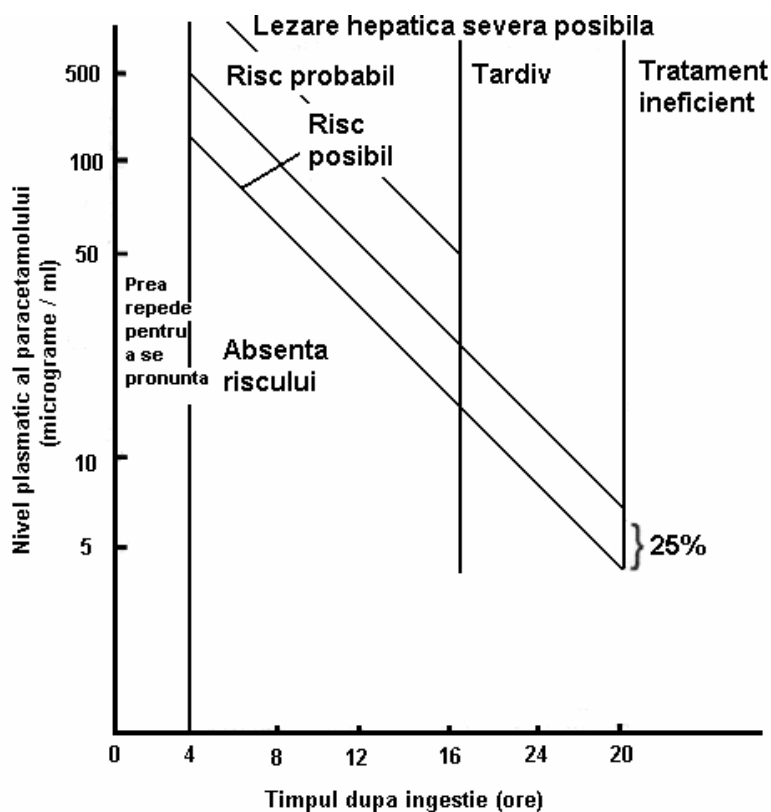
Se va face conform nomogramei Rumack-Matthew (Figura p. 158). Concentrația paracetamolului în plasmă se poate obține numai după 4 ore de la ingestie. Nomograma permite aprecierea potențialului hepatotoxic pentru pacienții netratați cu antidot (N-acetilcisteină).

ANALIZA TOXICOLOGICĂ A ANTIDEPRESIVELOR TRICICLICE

DETERMINAREA CANTITATIVĂ A IMIPRAMINEI CU METAVANADAT DE SODIU

Izolarea din țesuturi:

5 g țesut se triturează bine cu puțin nisip purificat. Se adaugă 0,2-0,5 g oxid de magneziu și circa 15 g sulfat de sodiu anhidru și se omogenizează. Amestecul obținut se aduce cantitativ într-un flacon conic cu dop rotat și se extrage prin agitare energetică timp de 10 minute cu 20-30 ml cloroform sau acetonă. După sedimentare se separă faza de solvent și se repetă extracția de cel puțin două ori.



Nomograma Rumack-Matthew pentru aprecierea gravității intoxicației cu paracetamol și a eficienței tratamentului

Fazele de solvent reunite se filtrează (printr-un filtru uscat) într-o capsulă și se evaporă la sec pe baie de apă.

Prin această tehnică se separă și metaboliții cu caracter alcalin.

Principiul metodei:

Antideprinul formează cu metavanadatul de sodiu în mediu acid colorații albastre colorimetrabile. Sensibilitatea reacției este de 0,5 μg/ml.

Tehnica de lucru:

Reziduul obținut după extracție se dizolvă în 5 ml acid sulfuric 1:2 și se aduce cantitativ (cu acid sulfuric) într-un balon cotat de 25 ml.

2 ml din această soluție se prelucrează paralel cu o scară de etaloane cu concentrația cuprinsă între 1-20 μg antideprin/2 ml acid sulfuric 1:2. Fiecare eprubetă se tratează cu 0,5 ml reactiv metavanadat de sodiu 0,2% în acid sulfuric

1:2. Se măsoară absorbantele la spectrofotometru la 620 nm în cuva de 1 cm, față de un martor de acid sulfuric 1:2. Raportarea absorbanței probei se face pe curba etalon, obținându-se concentrația C în μg antidepressin/probă.

Calcul:

$$\text{mg imipramină/100 g țesut} = [V \times C \times 100] / [n \times p \times 1000]$$

unde: V = volumul balonului cotate;

n = ml prelucrați din balonul cotate;

p = g probă biologică luată în lucru.

Interpretarea rezultatelor:

La decedați în urma unei intoxicații acute cu imipramină, au fost determinate concentrații în ficat de 16-46 $\mu\text{g/g}$.

ANALIZA TOXICOLOGICĂ A FENOTIAZINELOR

DETERMINAREA CANTITATIVĂ CU CLORURĂ DE FIER (III)

Izolarea din urină:

25 ml urină se alcalinizează la pH 10 cu hidroxid de sodiu 10% sau cu amoniac concentrat și se extrage într-o pâlnie de separație cu 50 ml diclormetan sau cloroform. Solventul se separă, iar porțiunea rămasă se mai extrage de cel puțin două ori cu câte 50 ml cloroform sau diclormetan. Fazele de solvent separate și reunite se filtrează (printr-un filtru uscat) într-o capsulă, apoi se evaporă pe baie de apă.

Principiul metodei:

Fenotiazinele formează cu clorura de fier (III) în mediu de acid sulfuric colorații caracteristice (verde, roșu sau violet), care se determină spectrofotometric în vizibil. Sensibilitatea reacției este de 1 $\mu\text{g/ml}$.

Tehnica de lucru:

Reziduul obținut prin extracție cu solvenți organici din produse biologice se aduce cantitativ prin spălări repetate cu acid sulfuric 1:2 într-un balon cotate de 25 ml. Se completează la semn cu acid sulfuric 1:2. Peste 2,5 ml din această soluție se adaugă 0,2 ml clorură de fier (III). După 15 minute se măsoară absorbanta la spectrofotometru în cuva de 1 cm, față de un martor de acid sulfuric 1:2.

Absorbanța probei se raportează la o curbă etalon obținută prin prelucrarea (în condițiile probei) a 6-8 standarde cu concentrația cuprinsă între 5-50 µg derivat fenotiazinic/2,5 ml acid sulfuric 1:2, obținându-se concentrația C în µg/probă.

Lungimile de undă la care se citesc absorbanțele sunt:

Clorpromazina: 455 nm,

Levomepromazina: 555 nm,

Proclorpromazina: 500 nm,

Tioridazin: 620 nm.

Calcul:

$$\text{mg derivat fenotiazinic/1000 ml urină} = [V \times C] / [n \times p]$$

unde: V = volumul balonului cotate;

n = ml prelucrați din balonul cotate;

p = ml probă biologică luată în lucru.

ANALIZA TOXICOLOGICĂ A IZONIAZIDEI

DETERMINAREA CANTITATIVĂ DIN PLASMĂ CU p-DIMETILAMINOBENZALDEHIDĂ

Din **plasmă** HIN-ul poate fi determinat fără izolare.

Principiul metodei:

HIN-ul formează cu p-dimetilaminobenzaldehida o colorație galben-portocalie, colorimetrabilă. Sensibilitatea reacției este de 1µg/ml.

Tehnica de lucru:

Peste 2 ml plasmă se adaugă 1 ml acid acetic 1% și 0,5 ml soluție alcoolică de p-dimetilaminobenzaldehidă 1%. Paralel se prelucurează în condițiile probei 10 standarde cu concentrația cuprinsă între 10-100 µg HIN/2 ml apă distilată și un martor de reactivi. Absorbanțele probei și etaloanelor se citesc la spectrofotometru la 530 nm, față de martorul de reactivi. Raportarea absorbanței probei se face pe curba etalon, obținându-se concentrația C în µg HIN/probă.

Calcul:

$$\text{mg HIN/100 ml plasmă} = [C \times 100] / [2 \times 1000].$$

Interpretarea rezultatelor:

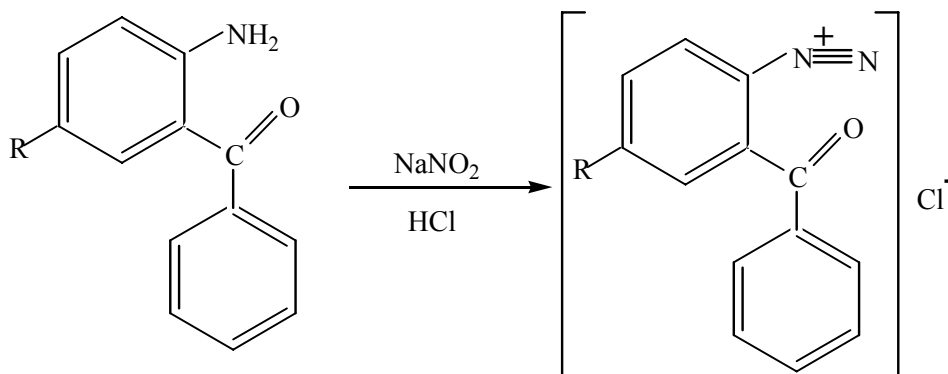
După doze terapeutice de 300-400 mg HIN / zi, nivelele plasmatice sunt cuprinse între 0,5-10 µg/ml.

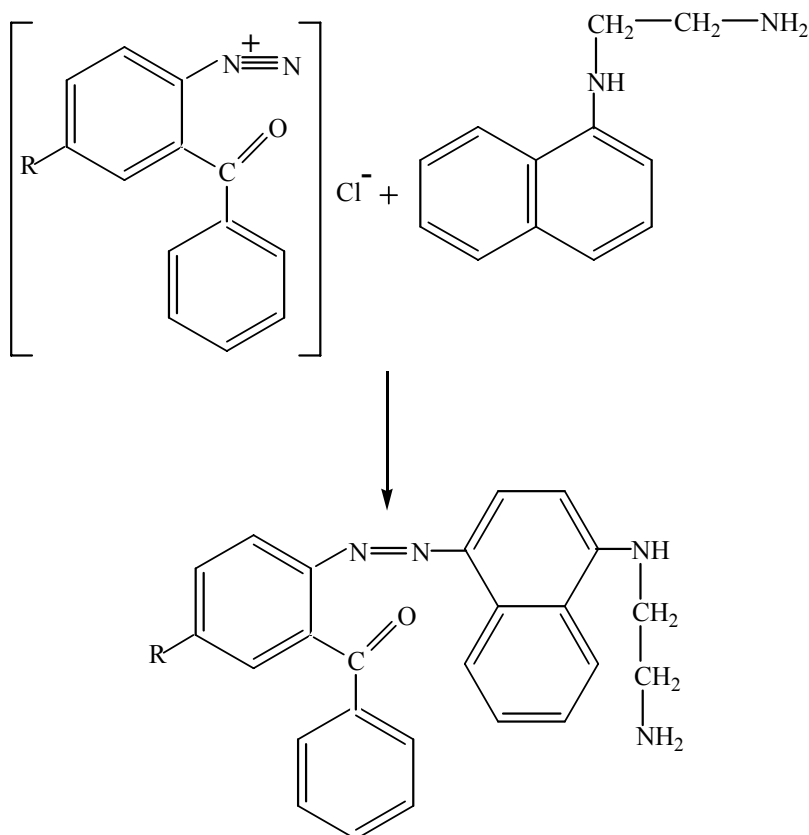
ANALIZA TOXICOLOGICĂ A BENZODIAZEPINELOR**DETERMINAREA CANTITATIVĂ SUB FORMĂ DE AZOCOLORANȚI****Izolarea din urină:**

25 ml urină se alcalinizează cu carbonat de sodiu sau de potasiu 5% (pH=10) și se aduce într-o pâlnie de separație; se extrage de cel puțin două ori cu câte 50 ml eter etilic (dicloretan sau amestec dicloretan:acetat de etil 2:1). Fazele de solvent separate și reunite se filtrează (printr-o hârtie de filtru uscată, spălând filtrul cu puțin solvent) într-o capsulă și se evaporă la sec pe baie de apă. Reziduul obținut servește la analiza toxicologică a clordiazepoxidului, nitraxepamului și a unor metaboliți.

Principiul metodei:

Gruparea aminică aromatică primară eliberată prin hidroliză acidă, după diazotare și cuplare cu N-naftiletilendiamină dă un derivat de culoare roz-violacee, colorimetricabil. Sensibilitatea reacției este de 1 µg/ml.





Tehnica de lucru:

- a) Reziduul obținut prin extracție cu solvenți organici, după hidroliză, se dizolvă în 2 ml acid clorhidric 2N, se aduce cantitativ cu apă distilată într-un balon cotat de 25 sau 50 ml. Din această soluție se prelucrează 2 ml, peste care se adaugă 0,5 ml acid clorhidric 2N și 0,1 ml nitrit de sodiu 1%; se agită și se lasă în repaus 10 minute. Se adaugă 2 ml uree 10%, se agită bine și după 5 minute se adaugă 0,1 ml N-naftiletilendiamină 1%. Paralel cu proba se prelucrează în aceleași condiții un martor de reactivi și 8-10 standarde cu concentrația cuprinsă între 250-500 μg benzodiazepină hidrolizată. Se măsoară absorbanțele probei și etaloanelor la spectrofotometru la 550 nm, în cuva de 1 cm, față de martorul de reactivi. Raportarea absorbanței probei se face pe curba etalon, obținându-se concentrația C în $\mu\text{g/probă}$.
- b) Reziduul obținut prin extracție directă din produse biologice poate fi dozat aplicând metoda descrisă mai sus în următoarele condiții: reziduul se tratează cu 10 ml acid clorhidric 4N, se hidrolizează prin încălzire (timp de 30 minute) pe o baie de apă în fierbere, evitând evaporarea. După răcire se aduce cantitativ cu apă distilată într-un balon cotat de 25 sau 50 ml. Se continuă apoi determinarea ca mai sus.

Calcul:

$$\text{mg benzodiazepină/1000 ml urină} = [V \times C] / [n \times p]$$

unde: V = volumul balonului cotat;

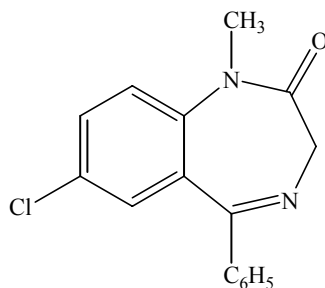
n = ml prelucrați din balonul cotat;

p = ml probă biologică luată în lucru.

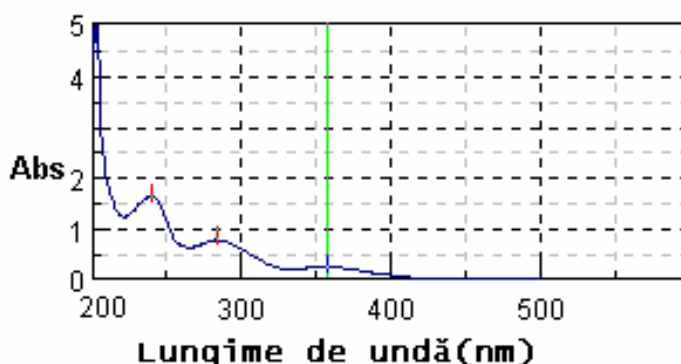
DETERMINAREA CANTITATIVĂ A DIAZEPAMULUI
PRIN SPECTROFOTOMETRIE ÎN UV

Principiul metodei:

Dozarea diazepamului din plasmă se realizează după izolarea lui prin extracție cu solvenți organici la pH 6,8 – 7 (extracție lichid-lichid ~ ELL sau extracție pe fază solidă ~ EFS). Este ușor solubil în acetonă, benzen, cloroform, solubil în alcool, greu solubil în eter și practic insolubil în apă.



Se determină cantitativ spectrofotometric în UV, diazepamul prezentând în soluție de HCl 2N trei maxime de absorbție: 242, 287 și 359 nm. Diferența dintre valorile absorbției maxime și minime este proporțională cu concentrația. Sensibilitatea metodei este de 5 μg/ml.



Spectrul UV al diazepamului, cu cele trei maxime de absorbție

Reactivi:

- 1) Tampon fosfat pH 6,8 (0,2M): la 51 ml KH_2PO_4 0,2M se adaugă 49 ml $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0,2M
- 2) Tampon fosfat pH 6,8 (0,002M): se diluează 1:100 tamponul 0,2M, ajustând pH-ul la 6,8 cu Na_2HPO_4 0,2M
- 3) HClO_4 7% (HClO_4 conc. diluat 1:10, v/v, cu apa distilată)
- 4) NaOH 20%
- 5) Cloroform
- 6) Metanol
- 7) Acetonă
- 8) HCl 2N: 170,8ml HCl 37% ($d=1,155$) se diluează cu apă distilată la 1000ml
- 9) Soluție etalon de diazepam în HCl 2N, cu concentrația de 0,5mg/ml

Izolarea diazepamului din plasmă:

a) Extracția lichid-lichid:

Se aduc $p = 2$ ml plasmă la pH = 6,8 cu 2 ml tampon fosfat pH 6,8 (0,2M) și se extrag într-o pâlnie de separație cu 10 ml cloroform (benzen), agitând câteva minute. Se separă faza organică într-o capsulă de porțelan filtrându-se prin filtru uscat și se evaporă la sec pe baie de apă.

b) Extracția pe fază solidă:

Pregătirea probei:

- $p = 1$ ml plasmă se deproteinizează cu 0,4 ml HClO_4 7% și se diluează într-o eprubetă de centrifugă cu 2 ml tampon fosfat pH 6,8 (0,2M), se vortexează 30 secunde și se centrifughează 6 minute la 2500 rotații/minut;
- supernatantul se separă și se neutralizează cu 0,1 ml NaOH 20%

Condiționarea cartușului de extracție (C18 – 300 mg):

Se trec prin cartuș cu ajutorul unei seringi:

- 5 ml metanol (viteza de trecere prin cartuș ~ 3ml/min)
- de trei ori aer
- 5 ml apă distilată (viteza de trecere prin cartuș ~ 3ml/min; cartușul trebuie să rămână umectat)
- 5 ml tampon fosfat pH 6,8 (0,2M) (viteza de trecere prin cartuș ~ 3ml/min; cartușul trebuie să rămână umectat)

Trecerea probei prin cartuș:

- se trece supernatantul neutralizat cu un debit de ~1ml/min (cartușul trebuie să rămână umectat)

Spălarea cartușului:

- cu 5 ml tampon fosfat pH 6,8 (0,002M) (debit - 3ml/min)

Eluarea:

- de trei ori aer;
- 5 ml metanol (debit ~1ml/min)

Se evaporă metanolul la sec pe baie de apă, sub nișă.

Tehnica de lucru:

Reziduul obținut prin ELL sau prin EFS se dizolvă în 3ml HCl 2N. Se măsoară absorbanta la spectrofotometru la 359 nm și 332 nm față de HCl 2N.

Metoda spectrofotometrică este lineară pe domeniul de concentrații 5 – 100 μg diazepam /ml HCl 2N. Se reprezintă grafic diferența dintre absorbanta citită la 359 nm (maxim de absorbție) și cea citită la 332 nm (minim de absorbție) în funcție de concentrație.

Observații:

Se prelucrează mai întâi câte o probă marcată cu concentrația de 100 μg/ml ($C_{s-reala}$), atât prin ELL, cât și prin EFS, pentru determinarea randamentelor de extracție. (volumul corespunzător de plasmă, precizat în tehnică, se va înlocui cu un volum egal de apă distilată și se va marca cu 100 μg diazepam /ml).

Cu ajutorul programului Spectra manager, se va obține pentru fiecare metodă de extracție concentrația regăsită ($C_{s-regasita}$), din ecuația dreptei de regresie obținută pentru domeniul de concentrații 5 – 100 μg/ml.

Se calculează apoi randamentele de extracție conform formulei:

$$R (\%) = [C_{s-regasita} \times 3 / C_{s-reala}] \times 100$$

Pentru determinarea cantitativă a diazepamului din proba de analizat se selectează metoda de extracție cea mai eficientă.

Calcul:

Prelucrarea datelor se va face cu ajutorul programului Spectra manager. Rezultatul final se va exprima în μg diazepam /100ml plasmă, conform formulei:

$$\mu\text{g diazepam /100ml plasmă} = C_p \times 3 \times 100$$

Interpretarea rezultatelor:

În tratamentele cu o doză unică orală de 10 mg diazepam, concentrațiile sanguine maxime au fost de ordinul a sutelor de micrograme diazepam / litru sânge. În tratamentele cu doze zilnice de 30 mg diazepam, concentrațiile maxime au fost de asemenea de ordinul sutelor de micrograme / litru sânge.

În intoxicațiile severe sau mortale, concentrațiile sanguine au fost de 2-30mg / litru sânge.

ANALIZA TOXICOLOGICĂ A MORFINEI

DETERMINAREA CANTITATIVĂ PRIN INTERMEDIUL FORMĂRII ALBASTRULUI DE MOLIBDEN

Izolarea metabolitilor conjugați și a morfinei din urină:

20 ml urină se tratează cu 10 ml acid clorhidric 4N și se fierbe 30 minute pe baie de apă, sub refrigerent ascendent. După răcire, se alcalinizează la pH=8 cu carbonat acid de sodiu sau cu hidroxid de amoniu concentrat. Amestecul se aduce într-o pâlnie de separație și se extrage cel puțin de două ori cu câte 25 ml cloroform. Fazele cloroformice reunite se filtrează (printr-un filtru uscat) într-o capsulă și se evaporă la sec pe baie de apă.

Principiul metodei:

Morfina, în mediu amoniacal, reduce acidul fosfomolibdenic la molibdat de molibdenil de culoare albastră, colorimetrabil. Sensibilitatea reacției este de 10 μg morfină/ml.

Tehnica de lucru:

2,5 ml din soluția obținută mai sus (adusă în balon cotat de 25 sau 50 ml) se prelucrează paralel cu un martor de reactivi și cu o scară de etaloane cu concentrația cuprinsă între 10-100 μg morfină/2,5 ml acid sulfuric 0,1N. În fiecare probă se adaugă 1 ml soluție alcoolică de acid fosfomolibdenic 1% și 0,5 ml

amoniac concentrat. Absorbanțele probei și etaloanelor se citesc la spectrofotometru la 570 nm în cuva de 1 cm, față de martorul de reactivi. Raportarea absorbanței probei se face pe curba etalon, obținându-se concentrația C în μg morfină/probă.

Calcul:

$$\text{mg morfină/1000 ml urină} = [C \times V] / [n \times p]$$

unde: V = volumul balonului cotate;

n = ml prelucrați din balonul cotate;

p = ml probă biologică prelucrată.

ANALIZA TOXICOLOGICĂ A UNOR PESTICIDE

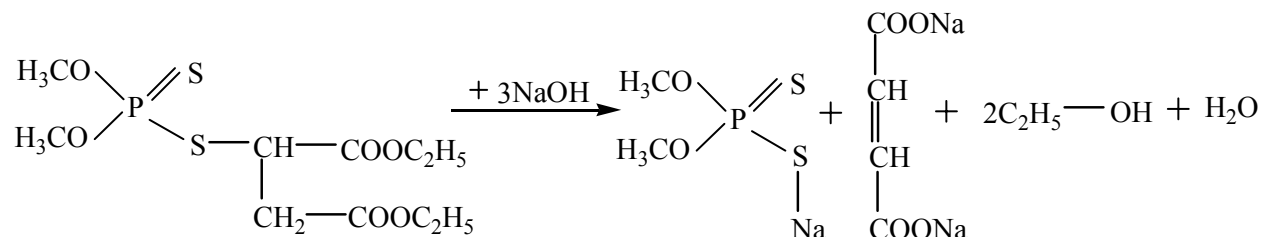
DETERMINAREA CANTITATIVĂ A MALATIONULUI

Izolarea din urină:

50 ml urină se acidulează cu acid clorhidric 5% și se extrage de cel puțin două ori cu câte 50 ml eter etilic sau cloroform. Fazele de solvent separate și reunite se filtrează (printr-un filtru uscat) într-o capsulă și se evaporă la sec pe baie de apă la 50°C.

Principiul metodei:

Malationul se hidrolizează în mediu alcalin la dimetilditiofosfat de sodiu, fumarat de sodiu și etanol. Dimetilditiofosfatul de sodiu formează cu ionii de Cu (II) un compus de culoare galbenă, extractibil în tetraclorură de carbon. Sensibilitatea reacției este de 10 μg malation/ml.



Tehnica de lucru:

Reziduul obținut prin extracție cu solvenți organici se prelucrează paralel cu un martor de reactivi și cu o scară de etaloane cu concentrația cuprinsă între 20-200 µg malation/probă. Fiecare reziduu se tratează cu 1 ml hidroxid de sodiu 6N și 25 ml reactiv clorură de fier (III) 0,2% în acid clorhidric 1%. Se agită bine și se lasă în repaus 15 minute. Se adaugă 2-3 picături de soluție alcoolică de fenolftaleină 1% și se neutralizează cu acid clorhidric 5N (până la decolorare). Se aduce cantitativ într-o pâlnie de separație, se adaugă 2 ml sulfat de cupru 1% și se extrage de două ori cu câte 5 ml tetraclorură de carbon. Fazele de solvent separate și reunite se filtrează sau se centrifughează. Se măsoară absorbanțele la spectrofotometru, la 470 nm în cuva de 1 cm, față de martorul de reactivi. Absorbanța probei se raportează la curba etalon, obținându-se concentrația C în µg malation/probă.

Calcul:

$$\text{mg malation/1000 ml urină} = C / p$$

unde: p = ml probă biologică prelucrată.

ANALIZA TOXICOLOGICĂ A PARAQUATULUI ÎN URINĂ

Paraquatul (1,1'-dimetil-4,4'-dipiridil) este un ierbicid foarte mult utilizat pe plan mondial. Intoxicațiile cele mai grave sunt datorate ingerării accidentale sau în scop suicidal, fiind adesea letale.

Principiul metodei:

În mediu alcalin, paraquatul este redus de către ditionitul de sodiu la un radical liber de culoare albastră. Dozarea se face spectrofotometric.

Diquatul, un ierbicid înrudit cu paraquatul, dă în aceleași condiții o culoare verde.

Limita de sensibilitate a metodei este de 1 µg/ml.

Reactivi:

1. Hidroxid de sodiu 1N
2. Ditionit de sodiu (hidrosulfid de sodiu - $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) 1% în hidroxid de sodiu 1N (se prepară ex-temporae, dizolvând 0,1g ditionit în 10 ml hidroxid de sodiu 1N)
3. Soluție saturată de clorură de amoniu

4. Paraquat – soluție etalon (0,1mg/ml– se diluează soluția stoc [200mg/ml] în proporție de 1:2000 cu soluție saturată de clorură de amoniu)

Analiza calitativă:

Într-o eprubetă se adaugă la 1 ml urină, 0,4 ml ditionit de sodiu 1% în hidroxid de sodiu 1N. În paralel se prelucrează un “blanc”: peste 1 ml urină se adaugă 0,4 ml hidroxid de sodiu 1N. Se compară colorațiile obținute în cele două eprubete.

În prezența paraquatului, apare o colorație albastră în eprubeta în care s-a introdus ditionit. Diquatul dă în aceste condiții o colorație verde.

Analiza cantitativă:

Se lucrează în patru eprubete, conform următorului tabel:

	Etalon 1	Etalon 2	Etalon 3	Proba
	0,1 ml urină blanc	0,1 ml urină blanc	0,1 ml urină blanc	0,1 ml urină probă
Apă distilată	2,1 ml	2,05 ml	2 ml	2,1 ml
Paraquat 0,1 mg/ml	-	0,05 ml	0,1 ml	-
Ditionit de sodiu 1%	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml

Eprubetele se agită și se citesc absorbantele la spectrofotometru, la 600 nm.

Se reprezintă grafic variația absorbantei în funcție de concentrație și se obține concentrația probei (C_p - $\mu\text{g}/0,1$ ml urina) prin extrapolare din grafic. Rezultatul final se exprimă în mg paraquat / 1000 ml urină.

Observații:

Paraquatul se metabolizează în proporție mică la om. Se elimină prin urină relativ lent, astfel că poate fi detectat în această probă biologică chiar și după 16 – 30 de zile de la ingerare.

DETERMINAREA CANTITATIVĂ A DINITRO-ORTO-CRESOLULUI (DNOC) DIN SÂNGELE TOTAL

Principiul metodei:

DNOC-ul poate fi ușor dozat spectrofotometric din sângele total, deoarece prezintă o absorbantă puternică la 430 nm, iar concentrațiile toxice sunt relativ mari. Sensibilitatea metodei este de 10 mg DNOC/l.

Reactivi:

1. Soluție apoasă de clorură de sodiu (270 g/l) ce conține 30 g/l carbonat de sodiu
2. Etaloane DNOC cu concentrații de 10, 20 și 50 mg/l în sânge total

Tehnica de lucru:

- 1 ml probă sau standard se tratează într-un tub de centrifugă cu 5 ml butanonă și apoi cu 1 ml soluție de clorură de sodiu și carbonat de sodiu.
- **Se vortexează** 30 de secunde, apoi se centrifughează 5 minute la 3000 rpm. Din extractul organic se prelevează într-o eprubetă 2 ml.
- Se citește absorbanta la spectrofotometru la 430 nm în cuvele de 1 cm, față de butanonă.

Rezultate:

Se reprezintă grafic absorbanta etaloanelor în funcție de concentrația în DNOC (mg/l), iar prin extrapolare se calculează concentrația probei, exprimată în mg/l.

Interpretarea rezultatelor

DNOC-ul decuplează fosforilarea oxidativă, simptomatologia intoxicației caracterizându-se prin oboseală, transpirații excesive, hipertermie și sete intensă, care pot conduce la epuizare. În cazurile grave survine decesul. Semnele de toxicitate apar la concentrații sanguine mai mari de 30 mg/l și sunt grave la concentrații mai mari de 60 mg/l.

DETERMINAREA CANTITATIVĂ A DNOC DIN URINĂ

Izolarea din urină:

20 ml urină se aduc într-o pâlnie de separație, se acidulează cu acid clorhidric 10% și se extrage de două ori cu câte 20 ml eter etilic sau cloroform.

Fazele organice se reunesc, se filtrează prin filtru uscat cu sulfat de sodiu sicc. într-o capsulă și se evaporă la sec pe baia de apă.

Principiul metodei:

Dinitro-orto-crezolul este redus cu zinc și acid clorhidric la aminoderivatul corespunzător care, cu un oxidant (sulfat de ceriu, dicromat de potasiu) formează un derivat chinoniminic de culoare roșie, colorimetrabil.

Sensibilitatea metodei este de 5 µg/ml.

Tehnica de lucru:

Reziduul obținut în urma extracției cu solvenți organici se reia cu 3 ml apă distilată. Se adaugă 1 ml acid clorhidric concentrat și 1-2 granule de zinc amalgamat. Se încălzește pe baia de apă la fierbere. Se răcește și se filtrează într-o eprubetă gradată de 10 ml. Se adaugă 0,1 ml sulfat de ceriu 0,2N în acid sulfuric 5% și se completează la 10 ml cu apă distilată. Se citește absorbanta după 15 minute la spectrofotometru, la 490 nm față de apă distilată. Curba de calibrare se întocmește din etaloane cu concentrații cuprinse între 20 și 200 µg/3 ml. Valoarea absorbantei probei se raportează la curba de calibrare, extrapolându-se concentrația probei.

Calcul:

$$\text{mg DNOC} / 1000 \text{ ml urină} = C / V,$$

Unde : C = concentrația DNOC în µg
 V = volumul de urină prelucrat

**DETERMINAREA CANTITATIVĂ A
PARA-NITROFENOLULUI TOTAL DIN URINĂ**

Para-nitrofenolul este principalul metabolit al parationului. El se elimină prin urină ca atare și sub formă de conjugat. Se izolează din urină prin extracție cu solvenți organici din mediu acid.

Izolarea din urină:

Într-un balon cu fund rotund se introduc 25-50 ml urină și 10 ml acid clorhidric 15% și se fierbe sub refrigerent ascendent, la flacără mică, timp de 60 minute. După răcire, produsul se extrage într-o pâlnie de separație, de cel puțin

două ori cu câte 20 ml eter etilic. Fazele de solvent separate și reunite se filtrează prin filtru uscat cu sulfat de sodiu sicc. și se evaporă la sec. Reziduul se dizolvă în apă și se aduce cantitativ într-un balon cotat de 25-50 ml, care se completează la semn.

Principiul metodei:

Gruparea nitro a para-nitrofenolului se reduce, cu hidrogen în stare născândă, la grupare aminică. Aceasta se diazotează și apoi se cuplează cu N-naftiletildiamină, formând un azoderivat de culoare violet, care prezintă absorbție în domeniul vizibil.

Tehnica de lucru:

5 ml soluție obținută în urma izolării se prelucrează paralel cu un martor de reactivi și cu o scară de etaloane cu concentrația cuprinsă între 25-150 μg p-nitrofenol /5 ml. În fiecare eprubetă se adaugă 1 ml acid clorhidric concentrat și 1-2 granule de zinc și se încălzesc în baie de apă timp de 10 minute. Se filtrează cantitativ în eprubete gradate și se completează volumul la 10 ml cu apă distilată. Peste 5 ml de soluție prelevați din fiecare eprubetă se adaugă 0,5 ml nitrit de sodiu 1% și se lasă 5-10 minute, apoi se adaugă 2 ml uree 10%. După 10-15 minute se adaugă 1 ml N-naftiletildiamină 1‰. După 15 minute se măsoară absorbanțele la spectrofotometru, la 540 nm în cuva de 1 cm, față de martorul de reactivi. Prin extrapolare pe curba de calibrare se calculează concentrația C în μg p-nitrofenol /5 ml probă.

Calcul:

$$\text{mg p-nitrofenol total} = [C \times V] / [n \times p]$$

unde: V = volumul balonului cotat,
n = ml prelucrați din balon
p = ml produs biologic prelucrat

Interpretarea rezultatelor:

În intoxicații severe cu paration s-au determinat concentrații de 1,6-11,6 mg p-nitrofenol total / l de urină.

DETERMINAREA ACTIVITĂȚII COLINESTERAZICE ÎN SÂNGELE TOTAL

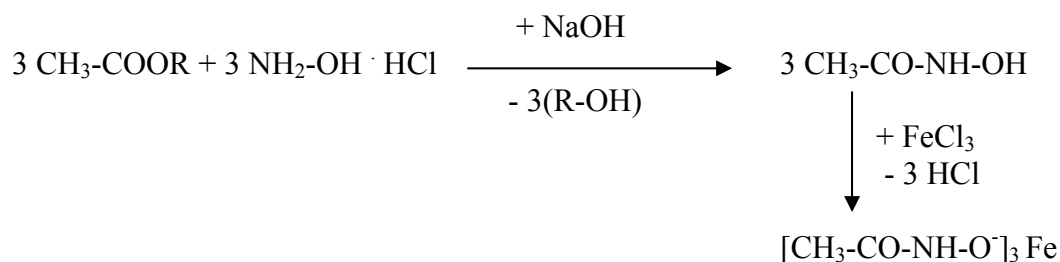
Obiectiv:

Evaluarea activității colinesterazice sanguine permite diagnosticarea și supravegherea unei intoxicații cu insecticide organofosforice.

Aceste insecticide inhibă colinesterazele, determinând acumularea acetilcolinei la nivelul plăcii motorii a mușchilor striati.

Principiul metodei:

Colinesteraza din sângele total acționează asupra unui exces cunoscut de acetilcolină. Acetilcolina nehidrolizată formează cu hidroxilamina în mediu alcalin acid acetohidroxamic, care cu Fe^{3+} dă un complex de tip Hantzsch solubil, roșu-violet, colorimetrabil:



Reactivi:

- 1) Tampon veronal pH 7,4
 Soluția A: 2,06 g barbitol sodic se dizolvă în 100 ml apă distilată
 Soluția B: 0,365 g barbitol se dizolvă în 100 ml apă distilată
 Se amestecă 5 ml soluție A cu 95 ml soluție B (se păstrează la 4°C).
- 2) Soluție stoc de acetilcolină clorhidrat 0,04M (72,66 mg acetilcolină / 10 ml apă distilată; se păstrează la 4°C)
- 3) Soluție de lucru de acetilcolină clorhidrat 0,004M (se diluează soluția stoc de acetilcolină clorhidrat cu tampon veronal, în proporție de 1:10)
- 4) Soluție de hidroxilamină 2M (1,39 g hidroxilamină clorhidrat / 10 ml apă distilată; se păstrează la 4°C, maximum 2 săptămâni)
- 5) Hidroxid de sodiu 3,5M (28 g NaOH / 200 ml apă distilată)
- 6) Soluție alcalină de hidroxilamină: se prepară **ex-temporae**, amestecând 1ml soluție 2M de hidroxilamină cu 2ml NaOH 3,5M.
- 7) Acid percloric 1,8M [10 ml HClO_4 (d = 1,61) se diluează cu 30 ml apă distilată]
- 8) Clorură ferică 0,37M (6g FeCl_3 se dizolvă în 100 ml HCl 0,1M)

Tehnica de lucru:

Se analizează sângele total, recoltat pe fluorură de sodiu:

Nr. eprubetei	1 proba	2 martor de acetilcolină	3 martor de reactivi
Tampon veronal	0,95 ml	1 ml	2 ml
Sânge	0,05 ml	-	-
Acetilcolină 0,004M	1 ml	1 ml	-

Se agită și se incubează 10 minute la 25°C (temperatura camerei).

În fiecare eprubetă se adaugă 0,4 ml soluție alcalină de hidroxilamină preparată ex-temporae.

Se agită și se lasă în repaus 2 minute.

Apă distilată	2 ml	2 ml	2 ml
Acid percloric 1,8M	0,4 ml	0,4 ml	0,4 ml
Clorură ferică 0,37M	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml

Se filtrează și se așteaptă 15 minute.

Se măsoară absorbanta filtratelor din eprubetele 1 și 2 la spectrofotometru, la 520 nm, față de martorul de reactivi (eprubeta 3).

Calcul:

$$\mu\text{moli acetilcolină nehidrolizată} = 4 \times [A_1 / A_2]$$

Activitatea colinesterazică din sânge este dată de numărul de micromoli de acetilcolină hidrolizată în timpul incubării în prezența a 50 μl sânge.

$$\text{Activitatea colinesterazică} = 4 \times [1 - (A_1 / A_2)],$$

unde A_1 este absorbanta probei (eprubeta 1), iar A_2 este absorbanta martorului de acetilcolină (eprubeta 2).

Interpretarea rezultatelor:

Activitatea colinesterazică normală este de $2,15 \pm 0,03$.

La muncitorii din sectorul agricol expuși la insecticide organofosforice se poate observa o diminuare a activității colinesterazice de 40%. Când valorile scad cu peste 50-60% se impune părăsirea locului de muncă.

Intoxicația cu derivați organofosforici este deosebit de gravă la copii.

Capitolul 5

DIAGNOSTICUL CLINIC AL INTOXICAȚILOR: STUDII DE CAZURI CLINICE

Intoxicațiile acute și cronice reprezintă la ora actuală prima cauză a consultațiilor medicale de urgență în țările dezvoltate și a doua cauză de deces, după infecții și pe același plan cu accidentele, la persoanele sub 30 de ani din țările în curs de dezvoltare. Marea majoritate a acestor intoxicații sunt accidentale (70%), fapt care, alături de alți factori, contribuie la dificultatea stabilirii diagnosticului. Deși, așa cum s-a văzut în capitolul 1, analiza toxicologică joacă un rol important în confirmarea diagnosticului, în cele mai multe cazuri stabilirea acestuia se face în principal pe baza simptomatologiei observate.

În acest capitol vor fi prezentate câteva cazuri reprezentative de intoxicații reale, a căror rezolvare va permite aplicarea practică a cunoștințelor teoretice acumulate în cadrul cursului și corelarea lor cu unele analize de laborator. Pentru facilitarea rezolvării problemelor, în tabelele de la sfârșitul capitolului sunt sistematizate substanțele toxice care produc anumite simptome majore, alături de valorile normale ale semnelor vitale sau ale unor parametri hematologici.

Caz clinic 1: Fumul din incendii arde și....intoxică

În timpul unei acțiuni de salvare în cazul unui incendiu izbucnit într-un apartament, pompierii găsesc mai multe victime: 2 persoane cu arsuri extinse, o persoană cu arsuri pe mai puțin de 10% din suprafața corpului, dar care este în stare de inconștiență și colaps, și un mort fără arsuri aparente. Cele trei victime cu arsuri sunt transportate la spital, iar decedatul la Institutul de Medicină Legală.

Victimele cu arsuri sunt tratate cu pansamente, analgezice, antibiotice, evoluția fiind favorabilă după o săptămână.

Pacientul cu arsuri lejere este examinat în serviciul de urgențe. Se pare că arsurile nu sunt responsabile de gravitatea tabloului clinic. Se presupune implicarea unui gaz, care fie că a lipsit din atmosfera inhalată (incendiul consumă oxigenul), fie s-a acumulat ca urmare a obstrucției căilor aeriene (dioxidul de carbon), fie a fost inhalat după eliberarea sa prin combustia substanțelor ce conțin carbon (monoxid de carbon) sau a altor materiale: lână, mătase, lemn, materiale plastice (acid cianhidric).

Se asigură căile respiratorii ale pacientului și se practică o fibroscopie bronșică ce permite extracția secrețiilor de mucus. Se recurge la ventilație asistată sub oxigen pur.

Rezultatele de laborator evidențiază:

- absența unor tulburări hidro-electrolitice capabile să explice coma și colapsul
- o oxicarbonemie prelevată la locul accidentului de 1 mmol/l (normal la nefumători: < 0,15 mmol/l)
- o lactatemie de 9 mmol/l (normal < 2 mmol/l)

Probleme și discuții

- Cum se explică la victimele incendiilor disocierea între caracterul discret al arsurilor și gravitatea simptomatologiei?
- Pe baza simptomatologiei și a primelor analize de laborator, care este substanța toxică implicată în acest caz?
- Care este tratamentul specific recomandat în această intoxicație?
- Care se presupune că va fi rezultatul analizei toxicologice medico-legale efectuată pe sângele provenit de la decedat?

Caz clinic 2: Călătorie în zorii zilei

Doamna D. pleacă într-o dimineață devreme, împreună cu soțul ei, într-o vizită la părinții acestuia, care locuiesc la distanță de o zi cu mașina. După 5 ore monotone parcurse pe autostradă, ea începe să se simtă rău. Acuză lipotimie, însoțită de angoasă intensă, transpirații, tremurături și greață. Reușește totuși să ajungă la destinație.

Absența sa la cină îngrijorează anturajul. Soțul și părinții acestuia observaseră la sosire că nu se simte bine, dar nu dăduseră prea multă importanță acestui fapt, deoarece doamna D. invocase căldura și oboseala drumului și declarase că dorește să se odihnească puțin în camera sa. Găsind camera goală, socrii o caută în jurul casei și cum nu o găsesc, alertează jandarmeria.

Doamna D. este găsită pe stradă câteva ore mai târziu. Ea este foarte confuză, nu recunoaște pe nimeni și este incoerentă. Este spitalizată imediat, dar agitația și confuzia se agravează. Vorbește de animale înfricoșătoare care vor să o atace și încearcă să fugă din salon. Starea sa necesită imobilizare și un tratament cu sedative.

Examenul de laborator relevă:

- sodiu: 152 mmol/l
- potasiu: 3,1 mmol/l
- ioni clorură: 107 mmol/l

- bicarbonat: 16 mmol/l
- glicemie: 5,5 mmol/l
- alcoolemia: zero
- hematocritul: 48

În condițiile spitalului nu se poate realiza o electroencefalogramă sau o tomografie, iar radiografia toracică este normală.

Interogarea anturajului nu confirmă existența unor antecedente neurologice sau psihiatrice. În zilele precedente, pacientei nu i s-a prescris nici un tratament medicamentos iar soțul insistă să menționeze că pacienta nu consumă alcool. Examenul somatic nu aduce nici un element suplimentar de diagnostic, în principal sub aspect neurologic.

Probleme și discuții

- Care sunt intoxicațiile ce ar putea fi asociate cu această simptomatologie?
- Care este ipoteza cea mai credibilă de diagnostic?
- Care este tratamentul recomandat și starea pacientei după recuperare?

Caz clinic 3: Produse domestice periculoase

Un bărbat de 41 de ani, cu antecedente de depresie, este descoperit la domiciliu, la aproximativ 15 ore de la o ingestie voluntară de alcool și benzodiazepine. Este internat în serviciul de urgențe la o oră după ce a fost găsit, în comă profundă, însoțită de dispnee Kussmaul, hipotonie, hiporeflexie, pupile midriatice nereactive. Presiunea sanguină este 120/60 mm Hg, pulsul 85/min, temperatura 36,5°C. La examenul fundului de ochi se observă un edem papilar hiperemic important.

Electrocardiograma nu este modificată. Determinarea gazelor din sânge evidențiază o acidoză metabolică profundă. Lactacidemia este 2,2 mmol/l, iar corpii cetonici sunt absenți. Examenul toxicologic relevă o concentrație a metanolului în sânge de 150 mg% și prezența benzodiazepinelor în sânge și în urină. Pacientul decedează la puțin timp de la internare.

Probleme și discuții

- Care este mecanismul ce explică toxicitatea metanolului? Care sunt factorii care dau nota de gravitate a acestei intoxicații?
- Care sunt factorii de prognostic defavorabil în cazul acestui pacient?
- Care este tratamentul de bază al acestei intoxicații?

Caz clinic 4

O femeie în vârstă de 23 de ani, cântărind 45,8 kg, este implicată într-un accident de circulație. Este arestată sub acuzația de conducere în stare de ebrietate. La poliție își pierde cunoștința și este transportată la spital. După ce își va reveni, va povesti următoarele: pe stomacul gol a consumat 780 ml băutură alcoolică cu concentrația de 50% alcool (v/v) în interval de 2 ore. Accidentul a survenit imediat după ce a părăsit barul. Mai târziu a recunoscut că face abuz de alcool de la vârsta de 13 ani și că a fost externată dintr-un centru de reabilitare a alcoolicilor cu o săptămână înainte de accident.

La sosirea în serviciul de urgență, pacienta s-a aflat în comă de gradul 1, prezentând răspuns la stimuli dureroși. Valorile examenului de laborator au fost normale sub aspectul pH-ului, electroliților și glucozei. Screeningul toxicologic nu a evidențiat o intoxicație medicamentoasă. Alcoolemia a fost de 780 mg%. S-a practicat spălătură gastrică, urmată de administrarea de cărbune activat. După 2 ore alcoolemia a scăzut la 730 mg% și a început să răspundă la solicitări verbale. La 3 ore alcoolemia a fost de 420 mg%, iar după 11 ore a fost externată cu o alcoolemie de 190 mg%.

Probleme și discuții:

- Să se calculeze alcoolemia maximă pe care subiectul ar fi trebuit să o prezinte după absorbția completă a dozei ingerate. Dacă valoarea calculată nu corespunde cu alcoolemia determinată la internarea la urgență, să se explice diferențele apărute.
- Luând în considerare valoarea alcooliei la internare, ar fi eficientă hemodializa pentru reducerea concentrației alcoolului? În acest caz este utilă hemodializa?
- Să se calculeze cantitatea de alcool ce ar fi trebuit să se elimine în 11 ore, să se determine nivelul teoretic al alcooliei la 11 ore și să se compare cu alcoolemia la externare. Să se explice eventualele diferențe.

OBSERVAȚII

Alcoolemia maximă după absorbția completă a dozei ingerate se calculează cu formula lui Widmark:

$$C = [A \times 0,8 \times 100] / [G \times r]$$

unde: C = alcoolemia (g%)
0,8 = densitatea specifică a alcoolului
G = greutatea corporală (g)
r = raportul de distribuție a alcoolului (= 0,55 pentru femei)

A = cantitatea de alcool ingerat (100%)

Viteza de dispariție a alcoolului din sânge este de aproximativ 18 mg/100 ml/oră.

Caz clinic 5

O femeie sănătoasă, bine hrănită, se plânge de o “albeață a imaginilor, ca și cum ar păși pe un câmp înzăpezit”. În seara anterioară prezentării în clinica de urgențe a consumat 60-90 ml dintr-o votcă de 43% alcool și două pahare de vin. Nu a sesizat nimic neobișnuit în seara anterioară. A fost internată la urgență cu o respirație neregulată, rapidă (30 / minut), tensiune arterială 170 / 105 mmHg (în antecedente a avut tensiune labilă) și puls 110 bătăi pe minut. Rezultatele analizei de laborator au fost:

- $[\text{Na}^+] = 135 \text{ mmoli / l}$
- $[\text{K}^+] = 4,7 \text{ mmoli / l}$
- $[\text{Cl}^-] = 107 \text{ mmoli / l}$
- $[\text{HCO}_3^-] = 6 \text{ mmoli / l}$
- pH –ul sângelui = 7,21
- pCO_2 (presiunea parțială a CO_2) = 11 mm Hg
- pO_2 (presiunea parțială a O_2) = 123 mm Hg

Pe baza simptomatologiei s-a presupus existența unei intoxicații cu metanol, iar examenul toxicologic a evidențiat o concentrație a metanolului în sânge de 140 mg / 100 ml.

Tratamentul aplicat a constat din perfuzie cu etanol, bicarbonat de sodiu și hemodializă timp de 6 ore. Pacienta nu a acuzat alte tulburări în timpul dializei. Nivelele sanguine ale metanolului au scăzut la zero la sfârșitul dializei, iar examenul oftalmologic a evidențiat doar o ușoară paloare a discului optic, în rest recuperarea fiind completă.

Probleme și discuții

- Care este sursa cea mai probabilă de metanol?
- Pacienta a prezentat lacună anionică normală sau crescută?
- De ce nu s-a aplicat spălătura gastrică și nu s-a administrat cărbune activat în acest caz?
- Explicați apariția târzie a simptomelor intoxicației cu metanol (tulburările vizuale) în acest caz.
- De ce este recomandată hemodializa.

OBSERVATII

Lacuna anionică este diferența între concentrația cationilor din ser (Na^+ și K^+) și suma concentrațiilor anionilor de bicarbonat și de clor:

$$(\text{Na}^+ + \text{K}^+) - (\text{HCO}_3^- + \text{Cl}^-)$$

Valorile normale ale lacunei anionice sunt în jur de 10 mmoli /l (7-15 mmoli /l). Dacă aceste valori sunt mai mari de 15 mmoli /l, acest fapt indică un exces de anioni (corpi cetoni, acid lactic), fapt sugestiv pentru o acidoză metabolică.

În cazul intoxicațiilor cu alcool metilic și etilenglicol se observă o acidoză metabolică severă cu lacună anionică.

Caz clinic 6

Nouă muncitori părăsesc orașul Nouakchott din Mauritania într-o dimineață de februarie, pentru a ajunge pe șantierul aflat la o distanță de 40 de km de oraș. Deoarece ei nu au ajuns încă pe șantier la ora două după masă, șeful de șantier trimite o echipă în căutarea lor. Ei sunt regăsiți la jumătatea drumului, imobilizați în deșert. Camionul, livrat din Germania cu o zi înainte, este intact, dar asupra muncitorilor pare să se fi abătut un cataclism.

Salvatorii au regăsit: 1 mort, 4 persoane comatoase, 3 în convulsii. Singurul dintre muncitori care a putut fi interogat, deși a prezentat semne de encefalopatie, a dat explicații incoerente: “era foarte cald, nu am avut nimic de băut, a băut tot ce se găsea acolo și nu a fost bine”.

Muncitorii sunt duși la spitalul din Nouakchott, unde se constată că toți prezintă oligoanurie. La toți se observă acidoză metabolică intensă (pH între 7,20 și 6,85), fără creșterea lactatilor și fără cetoacidoză. Ei nu prezintă nici febră, nici deshidratare, nici tendință de colaps, în ciuda unor tulburări de ritm ventricular de tip hiperexcitabilitate, prezente la 2 pacienți. Cauza nu este deci căldura excesivă. Unul din subiecții comatoși și unul în stare convulsivă vor muri în timpul serii, înainte de a li se asista respirația. Un altul, aflat în comă calmă, hipotonică, cu midriază bilaterală, va muri în timpul nopții, în ciuda ventilației asistate. Chiar dacă nu s-a putut efectua o electroencefalogramă, se poate presupune existența decerebrării.

Pentru ceilalți pacienți, compania angajatoare a negociat transferul într-un spital parizian. Centrul antitoxic solicită laboratorului cercetarea prezenței substanțelor toxice în sânge și analiza sedimentului din urina adusă împreună cu pacienții. Supraviețuitorii, toți cu anurie și acidoză, sunt supuși în primul rând epurării extrarenale. În 48 de ore vor mai muri încă 2 pacienți, unul consecutiv decerebrării, iar celălalt datorită unor tulburări paroxistice de ritm, fără anomalie hidroelectrolitică, evocând deci o miocardită toxică.

Probleme și discuții

- Pe baza simptomatologiei și a evoluției intoxicației, care presupuneți că sunt rezultatele examenului de laborator?
- Care credeți că a fost sursa substanței toxice implicată în această intoxicație colectivă?
- Comparați eficiența tratamentului prin antidotism comparativ cu tratamentul simptomatic în acest caz particular și apreciați dacă decizia de a se aplica doar tratamentul simptomatic a fost cea corectă.

Caz clinic 7: Pancreatite ciclice

În momentul în care D-nul Z. este internat în secția de toxicologie a unui spital parizian, diagnosticul său a fost deja pus: este primul caz semnalat în Franța de „sindrom al uleiului spaniol”. În perioada în care se produce această intoxicație, în presă sunt prezentate o serie de intoxicații, semnalate în special în regiunea Madridului, în urma consumului unor uleiuri vândute la preț redus, care inițial fuseseră destinate utilizării industriale, fiind apoi „renaturate”.

Istoricul D-lui Z. este curios. El este un muncitor de origine marocană, care trăiește în Franța de mai mulți ani și nu are antecedente deosebite. Cu câteva luni în urmă, el a început să acuze dureri abdominale violente, însoțite de stare de greață. Este examinat în serviciul de urgență al unei clinici de chirurgie, unde se constată următoarele:

- creștere a amilazemiei la 300 U/l
- creștere ușoară a transaminazelor: TGO = 120 U/l, TGP = 132 U/l
- ușor edem al capului de pancreas observat la ecografie, care poate indica o pancreatită acută.

Este reținut diagnosticul de pancreatită acută și D-nul Z este internat în clinica de chirurgie, fiind programat pentru operație.

Două zile mai târziu, soția sa ajunge și ea în aceeași clinică, prezentând simptome similare: dureri abdominale intense însoțite de o creștere a amilazemiei. În cazul ei, simptomele dispar destul de repede și ea părăsește clinica în câteva zile, lăsându-și soțul suferind sub observație. Di păcate, vindecarea D-nei Z este de scurtă durată, la puțin timp după întoarcerea la domiciliu revenind durerile abdominale. În plus, fiul cel mare întors din vacanță acuză și el dureri abdominale violente.

Probleme și discuții

- Este această coincidență de simptomatologie compatibilă cu diagnosticul de pancreatită?

- Așa cum s-a menționat, noul diagnostic evocat este cel de intoxicație. De ce natură poate fi intoxicația care a produs aceste fenomene?
- La transferul în secția de toxicologie s-a presupus că este vorba despre sindromul uleiului spaniol, deoarece familia primise o sticlă de ulei de la o rudă venită din Maroc. Examenul specializat a infirmat această ipoteză, pe de o parte datorită faptului că simptomatologia nu coincidea, iar pe de altă parte deoarece marca de ulei primită nu a fost niciodată implicată în producerea de fenomene toxice. În noua perspectivă, care este substanța pe care medicii, pe baza simptomatologiei comune, o incriminează în producerea acestei intoxicații?
- Care este tratamentul specific recomandat pentru rezolvarea acestor cazuri de intoxicație?

Caz clinic 8

O familie originară din Mali, locuiește într-un apartament de două camere situat într-un imobil vechi din nordul Parisului. Tatăl are două soții și 5 copii. Micul Ali, în vârstă de 5 ani, se simte sufocat în micul apartament, așa că în fiecare zi urcă într-o locuință dezafectată unde se joacă cu camarazii săi, mai mari decât el.

Acest copil, care este bine hrănit și normal, începe la un moment dat să vomeze, este somnolent și prezintă dificultăți la trezire. Părinții îngrijorați îl duc la spital, unde se constată absența febrei și a unui sindrom meningeal sau traumatic. Sporadic, copilul mai acuză dureri abdominale.

Examenul complementare decelează:

- o anemie normocromă, normocitară
- mici opacități pe radiografia abdomenului fără pregătire, care sunt fără îndoială de origine digestivă
- benzi radio-opace dense pe versantul metafizar al cartilajelor de conjugare ale tibiei și peroneului.

Probleme și discuții

- Care este diagnosticul ce poate fi reținut, pe baza simptomatologiei și a datelor de anamneză?
- Cum poate fi confirmat acest diagnostic?
- Care este tratamentul specific aplicat în această intoxicație?
- De ce micul Ali a fost singurul copil care a prezentat astfel de simptome?

Caz clinic 9

O femeie în vârstă de 19 ani, cu un istoric de tulburări psihiatrice și cântărind 70 kg, a ingerat 200 tablete de Codenal (forma farmaceutică britanică), care au conținut în total 2,3 g codeină bază și 1,7g fenobarbital. Ea este internată în secția de urgență cu comă profundă, pupile miotice și respirație superficială.

Pacientei i se administrează intravenos două doze de câte 0,4 mg naloxonă, după care ea prezintă o îmbunătățire semnificativă a respirației și o ușoară dilatare a pupilelor. Analiza conținutului gastric după spălătură a evidențiat prezența unor cantități mari de codeină, dar nu s-a procedat la determinarea cantitativă a acesteia în sânge sau urină.

În continuare s-a administrat nalorfină în perfuzie, 0,7 $\mu\text{g/kg/min.}$, dar după 36 de ore nu s-a constatat o îmbunătățire a statusului neurologic. Schimbarea antidotului s-a făcut deoarece spitalul nu a dispus de o cantitate suficientă de naloxonă. S-a încercat hemodializa, care a fost continuată 6 ore, dar a fost lipsită de rezultat.

După 5 zile s-a oprit perfuzia cu nalorfină, statusul respirator al pacientei rămânând satisfăcător. S-au observat semne ale lezării cerebrale și femeia a decedat brusc, în timpul unei crize convulsive, la 10 zile de la internare.

Probleme și discuții

- Care sunt semnele intoxicației cu opioide observate în acest caz?
- Necesitatea administrării unor doze repetate sau continue de antagonist este corelată cu tipul de opioid implicat în producerea intoxicației?
- Pacienta a ingerat o cantitate mare de codeină. Care este cauza cea mai probabilă a deprimării respiratorii observate: codeina sau fenobarbitalul?

Caz clinic 10

O femeie de 28 de ani cântărind 48 de kg, aflată sub tratament de substituție cu metadonă (80 mg metadonă/zi), ajunge în secția de urgență în stare comatoasă, dar cu capacitatea de a-și mișca extremitățile ca răspuns la stimuli dureroși. Ea afirmă că a ingerat aproximativ 90 de tablete, fiecare conținând 100 mg napsilat de propoxifen și 650 mg paracetamol. Pacienta a adormit, dar s-a trezit după 10 ore și a vomat de 5 ori. După 9 ore nu a mai răspuns la stimuli verbali și a fost adusă la urgență de persoanele din anturajul său.

La internare s-au constatat următoarele:

- presiune sanguină 100/70 mm Hg
- puls 60/min

- temperatură rectală 32°C
- diametrul pupilelor 8 mm
- raluri pulmonare
- prezența în urină a propoxifenului, metadonei, fenobarbitalului, secobarbitalului, pentobarbitalului, metaqualonei și acidului salicilic.

S-a administrat naloxonă în bolus de 2,8 mg, fără să se observe un răspuns. S-a făcut spălătură gastrică cu cărbune activat și apoi cu soluție de citrat de magneziu. S-a administrat acetilcisteină la 24 de ore de la ingestia medicamentului, administrarea repetându-se de 5 ori. La 36 de ore s-a inițiat hemodializa, care a continuat timp de 4 ore.

După această perioadă pacienta s-a trezit, părând a fi orientată și a putut să urmeze instrucțiunile. Ea a fost externată după două săptămâni de la internare, fără sechele hepatice sau cerebrale aparente.

Medicul care a internat-o a afirmat că probabilitatea ca pacienta să fi absorbit întreaga cantitate de substanțe ingerate este foarte mare, deoarece ea nu a vomat timp de 10 ore după ingestie. De asemenea, nivelele serice de paracetamol și propoxifen au fost în concordanță cu ingestia masivă care a fost recunoscută de pacientă.

Probleme și discuții

- Pacienta a supraviețuit în ciuda tuturor factorilor care prevedeau un prognostic negativ: doza, prezența barbituricilor, intervalul de 24 de ore până la administrarea acetilcisteinei, lipsa de reacție la administrarea dozei de naloxonă. Comentați influența acestor factori și explicați de ce pacienta a supraviețuit.
- Identificați manifestările clinice induse de paracetamol și de propoxifen.

Caz clinic 11

Y. și I. sunt doi gemeni de 23 de ani, de origine israeliană. Ei vin la Paris în luna iunie, pentru o durată de 8 zile. Cei doi tineri, solizi și în pantaloni scurți, sunt găzduiți de un prieten care pleacă pentru două săptămâni din localitate lăsând portăresei, conform obiceiului, o dublură a cheii de la apartament. După trei zile în care nu aude nici o mișcare în apartament, portăreasa se îngrijorează și se decide să utilizeze cheia de rezervă și să intre să vadă ce s-a întâmplat. Ea îi găsește pe cei doi tineri așezați pe fotolii, în stare de prostrație, epuizați și având la îndemână un vas în care au vomat. În apartamentul închis se simte un miros greu de diaree. În bucătărie nu sunt semne ale unei mese recente: nu sunt vase murdare, iar coșul de gunoi este gol.

Gemenii nu vorbesc limba franceză și nu pot să dea explicații, iar portăreasa negociază spitalizarea lor cu medicul de la Serviciul de Ambulanță, care constată prezența unor tulburări digestive difuze, o stare hemodinamică precară și deshidratare majoră, presupunând existența unei intoxicații alimentare.

La examinarea în secția de urgență, se constată simetria acestei patologii colective: cei doi subiecți prezintă midriază fixă, sunt afebrili, incapabili să se țină pe picioare, conștienți dar epuizați; ei afirmă că nu au dormit de la sosirea lor în Franța. Acuză dureri abdominale intense, cu scaune apoase și vomismente, care durează de trei zile. Mai spun că nu tolerează nici un aport de alimente pe cale orală.

Deși tulburările digestive par să indice o intoxicație alimentară, midriaza este un simptom discordant și poate orienta diagnosticul. Abdomenul este suplu și o radiografie fără pregătire elimină posibilitatea unei perforări sau a unei ocluzii. Fibroscopia gastrică nu evidențiază nici un obstacol duodenal.

Starea generală a pacienților este alterată, cu:

- oligo-anurie
- presiune arterială sistolică sub 100 mm Hg
- pierdere în greutate de 4 kg
- hemoconcentrare intensă: proteinemie de 110 g la un pacient și 96 la celălalt, hipocloronatremie (75-124 și 80-128), hipokalemie (2 mmol/l)
- pH-ul este aproape 7,4, pierderea de ioni H^+ prin vomismente fiind compensată de pierderea de ioni HCO_3^- prin scaun

Pacienții au electrocardiograma normală, ei nu sunt febrili, dar totuși au frisoane și piloerecție cutanată.

La examenul toxicologic nu s-a găsit nici un toxic cu tropism digestiv: nici colchicină, nici arsen, nici metale grele, iar consumul de ciuperci în luna iunie este puțin probabil.

S-a suspectat o intoxicație alimentară de tip botulism, stafilococie sau salmoneloză, dar nici o încercare de identificare nu a avut succes.

Tratamentul aplicat a fost unul simptomatic și a constatat din: aport de glucoză, lichide și electroliți prin perfuzii. În urma tratamentului a reapărut rapid diureza, s-a restabilit hemodinamica și au dispărut tulburările hidro-electrolitice. Au mai persistat încă 48 de ore midriaza și piloerecția cutanată.

Probleme și discuții:

- Care este diagnosticul pe care îl evocă asocierea midriazei cu piloerecția cutanată?
- Care a fost cauza ce a determinat starea patologică observată la cei doi tineri și care sunt simptomele caracteristice?
- A fost tratamentul aplicat cel adecvat? S-ar mai fi putut recurge și la o altă intervenție terapeutică?

Caz clinic 12

Un bărbat de 39 de ani, cunoscut drept alcoolic, este spitalizat cu o infecție submandibulară consecutivă unei fracturi. La examenul de laborator efectuat la internare se constată următoarele:

- activitatea serică a unor enzime: ASAT = 5640 U/l, ALAT = 354 U/l, LDH = 655 U/l, fosfataza alcalină = 385 U/l
- parametri biochimici: bilirubina = 165 mg/dl (față de valorile normale de 0,1-1,2 mg%)
- timpul de protrombină = 21 sec. (față de control: 10,6 sec.).

Deoarece aceste valori nu au corespuns unui ficat alcoolic, pacientul a fost interogat, încercându-se să se identifice alte cauze. În final, el a admis că a ingerat câte 3,8 g paracetamol pe zi (în total 21 g) în urmă cu o săptămână.

Pacientului i s-a aplicat tratament prin hemoperfuzie, datorită encefalopatiei incipiente. În ziua a patra, valorile ASAT și ALAT au fost de 925, respectiv 647 U/l, bilirubina 35 mg/dl, iar timpul de protrombină de 16,1 sec. (față de control 10,9 sec.). S-a decis întreruperea hemoperfuziei, iar în următoarele zile starea pacientului s-a îmbunătățit, el fiind externat fără sechele.

Probleme și discuții:

- Pacientul a ingerat aproximativ 21 g paracetamol în interval de o săptămână, ceea ce nu reprezintă în mod normal o doză toxică. Care este motivul pentru care s-a produs intoxicație la această doză?
- Revedeți procedeul hemoperfuziei. Credeți că hemodializa ar fi fost eficientă? Argumentați opinia dumneavoastră.

Caz clinic 13: Intoxicații cu salicilați la copii

13 a)

Un băiețel de 18 luni ce cântărește 10 kg este adus la spital cu următoarele simptome: febră, iritabilitate, hiperventilație și hematemeză. El a fost tratat în ultimele două zile pentru o infecție a căilor respiratorii superioare. Părinții spun că i-au administrat doar câte o tabletă de aspirină pentru copii la interval de 4-6 ore.

Deoarece s-a suspectat totuși o intoxicație cu salicilați, s-a solicitat laboratorului determinarea nivelului salicilaților. Concentrația determinată a fost de 55 mg/dl, iar pacientul a fost transferat într-un centru medical mai mare, pentru investigații suplimentare.

La sosirea în noul spital, pacientul a fost letargic, dar treaz. Examenul fizic a evidențiat semne de deshidratare moderată și o temperatură de 40,5°C. Pulsul a fost

de 220 bătăi/min., presiunea sistolică de 90 mm Hg, frecvența respiratorie de 70/min, față de valorile normale la copii de 80-160 bătăi pe min., 100-140 mm Hg și respectiv 20-50/min.

Rezultatele examenului de laborator au fost următoarele:

- Sodiul: 148 mEq/l
- Potasiul: 7,2 mEq/l
- Bicarbonatul: 11 mEq/l
- Glucoza: 87 mg/dl
- Azotul ureic: 158 mg/dl
- Creatinina: 3,9 mg/dl
- Leucocitele: 16000/mm³
- Timpul de protrombină: crescut
- Presiunea parțială a CO₂: 20 mm Hg
- pH: 7,34
- Nivelul sanguin al salicilatului: 168 mg/dl.

Tratamentul a constat în creșterea volumului circulant prin perfuzii cu ser fiziologic, glucoză și bicarbonat. La perfuzie s-au adăugat 50 g/l albumină. S-a practicat de asemenea spălătură gastrică cu ser fiziologic conținând cărbune activat și sulfat de magneziu. S-a administrat oxigen, iar copilul a fost plasat sub ventilație artificială.

Datorită debutului insuficienței renale și a persistenței nivelurilor crescute de salicilați, s-a inițiat dializa peritoneală cu o soluție de Impresol 1,5%, ce conține 5% albumină. După 24 de ore, nivelul seric al salicilaților a scăzut la 40 mg/dl, iar azotul ureic a fost redus la 34 mg/dl. După 48 de ore, nivelul salicilaților a fost doar de 4 mg/dl, iar funcția renală a fost îmbunătățită semnificativ. S-a decis întreruperea dializei, iar băiatul a continuat să prezinte semne de îmbunătățire a condiției sale. După 12 ore de la întreruperea dializei, pacientul a devenit hipotensiv și a început să prezinte semne de șoc aseptice, însoțite de leucocitoză. S-a pus diagnosticul de coagulare intravasculară diseminată, iar hemocultura a evidențiat prezența *E.coli*. În ciuda administrării de antibiotice și a altor măsuri suplimentare de tratament, victima a decedat în ziua a patra de spitalizare.

13 b)

Cu 12 ore înainte de internarea în serviciul de urgență, un băiat de 5 ani, fără alte probleme de sănătate, a acuzat dureri de stomac și a vomat. Mama copilului a observat că respirația acestuia era rapidă, dificilă, iar micuțul s-a plâns de zgomote în urechi. Mama a găsit o cutie goală de aspirină pentru copii și a decis să ducă băiatul la spital.

La internare pacientul a fost letargic, dar treaz. S-au observat semne de deshidratare, iar examenul fizic a relevat o temperatură rectală crescută (în jur de

40°C), o presiune sanguină de 110/64 mm Hg, un puls de 120 bătăi/min și o frecvență respiratorie de 45/min.

Rezultatele examenului de laborator au fost următoarele:

- concentrația serică a salicilatului: 61 mg/dl
- glucoza: 160 mg/dl
- presiunea parțială a CO₂: 25 mm Hg
- pH-ul seric: 7,3
- concentrația bicarbonatului: 15 mEq/l
- examenul urinei: pH = 5,3 și cetonurie

Pacientul a supraviețuit în urma aplicării unui tratament de întreținere.

Probleme și discuții:

- Comentați doza de aspirină pe care se presupune că a primit-o pacientul din cazul 1. Este probabil ca aceasta să reprezinte întreaga cantitate de aspirină ingerată? Dacă da, care sunt factorii care au condus la apariția complicațiilor și care au determinat creșterea nivelului de salicilați?
- Pacientului 1 i s-a administrat albumină în perfuzie. În ce scop?
- Este posibil ca pacientul din cazul 2 să fi ingerat o cantitate mai mare de salicilați decât victima din cazul 1, deși nivelul seric a fost mai mic? Dacă da, de ce?
- A prezentat vreunul din pacienți acidoză metabolică?
- Pacientul din cazul 1 a avut o glicemie normală, în timp ce la pacientul 2 s-a observat hiperglicemie. Cum se explică această diferență?

Tabel 6.1. Substanțe ce induc acidoze metabolice toxice

Mecanisme	Substanțe toxice	Semne biologice complementare
I. Agresiune acidă directă	Acidifianți: Clorură de amoniu Clorhidrat de arginină	Hipercloremie
Inhibarea respirației celulare	Toxici ce produc hipoxie histotoxică: Cianuri	Hiperlactatemie
Necroză celulară	Substanțe caustice: Acizi și baze tari	Hipovolemie
Metabolismul muscular lipsă de oxigen	Convulsivante: Izoniazidă Amfetamine Stricnină Cloraloză Teofilină Salicilați	Hiperlactacidemie (anoxie celulară)
	Alcooli: Etilic Metilic Etilenglicol	Hipokalemie Alcaloză respiratorie inițială
II. Pierdere de baze		
Digestiv	Substanțe toxice ce produc diaree	Hipokalemie
Renal	Acetazolamida	Urină alcalină
III. Eliminare insuficientă a ionilor de H^+	Toate insuficiențele circulatorii toxice	Hipoxie celulară + suprimarea filtrării glomerulare
	Insuficiență renală acută toxică Tetracicline degradate	Acidoză tubulară

Tabel 6.2. Substanțe ce induc hipoxii toxice

Tablou clinic	Substanță toxică sau cauză	Tratament
<i>Plămân normal- Hipoxemie</i>		
Paralizia centrului respirator	Anestezice, opiacee, tranchilizante, insecticide, stricnină	Ventilație asistată
Convulsii	Tabel 6.4.	
Paralizie musculară	Curara Organofosforice	Ventilație asistată Atropină, ventilație asistată
Deficit atmosferic de O ₂	Gaze sufocante, brom Exces de CO ₂ Concentrație excesivă de vapori nitroși, H ₂ S, hidrocarburi în aer	Reanimare cu aer pur
Obstrucția căilor aeriene	Edem glotic Edem caustic al limbii, faringelui, laringelui (acizi și baze tari)	Eliberarea căilor aeriene
Hipersecreție bronșică	Organofosforice Parasimpatomimetice	Ventilație asistată Atropină
Bronhospasm	Halogeni Caustice volatile	Aleudrine aerosol Corticoizi injectabili
<i>Plămân anormal - Hipoxemie</i>		
Perturbarea difuziei	Caustice: clor, amoniac	Antibiotice, corticoterapie
Edem pulmonar	Opiu Suprainfecții	Oxygenoterapie
Inhalare de lichid gastric		
Fibroză pulmonară	Paraquat	

Tabel 6.2. Continuare

Tablou clinic	Substanță toxică sau cauză	Tratament
<i>Anomalii circulatorii sau sanguine</i> Prăbușire tensională Hemoglobină inactivă	Colaps toxic Oxid de carbon Methemoglobinemie	Oxygenoterapie hiperbară Ventilație asistată cu O ₂ pur, albastru de metilen, exsanguinotransfuzii în cazuri grave
<i>Plămân normal – Sânge normal</i> Hipoxie tisulară	Cianuri Fluoruri Hidrogen sulfurat	Kelocianor, hidroxicobalamină, ventilație asistată cu O ₂

Tabel 6.3. Substanțe toxice și condiții ce determină bradicardii sinusale

Cauze ale bradicardiilor sinusale
Hipotermia < 35°C Digitalicele Betablocantele Stabilizanții de membrană Anticolinesterazicele: prostigmină, insecticide organofosforice, carbamice Clonidină (utilizată în tratamentul sindromului de abinență la heroinomani)

Tabel 6.4. Substanțe toxice ce produc convulsii

Tipul convulsiilor	Toxici incriminați	Semne asociate
Clonii	Derivați triciclici, antidepresive, hipocalcemiante Clorochin Bromură de metil	Anomalii ale conducerii intraventriculare Idem Sindroame cerebelare și extrapiramidale
Mal convulsiv	Săruri de bismut Sevraj la barbiturice sau benzodiazepine Izoniazidă Etilenglicol	Abuz recent întrerupt Acidoză metabolică Acidoză metabolică + anurie
Hiperexcitabilitate neuromusculară	Stricnină Hipoglicemiant Cloraloză Litiu Sindrom de sevraj Alcool Barbiturice Benzodiazepine	Hipoglicemie Hipersecreție bronșică Diabet insipid Abuz recent întrerupt

Tabel 6.5. Substanțe ce pot produce comă calmă

Cauze toxice ale comei calme
<i>De obicei însoțită de bradipnee și mioză</i> Morfina Codeina Codetilina Barbituricii cu acțiune rapidă
<i>Poate fi însoțită de bradipnee și mioză</i> Benzodiazepine Ciclopirolone (zopiclon) și Imidazopiridine (zolpidem) Meprobamat Fenotiazine sedative Baclofen Cloralhidrat Bromuri hipnotice Alte miorelaxante: clorproetazin

Tabel 6.6. Alterarea nivelului de conștiență. Bolnavul este confuz sau delirant?

	Alterare funcțională (psihiatrică)	Alterare organică (toxică, metabolică, neurologică)
Nivelul de conștiență	Stabil	Fluctuant
Atenția	Variabilă	Inexistentă sau de scurtă durată
Orientarea	Prezentă	Absentă
Gândirea	Adesea neliniștită, halucinatorie, uneori doar bizară sau complexă, în orice caz neadaptată la realitate	Puțin accesibilă sau intermitentă, niciodată foarte elaborată
Percepția	Dacă apar halucinații, ele sunt auditive	Dacă apar halucinații, ele sunt vizuale și tactile
Motricitatea	În general normală (exceptând situația tratamentelor anterioare cu neuroleptice, când pot să apară tremurături, akatisie) Fără deprimare respiratorie	Agitație Tresăriri Tremurături Fasciculații Clonii sau convulsii focale sau generalizate

Tabel 6.7. Substanțe toxice ce pot produce halucinații

Substanțe incriminate în producerea de halucinații	
Acid lisergic (LSD)	Canabis
Alcool	Difenhidramină
Amantadină	Hidantoine
Amitriptilină	Levodopa
Amfetamină	Lophophora williamsi (cactus)
Atropină	Metilfenidat
Baclofen	Morfină
Bismut (săruri)	Trihexifenidil
Bromocriptină	Unele ciuperci toxice
Camfor	Orice anticolinergic

Tabel 6.8. Substanțe ce induc hipertermii toxice

Etiologie	Semne asociate
Salicilați	Hiperpnee
Amfetamine	Delir halucinator
Atropinice	Tahicardie
Teofilină	Hipokalemie-hiperglicemie-acidoză
Cafeină	
IMAO și tricyclice	
Hormoni tiroidieni	
Nitroderivați ai fenolilor și crezolilor	Transpirații de culoare galbenă ce pătează lenjeria
Săruri ale metalelor grele (staniu, nichel, plumb, cobalt, zinc)	
Fenotiazine și butirofenone	(Sindrom neuroleptic malign)
Anestezice gazoase	(Hipertermie malignă)
Unele curarizante	Hipertonie-mioliză
	Hiperkalemie
Hipertonie persistentă după anoxie sau convulsii	
Complicații infecțioase sau tromboembolice	
Cocaină și crack	

Tabel 6.9. Hipokalemii de natură toxică

Mecanismul de producere	Substanțe incriminate
Captarea celulară a potasiului	Perfuzii alcaline Beta-adrenergice Teofilină Clorochin (și alți stabilizanți ai membranelor)
Pierdere renală de potasiu	Coca Corticoizi Diuretice
Pierdere de potasiu prin vomismente	Digitalină Emetice
Pierdere de potasiu prin diaree	Antibiotice (neomicină) Metale (arsen, mercur) Ciuperci toxice Colchicină Fosfor Tricloretilenă Sindrom de sevraj alcoolic

Tabel 6.10. Valorile normale ale unor parametri sanguini

Parametru	Valoarea normală
Azotul ureic din sânge	8-25 mg% (2,9-8,9 mM/l)
Bicarbonat	24-28 mEq/l (24-28 mmoli/l)
Bilirubina serică	
Totală	0,1-1,2 mg%
Directă	0,1-0,3 mg%
Indirectă	0,1-1,0 mg%
Gazele din sânge	
PH	7,35-7,45 (arterial) 7,36-7,41 (venos)
PCO ₂	35-45 mm Hg (arterial)
PO ₂	95-100 mm Hg (arterial)
Calciu	
Seric	8,5-10,5 mg%
Total	4,2-5,2 mEq/l
Cloruri	95-106 mEq/l (95-106 mM/l)
Creatinină	0,8-1,2 mg%
Glucoză	65-110 mg%
Hemoglobină (sânge total)	
Femei	12-16 g%
Bărbați	13,5-18 g%
Lactat dehidrogenaza	110-259 UI/ml
Fosfataza alcalină	5-13 unități% (King-Armstrong)
Potasiu	3,5-5,0 mEq/l
Sodiu	136-145 mEq/l
Transaminaze	
SGOT (ASAT)	
SGPT (ALAT)	

Tabel 6.11. Valorile normale ale semnelor vitale

Semnul vital	Valoarea normală
<i>Frecvența respiratorie</i>	
Adult	12-18 / min.
Copil	20-50 / min.
<i>Pulsul</i>	
Adult	60-90 bătăi / min.
Copil	80-160 bătăi / min.
<i>Presiunea sanguină</i>	
Adult	
Sistolică	100-140 mm Hg
Diastolică	60-90 mm Hg
Copil	
Sistolică	80 (+ 2 x vârsta în ani)
Diastolică	2/3 din cea sistolică
<i>Temperatura</i>	37°C (36-37,4°C)

Capitolul 6

ÎNTREBĂRI ȘI PROBLEME

Întrebări cu răspunsuri multiple

1. Ce informații se pot obține dintr-un studiu de toxicitate acută:
A) Nivelul care nu produce efect observat (NOEL)
B) DL_{50}
C) Indicele terapeutic
D) Organele țintă ale acțiunii toxice
E) Toate cele de mai sus
2. Indicele terapeutic este raportul dintre:
A) DT_{50} / DL_{50}
B) DE_{50} / DL_{50}
C) DL_{50} / DE_{50}
D) DE_{50} / DT_{50}
E) DL_1 / DE_{99}
3. Dacă se inhalează particule cu diametru de $20\mu m$, la ce nivel al sistemului respirator vor fi depozitate:
A) alveole
B) nas
C) trahee
D) bronhii
E) bronhiole terminale
4. Într-un studiu experimental, la animale se administrează un compus volatil. După doze mici, compusul se elimină din organism pe cale renală sub formă de metabolit. La doze mari, metabolismul este saturat. Dacă acest compus este marcat radioactiv, ce credeți că se observă după administrarea unei doze mari:
A) o scădere a radioactivității aerului expirat
B) o creștere a radioactivității în urină
C) o creștere a radioactivității în fecale
D) o creștere a radioactivității atât în urină cât și în aerul expirat
E) o creștere a radioactivității în aerul expirat în defavoarea urinei

5. Absorbția căror compuși este facilitată de creșterea pH-ului stomacal:
 - A) baze organice slabe
 - B) acizi tari
 - C) acizi organici slabi
 - D) baze tari
 - E) nici una din substanțele de mai sus
6. Coeficientul de partiție lipide /apă al unei substanțe este un indicator al:
 - A) carcinogenității
 - B) unui timp de înjumătățire lung
 - C) potențialului de bioacumulare
 - D) unui volum aparent de distribuție mic
 - E) toxicității cronice
7. Metabolizarea unui compus exogen poate avea drept consecință:
 - A) acumularea compusului în țesuturi
 - B) creșterea excreției urinare
 - C) scăderea toxicității
 - D) modificarea structurii chimice
 - E) creșterea toxicității
8. Fenomenul de inducție enzimatică implică:
 - A) o creștere a sintezei enzimei
 - B) o creștere a activității enzimei
 - C) o creștere a greutatea ficatului
 - D) o modificare a specificității de substrat a enzimei
 - E) o creștere a fluxului biliar
9. Ce efecte pot produce asupra embrionului substanțele care acționează în prima săptămână de sarcină, după fertilizarea oului:
 - A) moarte
 - B) malformații
 - C) anomalii funcționale
 - D) retardarea creșterii
 - E) sterilitate
10. O substanță teratogenă poate produce malformații congenitale ca urmare a:
 - A) expunerii masive a mamei înainte de fertilizare
 - B) expunerii femelei în timpul organogenezei
 - C) expunerii masculului în timpul spermatogenezei
 - D) expunerii nou-născutului prin intermediul laptelui

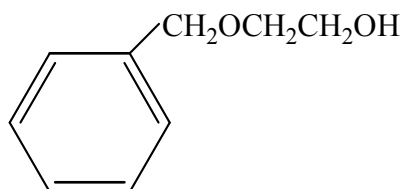
E) nici unul din răspunsurile de mai sus

11. Care din următoarele aspecte este cel mai important în determinarea nivelului de toxicitate al unei substanțe chimice:

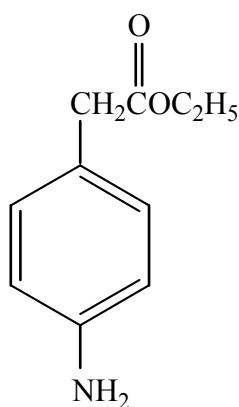
- A) structura chimică
- B) doza
- C) metabolismul compusului
- D) excreția compusului
- E) detoxifierea metabolică a compusului

Probleme

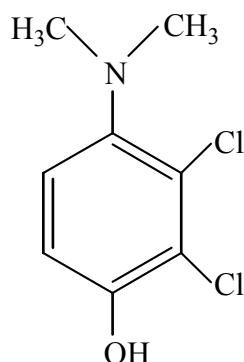
Problema nr.1. Structura de mai jos este cea a unui medicament nou ipotetic, care este destinat administrării orale. Arătați schema de metabolizare previzibilă. Menționați enzimele care catalizează reacțiile de metabolizare prevăzute.



Problema nr.2. Compusul de mai jos este un potențial nou medicament. Care sunt metaboliții previzibili? Arătați schema de metabolizare și enzimele implicate. Care sunt metaboliții care ar putea prezenta toxicitate?



Problema nr.3. Compusul de mai jos este un potențial rodenticid, la care se preconizează o expunere a rozătoarelor prin intermediul alimentelor. Sugerați căile posibile de metabolizare și enzimele implicate. Indicați posibii metaboliți toxici ce s-ar putea forma.



Problema nr.4. Monoxidul de carbon este un toxic responsabil de numeroase decese. Discutați mecanismul de acțiune toxică și tratamentul intoxicației. Un mecanic auto expus într-un garaj la o concentrație în aer de 0,1% monoxid de carbon este expus unui risc? (Concentrația oxigenului în aer este 21%, iar constanta lui Haldane este 240.) Care sunt factorii care ar putea influența gravitatea intoxicației și deznodământul acesteia?

Problema nr.5. În tabelul de mai jos sunt prezentate efectele diferitelor tratamente combinate în intoxicația cu cianură de potasiu la șoareci. Interpretați aceste date și explicați mecanismele care stau la baza eficienței tratamentului. Descrieți mecanismul acțiunii toxice a cianurii.

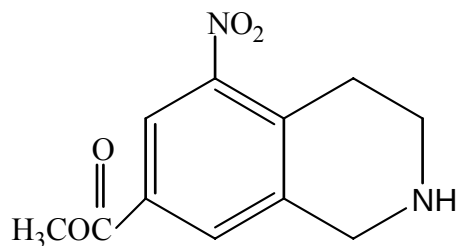
Experiment Nr.	Tratament				
	Oxigen hiperbaric	NaNO ₂ (g/kg)	Na ₂ S ₂ O ₃ (g/kg)	EDTACo ₂ (mg/kg)	DL ₅₀ (mg/kg)
1	-	0	0	0	11,8
2	+	0	0	0	1102
3	-	0,1	0	0	21,2
4	+	0,1	0	0	21,2
5	-	0	1,0	0	34,8
6	+	0	1,0	0	39,0
7	-	0,1	1,0	0	51,7
8	+	0,1	1,0	0	73,0
9	-	0	0	15,0	94,0
10	+	0	0	15,0	93,0

„+” și „-” indică prezența, respectiv absența oxigenului hiperbar

Șoarecii au fost tratați cu nitrit de sodiu sau tiosulfat de sodiu înainte de administrarea cianurii de potasiu, sau cu EDTA dicobaltic, după administrarea cianurii.

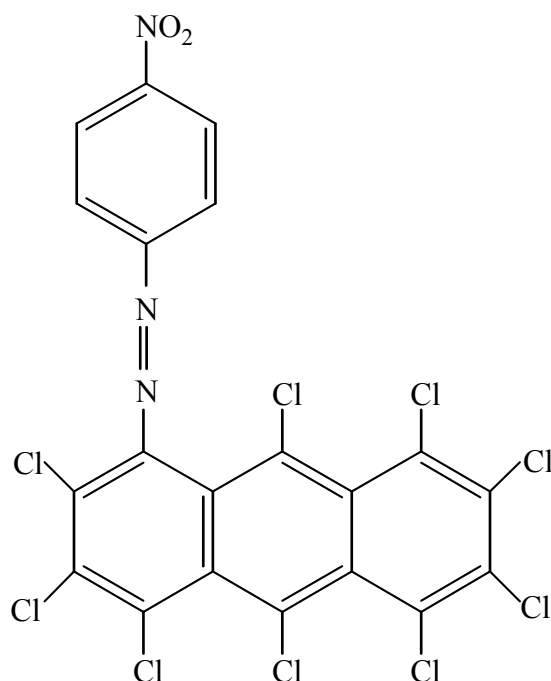
Problema nr.6. Substanța de mai jos este un medicament hipotensiv potențial. Ea poate fi administrat oral sau prin plasture dermic, iar compusul părinte este activ farmacologic. Care sunt căile metabolice previzibile pentru acest compus? Pot fi anticipați factori genetici care ar putea să influențeze metabolismul acestui compus? Dacă da, este de presupus că acești factori ar putea avea consecințe farmacologice sau toxicologice?

Este previzibilă existența unor diferențe de metabolism între cele două căi posibile de administrare?



Problema nr.7. Compusul de mai jos a fost sintetizat în vederea utilizării ca un nou colorant alimentar. Însă, expunerea cronică a șoarecilor la substanța administrată în apa de băut a condus la o creștere semnificativă a incidenței tumorilor pulmonare și a altor efecte toxice (vezi Tabel). Totuși, la șobolani nu s-a constatat o creștere a incidenței tumorilor pulmonare. Aceste efecte nu au fost observate la doze mai mici. Se estimează că ingestia la om ar fi de 1 $\mu\text{g} / \text{kg} / \text{zi}$.

Ținând cont de structura compusului, care sunt metaboliții ce presupuneți că s-ar putea forma pe baza datelor prezentate; sugerați mecanisme posibile pentru efectele observate. Ce alte experimente ați recomanda pentru a vă susține ipoteza? Din datele de mai sus, cum ați recomanda producătorului să procedeze cu acest compus cu destinație de colorant alimentar? Explicați poziția dumneavoastră.



<i>Specie</i>	<i>Doza (mg/kg/zi)</i>	<i>Calea de administrare</i>	<i>Toxicitate</i>	<i>Incidența tumorilor</i>
Șoarece	500	Apă de băut	Hemoliza eritrocitelor	25%
Șoarece	500	Injectie subcutană	Nu a fost detectată	19%
Șoarece (martor)	0	-	-	20%
Șobolan	500	Apă de băut	Mărirea ficatului, fără hemoliză	12%
Șobolan (martor)	0	-	-	13%

ANEXA I

Valori limită de expunere profesională pentru agenții chimici

Nr.c rt.	Denumire	Valoare limită mg/m ³ aer	
		Concentrația medie	Concentrația maximă admisă
1.	Acetaldehida	90	180
2.	Acetat de etil	400	500
3.	Acetonă	1200	-
4.	Acetonitril	70	-
5.	Acid acetic	25	-
6.	Acid bromhidric	-	6,7
7.	Acid cianhidric	0,30	1
8.	Acid clorhidric	8	15
9.	Acid fluorhidric	1,50	2,50
10.	Acid formic	9	-
11.	Acid ortofosforic	1	2
12.	Acid oxalic	1	-
13.	Acid picric	0,1	-
14.	Acid sulfuric și anhidridă sulfuroasă	0,50	1
15.	Alcool etilic	1900	9500
16.	Alcool metilic	260	-
17.	Aluminiu și oxizi (pulberi)	3	10
18.	Aluminiu și oxizi (fumuri)	1	3
19.	Amoniac	14	36
20.	Anhidridă acetică	15	25
21.	Anilină	3	5
22.	Arsen și compuși anorganici	0,01	0,100
23.	3-4 benzpiren (benz(a)piren)	-	-
24.	Benzen	3,25	-
25.	Benzidină	-	-
26.	Benzine (carburanți)	300	500
27.	Bioxid de carbon	9000	-
28.	Bioxid de sulf (anhidridă sulfuroasă)	5	10
29.	Brom	0,7	-
30.	Cadmiu și compuși (exprimați în Cd)	0,05	-
31.	Cianuri și cianogeni (exprimați în CN ⁻)	0,50	1
32.	Clor	-	1

33.	Clorură de vinil	7,77	-
34.	Crom trivalent	0,50	-
35.	Cupru (fumuri)	-	0,20
36.	Cupru (pulberi)	0,50	1,50
37.	2,4D (acid 2,4-diclor-fenoxiacetic)	5	10
38.	DDT (p,p''-diclordifenil-triclorețan)	0,50	1
39.	Dieldrin (1,2,3,4,10,10hexaclor-6,7epoxi-1,2,4a,5,6,7,8,8a,octahidro-1,4,5,8,dimetano-naftalină)	0,20	0,25
40.	Dietilamina	30	-
41.	Difenilamina	4	6
42.	Dimetilamina	3,8	9,4
43.	Dinitrofenol	0,70	1
44.	4,6-dinitro-o-crezol	0,05	0,20
45.	Eter etilic	300	800
46.	Etilenglicol	52	104
47.	Fenol	5	-
48.	Fluor	1,58	3,16
49.	Formaldehida	1,20	3
50.	Hexan (n)	170	-
51.	Hexaclorciclohexan (HCH, Lindan)	0,30	0,50
52.	Hidrocarburi alifatice (white spirit, solvent nfta, ligroina, petrol lampant, motorină)	700	1000
53.	Hidrocarburi policiclice aromatice (fracțiunea extractibilă în benzen)	0,20	-
54.	Hidrogen arseniat	0,10	0,30
55.	Hidrogen sulfurat	10	15
56.	Iod	0,50	1
57.	Mercaptan (metil și etil)	-	1
58.	Mercur	0,05	0,15
59.	Mercur (compuși organici)	-	0,01
60.	Metan	1200	1500
61.	Nichel și compuși	0,10	0,50
62.	Nichel carbonil	0,05	0,10
63.	Nicotina	0,5	-
64.	Nitrobenzen	5	-
65.	Ozon	0,10	0,20
66.	Oxid de carbon	20	30
67.	Oxid de etilenă	1,80	-

68.	Oxizi de azot (exprimați în NO ₂)	5	8
69.	Oxid de cadmiu (fumuri)	0,05	0,10
70.	Parathion (o,o-dietil-o-p-nitrofenil-tiofosfat)	0,05	0,15
71.	Plumb și compuși (în afară de PbS)	0,05	0,10
72.	Rezorcină (m-dihidroxi-benzen)	10	15
73.	Stiren (monomer feniletilen)	50	150
74.	Sulfură de carbon	10	20
75.	Tetraclorură de carbon	30	50
76.	Tetraetil și trietil plumb	0,01	0,03
77.	Toluen	100	200
78.	Trinitrotoluen (TNT)	0,50	1
79.	Warfarină sau Cumaten (3- α -fenil- β -acetil-etil-4-hidroxicurarină)	0,10	0,30

ANEXA II

Limite biologice tolerabile (LTB)

Nr. crt.	Substanța	Indicator biologic	Material biologic	LBT propuse
1.	Acetona	Acetona	urină	50 mg/l
2.	Alcool metilic	Metanol	urină	6 mg/l
3.	Anilina	p-amino-fenol methemoglobina	urină sânge	10 µg/l 1,5% Hb totală
4.	Arsen și AsH ₃	Arsen	urină păr	50 µg/gC 0,5 mg/100g
5.	Benzen	Acid S-fenilmercapturic Fenoli totali Sulfat index	urină urină urină	25 µg/gC 50 mg/l >0,8 mg/l
6.	Cadmium și compuși anorganici	Cadmium Proteine	urină sânge urină	5 µg/gC 5 µg/l 2 mg/l
7.	Compușii cian (acid cianhidric, cianuri, cianogen)	Tiocianați	urină	30 mg/l
8.	Fenol	Fenol total	urină	50 mg/l
9.	Fluor - compuși	Fluor	urină	5 mg/gC
10.	Mercur și compuși	Mercur	sânge urină	10 µg/l 35 µg/gC
11.	Oxid de carbon	COHb	sânge	5% Hb
12.	Parathion	p-nitro-fenolul total Activitatea colinesterazică	urină sânge	500 µg/l scădere >30%
13.	Pesticide organofosforice	Activitatea colinesterazică	sânge	scădere >30%
14.	Plumb	Plumb Acidul Δ-ALA Coproporfirine urinare Protoporfirine urinare	urină sânge păr urină urină sânge	150 µg/l 40 µg/100 ml 3 µg/cm 10 mg/l 300 µg/l 100µg/100 ml eritrocite
15.	Sulfura de carbon	Acid 2-tio-tiazolidin 4 carboxilic Testul iodazida	urină urină	4 mg/l E = 6,5
16.	Toluen	Acidul hipuric o-crezol	urină urină	2 g/l 3 mg/l

ANEXA III

Concentrații terapeutice, toxice sau letale ale unor substanțe toxice

Substanța	Concentrații în mg/l								
	Normal/ Terapeutic			Toxice			Letale /Postmortem		
	sânge	Ser/ plasmă	urină	sânge	Ser/ plasmă	urină	sânge	Ser/ plasmă	urină
Acid acetilsalicilic		20-200			150		500		500
Acetaminofen		10-20			400			1500	
Amitriptilina	0,05-0,2	0,04-0,2			0,3-0,5	0,5-10	2	1,5	2,5
Amfetamina	0,02-0,03	0,02-0,15	1-5		0,2	25	0,5	0,5	25-700
Antidepresive triciclice		0,1-0,25			0,5			1	
Arsen	0-0,01	0-0,2	0,002-0,05	0,6 (a) 0,01-0,5 (c)	0,05	1-20 (a) 0,05-5 (c)	10	10	0,2
Barbiturice: - acțiune lungă - acțiune medie - acțiune scurtă		5-20 0,3-10 0,1-8			10 20 10		50 30 20		
Benzen	0-0,0006						1		1
Brom		50		0,5-1,5			2		
Cadmiu	0,0006	0-0,00036	0-0,0014	0,1	0,05	0,1-1	1		5,6
Cafeina		2-10	0-10		15	15	80	80	25
Carboxihemoglobina	1-3,5% (nf) 5,8 (f)			>10% (nf) >15% (f)			50%		
Cianura	0,02 (nf) 0,04 (f)	0,004-0,1	0-0,03 (nf) 0,01-0,8 (f)	0,2	1 (a)		1		0,5
Clordiazepoxid		0,4-2		5,5	3	1	20		8

Cloroform				70-250			390		
Clorpromazina - la copii		0,01-0,3 0,04-0,08		1	0,05-1		3	3	1,2
Cocaina		0-0,3	0-10		0,5		1	1	35
Codeina	0,03-0,1	0,01-0,1	5-20		0,2	25	1,6	1,8	50
DDT		13 µg/l							
Diazepam	0,5	0,1-1		5	1,5-15		10	20	
Digitoxina		0,003-0,025			0,03			0,03-0,1	
Digoxina		0-0,002	0,025-0,125		0,003	0,005		0,005	
Dinitro-o-crezol					30-40 µg/			75	
Etanol	1,5-30			1.000			4.000		5.000
Eter etilic		0,9-1 g/l						1,4-1,89 g/l	
Etilenglicol		0			200- 500		300	2.000	600
Fenciclidina		0,01-0,2	0,04	0,02	0,1-0,8	0,4	0,3	0,5	5
Fenobarbital	6-30	10-25	4-20	30	15-30		50	60	40
Flunitrazepam		0,001-0,015			0,05				
Fluor		0-0,5	0,2-3		0,5		2	2	17-300
Glutetimida		0,2			10-80			30-100	
Haloperidol - la copii		0,0005-0,04			0,05 0,01- 0,05		1		7
Hidrogen sulfurat								0,92	
Imipramina		0,04-0,15			0,3-1		1	2	10-50
Izoniazida	10	0,2-10			20	400	65	50	470
Levomeproma- zina		0,005-0,15			0,4		8	0,4	

Litiu		4,2-8,3 0,3-1,4 mmol/l			10 1,5 mmol/l		14 2,5m mol/l	34 3mEq/l	7mmol/ l
LSD		0,001	0,001		0,002	0,002-0,03	0,005	0,005	
Meproamat	3-26	5-15	25-100		10-25		43	120	200
Mercur	0,0017-0,01	0-0,004	0-0,007	0,2	0,3	0,3	0,5		0,8
Metanol		0-1,5	0-2	200	100		1.000	400	
MDMA (Ecstasy)		0-0,3	0-17		0,5-6,5 (a)		0,6	[0,42]	
Morfina	0-0,1	0-0,1	0-0,5		0,1	0,5	0,2	0,1	5
Nitrazepam		0,03-0,1			0,2		1	5	1-10
Nortriptilina		0,05-0,2	0,2-5		0,2		10	1	25-100
Oxazepam		0,1-1,4						3	
Paracetamol	10-20			400			1500		
Paraquat				0,1	0,2	0,6	1	2	0,6- 0,20
Plumb	0,05-1,3			0,7					
Chinidină	0,36	0,35	10-100	10	5-15		30	15	
Chinină		2-8	5-10		10		10	12	140
Stricnină				2			9-12		
Tioridazină		0,15-1			2		5	5	0,5-2
Tiocianți		1-4 (nf) 3-12 (f)	1-4 (nf) 17 (f)	3	6-35	1,5-15		200	
Toluen	0-0,001			1		0-5	4	10	1-5
Tramadol		0,1-1						2	
trifluoperazină		1-2			2-3			5	
Warfarina	1-10								

(a) = intoxicație acută; (c) = intoxicație cronică; (f) = nivel la fumători; (nf) = nivel la nefumători

ANEXA IV
Valorile probit corespunzătoare procentelor de letalitate

%	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
0	...	1,9098	2,1218	2,2522	2,3479	2,4242	2,4879	2,5427	2,5911	2,6344
1	2,6737	2,7096	2,7429	3,7738	2,8027	2,8299	2,8556	2,8799	2,9031	2,9251
2	2,9463	2,9665	2,9859	3,0046	3,0226	3,0400	3,0569	3,0732	3,0890	3,1043
3	3,1192	3,1337	3,1478	3,1616	3,1750	3,1881	3,2009	3,2134	3,2256	3,2376
4	3,2493	3,2608	3,2721	3,2831	3,2940	3,3046	3,3151	3,3253	3,3354	3,3454
5	3,3551	3,3648	3,3742	3,3836	3,3928	3,4018	3,4107	3,4195	3,4282	3,4368
6	3,4452	3,4536	3,4618	3,4699	3,4780	3,4859	3,4937	3,5015	3,5091	3,5167
7	3,5242	3,5316	3,5389	3,5462	3,5534	3,5605	3,5675	3,5745	3,5813	3,5882
8	3,5949	3,6016	3,6083	3,6148	3,6213	3,6278	3,6342	3,6405	3,6468	3,6531
9	3,6592	3,6654	3,6715	3,6775	3,6835	3,6894	3,6953	3,7012	3,7070	3,7127
10	3,7184	3,7241	3,7298	3,7354	3,7409	3,7464	3,7519	3,7574	3,7228	3,7681
11	3,7735	3,7788	3,7840	3,7893	3,7945	3,7996	3,8048	3,8099	3,8150	3,8200
12	3,8250	3,8300	3,8350	3,8399	3,8448	3,8497	3,8545	3,8593	3,8641	3,8689
13	3,8736	3,8783	3,8830	3,8877	3,8923	3,8969	3,9015	3,9061	3,9107	3,9152
14	3,9197	3,9242	3,9286	3,9331	3,9375	3,9419	3,9463	3,9506	3,9550	3,9593
15	3,9636	3,9678	3,9721	3,9763	3,9806	3,9848	3,9890	3,9931	3,9973	4,0014
16	4,0055	4,0096	4,0137	4,0178	4,0218	4,0259	4,0299	4,0339	4,0379	4,0419
17	4,0458	4,0498	4,0537	4,0576	4,0615	4,0654	4,0693	4,0731	4,0770	4,0808
18	4,0846	4,0884	4,0922	4,0960	4,0998	4,1035	4,1073	4,1110	4,1147	4,1184
19	4,1221	4,1258	4,1295	4,1331	4,1367	4,1404	4,1440	4,1476	4,1512	4,1548
20	4,1584	4,1619	4,1655	4,1690	4,1726	4,1761	4,1796	4,1831	4,1866	4,1901
21	4,1936	4,1970	4,2005	4,2039	4,2074	4,2108	4,2142	4,2176	4,2210	4,2244
22	4,2278	4,2312	4,2345	4,2379	4,2412	4,2446	4,2479	4,2512	4,2546	4,2579
23	4,2612	4,2644	4,2677	4,2710	4,2743	4,2775	4,2808	4,2840	4,2872	4,2905
24	4,2937	4,2969	4,3001	4,3033	4,3065	4,3097	4,3129	4,3160	4,3192	4,3224

%	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
25	4,3255	4,3287	4,3318	4,3349	4,3380	4,3412	4,3443	4,3474	4,3505	4,3536
26	4,3567	4,3597	4,3628	4,3659	4,3689	4,3720	4,3750	4,3781	4,3811	4,3842
27	4,3872	4,3902	4,3932	4,3962	4,3992	4,4022	4,4052	4,4082	4,4112	4,4142
28	4,4172	4,4201	4,4231	4,4260	4,4290	4,4319	4,4349	4,4378	4,4408	4,4437
29	4,4466	4,4495	4,4524	4,4554	4,4583	4,4612	4,4641	4,4670	4,4698	4,4727
30	4,4756	4,4785	4,4813	4,4842	4,4871	4,4899	4,4928	4,4956	4,4985	4,5013
31	4,5041	4,5070	4,5098	4,5126	4,5155	4,5183	4,5211	4,5239	4,5267	4,5295
32	4,5323	4,5351	4,5379	4,5407	4,5435	4,5462	4,5490	4,5518	4,5546	4,5573
33	4,5601	4,5628	4,5656	4,5684	4,5711	4,5739	4,5766	4,5793	4,5221	4,5848
34	4,5875	4,5903	4,5930	4,5957	4,5984	4,6011	4,6039	4,6066	4,6093	4,6120
35	4,6147	4,6174	4,6201	4,6228	4,6255	4,6281	4,6308	4,6335	4,6362	4,6389
36	4,6415	4,6442	4,6469	4,6495	4,6522	4,6549	4,6575	4,6602	4,6628	4,6655
37	4,6681	4,6708	4,6734	4,6761	4,6787	4,6814	4,6840	4,6866	4,6893	4,6919
38	4,6945	4,6971	4,6998	4,7024	4,7050	4,7076	4,7107	4,7129	4,7155	4,7181
39	4,7207	4,7233	4,7259	4,7285	4,7311	4,7337	4,7363	4,7389	4,7415	4,7441
40	4,7467	4,7492	4,7518	4,7544	4,7570	4,7596	4,7622	4,7647	4,7673	4,7699
41	4,7725	4,7750	4,7776	4,7808	4,7827	4,7853	4,7879	4,7904	4,7930	4,7955
42	4,7981	4,8007	4,8032	4,8058	4,8083	4,8109	4,8134	4,8160	4,8185	4,8211
43	4,8236	4,8262	4,8287	4,8313	4,8338	4,8363	4,8389	4,8414	4,8440	4,8465
44	4,8490	4,8516	4,8541	4,8566	4,8592	4,8617	4,8642	4,8668	4,8693	4,8718
45	4,8743	4,8769	4,8794	4,8819	4,8844	4,8870	4,8895	4,8920	4,8945	4,8970
46	4,8996	4,9021	4,9046	4,9071	4,9096	4,9122	4,9147	4,9172	4,9197	4,9222
47	4,9247	4,9272	4,9298	4,9323	4,9348	4,9373	4,9398	4,9423	4,9448	4,9473
48	4,9498	4,7524	4,9549	4,9574	4,9599	4,9624	4,9649	4,9674	4,9699	4,9724
49	4,9749	4,9774	4,9799	4,9825	4,9850	4,9875	4,9900	4,9925	4,9950	4,9975

%	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
50	5,0000	5,0025	5,0050	5,0075	5,0100	5,0125	5,0150	5,0175	5,0201	5,0226
51	5,0251	5,0276	5,0301	5,0326	5,0351	5,0376	5,0401	5,0426	5,0451	5,0476
52	5,0502	5,0527	5,0552	5,0577	5,0602	5,0627	5,0652	5,0677	5,0702	5,0728
53	5,0753	5,0778	5,0803	5,0828	5,0853	5,0878	5,0904	5,0929	5,0954	5,0979
54	5,1004	5,1030	5,1055	5,1080	5,1105	5,1130	5,1156	5,1181	5,1206	5,1231
55	5,1257	5,1282	5,1307	5,1332	5,1358	5,1383	5,1408	5,1434	5,1459	5,1484
56	5,1510	5,1535	5,1560	5,1586	5,1611	5,1637	5,1662	5,1689	5,1713	5,1738
57	5,1764	5,1789	5,1815	5,1840	5,1866	5,1891	5,1917	5,1942	5,1968	5,1993
58	5,2019	5,2045	5,2070	5,2096	5,2121	5,2147	5,2173	5,2198	5,2224	5,2250
59	5,2275	5,2301	5,2327	5,2353	5,2378	5,2404	5,2430	5,2456	5,2482	5,2508
60	5,2533	5,2559	5,2585	5,2611	5,2631	5,2666	5,2689	5,2715	5,2741	5,2767
61	5,2793	5,2819	5,2845	5,2871	5,2898	5,2924	5,2950	5,2976	5,3002	5,3029
62	5,3055	5,3081	5,3107	5,3134	5,3160	5,3186	5,3213	5,3239	5,3266	5,3292
63	5,3319	5,3345	5,3372	5,3398	5,3425	5,3451	5,3478	5,3505	5,3531	5,3558
64	5,3585	5,3611	5,3638	5,3665	5,3692	5,3719	5,3745	5,3772	5,3799	5,3826
65	5,3853	5,3880	5,3907	5,3934	5,3961	5,3989	5,4016	5,4043	5,4070	5,4097
66	5,4125	5,4152	5,4179	5,4207	5,4234	5,4261	5,4289	5,4316	5,4344	5,4372
67	5,4399	5,4427	5,4454	5,4482	5,4510	5,4538	5,4565	5,4693	5,4621	5,4649
68	5,4677	5,4705	5,4733	5,4761	5,4789	5,4817	5,4845	5,4874	5,4902	5,4930
69	5,4959	5,4987	5,5015	5,5041	5,5072	5,5101	5,5129	5,5158	5,5187	5,5215
70	5,5244	5,5273	5,5302	5,5330	5,5359	5,5388	5,5417	5,5446	5,5476	5,5505
71	5,5534	5,5563	5,5592	5,5622	5,5651	5,5681	5,5710	5,5740	5,5769	5,5799
72	5,5828	5,5858	5,5888	5,5918	5,5948	5,5970	5,6008	5,6038	5,6068	5,6098
73	5,6128	5,6158	5,6189	5,6219	5,6250	5,6280	5,6311	5,6341	5,6372	5,6403
74	5,6433	5,6464	5,6495	5,6526	5,6557	5,6588	5,6620	5,6651	5,6682	5,6713

%	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
75	5,6745	5,6776	5,6808	5,6840	5,6871	5,6903	5,6935	5,6967	5,6999	5,7031
76	5,7063	5,7095	5,7128	5,7160	5,7192	5,7225	5,7257	5,7290	5,7323	5,7356
77	5,7388	5,7421	5,7454	5,7488	5,7521	5,7554	5,7588	5,7621	5,7655	5,7688
78	5,7722	5,7756	5,7790	5,7824	5,7858	5,7892	5,7926	5,7961	5,7995	5,8030
79	5,8064	5,8099	5,8134	5,8169	5,8204	5,8239	5,8274	5,8310	5,8345	5,8381
80	5,8416	5,8452	5,9488	5,8524	5,8560	5,8596	5,8633	5,8669	5,8705	5,8742
81	5,8779	5,8816	5,8853	5,8890	5,8927	5,8965	5,9002	5,9040	5,9078	5,9116
82	5,9154	5,9192	5,9230	5,9269	5,9307	5,9346	5,9385	5,9424	5,9463	5,9502
83	5,9542	5,9581	5,9621	5,9661	5,9701	5,9741	5,9782	5,9822	5,9863	5,9904
84	5,9945	5,9986	6,0027	6,0069	6,0110	6,0152	6,0194	6,0237	6,0279	6,0322
85	6,0364	6,0407	6,0450	6,0494	6,0537	6,0581	6,0625	6,0669	6,0714	6,0758
86	6,0803	6,0848	6,0893	6,0939	6,0985	6,1031	6,1077	6,1123	6,1170	6,1217
87	6,1264	6,1311	6,1359	6,1407	6,1455	6,1503	6,1552	6,1601	6,1650	6,1700
88	6,1750	6,1800	6,1850	6,1901	6,1952	6,2004	6,2055	6,2107	6,2160	6,2212
89	6,2265	6,2319	6,2372	6,2426	6,2481	6,2536	6,2591	6,2646	6,2702	6,2759
90	6,2816	6,2873	6,2930	6,2988	6,3047	6,3106	6,3165	6,3225	6,3285	6,3346
91	6,3408	6,3469	6,3532	6,3595	6,3658	6,3722	6,3787	6,3852	6,3917	6,3984
92	6,4051	6,4118	6,4187	6,4255	6,4325	6,4395	6,4466	6,4538	6,4611	6,4684
93	6,4758	6,4833	6,4909	6,4985	6,5063	6,5141	6,5220	6,5301	6,5382	6,5464
94	6,5548	6,5632	6,5718	6,5805	6,5893	6,5982	6,6072	6,6164	6,6258	6,6352
95	6,6449	6,6546	6,6646	6,6747	6,6849	6,6954	6,7060	6,7169	6,7279	6,7392
96	6,7507	6,7624	6,7748	6,7866	6,7991	6,8119	6,8250	6,8384	6,8522	6,8663
97	6,8808	6,8957	6,9110	6,9268	6,9443	6,9600	6,9774	6,9954	7,0141	7,0335
98	7,0537	7,0749	7,0969	7,1201	7,1444	7,1701	7,1973	7,2262	7,2571	7,2904
99	7,3263	7,3656	7,4087	7,4571	7,5120	7,5758	7,6520	7,7478	7,8782	8,0902

ANEXA V

Reactivi speciali

Reactiv azotat mercurios: se dizolvă 1 g azotat mercurios în 100 ml apă distilată și se adaugă acid azotic concentrat până când soluția devine limpede.

Reactiv Bertrand: acid silicowolframic 5% în apă distilată.

Reactiv Bouchardat: se dizolvă 2 g iodură de potasiu în 10 ml apă distilată, se adaugă 2 g iod și după dizolvare se completează cu apă la 100 ml.

Reactiv Caseneuve: soluție saturată de difenilcarbazidă în benzen, alcool sau eter.

Reactiv Cheramy: 1 g iodură de potasiu și 0,25 g clorhidrat de chinină se dizolvă în 100 ml apă distilată.

Reactiv chihhidronă: preparat extemporaneu din 1 ml p-benzochinonă, 0,03 și 4 ml acid fosforic concentrat.

Reactiv Donath: 1 g arseniat monopotasic se dizolvă în 100 ml acid sulfuric concentrat.

Reactiv Dragendorf: peste o suspensie de 5 g carbonat de bismut în 50 ml apă distilată se adaugă 10 ml acid clorhidric concentrat și iodură de potasiu dizolvată în 40 ml apă. După 24 ore precipitatul eventual format se separă prin filtrare.

Reactiv Erdman: 1 ml acid azotic concentrat, 20 ml apă. 80 ml acid sulfuric concentrat.

Reactiv Forest: se amestecă 25 ml soluție apoasă de dicromat de potasiu (2 g/l) cu 25 ml acid sulfuric diluat (300 ml/l), 25 ml soluție apoasă de acid percloric (200 g/kg) și 25 ml acid azotic diluat (500 ml/l).

Reactiv FNP: 5 ml soluție apoasă de clorură ferică (50 g/l) se amestecă cu 45 ml soluție apoasă de acid percloric (200 g/kg) și 50 ml acid azotic diluat (500 ml/l).

Reactiv Folin-Ciocâlțeu: într-un balon de 250 ml prevăzut cu refrigerent ascendent cu reflux, se dizolvă în 70 ml apă, 10 g wolframat de sodiu, $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ p.a. și 2,5 g molibdat de sodiu, Na_2MoO_4 p.a. Se adaugă 25 ml acid fosforic 85% p.a. și 50 ml acid clorhidric concentrat ($d = 1,19$). Se montează refrigerentul ascendent la balon și se fierbe la reflux timp de 10 ore. Se deconectează refrigerentul, se adaugă 15 g sulfat de litiu, Li_2SO_4 p.a., 5 ml apă, 2 picături de brom și se continuă fierberea, deschis, fără refrigerent, timp de 15 minute, pentru îndepărtarea excesului de brom. Se lasă să se răcească și se completează cu apă distilată la 100 ml. Soluția obținută se filtrează. Culoarea reactivului trebuie să fie galbenă-aurie. Se conservă în sticle brune, bine închise, timp de mai multe luni. Dacă în timp soluția capătă o tentă verzuie, se tratează din nou cu brom. La întrebuințare, soluția astfel preparată se diluează cu un volum egal de apă distilată.

Reactiv Fröhde: 0,1-1 g molibdat de amoniu se dizolvă în 100 ml acid sulfuric concentrat.

Reactiv Griess I: 0,5 g acid sulfanilic în 150 ml acid acetic 15%.

Reactiv Griess II: 0,1 g α -naftilamina se dizolvă la ușoară încălzire în 150 ml acid acetic 15%.

Reactiv hipobromit de sodiu: se dizolvă 0,5 ml brom, cu precauție și răcind continuu, în 5 ml soluție de hidroxid de sodiu 400 g/l.

Reactiv Ioanid: 2 g sulfat de cupru amoniacal se tratează cu 40 ml amoniac 1% și 2 ml piridină.

Reactiv iodoplatinat acidulat: se dizolvă 0,25 g clorură de platină, 5 g iodură de potasiu și 5 ml acid clorhidric concentrat în 100 ml apă distilată).

Reactiv Lafon: 5 g selenit de amoniu în 100 ml acid clorhidric concentrat.

Reactiv Libermann: nitrit de potasiu 5% în acid sulfuric concentrat.

Reactiv Mandelin: se suspendă 1 g vanadat de amoniu fin pulverizat în 100 ml acid sulfuric concentrat; se agită bine înainte de utilizare.

Reactiv Marquis: 1 ml formol 40%, 30 ml acid sulfuric concentrat (se prepară înainte de întrebuințare).

Reactiv Marmé: se dizolvă 2 g iodură de potasiu și 1 g iodură de cadmiu în 100 ml apă distilată.

Reactiv Mayer: peste 20 ml soluție de iodură de potasiu 5% se adaugă 50 ml soluție fierbinte de clorură de mercur (II) 10%. După răcire se filtrează și se completează cu apă distilată la 100 ml.

Reactiv Mecke: 0,5 g de selenit de sodiu se dizolvă în 100 ml acid sulfuric concentrat.

Reactiv Sonnenschein: se dizolvă 10 g fosfomolibdat de amoniu în puțină apă distilată și se adaugă 0,25 ml acid azotic concentrat, apoi se completează cu apă distilată la 100 ml.

Reactiv Schiff: 0,2 g fuxină bazică se dizolvă în 140 ml apă distilată și se răcește pe gheață. Se adaugă 5 ml sulfat de sodiu, 5 ml acid clorhidric (250g/l) sub agitare și se completează cu apă la 200 ml. Dacă soluția este colorată, aceasta se decolorează cu cărbune activ. Se ține la întuneric 12 ore înainte de utilizare.

Reactiv Tollens: la 10 ml azotat de argint 5% se adaugă amoniac concentrat până la dizolvarea precipitatului format.

Reactiv Trinder: 40 g clorură mercurică dizolvată în 850ml apă + 120 ml acid clorhidric 1M + 40 g azotat de fier (III) dizolvat în 1l apă.

Reactiv Zwiker: 4 ml sulfat de cupru 10% se tratează cu un amestec format din 1 ml piridină și 5 ml apă distilată.

Reactiv Wasicky: 2 g p-dimetilaminobenzaldehidă, 6 g acid sulfuric concentrat și 0,4 ml apă distilată.

Rozanilină: soluția mamă se obține prin macerarea la rece, timp de 48 de ore, a următorului amestec: 500 mg para-rozanilină (fucsină bazică) în 100 ml apă

distilată, urmată de filtrare. Se lucrează cu o soluție diluată astfel: 2ml soluție mamă + 5ml acid clorhidric concentrat + apă distilată ad 100ml.

Soluție apoasă de hipobromit de sodiu: se amestecă 3 ml apă de brom saturată cu 20 ml soluție de carbonat de sodiu (2,2 g carbonat de sodiu anh. la 20 ml apă).

Tampon borat pH 8,4: se dizolvă 22,4 tetraborat de sodiu în 76 ml acid clorhidric 1M și se completează la 2l cu apă distilată.

Tetracloromercuriat de sodiu (toxic): 0,50 g HgCl_2 + 0,20 g NaCl + apă distilată ad 1000 ml.

Amestec de sulfat de sodiu și cărbune activat: se adaugă 100 mg cărbune activat la 100 g sulfat de sodiu anhidru, se amestecă și se încălzește într-o capsulă la 100°C timp de 8 ore. Se răcește și se conservă într-un recipient închis ermetic.

RASPUNSURI LA ÎNTREBĂRI ȘI PROBLEME

Întrebări

1. Corect: E) toate cele de mai sus
2. Corect: C) DL_{50} / DE_{50}
3. Corect: D) bronhii
4. Corect: E) o creștere a radioactivității în aerul expirat în defavoarea urinei
5. Corect: C) acizi organici slabi
6. Corect: C) potențialului de bioacumulare
7. Corect: D) modificarea structurii chimice
8. Corect: A) o creștere a sintezei enzimei
9. Corect: A) moarte
10. Corect: B) expunerii femelei în timpul organogenezei

Probleme

1. Căile metabolice prevăzute sunt prezentate în Fig. 1, iar enzimele implicate sunt: (a) citocromul P450; (b) glucuronoziltransferaza sau sulfotransferaza; (c) alcool dehidrogenaza; (d) aldehyd dehidrogenaza; (e) epoxid hidrolaza; (f) glutatión-S-transferaza; (g) acil CoA transferaza și ligaza sau glucuronoziltransferaza; (h) γ -glutamiltransferaza; (i) glicinaza; (j) acetiltransferaza.

2. Posibilele căi metabolice ale compusului 2 sunt prezentate în Fig.2. Gruparea aminică ar putea fi hidroxilată cu formarea inițială a unei hidroxilamine (reacția h), care are potențial toxic, și apoi, în urma oxidării chimice, a unui compus nitrozo. Acești compuși sunt hematotoxici, afectând în principal hematiile.

Enzimele implicate în aceste reacții sunt: (a) citocrom P450; (b) epoxid hidrolaza; (c) glutatión-S-transferaza; (d) γ -glutamiltransferaza; (e) glicinaza; (f) acetiltransferaza; (g) N-acetiltransferaza; (h) citocrom P450; (f) glucuronoziltransferaza; (j) se poate produce dehidratarea la un pH acid al urinei; (k) esterază; (l) glucuronoziltransferază sau acil CoA transferază și ligază; (m) alcool dehidrogenază; (n) aldehyddehidrogenază.

3. Posibilele căi de metabolizare ale potențialului rodenticid sunt prezentate în Fig.3. Demetilarea aminei substituie va conduce la o amină primară care poate fi hidroxilată, rezultând un metabolit cu potențial toxic. Nucleul aromatic poate fi oxidat cu formarea unui epoxid care este reactiv și deci toxic. Acest fapt este potențat de prezența celor doi atomi de halogen.

Enzimele implicate în aceste transformări sunt: (a) citocrom P450; (b) rearanjare chimică; (c) glutatión-S-transferaza; (d) γ -glutamiltransferaza; (e) glicinaza; (f) acetiltransferaza; (g) N-acetiltransferaza; (h) glucuronoziltransferaza sau sulfotransferaza; (i) epoxid hidrolaza; (j) dehidratarea la un pH acid al urinei; (k) reacții de oxido-reducere reversibile (ne-enzimatice).

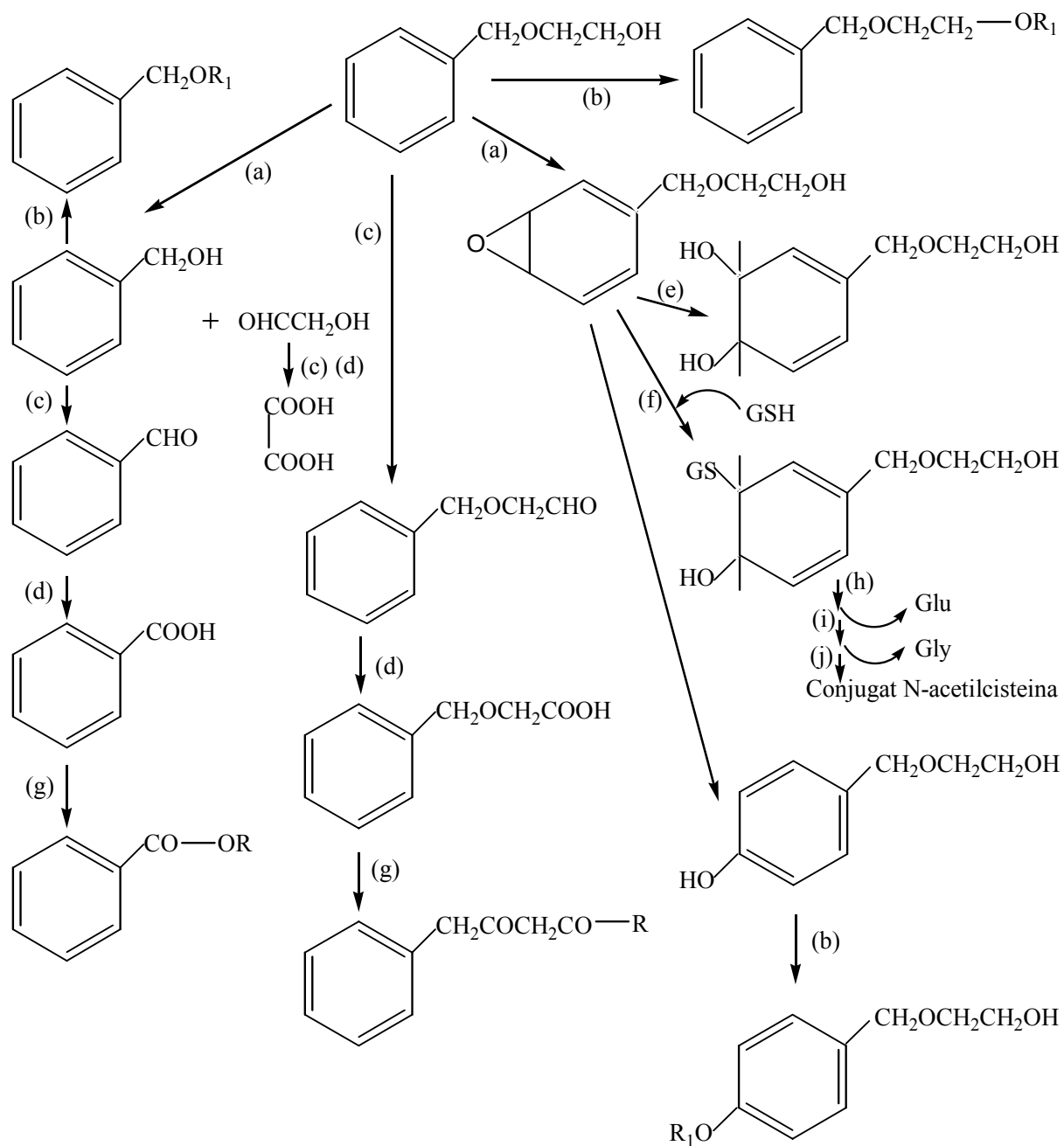


Figura 1. Căile metabolice posibile ale compusului 1
 (GSH = glutation, R = acid glucuronic sau glicină, R_1 = acid glucuronic sau sulfat)

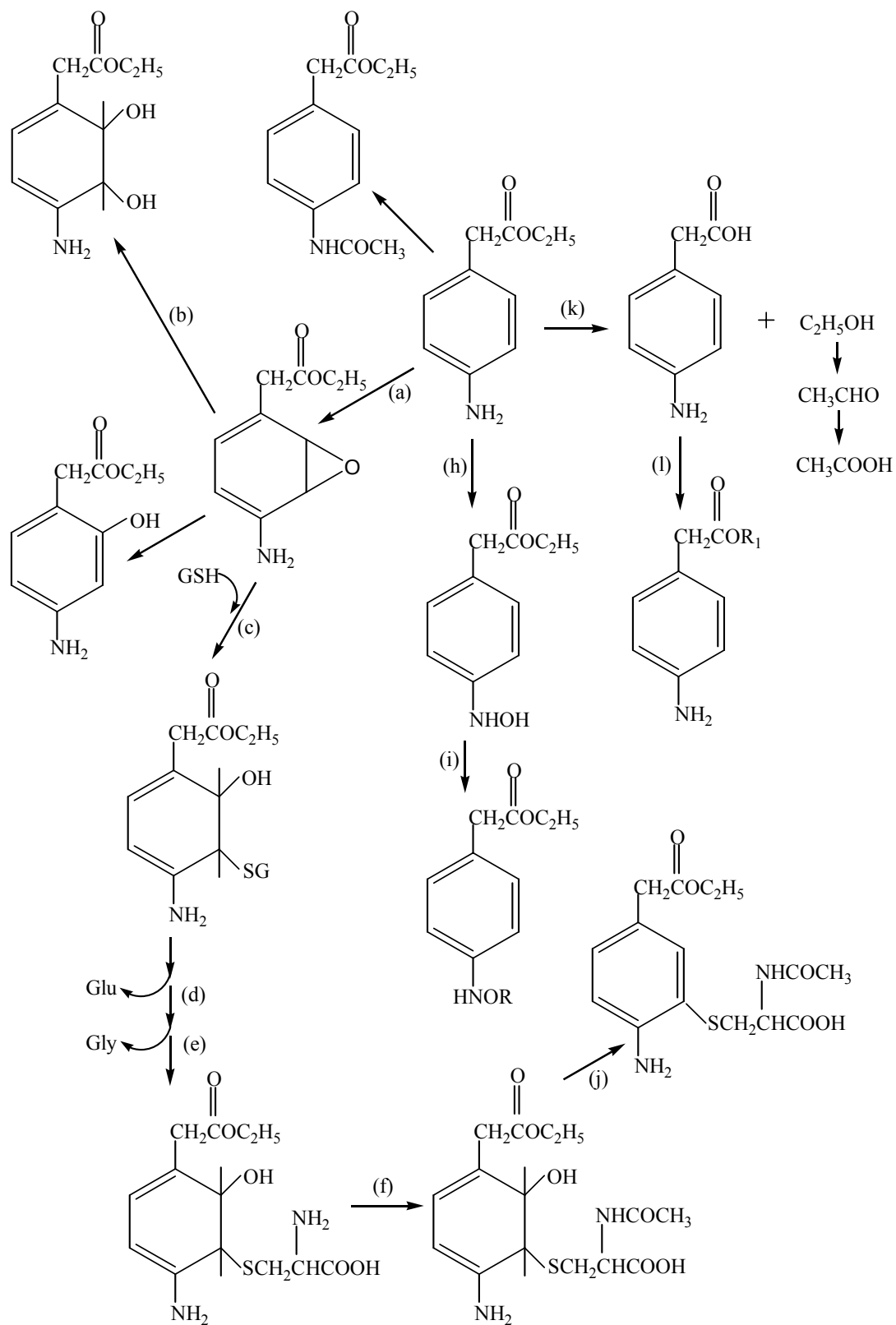


Fig.2. Căile posibile de metabolizare a compusului 2
(GSH = glutation, R = acid glucuronic, R₁ = acid glucuronic sau glicină)

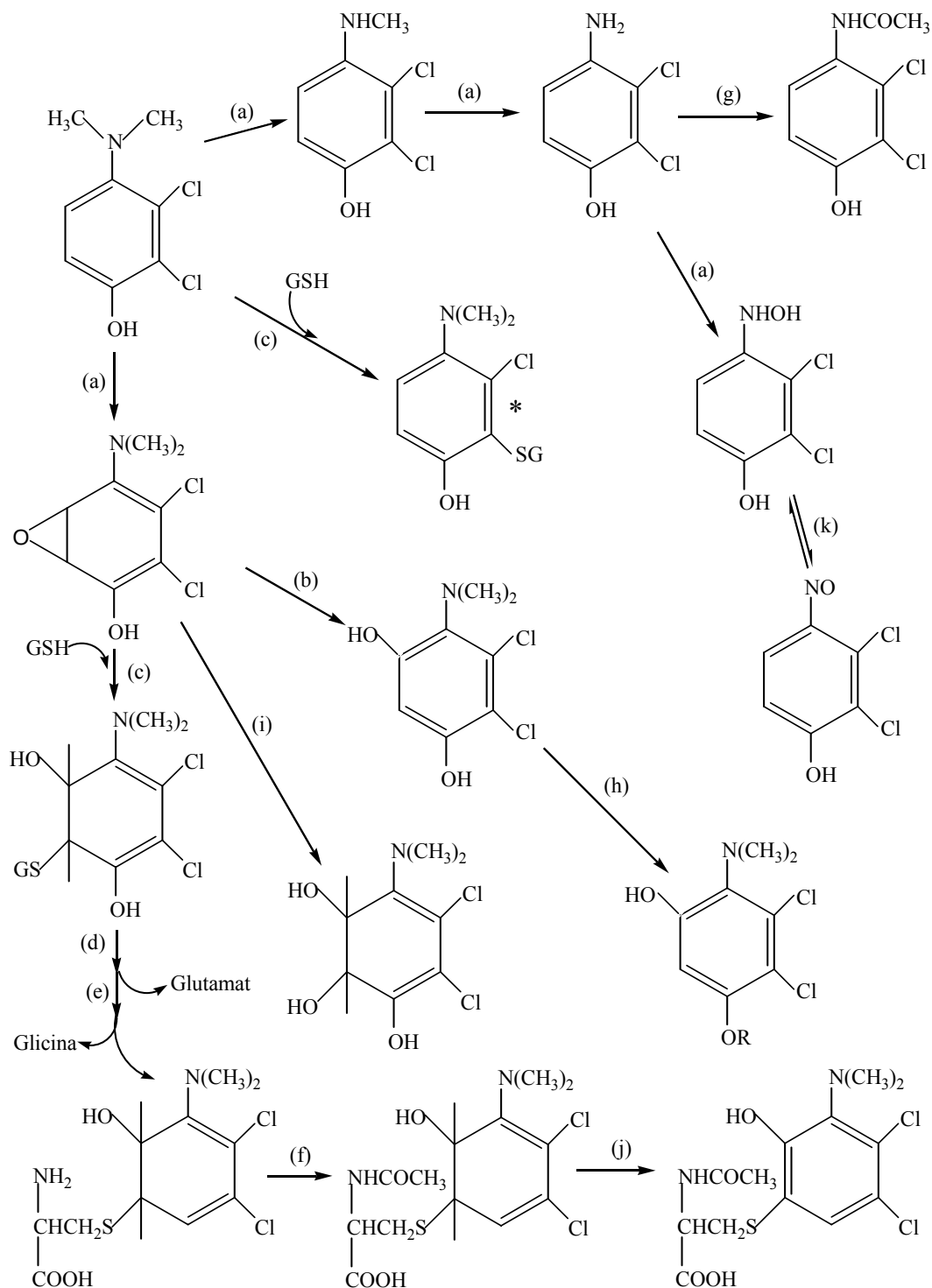


Figura 3. Căile posibile de metabolizare a compusului 3

(*Conjugatul cu glutation va fi metabolizat în continuare conform căilor (d), (e), (f), (j).

R = acid glucuronic sau sulfat)

4. Principala acțiune a monoxidului de carbon constă în legarea acestuia de hemoglobină, care nu mai este disponibilă pentru transportul oxigenului. Hemoglobina poate lega patru molecule de oxigen sau de monoxid de carbon, dar afinitatea sa pentru monoxidul de carbon este mai mare; carboxihemoglobina complet saturată nu mai poate transporta oxigenul. Legarea monoxidului de carbon induce și o modificare alosterică a hemoglobinei, care modifică curba de disociere a oxihemoglobinei, astfel încât oxigenul legat de aceeași moleculă de hemoglobină este eliberat mai greu. Haldane a descris reacția oxigenului și a monoxidului de carbon cu hemoglobina prin ecuația:

$$([\text{COHb}] / [\text{HbO}_2]) = M ([\text{pCO}] / [\text{pO}_2])$$

unde M = constanta lui Haldane, care are valoarea în jur de 240.

Pentru a calcula riscul la care este expus mecanicul auto în garaj se poate utiliza ecuația lui Haldane. Presiunea parțială a gazelor poate fi echivalată cu concentrația lor. Valorile acestora sunt deci 0,1 pentru monoxidul de carbon și 21 pentru oxigen. Din ecuație se poate calcula raportul între carboxihemoglobină și oxihemoglobină, care este: $240 \times (0,1 / 21)$, adică în jur de 1,1 sau mai mult de 50% carboxihemoglobină. O concentrație de carboxihemoglobină de 40-50% este apropiată de valorile letale, deci mecanicul este expus unui risc real.

Riscul ar fi mai mare dacă mecanicul ar lucra doar într-un spațiu închis, fără sursă de aer proaspăt și dacă nu s-ar deplasa și în mediul exterior nepoluat. Riscul este crescut și la persoanele care fac un efort fizic, deci au o frecvență respiratorie crescută, precum și la anemici, la care capacitatea sângelui de a transporta oxigenul este deja diminuată.

5. Din datele prezentate în problemă se observă că doza letală a cianurii la șoareci este în jur de 11 mg/kg. Această doză nu este influențată de administrarea oxigenului hiperbar, dar este afectată de administrarea nitritului de sodiu, când toxicitatea cianurii este redusă aproape la jumătate (DL_{50} mai mare). Nici în această variantă oxigenul hiperbar nu are nici un efect. În cazul administrării tiosulfatului de sodiu, toxicitatea este redusă la aproape o treime, iar oxigenul hiperbar poate scădea puțin mai mult această toxicitate (DL_{50} 34 față de 39). Atunci când la șoareci se administrează atât tiosulfat de sodiu cât și nitrit de sodiu, scăderea letalității este mai mare decât în fiecare din cazuri luate separat, dar este aproximativ aditivă (DL_{50} 21+ 35, față de 52). Totuși, oxigenul hiperbar scade și mai mult toxicitatea. Se pare că oxigenul hiperbar crește eficiența tiosulfatului de sodiu, atunci când este administrat singur, sau în combinație cu nitritul de sodiu. Mecanismul care explică acest fapt nu este pe deplin cunoscut și este dificil de explicat, deoarece ionul cianură blochează lanțul de transport al electronilor și întrerupe astfel utilizarea oxigenului. De aceea, oxigenul ar trebui să nu aibă efect asupra toxicității. Efectul aparent ar trebui să fie corelat cu mecanismul de acțiune al tiosulfatului de sodiu, care contribuie la detoxifierea cianurii prin conversia sa, sub acțiunea enzimei rodanaza, la tiocianat, ușor excretabil prin urină.

Efectul aditiv al nitritului de sodiu și al tiosulfatului de sodiu este consecința faptului că cele două antidoturi acționează prin mecanisme diferite. Nitritul de sodiu convertește hemoglobina în methemoglobină, capabilă să lege ușor cianura, formând cianmethemoglobină. Cianura are afinitate mai mare față de methemoglobină decât față de citocromoxidaza din lanțul de transport al electronilor, în prezența methemoglobinei fiind reluată funcția mitocondrială. Cianura trebuie totuși să fie eliminată, iar în plus concentrația de methemoglobină care poate fi tolerată este limitată. Tiosulfatul de sodiu favorizează conversia cianurii la tiocianat mai puțin toxic și mai ușor eliminabil, iar oxigenul hiperbar poate interveni în această reacție sau în procesul total.

EDTA-ul dicobaltic este antidotul cel mai eficient. El acționează ca un agent chelatat, legând cianura liberă din sânge, cu formarea unui complex ce poate fi eliminat renal. Pe măsură ce concentrația din țesuturi scade, cianura difuzează din mitocondrii, eliberând citocrom oxidaza.

6. După administrare orală, medicamentul ar putea fi redus de nitroreductazele bacteriene din intestin (Fig.6), formându-se o grupare amino. Aceasta la rândul ei poate fi acetalată de acetiltransferazele din sânge și ficat.

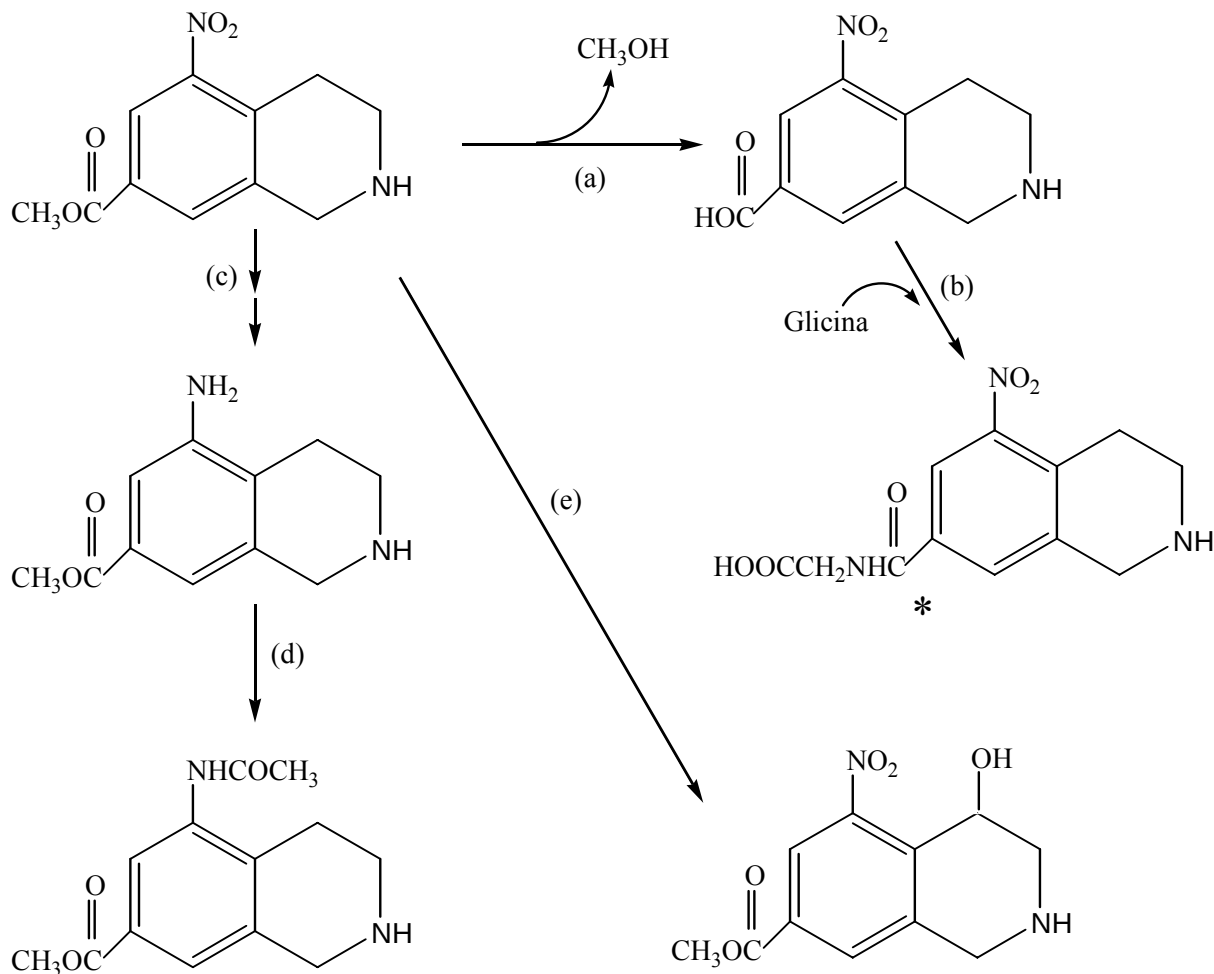


Figura 6. Căile metabolice posibile ale compusului 6

[*(a) esteraza; (b) acetyl CoA și ligaza; (c) nitroreductaza; (d) N-acetiltransferaza; (e) citocrom P450. Poate avea loc și conjugarea cu acid glucuronic, caz în care (b) este glucuronoziltransferaza*]

Catena laterală ester poate fi hidrolizată de esterazele din sânge și din alte țesuturi, formându-se un acid. Acesta poate fi apoi conjugat cu un aminoacid cum ar fi glicina sau acidul glucuronic. Nucleul aliciclic ar putea fi hidroxilat. Reacția ar putea implica o izoenzimă a

citocromului P450 care prezintă polimorfism genetic. Structura medicamentului este similară cu cea a medicamentului debrisoquine, care este afectat de polimorfismul izoenzimelor citocromului P450. De aceea, factorii genetici care ar putea influența metabolismul acestui compus sunt polimorfismul hidroxilazelor de tip debrisoquine și fenotipul acetilator. În cazul hidroxilazelor, este influențată viteza de dispariție a compusului părinte. Deoarece acesta este compusul farmacologic activ, consecința ar fi o diferență de răspuns farmacologic între cele două fenotipuri. Totuși, proporția și viteza celorlalte căi de metabolizare, hidroliza urmată de conjugare, reducerea urmată de acetilare, ar influența de asemenea efectul variațiilor genetice ale citocromului P450 asupra nivelului medicamentului nemetabolizat, determinând dacă o creștere a nivelului acestuia este suficientă pentru a modifica efectul farmacologic. Fenotipul acetilator ar afecta dispariția și probabil detoxifierea metabolitului amino al medicamentului. Astfel, acetilatorii lenti ar fi expuși la o concentrație mai mare de metabolit amino substituit, care ar putea fi toxic după hidroxilare / oxidare.

Dacă medicamentul se administrează prin platură dermică, este puțin probabil să aibă loc reducerea grupării amino. În acest caz nu are loc nici acetilarea. De aceea, metabolizarea compusului poate fi mai limitată și este mai probabil ca ea să fie influențată de variațiile genetice ale citocromului P450.

7. Compusul pare să determine o ușoară creștere a incidenței tumorilor la șoarecii expuși prin apa de băut, nu și la cei la care administrarea s-a făcut intraperitoneal. La șobolan nu se observă o creștere a incidenței tumorilor. Și efectele toxice sunt diferite între cele două specii, la șobolan observându-se o mărire a ficatului care nu este însoțită de hemoliză, în timp ce la șoarece se observă hemoliză. Hemoliza se observă însă doar atunci când compusul se administrează la șoareci pe cale orală. Aceasta sugerează rolul bacteriilor intestinale. Structura conține o grupare nitro, care poate fi redusă de nitroreductazele bacteriene din intestin [(a) în Fig. 7], rezultând un metabolit hidroxilamină care poate fi responsabil de hemoliză. Acest fenomen nu se observă însă la șobolan. La această specie se observă mărire a ficatului, care ar putea avea mai multe cauze. Astfel de cauze ar putea fi producerea de tumori, acumularea de lipide sau de lichid, inducerea enzimelor microzomale sau peroxizomale. Producerea de tumori și acumularea de lipide pot fi detectate prin examen histopatologic. Acumularea de lichid poate fi determinată prin cântărirea ficatului proaspăt și după uscare. Inducerea enzimelor microzomale și peroxizomale poate fi însoțită de o creștere a numărului peroxizomilor sau a cantității de reticul endoplasmatic neted, care pot fi observate în microscopia electronică.

Efectele diferite la cele două specii pot fi consecința unor diferențe de metabolism. Acest fapt ar trebui investigat prin analiza în plasmă și urină a metaboliților compusului. Rolul metaboliților rezultați în urma reducerii asupra toxicității ar trebui determinat prin folosirea unor animale de experiență lipsite de germeni intestinali. Căile de metabolizare prevăzute sunt prezentate în Fig. 7.

Este de așteptat ca produșii rezultați în urma reducerii să fie responsabili de efectele hemolitice. Este de asemenea previzibil faptul că acest compus policlorurat ar putea fi un inductor enzimatic. Prin urmare, expunerea repetată ar putea modifica metabolismul compusului, fapt care ar trebui investigat.

Dozele de compus administrate au fost mari comparativ cu ceea ce se așteaptă a fi doza la care omul ar fi expus, iar metabolismul ar putea fi diferit la om, mai ales la doza la care ar avea loc expunerea (metabolismul este dependent de doză).

Efectele biochimice, metabolismul și efectele patologice ar trebui determinate la doze mai mici, deși efectele menționate mai sus nu au fost observate la doze mai mici. Structura

compusului poate sugera o acumulare a fragmentului reprezentat de hidrocarbura policiclică polichlorurată.

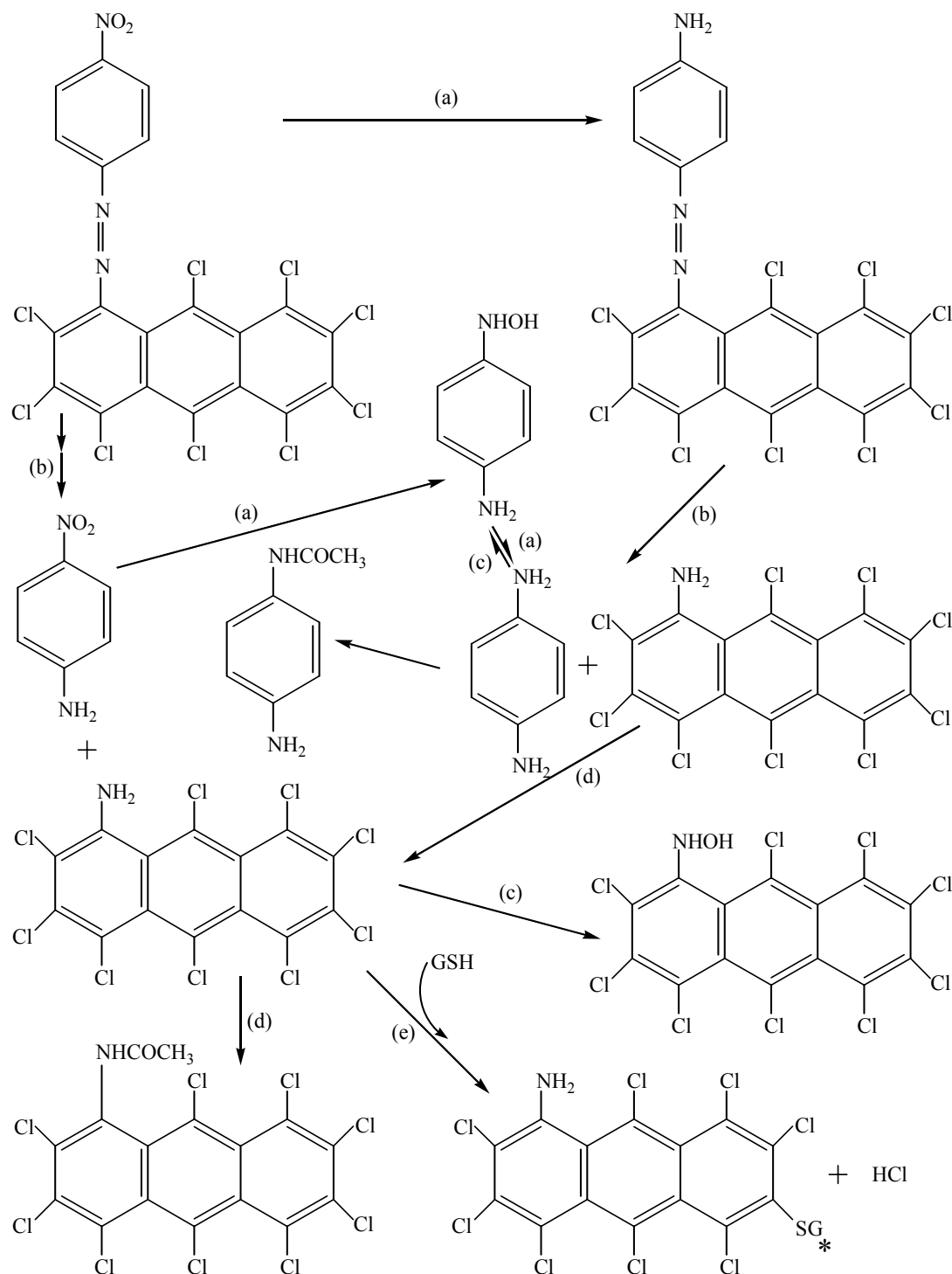


Figura 7. Posibilele căi de metabolizare ale compusului 7
 [(a) nitoreductaza; (b) azoreductaza; (c) citocrom P450; (d) N-acetiltransferaza; (e) glutation-S-transferaza]

Dacă mărirea ficatului s-a datorat proliferării peroxizomilor, acesta este un fenomen tipic pentru rozătoare. Multe medicamente și alți compuși sunt inductori ai enzimelor microzomale. Totuși, acest compus este propus a fi utilizat ca și colorant alimentar. Cunoașterea mecanismului care stă la baza efectelor toxice la ambele specii ar putea contribui la luarea unei decizii în legătură cu pașii de urmat în viitor. De exemplu, dacă apariția tumorilor la șoareci ar putea fi corelată cu un anumit metabolit, acesta ar putea fi dozat la voluntari umani după administrarea unei singure doze de colorant alimentar. Apoi, ar putea fi determinat un raport de doze real pentru compararea între șoareci sau șobolani și om, iar o decizie ar fi luată în cunoștință de cauză. Având această informație, compania ar putea să decidă continuarea dezvoltării produsului, chiar dacă în mod normal creșterea semnificativă a tumorilor la una din specii ar fi suficientă pentru a opri cercetările.

BIBLIOGRAFIE

1. BISMUTH c., DALLY S.: *Cas cliniques en Toxicologie*, Flammarion Médecine-Sciences, Paris, **1994**
2. BOGUSZ M.J.: *Hyphenated liquid chromatographic techniques in forensic toxicology*, J.Chromatogr. B, 733:65-91, **1999**
3. BRANDENBERGER H., MAES R.A.A, editors: *Analytical Toxicology for Clinical, Forensic and Pharmaceutical Chemists*, de Gruyter, Berlin, **1997**
4. BRUNK S.D.: *Thin-Layer Chromatography Using the Toxi-Lab System*, in *Analysis of Addictive and Misused Drugs* (editor ADAMOVICS J.A.), Marcel Dekker Inc, New York, **1995**
5. CHAMBERLAIN J.: *The Analysis of Drugs in Biological Fluids*, 2nd Ed., CRC Press, Boca Raton, **1995**
6. COTRĂU M., PROCA M.: *Toxicologie analitică*, Editura Medicală, București, **1988**
7. DRUMMER O.H.: *Chromatographic screening techniques in systematic toxicological analysis*, J.Chromatogr. B, 733:27-45, **1999**
8. FLANAGAN R.J., BRAITHWAITE R.A., BROWN S.S., WIDDOP B., WOLFF F.A.: *Eléments de toxicologie analytique*, Organisation mondiale de la Santé, Genève, **1997**
9. FOLEY T.: *Enzyme immunoassays*, in *Analysis of Addictive and Misused Drugs* (editor ADAMOVICS J.A.), Marcel Dekker Inc, New York, **1995**
10. FRANKE J.P., de ZEEUW R.A.: *Solid-phase extraction procedures in systematic toxicological analysis*, J.Chromatogr. B, 713:51-59, **1998**
11. GAD S.C.: *Statistics and Experimental Design for Toxicologists*, 3rd ed., CRC Press, Boca Raton, **1999**
12. GAILLARD Y., PEPIN G.: *Testing hair for pharmaceuticals*, J.Chromatogr. B, 733:231-246, **1999**
13. GOSSEL T.A., BRICKER J.D.: *Principles of Clinical Toxicology*, 3rd ed, Raven Press, New York, **1996**
14. HENNION M.-C.: *Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography*, J.Chromatogr. A, 856:3-54, **1999**
15. HODGSON E., LEVI P.E.: *A textbook of Modern Toxicology*, Appleton & Lange, Stamford, **1997**
16. KAMOUN P.: *Appareils et méthodes en Biochimie*, 3^e édition, Flammarion Médecine-Sciences, Paris, **1987**
17. KLEIN J., KARASKOV T., KOREN G.: *Clinical applications of hair testing for drugs of abuse – the Canadian experience*, Forensic Science International, 107:281-288, **2000**
18. LEVY J.M.: *Supercritical Fluid-Solid Sample Preparation: A Selective Extraction Strategy*, LC-GC International, 13(3): 174-181, **2000**
19. LOGHIN F., MARCHAND J.: *L'Évaluation toxicologique et clinique des médicaments dans l'Union Européenne*, Tipografia UMF Cluj-Napoca, **1997**
20. MAHUZIER G., HAMON M., FERRIER D., PROGNON P.: *Chimie analytique, vol. 2. Méthodes de separation*, Masson, Paris, **1999**
21. MAJORS R.E.: *Distillation as a Sample Preparation and Separation Technique*, LC-GC International, 12(1):19-23, **1999**

22. MAJORS R.E.: *Liquid extraction techniques for sample preparation*, LC-GC International, 10(2): 93-101, **1997**
23. MAUER H.H.: *Systematic toxicological analysis procedures for acidic drugs and/or metabolites relevant to clinical and forensic toxicology and/or doping control*, J.Chromatogr. B, 733:3-25, **1999**
24. MOFFAT A.C., JACKSON J.V., MOSS M.S., WIDDOP B.: *Clarke's Isolation and Identification of Drugs in Pharmaceuticals, Body Fluids and Post-mortem Material*, 2nd Ed., Pharmaceutical Press, London, **1986**
25. POLETTINI A.: *Systematic toxicological analysis of drugs and poisons by hyphenated chromatographic and spectroscopic techniques*, J.Chromatogr. B, 733:47-63, **1999**
26. POOLE C.F., GUNATILLEKA A.D., SETHURAMAN R., *Contributions of theory to method development in solid-phase extraction*, J. Chromatogr. A, 885:17-39, **2000**
27. PREDA N., ARIESAN M.: *Lucrări practice de Toxicologie*, Litografia IMF Cluj-Napoca, **1989**
28. REPETTO M.: *Toxicologia Fundamental*, 3rd ed, Diaz de Santos, Barcelona, **1997**
29. REPETTO M.: *Toxicologia fundamental*, Segunda edición, Editorial científico-medica, Barcelona, **1988**
30. RIVIER L.: *Is there a place for hair analysis in doping controls?*, Forensic Science International, 107:309-323, **2000**
31. SOCACIU C.: *Mutageneza chimica*, Ed.Genesis, Cluj-Napoca, **1996**
32. STROLIN-BENEDETTI M., CALDWELL J.: *Isolation and Identification of Metabolites*, in *Comprehensive Medicinal Chemistry. The rational design, mechanistic Study & Therapeutic Application of Chemical Compounds*, vol. 5, (HANSCH C., SAMMES P.G., TAYLOR J.B., editori), Pergamon Press, Oxford, **1990**, p.479-501
33. TAGLIARO F., TURRINA S., SMITH F.P.: *Capillary electrophoresis: principles and applications in illicit drug analysis*, Forensic Science International, 77:211-229, **1996**
34. TIMBRELL J.A.: *Study toxicology through questions*, Taylor & Francis, London, **1997**
35. WATSON I.D.: *Clinical Analysis from Biological Matrices*, in *Sample Preparation for Biomedical and Environmental Analysis* (STEVENSON D., WILSON I.D., edt.), Plenum Press, New York, **1994**, p.71-78
36. WENNING R.: *Potential problems with the interpretation of hair analysis results*, Forensic Science International, 107:5-12, **2000**
37. xxx : *Norme generale de protecția muncii*, MMSS, MSF, București. **2002**