پزشک آموز

به من نگاه کن

پزشک آموز

اولین رسانه دیجیتال در حوزه علوم پزشکی

011-3335 5440
0901 601 9192
0901 601 9192

pezeshkamooz.co@gmail.com
poshtibani@pezeshkamooz.com
pezeshkamooz.com

به نام خدا

آزمایشگاه سم شناسی

✓ **شناسایی و تعیین مقدار استامینوفن**

- **شناسایی استامینوفن با معرف o-cresolانجام میشود:**

۱ccازنمونه را با۱cc اسیدکلریدریک غلیظ به مدت ۱۰دقیقه در بن ماری حرارت میدهیم. سپس 0.1ml ازنمونه اسیدی شده را با 9.9ml از معرف o-cresolمخلوط میکنیم.پس 10mlمحلول حاوی o-cresol و نمونه داریم.

سپس2ml محلول آمونیاک (NH4OH) ۴N اضافه میکنیم و رنگ ان را با محلول بلانک مقایسه میکنیم. رنگ آبی نشانه وجود استامینوفن است.

- **تعیین مقدار :**

نمونه در پلاسما است و محلول رفرانس با غلظت مشخص داریم. 1ml ازنمونه را با استفاده از سولفات آمونیوم اشباع میکنیم.سپس با استفاده از25ml اتر،آن را استخراج میکنیم. حاصل استخراج را سانتریفیوژ میکنیم و لایه آلی (اتری) را جدا کرده وکاملا تبخیر میکنیم تا خشک شود. سپس به آن 4mlاتانول اضافه میکنیم. دو لوله آزمایش شامل نمونه مجهول و رفرانس حاوی اتانول داریم.

جذب را در 250nm میخوانیم و با استفاده از فرمول ، غلظت مجهول را به دست می‌اوریم:

$CS = AS / AR \times VS / VR \times CR$ غلظت رفرانس : CR حجم نمونه : VS حجم رفرانس : VR

غلظت نمونه : CS جذب نمونه : AS جذب رفرانس : AR

پس تعیین مقدار با روش اسپکتروفوتومتری انجام میشود.

- **روش کیفی :**

به دو نمونه مثبت(حاوی استامینوفن) و منفی(فاقد دارو) ، 1ml HCL اضافه میکنیم و دربن ماری100درجه به مدت ۱۰دقیقه قرارمیدهیم. 0.1ml ازنمونه ها برداشته وداخل بشر میریزیم.سپس 9.9ml معرفo-cresol و 2mlامونیوم هیدروکساید4N به آن اضافه میکنیم.ظهور رنگ آبی نشانه وجود استامینوفن است.

- **روش کمی :**

به 1ml از نمونه مجهول، سولفات امونیوم اضافه کرده تا کاملا اشباع شود.سپس نمونه را دردکانتور میریزیم و 25ml اتر زیرهود به ان اضافه میکنیم.لایه رویی را دریک بشر تمیز ریخته و دردمای ۱۰۰درجه در بن ماری قرارمیدهیم تا مواد کاملا تبخیرشود.

- ✓ این مراحل را برای نمونه رفرانس هم انجام میدهیم. به هردو بشر ۴mlاتانول اضافه میکنیم . سپس رسوبات را به طورکامل حل کرده و و وارد لوله ازمایش میکنیم. در طول موج ۲۵۰nm جذب را با استفاده از اسپکتروفوتومتر میخوانیم.(برای صفرکردن دستگاه از اتانول استفاده میکنیم) و با استفاده از فرمول غلظت مجهول را به دست می اوریم.

- ✓ **شناسایی و تعیین مقدار سالیسیلات ها**

سالیسیلات ها دارای اثرات Analgesics، Antipyretic و Anti-inflammation هستند.در واقع داروهای حاوی سالیسیلات مسکن،تب بر و ضد التهاب هستند.

مهم ترین ترکیبات حاوی سالیسیلات

- ✓ آسپرین
- ✓ متیل سالیسیلات(پماد مسکن موضعی)
- ✓ سالیسیلیک اسید (در فراورده های ساختنی در داروخانه ،در درمان میخچه و زگیل)

مسمومیت با فراورده های حاوی سالیسیلات در غلظت های ۳۰۰mg/l یا بیشتر اتفاق می افتد. روش های شناسایی و تعیین مقدار، قادر است سالیسیلیک اسید را detect کند و اگر نمونه ما حاوی آسپرین ،متیل سالیسیلات یا سالیسیل آمید باشد ،ابتدا باید نمونه را هیدرولیز کرده تا به سالیسیلیک اسید تبدیل شود.

- **تست های شناسایی:**

- ✓ معرف Trinder ،اولین معرفی است که استفاده می کنیم. ۰/۱ml از این معرف را به 2ml از نمونه اضافه کرده و به مدت ۵ ثانیه میکس می کنیم .رنگ بنفش تند ، نشاندهنده وجود سالیسیلیک اسید است.

- ✓ Mc Nallys test

از ۲ معرف استفاده می شود

واکنشگر شماره ۱ محلول ۰/۵ درصد از سولفات مس در استیک اسید ۱۰ درصد است و واکنشگر شماره ۲ ، محلول ۲درصد تازه تهیه شده از سدیم نیتریت است.

۱ml از نمونه + ۲ml آب + ۵ قطره از واکنشگر شماره ۱+ ۵ قطره واکنشگرشماره۲را مخلوط کرده و تکان میدهیم. در بن ماری به مدت ۳ دقیقه حرارت می دهیم.

رنگ قرمز نشاندهنده ی وجود سالیسیلیک اسید است.

- **تست های تعیین مقدار:**

باز هم از واکنشگر Trinder استفاده می کنیم.

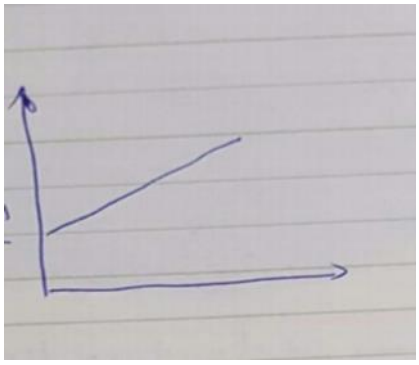
نمونه مجهول Specimen ۱عدد

محلول رفرانس در غلظت های mg/dl ۱۰،۲۰،۳۰ و ۴۰ 4عدد

محلول استانداردmg/dl۲۰ ۱عدد

محلول بلانک (آب) پلاسما ۱ عدد

در لوله آزمایش ۱۵ میلی لیتری، ۵ میلی لیتر آب میریزیم. ml۰/۵ از مخلوط ۴محلول بالا و نهایتا ۵ میلی لیتر از معرف Trinder اضافه می کنیم. مجموعا ۷ لوله داریم ،۳۰ ثانیه خوب مخلوط کرده و ۵ دقیقه با دور ۴۰۰۰سانترفیوژ می کنیم.



Supernatant را جدا کرده و جذب آن را در مقابل پلاسما در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه میگیریم.

با استفاده از منحنی استاندارد و فرمول زیر می توانیم غلظت نمونه مجهول را به دست اوریم. عدد به دست امده از دو روش با هم مقایسه می کنیم.

Cs =As÷Ar×20

- **روش کیفی:**

الف)لوله ازمایش اول حاوی سالیسیلات +۳ قطره استون + ۲ میلی لیتر آب مقطر + ۳ قطره نیتریت سدیم + ۳ قطره سولفات مس

ب)لوله ازمایش دوم بدون سالیسیلات+۳ قطره استون + ۲ میلی لیتر آب مقطر + ۳ قطره نیتریت سدیم + ۳ قطره سولفات مس

دو لوله را ۳ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه قرارمیدهیم، لوله حاوی سالیسیلات قرمز رنگ و لوله اول بی رنگ میشود.

✓ **شناسایی و تعیین مقدار <u>استریکنین</u>**

در ازمایشگاه سم شناسی برای بررسی یک نمونه، ابتدا باید آنالیت را از نمونه استخراج کنیم و سپس آزمون های شناسایی و تعیین مقدار را روی آن انجام دهیم. **سموم** به دسته کلی تقسیم میشوند :

الف) **Volatile یا فرار** : نقطه جوش پایین (الکل، استون)که روش های تقطیر با بخار آب ، میکرودیفیوژن یا ستون کانوِی برای جداسازی این سموم استفاده میشود.

ب) **organic یا الی**: شامل اغلب داروها (اسید ضعیف یا باز ضعیف)هستند که با تغییر pH میتوان ترکیب را به صورت غیریونیزه در اورد و توسط حلال آلی (مثل کلروفرم یا اتیل استات) آن را استخراج کرد.

ج) **inorganic یا معدنی**: بیشتر شامل فلزات هستند که برای جداسازی آنها، contents را با روش هضم اسیدی یا سوزاندن در کوره (Ashing)کاملا از بین می بریم و آن چه که باقی می‌ماند فلز مورد نظر ماست.

استریکنین یک الکالویید با مزه تلخ است که از دانه های درخت هندی Nux vomica به دست می اید. به عنوان pesticide یا rodenticide (جونده کش) مورد استفاده قرار می گیرد و یکی از مرگ موش های معروف است

همچنین استریکنین به عنوان ماده‌ی تقلبی همراه کوکایین، هروییین و امفتامین وجود دارد (برای افزایش حجم)

- **روش شناسایی :**

۵ سی سی از نمونه مشکوک به حضور استریکینین را بر می داریم و بااستفاده از محلول آمونیاک آن را استخراج کرده (در واقع محلول آمونیاک محیط را قلیایی می کند و استریکینین را به ترکیب غیریونیزه تبدیل می کند) با کلروفرم استخراج می کنیم و حاصل استخراج را تبخیر می کنیم و به حاصل تبخیر **محلول امونیوم وانادات** اضافه می کنیم.

رنگ های بنفش، قرمز و زرد طی ۱۰ دقیقه مشاهده می شود

همه‌ی این کار ها را برای نمونه بلانک نیز انجام داده و با هم مقایسه می کنیم.

✓ بعد از شناسایی استریکینین یک ازمون تاییدی انجام می دهیم که مطمئن شویم که حتما استریکینین است .

به نمونه مشکوک، چند گرانول روی (zinc) اضافه کرده و محیط را با استفاده از 1ml اسید کلریدریک غلیظ اسیدی می کنیم و به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری جوش می گذاریم و سپس آن را خنک می کنیم گرانول های باقی مانده روی را جدا می کنیم و به آن محلول **سدیم نیتریت** به میزان µl ۵۰ اضافه می کنیم . رنگ صورتی تایید وجود استریکینین است .

- **تعیین مقدار :**

محلول بلانک، محلول رفرانس با غلظت مشخص و نمونه مجهول داریم.

۱۰ سی سی از نمونه های ذکر شده را برداشته و به آن۰/۵ سی سی محلول امونیاک ۳ نرمال اضافه می کنیم. استریکینین به ترکیب غیرقطبی تبدیل می شود و توسط ۵۰ سی سی کلروفرم آن را استخراج می کنیم. حاصل استخراج را فیلتر می کنیم و ۴۰ سی سی از کلروفرم را برداشته و به ۲ قسمت ۲۰ سی سی تقسیم می کنیم و هردو قسمت را با ۲ سی سی سولفوریک اسید ۰/۱ نرمال استخراج می کنیم.

در واقع محیط را اسیدی کردیم و ترکیب را یونیزه کرده ایم و ان را وارد فاز اسیدی میکنیم.جذب را توسط uv می خوانیم و با استفاده از فرمول یا منحنی کالیبراسیون غلظت استریکینین را به دست می اوریم.

$$C_X = \frac{A_X}{A_R} \; X \; C_R$$

- **روش کیفی :**

۱- معرف ماندلین

5cc از نمونه مثبت و منفی را داخل دکانتور ریخته و روی آن 1ml۱امونیوم هیدروکسید غلیظ و سپس ۱۰ml کلروفرم به آنها اضافه کرده ، سپس آن را دکانته می کنیم و ۵ دقیقه صبر می کنیم (ثابت باشد) و سپس لایه زیری را در یک لوله تمیز ریخته و به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۴۰۰۰ سانترفیوژ می کنیم. سپس لایه زیرین را جدا کرده و داخل بشر می ریزیم و در بن ماری کاملا تبخیر میکنیم.حالا

۳ قطره کلروفرم اضافه می کنیم و داخل پلیت سرامیکی می ریزیم و ۳ قطره معرف ماندلین اضافه می کنیم. رنگ بنفش مایل به قرمز نشانه‌ی وجود استریکینین و رنگ زرد که در واقع تغییر نکرده عدم وجود استریکین است ،

۲- گرانول روی

به هریک از دو نمونه مثبت و منفی (با حجم1cc)، یک گرانول روی و 1cc اسیدکلریدریک اضافه می کنیم. ۱۰ دقیقه در بن ماری قرار میدهیم. بعدلوله ها را زیر اب سرد خنک میکنیم.محتوی لوله ها را داخل پلیت سرامیکی میریزیم و ۲ قطره نیتریت سدیم اضافه می کنیم رنگ صورتی_ارغوانی نشانه وجود استریکنین و درصورت بی رنگ شدن نشانه عدم وجود استریکنین است.

- **روش کمی :**

سه لوله حاوی ۱۰سی سی محلول رفرانس، محلول بلانک و محلول مجهول (کمی) داریم.

به هر لوله 0.5cc هیدروکسید امونیم اضافه می کنیم و داخل دکانتور می ریزیم و پنجاه سی سی کلروفرم به آن اضافه می کنیم دکانته می کنیم و ۲ دقیقه می گذاریم ثابت بماند سپس محلول زیری (کلروفرم) را جدا می کنیم و از کاغذ صافی عبور می دهیم و داخل دکانتور تمیزی می ریزیم. ۴ سی سی اسید سولفوریک 0.1N اضافه می کنیم و ۲ دقیقه صبر می کنیم. محلول اسیدی(رویی) را در لوله های ازمایش تمیز می ریزیم و ۱۰ دقیقه با دور ۴۰۰۰ سانترفیوژ می کنیم.(برای سه نمونه این کار راتکرار میکنیم) در طول موج ۲۸۶ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر جذب را می خوانیم (ابتدا با بلانک دستگاه را صفر می کنیم)

✓ استخراج و شناسایی اپیوئیدها

اپیوئیدها میتوانند به عنوان سم مطرح باشند. از انجایی که در کشورما افراد زیادی به دلایل مختلف وابسته به مصرف اپیوئیدها شده اند

و باتوجه به غیرمجازبودن مصرف این مواد ،شناسایی افرادی که از مواد اپیوئیدی استفاده میکنند میتواند حائزاهمیت باشد. به خاطر دردسترس بودن و مصرف زیاد اپیوئیدها ، مسمومیت هم درموارد زیادی اتفاق می افتد که اهمیت شناسایی این سموم درنمونه های بیولوژیکی افراد وابسته یا مسموم را مشخص میکند.

تست های مختلفی برای شناسایی اپیوئیدها انجام میشود. تست های بیوشیمیایی و ازمون های بالینی هم درکنار این تست ها به تشخیص کمک میکند.

نمونه های ادرار ، خون و بافت های مختلف بیولوژیک (بیشتر در موارد پس از مرگ) برای تشخیص استفاده میشوند. در نمونه ادراری اپیوئیدها تغلیظ میشوند و مواد مزاحم کمتری نیز وجود دارد.

- **روش رنگ سنجی** :

با واکنش نمونه و معرف های مختلف، رنگ یا تغییر رنگی ایجاد میشود که باتوجه به ان میتوان مواد اپیوئیدی را شناسایی کرد.

مرفین (سردسته این ترکیبات) ، کدئین ، متانول ، ترامادول ، پتدین و بوپرونورفین جز ترکیبات اپیوئیدی هستند.

تست های screening علی رغم حساس بودن ، اما specific نیستند. به عبارتی مقادیر کم را میتوانند تشخیص دهند اما انتخابی عمل نمیکنند و ترکیبات دیگر میتوانند درپاسخ آنها اختلال ایجاد کند. موارد منفی کاذب در این تست ها کم است اما موارد مثبت کاذب میتواند زیاد باشد. اگر پاسخ این تست ها منفی شد قابل اعتماد است اما اگر تست مثبت باشد باید وارد مرحله بعدی شویم و برای اطمینان تست های تاییدی انجام دهیم.(confirmatory)

- **تست رنگی (color test)**

اپیوئیدها جز ترکیبات قلیایی هستند و pKa آنها بین ۸-۱۰ است. برای استخراج خوب و تغلیظ کردن ترکیب ، لازم است که ماده مدنظر را وارد فاز غیرآبی کنیم که بتوان با اقدامات راحت مثل حرارت دهی، حلال آلی را تبخیر کرده وباعث تغلیظ نمونه ها شویم.معمولا برای استخراج اپیوئیدها ازکلروفرم یا دی اتیل اتر استفاده میشود. برای غیر قطبی کردن اپیوئید ها بایدpH ≤pKa فراهم کنیم. pH را معمولا با استفاده از امونیاک قلیایی(چندقطره) میکنیم و ترکیبات اپیوئید غیریونیزه میشوند. سپس با افزودن کلروفرم به نمونه، ترکیبات وارد فاز کلروفرمی میشود.دکانته میکنیم (کلروفرم سنگین تر از آب است ودر زیر آب قرار میگیرد) فاز زیری را جدا میکنیم. برای خوب جمع کردن مواد، باید ۳بار این کار تکرار شود. فاز کلروفرمی را روی بن ماری حرارت داده تاتغلیظ شود. سپس از معرف های مختلف استفاده میکنیم تا رنگ ایجادشده را تشخیص دهیم و متوجه شویم که ایا آن ماده مدنظر در نمونه ما وجود دارد یا خیر

نمونه ها شامل مورفین ، کدئین ،متادون و آب مقطر(به عنوان بلانک) هستند. نمونه را با چندقطره امونیاک غیریونیزه میکنیم.برای چک کردن PHازکاغذ تورنسل استفاده میکنیم(بایدقلیایی باشد)

۱۰cc کلروفرم به هرلوله اضافه میکنیم و ترکیب ها وارد فاز آلی میشوند(مرحله استخراج) برای کارایی بهتر ، سه بار انجام شود. مخلوط را داخل دکانتور ریخته و فاز زیری را جدا میکنیم. مواد حاصل را در بوته چینی ریخته و روی بن ماری تغلیظ میکنیم.(حلال کاملا تبخیرشود)

معرف مارکوس را به مورفین اضافه میکنیم. رنگ ارغوانی-بنفش ایجاد میشود که با گذر زمان رنگ واضح تر میشود.این معرف با کدئین رنگ ارغوانی-بنفش با کمی تفاوت رنگ ایجاد میکند که هم به علت تفاوت غلظت ، هم به علت تفاوت ساختاری کدئین و مورفین است. معرف مارکوس بامتادون رگه هایی از بنفش ایجاد میکند اما به وضوح کدئین و مورفین نیست. این معرف با بلانک رنگ خاصی ایجاد نمیکند.

معرف فرود با مورفین رنگ بنفش ، با کدئین رنگ سبز و با متادون رگه های سیاه ایجاد میکند که به علت رقیق بودن متادون است.

این معرف با بلانک رنگی ایجاد نمیکند.

معرف لیبرمن با مورفین رنگ مشکی یا سبز زیتونی و در واکنش با کدئین و متادون رنگ مشکی ایجاد میکند(بدون تغییر رنگ در واکنش با بلانک)

معرف ماندیلن با مورفین و متادون سبز تیره ایجاد میکند، با کدئین هم سبز تیره ایجاد میکند که در نهایت به مشکی ختم میشود.

✓ **شناسایی و تعیین سموم فرار**

- تست نیترو برای شناسایی این سموم به کارمیرود. ازمعرف دی کرومات پتاسیم و همچنین اسید سولفوریک استفاده میشود و تغییر رنگ نمایان گر وجود اتانول ،متانول، استون و فرمالئید در نمونه باشد.

برای انجام تست از آب مقطر به عنوان شاهد استفاده میکنیم. نمونه هایی شامل اتانول، متانول، فرمالدئید و استون داریم. چند قطره معرف دی کرومات پتاسیم به هرلوله آزمایش اضافه میکنیم.درابتدا همه نمونه ها به رنگ این معرف یعنی زرد-نارنجی تبدیل میشوند. وقتی محیط همه نمونه ها را با چندقطره اسیدسولفوریک غلیظ اسیدی کنیم (زیر هود)، نمونه فرمالدئید اتانول، متانول و استون همه از زرد به ابی(سبز) تبدیل میشوند. در نمونه شاهد تغییر رنگی ایجاد نمیشود. پس این تست غیراختصاصی است و توانایی تشخیص این سموم از یکدیگر را ندارد.

- تست شیف تست رنگی دیگر برای شناسایی سموم فرار، است. این معرف حاوی فوشین است وبیشتر برای شناسایی فرمالدئید استفاده میشود. به هرکدام از نمونه ها(همچنین نمونه شاهد) 1cc معرف شیف اضافه میکنیم. با اضافه شدن این معرف فرمالدئید به رنگ بنفش کاملا واضح ، متانول ، استون و اتانول به رنگ صورتی تبدیل میشوند. بلانک هم به رنگ معرف درمیاید.
- تست نیتروپروسید سدیم برای تشخیص استون استفاده میشود. با اضافه کردن نیتروپروسید سدیم و یک قطره سود به نمونه ها، فرمالدئید، اتانول و متانول نمونه شاهد تغییر رنگ زیادی اتفاق نمی افتد ولی استون از زرد به قرمز تبدیل میشود.
- تست آبی پروس برای شناسایی سیانید به عنوان سم فرار استفاده میشود.معرف های مختلف شامل سود ، FeSo4، FeCl3 و Hcl در این تست استفاده میشوند. به نمونه ها چندقطره سود ، FeSo4، FeCl3 را اضافه میکنیم. تا اینجا لوله هایی که حاوی سیانید نیستند رنگ زرد نشان میدهند. با اضافه کردن اسید به لوله حاوی سیانور، رنگ ابی پررنگ ایجاد میشود.

یکی از کاربردی ترین تست ها، تست های تشخیصی اتانول و متانول است. با تست هایی که تا اینجا اشاره کردیم امکان تشخیص این دو الکل وجود نداشت.

- تست شعله برای تشخیص این دو نوع الکل انجام میشود.دو پلیت برداشته، روی هرکدام مقداری اتانول ومتانول میریزیم، دراثر سوختن اتانول ، انتهای شعله رنگ زرد ایجاد میشود اما متانول رنگ آبی ایجاد میکند.

در صورت وجود ناخالصی ، رنگ شعله تغییر میکند یعنی هرچه متانول بیشتر باشد از رنگ زرد کاسته شده و رنگ آبی بیشتری ایجادمیشود.