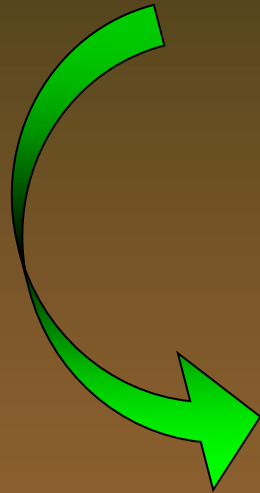


FARMASÖTIK TOKSIKOLOJİ LABORATUARI

Ksenobiyotiğe maruziyet



1. Kalitatif analiz
2. Yarı-kantitatif analiz
3. Kantitatif analiz

BİYOLOJİK ÖRNEKLERDE TOKSİK AJANLARIN BELİRLENMESİ

Ksenobiyotikle zehirlenmelerde;

1. Örnek Seçimi ve Analizi
2. Saklama
3. Protein Çöktürme ve Denatürasyon

ÖRNEK SEÇİMİ VE ANALİZİ

1

Pb, As, Etil alkol

Doğru örnek seçimi;

1. Fiziksel ve kimyasal özellikler
2. Absorpsiyon
3. Dağılım
4. Metabolizma
5. İtrah mekanizmaları

Zehirlenme sonucunda;

- Hasta yaşıyorsa → kan, idrar, mide içeriği, mide yıkama suyu, tükürük, feçes, göz yaşı, saç, tırnak, BOS, anne sütü
- Hasta ölmüşse → otopsi, organlardan örnek

KAN

Plazma (fibrinojen içerir)

Serum

İDRAR

Tercih edilir

FEÇES

Enterohepatik döngü

Safra içine itrah

Seçilen örnek;

- Uygun örnek kabına konur.
- Üzerine etiket yapıştırılır.

Etikette;

1. Örneğin alındığı tarih ve saat:
2. Örnek cinsi:
3. Kime ait olduğu:
4. Örneği alan kişinin adı ve imzası:

Örnek kabı kapatılır ve en kısa zamanda analize gönderilir.

Analize Başlamadan Önce Yapılacak İşlemler

- 1. Ambalaj açılmadan önce örneğin büyüklüğü, şekli incelenir.**
- 2. Ambalaj üzerindeki etiket okunur.**
- 3. Adli bir vaka ise mühürünün olup olmadığı incelenir.**
- 4. Örneğin net ağırlığı belirlenir.**
- 5. Örnek açılır, temiz, kuru ve uygun bir kapta karıştırılır.**

Örneğin 1/3'ü gerektiğinde incelenmek üzere saklanır.

Kalan örnek,

zehirlenmeye neden olan toksik etken
hakkında kesin bir bilgi yoksa ileri analizler
için 6 eşit bölüme ayrılır;

1. Ön deneylerin yapılması
2. Uçucu bileşiklerin aranması (CO, etanol, siyanür)
3. Uçucu olmayan bileşiklerin aranması (Barbitürat, salisilat, alkaloid)
4. Metalik zehirlerin aranması (Kurşun, antimon, arsenik)
5. Özel nitelikteki zehirlerin aranması (İnsektisit)
6. Kantitatif tayin yapılması için saklanır.

1. Uygun sıcaklık
2. Uygun materyalden kap
3. İlaç dekompozisyonunun önlenmesi (esteraz inhibitörü sodyum florür)
4. Kan örnekleri için uygun antikoagülan (heparin, sitrat, oksalat, EDTA)
5. Plazma, serum taze kandan hemen ayrılmalı
6. Örnekler küçük porsiyonlar halinde saklanmalı

PROTEİN ÇÖKTÜRME ve DENATÜRASYON

3

Plazma, feçes, tükürük gibi protein içeriği
yüksek biyolojik materyal

⇒ SERBEST KSENOBİYOTİK

1. Kuvvetli asit eklenmesi (TCA, perklorik asit, 80°C'de 5M HCl)
2. Organik çözücüler ile çöktürme (Etanol, aseton)
3. Tuzla çöktürme
4. Seçici denatürasyon

Protein çöktürme ya da denatürasyon için
uygulanan yöntemler

1. 90°C'de 5-15 dk ısıtma
2. Tekrarlanan dondurma-çözme
3. Amonyum sülfat ile doyurma
4. Çinko sülfat/ sodyum hidroksit
5. Metafosforik asit
6. Perklorik asit
7. Trikloroasetik asit
8. Etanol
9. Asetonitril

Ayrırma ve Saflaştırma

Çalışmalarının

Amacı:

- 1. Seçicilik (selektivite)**
- 2. Hassasiyet**
- 3. İnterfeansın en aza indirilmesi**



**miktar tayini
yapılmadan önce**

- 1. Ayırma ve saflaştırma**
- 2. Kalitatif analiz**
- 3. Uygun kantitatif analiz**

Ayırma ve saflaştırma yöntemleri;

- Ekstraksiyon
- Distilasyon
- Kromatografi
- Elektroforez
- Diğerleri....

Zehirlerin İzolasyon Yöntemlerine Göre Sınıflandırılması

Zehirler

İzolasyon Yöntemi

Örnek

Uçucu zehirler

Distilasyon
Difüzyon

CO, etanol, siyanür

Uçucu olmayan
zehirler

Ekstraksiyon

Barbitüratlar,
alkaloidler

Metalik zehirler

Kuru veya yağ
yıkılama

Kurşun, antimon,
civa

Toksik anyonlar

Diyazliz, iyon
değiştirme

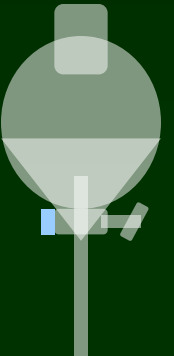
Klorat, fosfat

Özel olarak
aranması gereken
zehirler

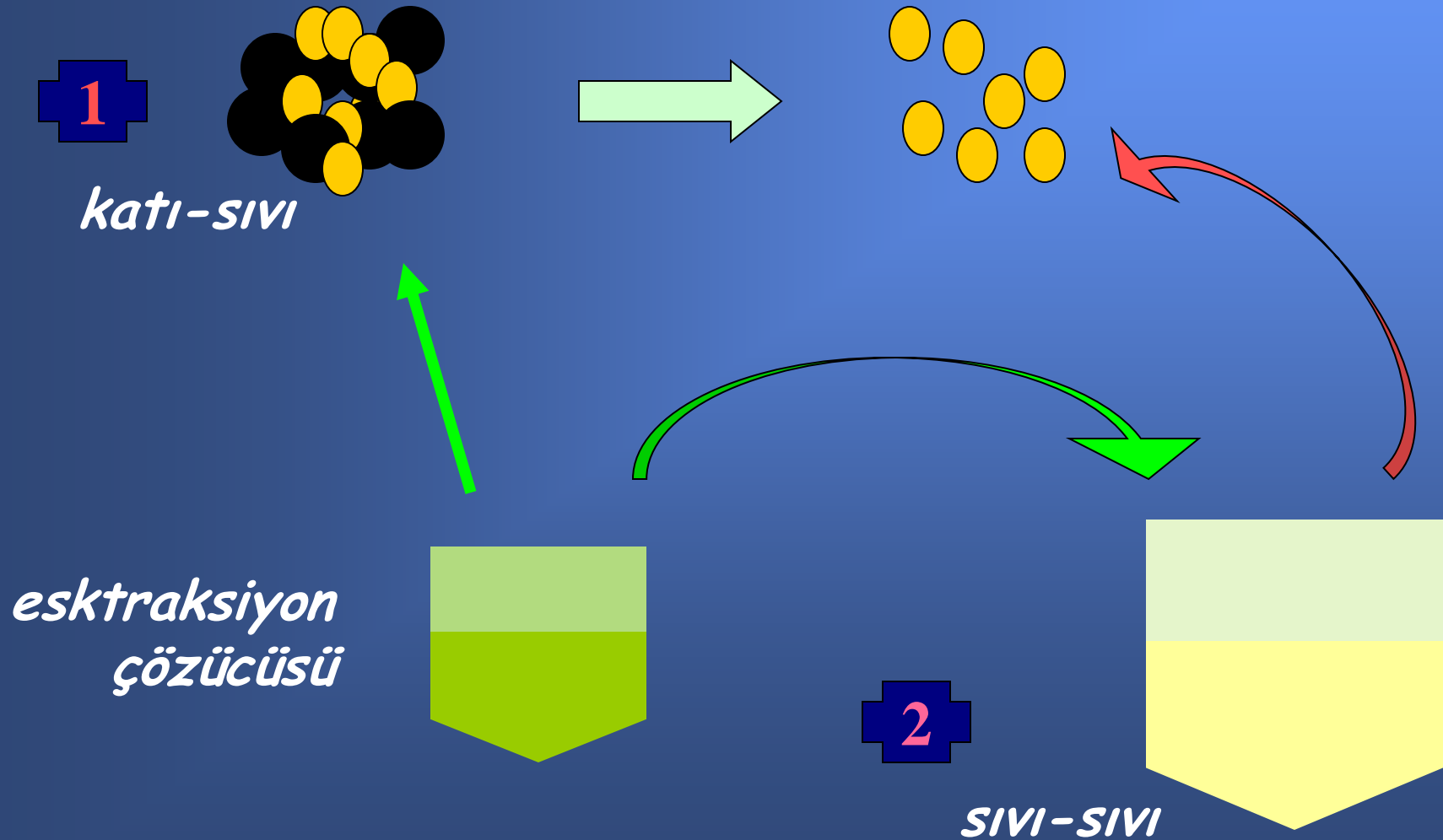
-

İnsektisitler

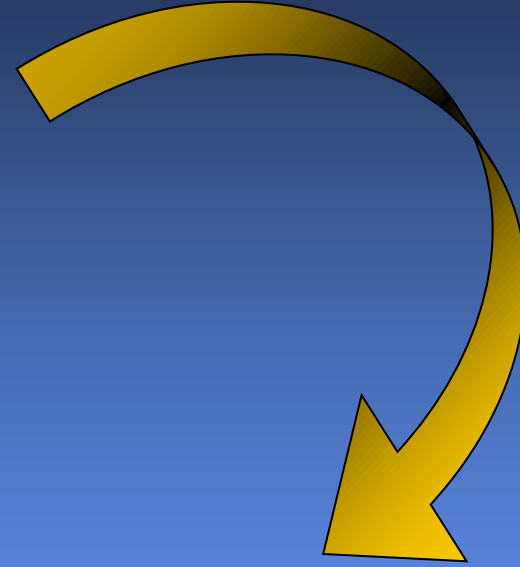
EKSTRAKSİYON



EKSTRAKSİYON



*SIVI-SIVI
ekstraksiyon*



Nerst Kanunu

Nerst Kanunu

1

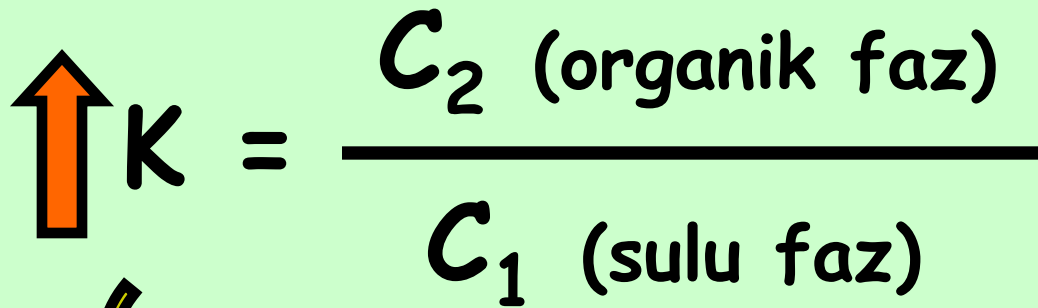
Birbiriyle karışmayan iki faza dağılmış bir maddenin her iki fazdaki konsantrasyonlarının birbirine oranı belirli sıcaklık, pH ve basınçta sabit olup, çözünmüş maddenin konsantrasyonundan bağımsızdır.

Nerst Kanunu

2

Çok sayıda maddenin bir arada bulunması, her bir maddenin dağılma durumunu etkilemez ve her bir maddenin dağılma dengesi "partisyon (dağılma) dengesi" ile ifade edilir.

partisyon (dağılma) dengesi






The diagram features a light green rounded rectangle containing the partition coefficient equation. To the left of the equation is a large orange arrow pointing upwards, with a curved black arrow pointing from its base to the word 'ayırım' below. The equation itself is
$$K = \frac{C_2 \text{ (organik faz)}}{C_1 \text{ (sulu faz)}}$$

 ayırım

Ekstraksiyon verimini etkileyen faktörler

- çözücü seçimi
- pH
- sulu fazın iyonik gerilimi

çözücü seçimi

1. Organik fazda maddenin çözünürlüğü 
2. Organik faz – biyolojik materyal karışmamalı
3. Organik fazın KN 
4. Maliyet
Toksisite } 
Alev almamalı

Zayıf Asit / Zayıf Baz



Güçlü Asit / Güçlü Baz

çözünürlük

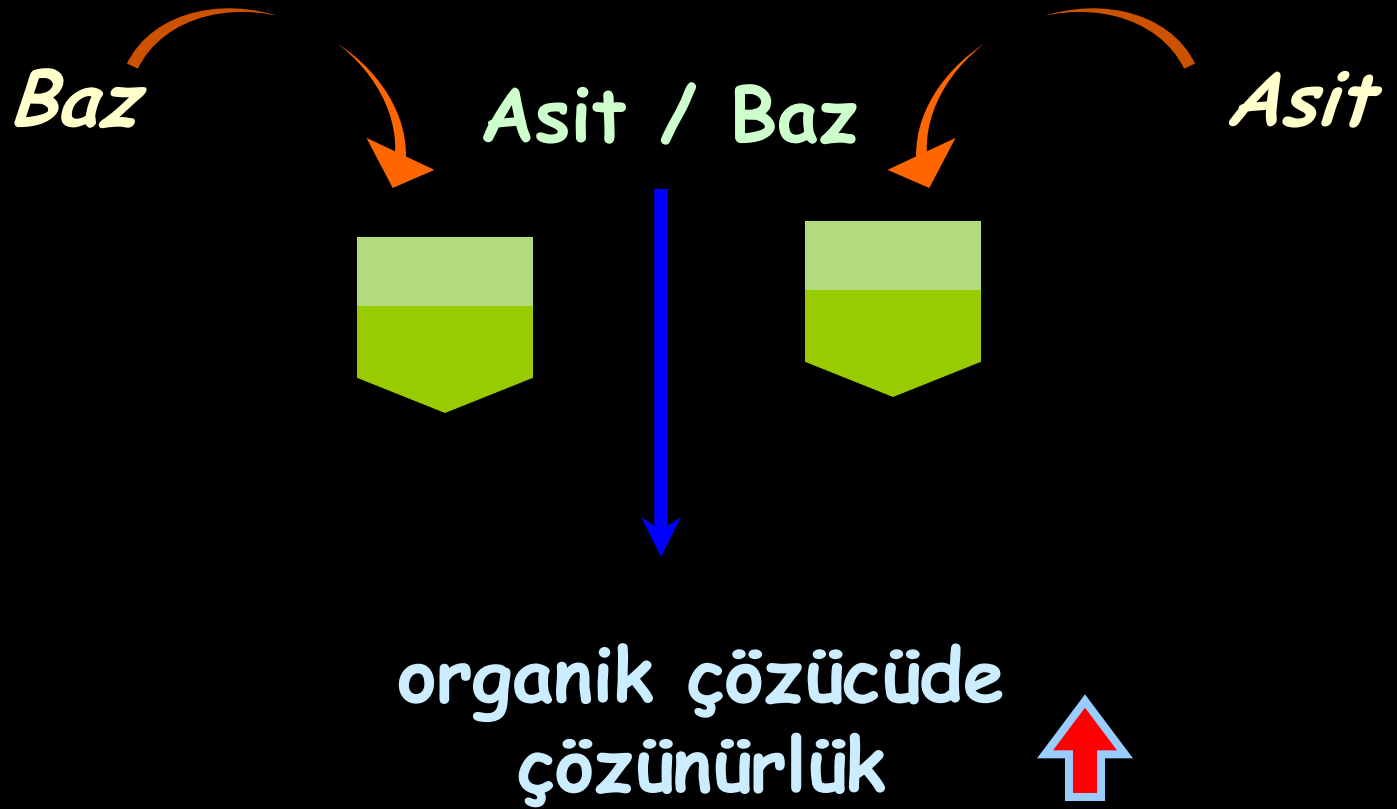


organik çözücü



polar çözücü

pH



pH

R-COOH
(non-ionize)



R-COO⁻ + H⁺
(ionize)



Henderson-Hasselbach

Zayıf Asit / Zayıf Baz

Asit


$$\text{Log} \frac{[\text{non iyonize ilaç}]}{[\text{iyonize ilaç}]} = \text{pKa} - \text{pH}$$

Baz

$$\text{Log} \frac{[\text{non iyonize ilaç}]}{[\text{iyonize ilaç}]} = \text{pH} - \text{pKa}$$

Örnek: İnsan idrar örneği içinde bulunan ve pK_a değeri 9.8 olan amfetamin (baz özelliğinde ilaç) sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile organik bir çözücü içine almak istediğimizde verimimiz ne olur? (idrar pH 'sı 6.0)

$$\text{Log} \frac{[ni]}{[i]} = 6 - 9.8$$

$$\text{Log} \frac{[ni]}{[i]} = -3.8 \quad \Rightarrow \quad \frac{[ni]}{[i]} = \frac{1}{6420}$$


non-iyonize %0.016

Bazik ilaç  $\text{pH} = \text{pK}_a + 2\text{-}3 \text{ ünite}$

Asidik ilaç  $\text{pH} = \text{pK}_a - 2\text{-}3 \text{ ünite}$

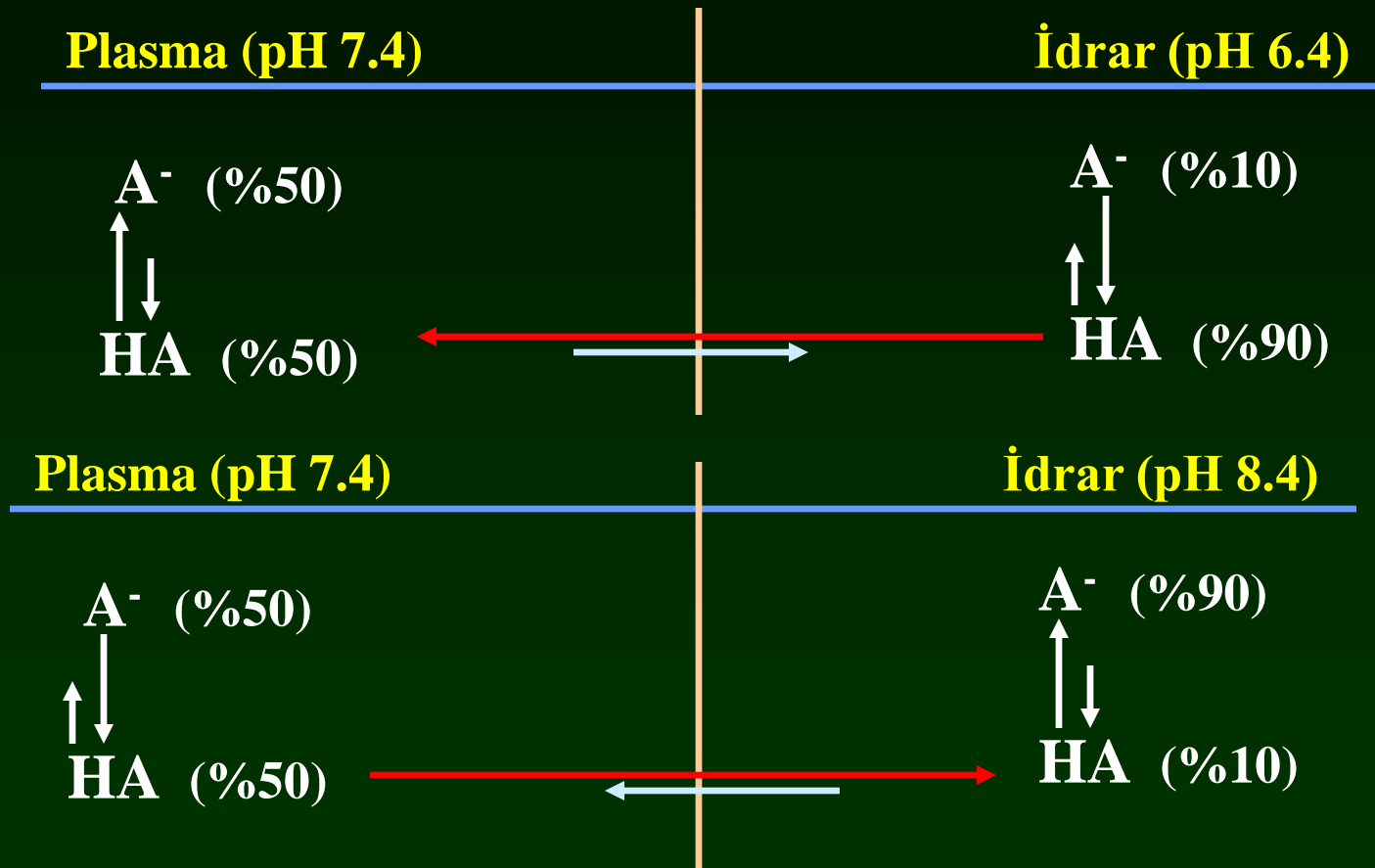
Ortam $\text{pH} = 13$ 

$$\text{Log} \frac{[\text{ni}]}{[\text{i}]} = 13 - 9.8$$

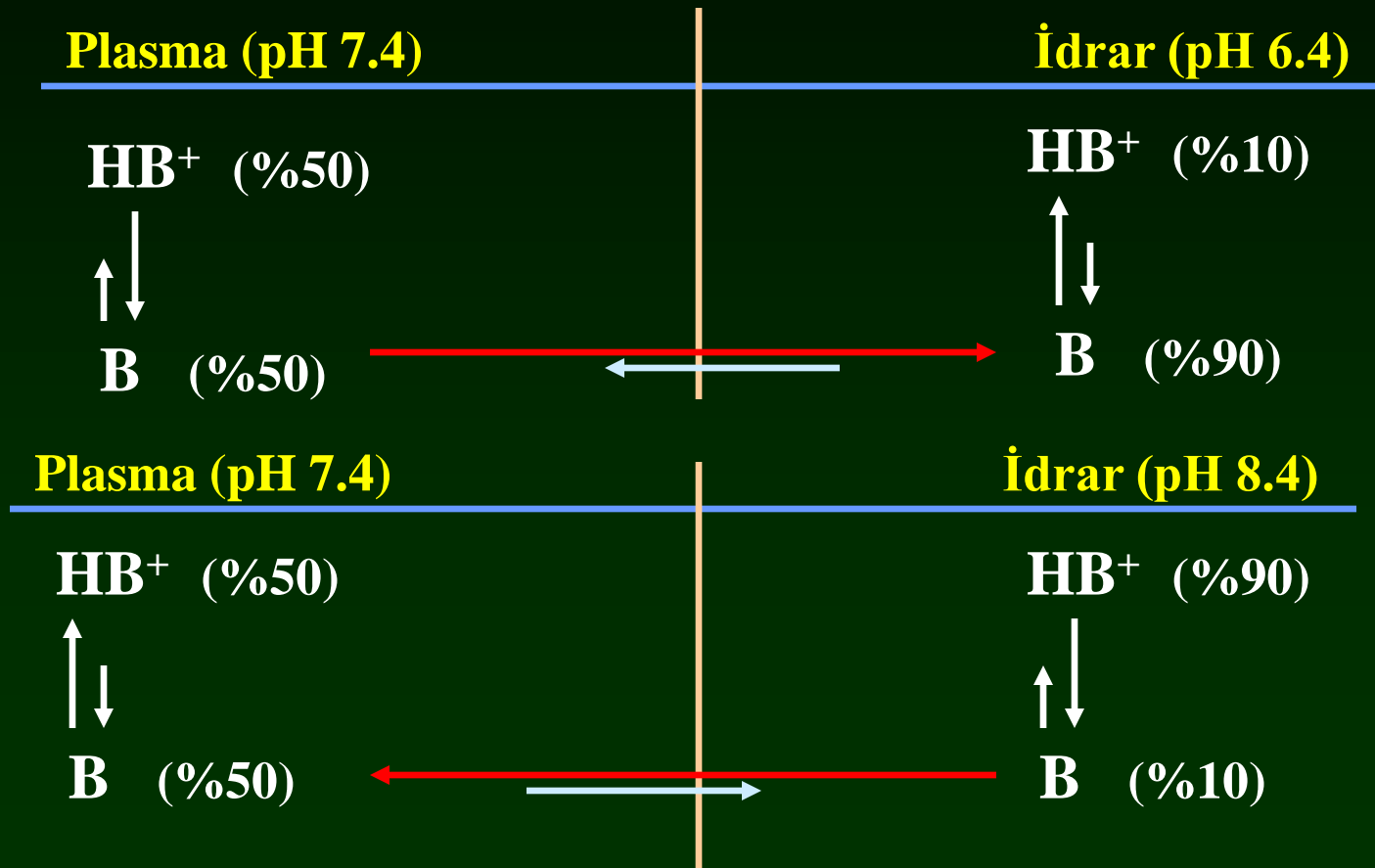
$$\text{Log} \frac{[\text{ni}]}{[\text{i}]} = 3.8 \quad \xrightarrow{\text{orange arrow}} \quad \frac{[\text{ni}]}{[\text{i}]} = \frac{1}{63 \times 10^{-5}}$$


non-iyonize %99.87

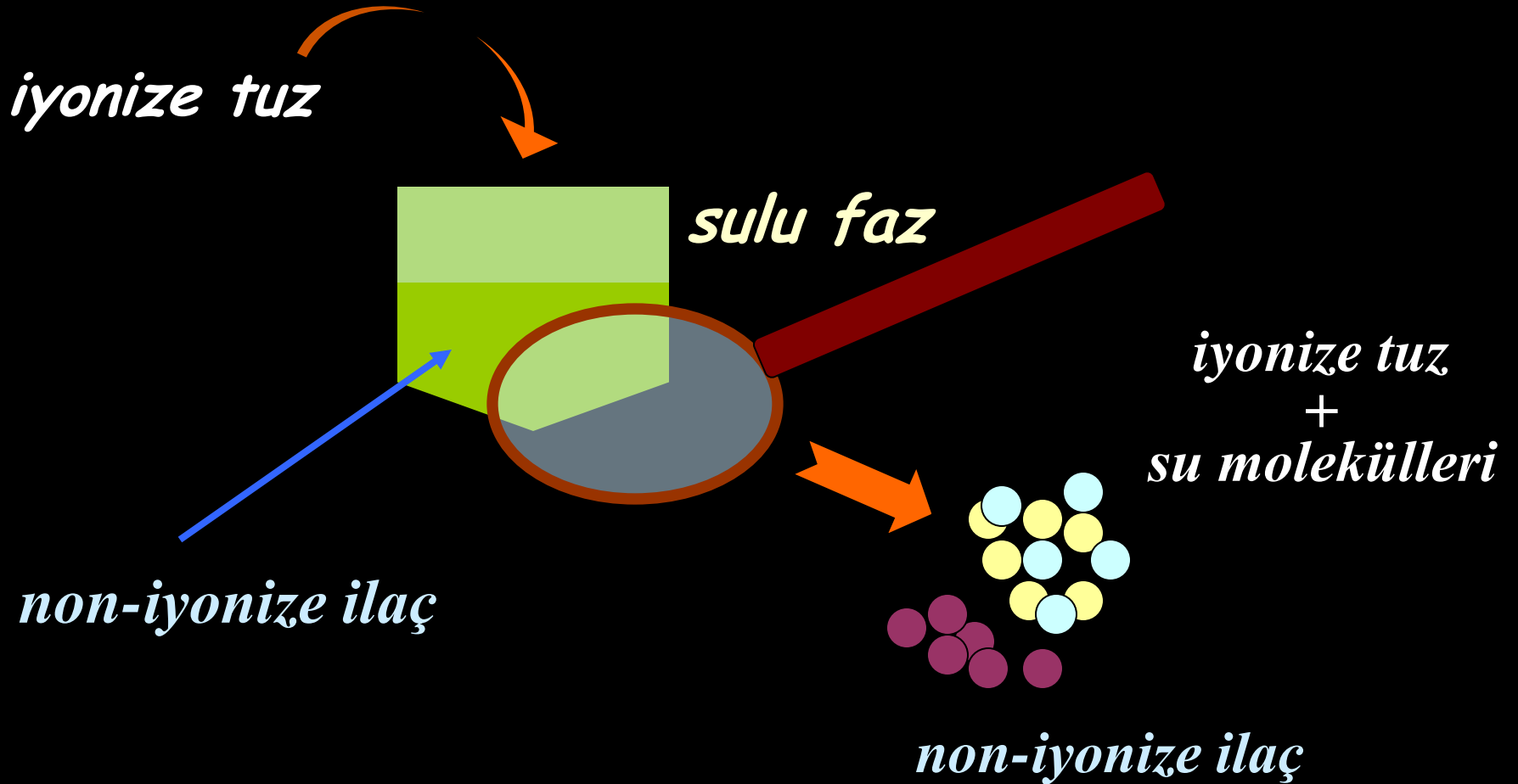
Örnek; pKa 7.4, zayıf organik asit



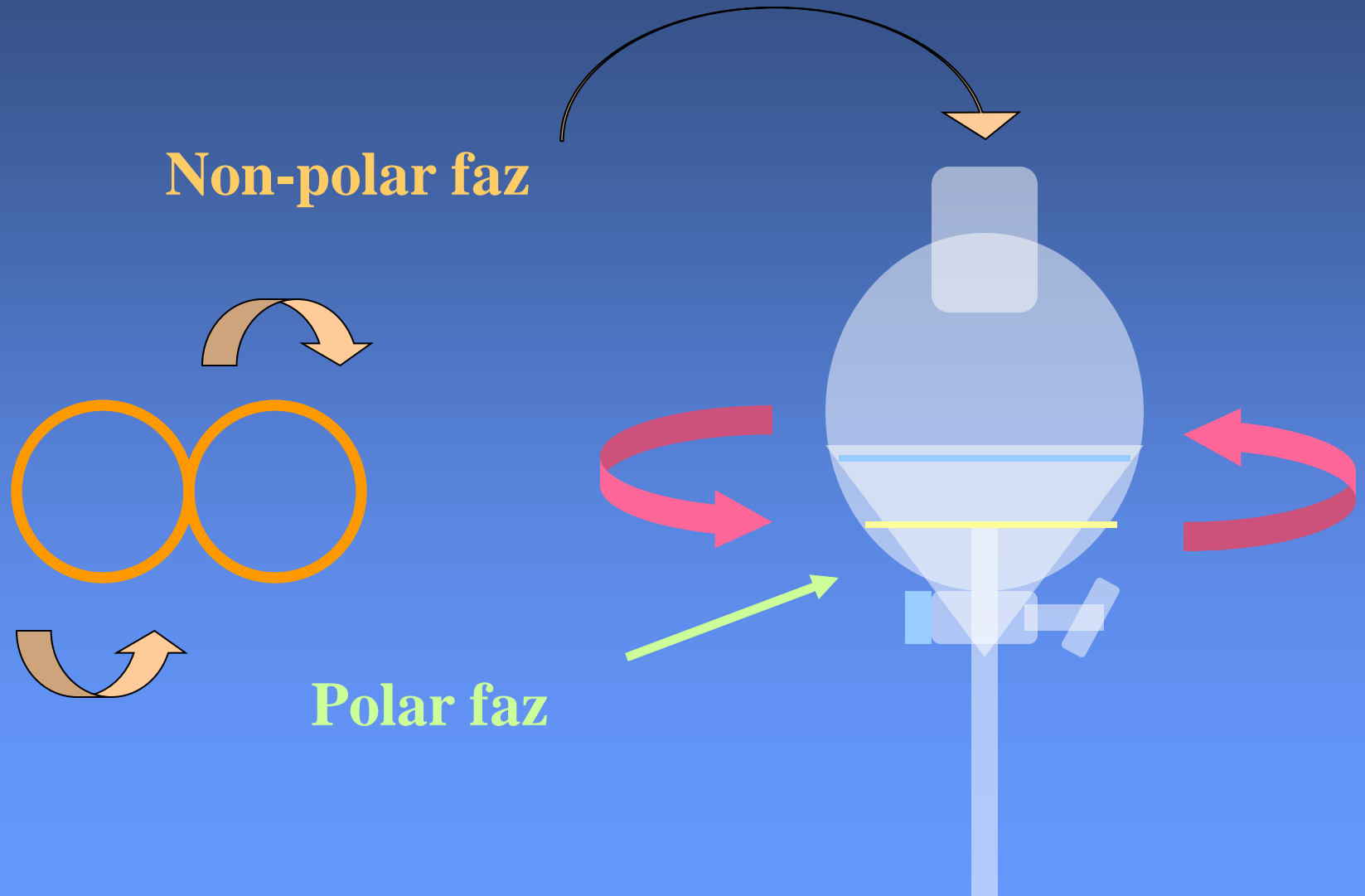
Örnek; pKa 7.4, zayıf organik baz



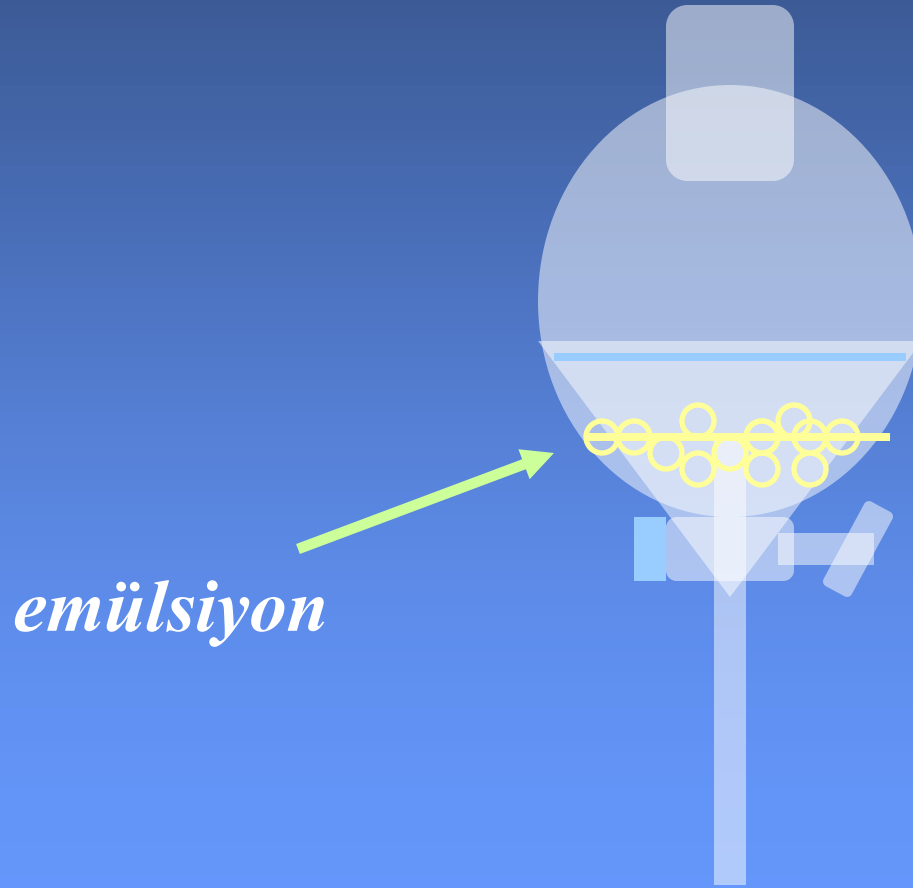
iyonik gerilim



EKSTRAKSİYON



EKSTRAKSİYON



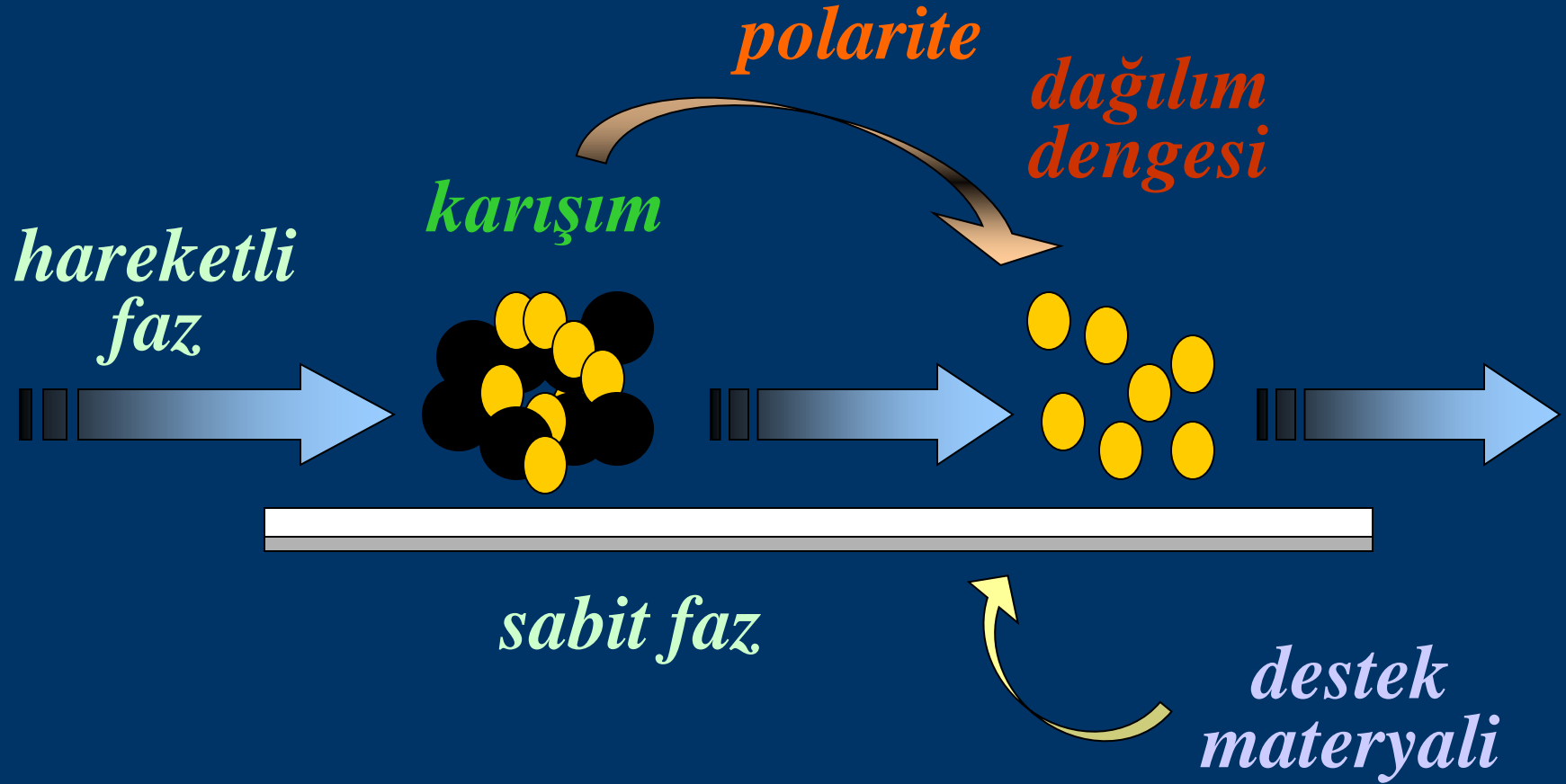
Emülsiyonu gidermek için

- Santrifüj
- Tuz eklenmesi
- Alkol eklenmesi
- Bekleme
- Isıtma

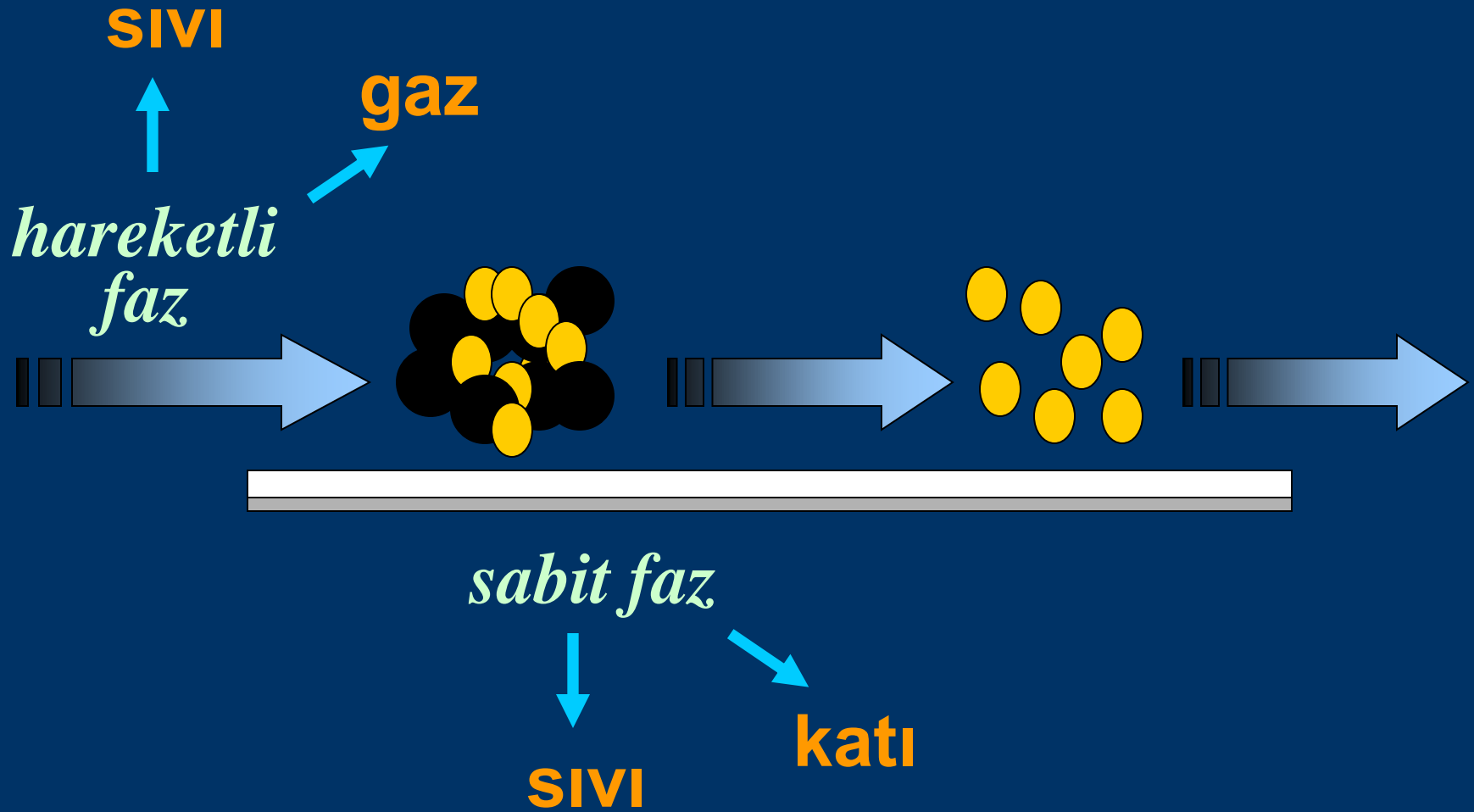
KROMATOGRAFI



KROMATOGRAFI



KROMATOGRAFI



Dayandığı ilkeye göre

1. Adsorbsiyon (*sıvı-katı / gaz-katı*)
2. Partisyon (*sıvı-sıvı / gaz-sıvı*)
3. İyon değiştirme
4. Jel filtrasyon

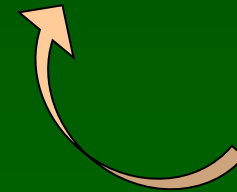
1

Adsorbsiyon

non-polar



Çözünmüş maddelerin katı
faza farklı tutunmaları



polarite

non-polar



(sıvı-katı / gaz-katı)

2

polar / az polar



polar

Örnek bileşenlerinin
hareketli fazla sabit faz
arasında farklı dağılımı

non-polar

(sıvı-sıvı / gaz-sıvı)

sabit faz  *iyon değiştirici reçine*

hareketli faz  *sulu çözelti*

4

Jel Filtrasyonu

Molekül ağırlıklarına
göre ayırım

İnce Tabaka Kromatografisi

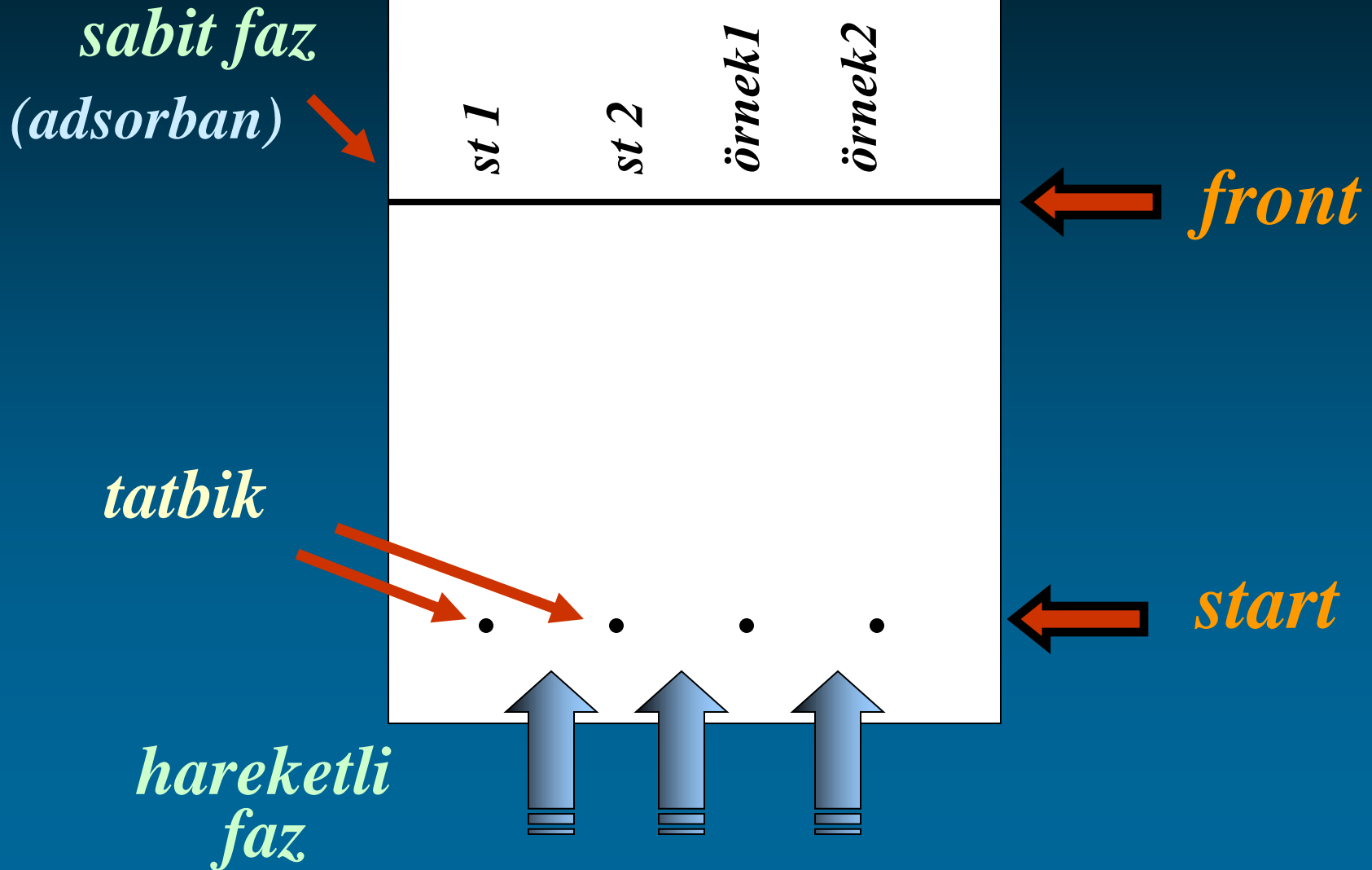
Adsorbsiyon
(partisyon)

adsorban

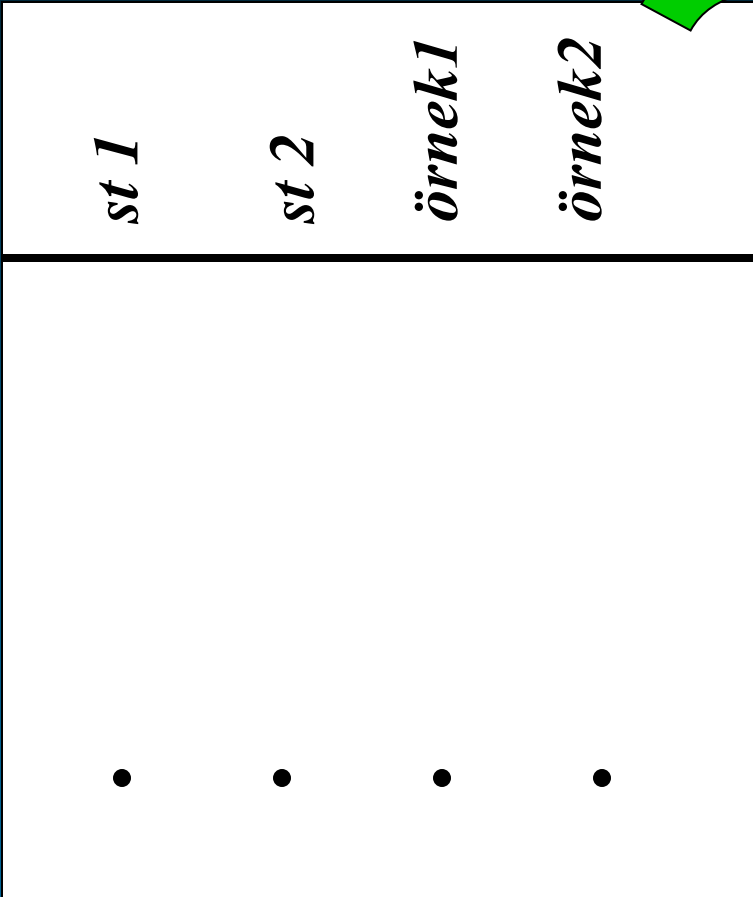


destek materyal

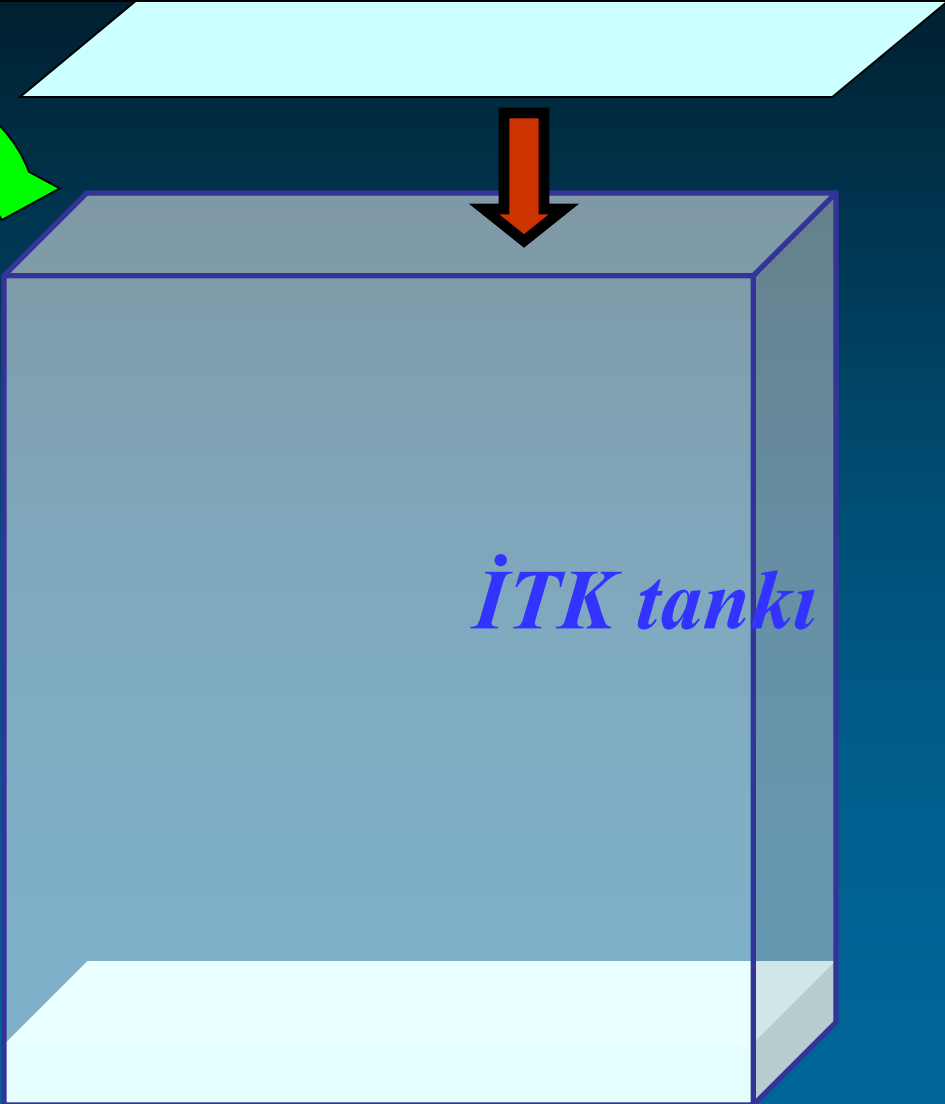
İnce Tabaka Kromatografisi



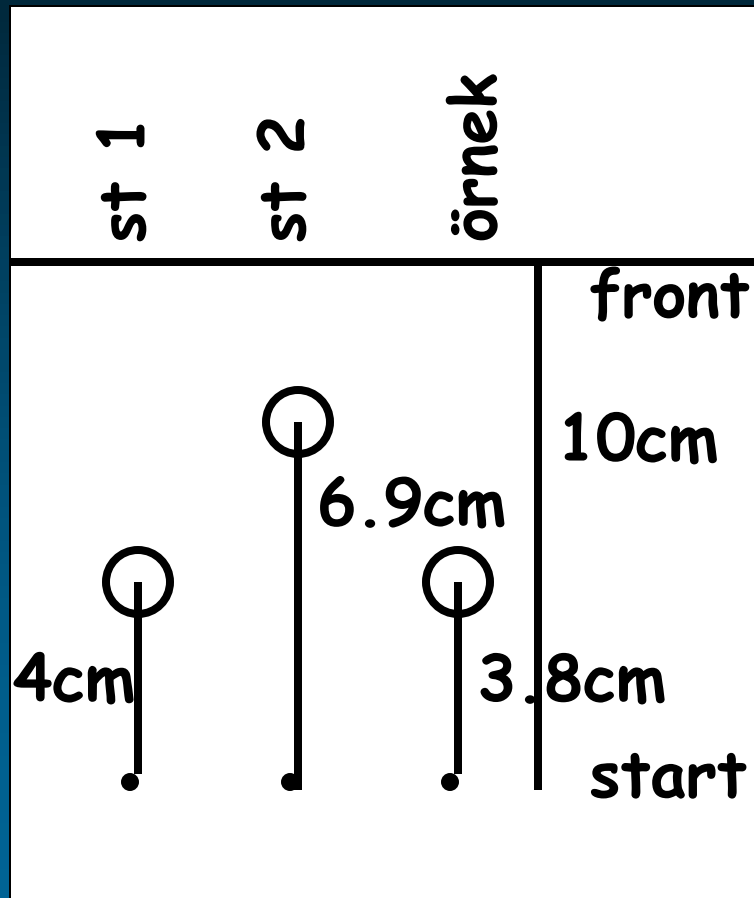
İnce Tabaka Kromatografisi



hareketli faz

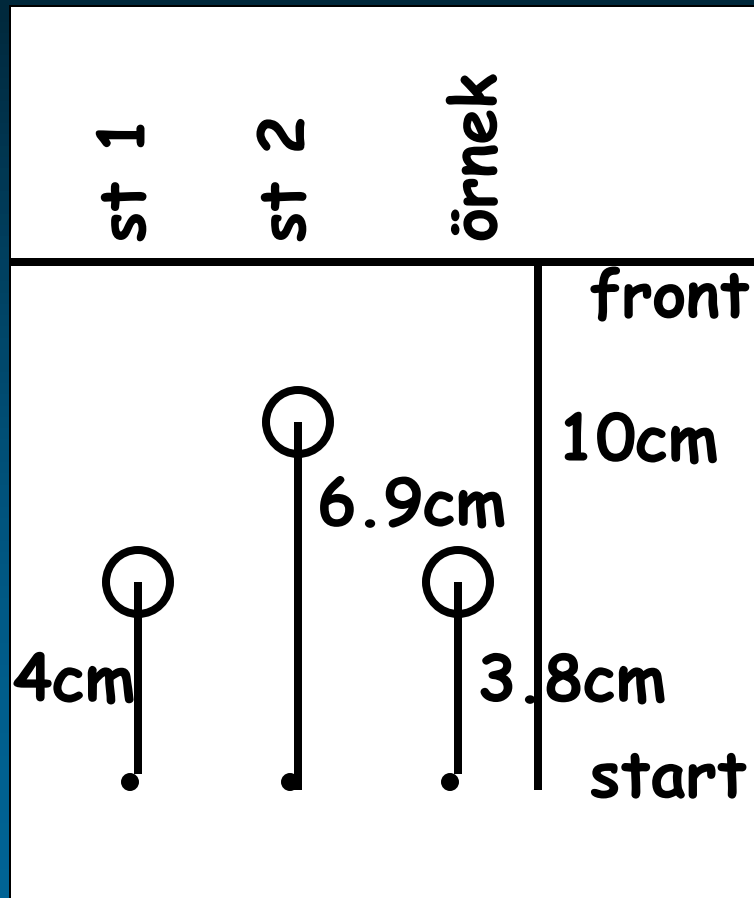


İnce Tabaka Kromatografisi



- *Hareketli faz*
- *Sabit faz*
- *Sürüklenme sıcaklığı*
- *Sürüklenme süresi*
- *Revalatör*
- *R_f değerleri*

İnce Tabaka Kromatografisi



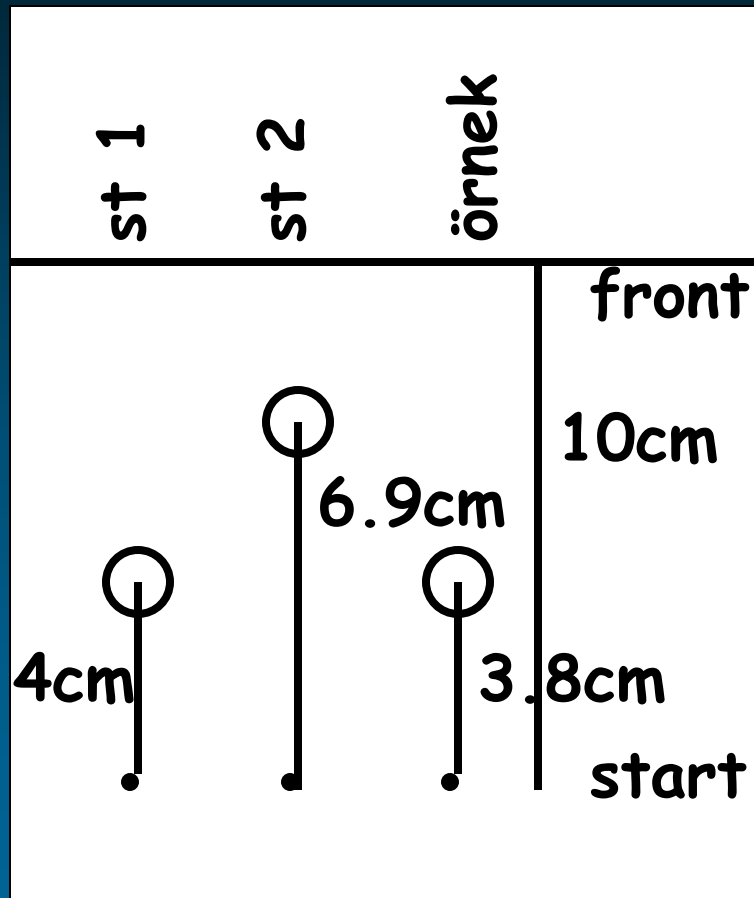
$$R_f = \frac{a}{b}$$

R_f = retansiyon faktörü

a = maddeye ait lekenin fronta uzaklığı

b = çözücünün katettiği yol (front)

İnce Tabaka Kromatografisi



$$R_f \text{ St } 1 = \frac{4}{10} = 0.4$$

$$R_f \text{ St } 2 = \frac{6.9}{10} = 0.69$$

$$R_f \text{ St } 2 = \frac{3.8}{10} = 0.38$$

➡ Örnek = Standart 1

İnce Tabaka Kromatografisi

Rf'e etki eden faktörler

- Hareketli ve sabit fazın cinsi
- Sıcaklık
- Çözelti konsantrasyonu
- Havanın nemi
- Tankın doygunluğu

