

Vybrané úlohy z toxikologie

Praktické cvičení z lékařské biochemie
Všeobecné lékařství

Martin Vejražka




2018/19

Obsah

1. TENKOVSTEVNÁ CHROMATOGRFIE LÉKŮ 3
2. PRŮKAZ ETHANOLU REAKCÍ S DICHROMANEM DRASELNÝM 5
3. STANOVENÍ KONCENTRACE ETHANOLU V KRVI PLYNOVOU CHROMATOGRFÍÍ –
VYHODNOCENÍ ZÁZNAMU ANALÝZY. 5
4. DEMONSTRACE RYCHLÉHO IMUNOCHROMATOGRFICKÉHO TESTU PRO PRŮKAZ
LÉKŮ A DROG V MOČI 6

1. Tenkovrstevná chromatografie léků

Chemikálie

Etylacetát 

Metanol 

Jód 

Detekční činidla


Marquisovo činidlo 

Formaldehyd 40%  4 ml

Kyselina sírová 96%  do 100 ml

Skladovat při pokojové teplotě (expirace 7 dní) nebo při 4 °C (expirace 14 dní).

Mandelinovo činidlo 

Metavanadičnan amonný  1,0 g

Kyselina sírová 96%  do 100 ml

Skladovat při pokojové teplotě, expirace 1 rok.


Dragendorffovo činidlo 


Roztok A:

Jodid draselný  6,0 g

Čištěná voda 10,0 ml

Roztok B:


Zásaditý dusičnan bismutitý  0,6 g

Kyselina chlorovodíková 31%  2,0 ml

Po rozpuštění přidat:

Čištěná voda 10,0 ml

Roztok C:






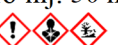


Kyselina chlorovodíková 31%  8,0 ml

Čištěná voda 475 ml









Postupně se smísí plný objem roztoků A, B a C.

Uchovávat při pokojové teplotě, chránit před světlem. Expirace 1 rok.

Vzorky léčiv

1. **Furosemid** pro inj. 10 mg·ml⁻¹ 
2. **Diklofenak** pro inj. 25 mg·ml⁻¹  ředěný 96% etanolem  v poměru 1:2
3. **Tramadol** pro inj. 50 mg·ml⁻¹  ředěný 96% etanolem  v poměru 1:4
4. **Mirtazapin**  – perorální tabletu s 30 mg mirtazapinu nechat rozpadnout ve 3 ml směsi etylacetát  : metanol  : čištěná voda 9:6:1, pak důkladně promíchat na

vortexu a oddělit nerozpuštěné součásti centrifugací. Supernatant oddělit do čisté mikrokumavky, skladovat při 4 °C, expirace 14 dní.

5. **Metoprolol**    – perorální tabletu se 100 mg metoprololu nechat rozpadnout v 5 ml směsi etylacetát   : metanol    : čištěná voda 9:6:1, pak důkladně promíchat na vortexu a oddělit nerozpuštěné součásti centrifugací. Supernatant oddělit do čisté mikrokumavky, skladovat při 4 °C, expirace 14 dní.

Pomůcky

Desky pro chromatografii na tenké vrstvě Alugram® SIL G UV₂₅₄, rozměr asi 10 × 15 cm

Komory pro chromatografii na tenké vrstvě






Rozprašovače na detekční činidla

Digestoř




Inkubátor 95 °C

Postup












Každá dvojice studentů připraví dvě chromatografické desky. U jedné provede detekci parami jódu, u druhé sekvenční detekci Marquisovým, Mandelinovým a Dragendorffovým činidlem.

1. Do chromatografické komory připravíme mobilní fázi etylacetát   : metanol    v poměru 3:2 (např. 30 ml : 20 ml).
2. Připravíme desku pro chromatografii na tenké vrstvě. Asi 1 cm od dolního okraje vyznačíme měkkou tužkou pět startů v rozestupu asi 1,5 cm, vzdálenost krajních startů od okrajů desky by měla být asi 2 cm. U horního okraje popíšeme, který standard/vzorek bude ve které dráze.
3. Na chromatografickou desku nanášíme na starty jednotlivé standardy/vzorky. Objem nanášky je asi 5 µl.
4. Desku necháme uschnout. Pak ji vložíme do chromatografické vany a vyvíjíme asi 10 až 20 minut. Mobilní fáze by měla vyvzlínat alespoň do dvou třetin desky.
5. Desku vyjmeme z komory a okamžitě tužkou vyznačíme polohu čela mobilní fáze.
6. Desku prohlédneme ve viditelném světle a pod UVA a UVC zářením. Vyznačíme polohu skvrn nebo desku vyfotografujeme.
7. Detekujeme jednotlivé frakce buď parami jódu, nebo sekvenční detekcí Marquisovým, Mandelinovým a Dragendorffovým činidlem.

Detekce parami jódu


Desku vložíme do komory, ve které je nádobka se šupinkami prvkového jódu   . Necháme působit páry jódu na desku, dokud se její plocha neobarví hnědožlutě. Pak desku vyjmeme a komoru ihned znovu uzavřeme. Zaznamenáme polohu skvrn, nebo desku vyfotografujeme.


Sekvenční detekce Marquisovým, Mandelinovým a Dragendorffovým činidlem

1. Desku v digestoři rovnoměrně postříkáme Marquisovým činidlem   . Objeví se namodralá skvrna tramadolu. Pak desku 3 minuty ohříváme na 95 °C v inkubátoru. Zaznamenáme polohu skvrn ve viditelném světle, UVA a UVC.
2. Desku postříkáme Mandelinovým činidlem    . Pak ji ohříváme na 95 °C v inkubátoru, dokud se neobjeví skvrna metoprololu (asi 3 minuty). Zaznamenáme polohu skvrn ve viditelném světle, UVA a UVC.
3. Desku postříkáme Dragendorffovým činidlem    . Skvrna mirtazapinu se obarví oranžově. Pak desku krátce ohřejeme na 95 °C v inkubátoru (asi 1 min) – zesvětlá pozadí, ale skvrna mirtazapinu by neměla zmizet. V případě potřeby lze detekci Dragendorffovým činidlem opakovat. Zaznamenáme polohu skvrn ve viditelném světle, UVA a UVC.

2. Průkaz ethanolu reakcí s dichromanem draselným




Chemikálie

Dichroman draselný 0,3 g/l 

Kyselina sírová 96% 

Ethanol 

Postup

Asi k 0,5 ml roztoku $K_2Cr_2O_7$  přidáme stejný objem ethanolu  a pak opatrně přikápneme 5–6 kapek kyseliny sírové  (ochrana očí štítem). Roztok po 1–2 minutách zezelená.

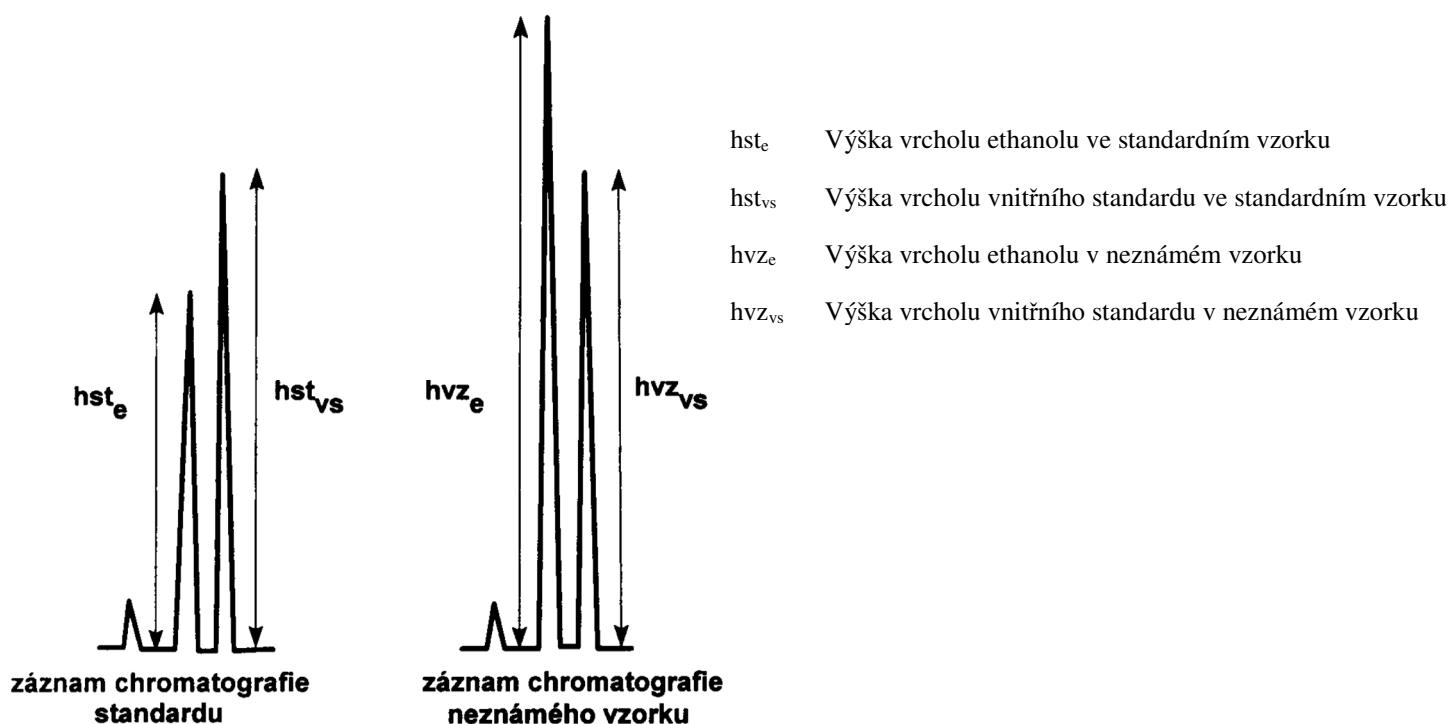
Reakční směs po vyhodnocení reakce vylévejte do nádob určených pro sběr nebezpečného odpadu.

3. Stanovení koncentrace ethanolu v krvi plynovou chromatografií – vyhodnocení záznamu analýzy.

Postup

V grafickém záznamu z plynové chromatografie změřte výšky vrcholů ethanolu a vnitřního standardu (isopropanolu) jak v neznámém vzorku, tak ve standardním roztoku. Vypočítejte obsah ethanolu v neznámém vzorku.

Ukázka záznamu:



4. Demonstrace rychlého imunochromatografického testu pro průkaz léků a drog v moči

Rychlá diagnostika léků a drog v moči imunochromatografickým testem bude demonstrována vyučujícím.