

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
ECZACILIK FAKÜLTESİ
Yayınları : 37

TOKSİKOLOJİ
LABORATUVAR KİTABI

Prof. Dr. MUSTAFA GÜLEY
A. Ü. Eczacılık Fakültesi
Toksikoloji Kürsüsü

Doç. Dr. NEVİN VURAL
A. Ü. Eczacılık Fakültesi
Toksikoloji Kürsüsü

ANKARA
1 9 7 5

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
ECZACILIK FAKÜLTESİ
Yayınları : 37

TOKSİKOLOJİ
LABORATUVAR KİTABI

Prof. Dr. MUSTAFA GÜLEY
A. Ü. Eczacılık Fakültesi
Toksikoloji Kürsüsü

Doç. Dr. NEVİN VURAL
A. Ü. Eczacılık Fakültesi
Toksikoloji Kürsüsü

ANKARA
1 9 7 5

Sevgi Sar

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ

A. GENEL BÖLÜM

ANALİTİK TOKSİKOLOJİDE KULLANILAN TEKNİK VE YÖNTEMLER

I. Toksikoloji pratiği hakkında genel bilgiler	1
II. Uçucu zehirlerin biyolojik materyalden izolasyonu ve aranmaları için kullanılan genel yöntemler	5
III. Uçucu olmayan organik zehirlerin biyolojik materyalden ayrılması ve aranması için kullanılan teknikler	18
IV. Metalik zehirlerin izolasyonları ve tanınmaları	36
V. Toksik anyonların aranması :	45
Dializle ayırma	
VI. Özel olarak aranması gereken zehirler	46
VII. Toksikolojide kullanılan önemli fizikokimyasal teknikler	46
1. Kromatografi	47
2. Absorbsiyon spektral analiz tekniğinin toksikolojide kullanılması	49

B. ÖZEL BÖLÜM

ÖNEMLİ ZEHİRLERİN BİYOLOJİK MATERYALDE ARANMALARI

I. Uçucu zehirler

1. Metil alkol aranması ve tayini	52
Mikrodifüzyon yöntemi (Feldstein ve Klendshoj yöntemi)	
2. Etil alkol aranması ve tayini	55
3. Klorlu Hidrokarbonlar	60
4. Benzen	64
Biyolojik maddeden izolasyonu ve tayini	64

	<u>Sayfa</u>
5. Fenoller	65
6. Anilin	68
7. Siyanürler	70
8. Fosfor	72
9. Karbonmonoksit	76
ii. Uçucu olmayan organik zehirler	
1. Barbitüratlar	78
2. Alkaloidlerin tanınmaları ve aranmaları	82
3. Narkotikler	86
Morfinin idrardan izolasyonu ve tanınması	86
iii. Metalik zehirler	
1. Bazı metallerin yıkılanmadan biyolojik materyalde aranmaları	89
(Reinsch deneyi)	
2. Kurşun	93
3. Talyum	96
iv. Özel olarak aranması gereken zehirler	
Organik fosforlu insektisitler	98
C. BİYOLOJİK DENEYLER	103
D. BAZI ÖNEMLİ İLÂÇ VE ZEHİRLERİN ÇABUK ARANMALARI	107
(ÖN DENEYLER)	
LABORATUVARDA İLK YARDIM	115
ÖNEMLİ REAKTİFLERİN HAZIRLANMASI	118
İNDEKS	124
LİTERATÜR	

ÖNSÖZ

Toksikoloji, özellikle Eczacılık Fakültelerinde okutulan Analitik Toksikoloji uygulamalı bir bilimdir, gerek meslekî ve gerekse kazaen oluşan zehirlenmelerin kontrol ve tanımlanmaları ve zamanında tedavileri için, biyolojik maddede (kan, idrar, doku gibi) zehirlenme ajanı olan kimyasal madde veya ilâcın analizi zorunludur,

Fakültemizde 1964 yılında demonstrasyon şeklinde başlayan toksikoloji laboratuvar uygulaması, eczacının ekspertis görevinde daha yetkili ve bilgili yetişmesini sağlamak için çeşitli aşamalardan geçerek bugünkü halini almıştır,

Bu kitap, A.Ü. Eczacılık Fakültesi III. sınıf öğrencilerine göstermekte olduğumuz pratik derslere göre hazırlanmış olmakla beraber, analitik toksikoloji alanında çalışan diğer meslek mensupları için de yararlı olacağını umuyoruz.

Kitabın daktilosunun yapılması, klişelerin çizilmesinde emeği geçen kürsümüz elemanlarından Canan Güley ve İskender Bütüner'e burada teşekkürü bir borç biliriz.

Kasım 1975 ANKARA

M. Güley — N. Vural

A. GENEL BÖLÜM

ANALİTİK TOKSİKOLOJİDE KULLANILAN TEKNİK VE YÖNTEMLER

I. Toksikoloji Pratiği Hakkında Genel Bilgiler

1. Giriş :

Zehirli maddelerin organizmaya giriş yolları, bunların vücuttaki etki şekilleri ve zehirlenmenin tedavisini konu alan toksikoloji bilimi, diğer taraftan zehirlerin biyolojik materyalden (kan, idrar, organ ve doku parçaları, bitki v.s.) izolasyonu, tanınmaları ve miktarlarının saptanması ile uğraşır.

Son 20 yıl içinde kimya endüstrisinin hızla gelişmesi sonucu insanlar gerek meslekî (occupational) ve gerekse günlük yaşantılarında (nonoccupational) bir çok toksik maddelerle karşı karşıya kalmaktadır. Buna bağlı olarak meslekî ve kazaen zehirlenme olayları da artmaktadır. Ayrıca yine son yıllarda farmasötik preparatların çok kullanılması sonucunda özellikle aşırı dozdan zehirlenmelerin de gittikçe arttığı biyoistatistik incelemelerden anlaşılmaktadır. Bu nedenle kronik ve akut zehirlenmelerin teşhisinde, postmortem zehirlenmelerin aydınlatılmasında çabuk ve kesin sonuca ulaştıran teknik ve yöntemlerin gelişmesi zorunlu olmaktadır.

İşte analitik toksikolojinin başlıca görevi, zehirli maddelerin ve metabolitlerinin biyolojik ortamdaki yabancı maddelerden ayrılmasını (izolasyon) ve saflandırılmasını (purifikasyon) sağlayan prensip ve tekniği araştırmak tanımlanmalarını ve tayinlerini mümkün kılan yöntemleri kurmaktır. Bu şekilde bulunan zehirin cinsi ve miktarı ile hastada görülen zehirlenme semptomları arasında bir ilişki kurularak gerekli tedavi şekli saptanabilir.

Zehirlenme olaylarında nümune olarak en çok idrar, kusmuk, mide yıkama suyu ve kan alınır. Bunun dışında zehirlenmenin meydana geldiği yerde şüpheli her şey, örneğin yemek kabı, su bardağı, ilaç şişesi, diğer ilaçlar, kimyasal kap ve içeriği, havadan da analiz için örnek alınır.

Hava nümunesi özellikle endüstriyel zehirlenmelerde büyük önem taşır, Ölüm olaylarında ise ilâveten çeşitli organ ve dokulardan da örnek seçilir.

Toksikolojik analizlerde, çok çeşitli kimyasal maddelerin aranması gerekmektedir. Bunların her birinin tanınması ve tayinleri için çeşitli analitik kimya ve fizikokimyasal tekniklerden yararlanılmaktadır. Çoğunlukla aranan zehirli madde çok az miktarda (miligram ve hatta mikrogram düzeyinde) olduğundan öncelikle bunların bulunduğu ortamdan ayrılması, saflandırması için kullanılacak izolasyon yöntemleri çok önemlidir. Analitik toksikolojide, analizi kolaylaştırmak için zehirler bu ayırma işlemine göre sınıflandırılmıştır. Bilinmeyen veya şüpheli bir zehir önce bu genel ayırma tekniklerine göre saflandırıldıktan sonra, modern ve mikro tekniklerle tanımlanırlar.

2. Zehirlerin izolasyon yöntemlerine göre sınıflandırılmaları :

Analitik amaçla bir çok toksikologlar, zehirleri uygulanan izolasyon tekniklerine göre başlıca beş sınıfta toplarlar :

a) Uçucu zehirler : Biyolojik maddeden distilasyon veya difüzyon yolu ile ayrılırlar (CO, etil alkol).

b) Uçucu olmayan organik zehirler : Biyolojik ortamdan sıvı ekstraksiyon yöntemi ile izole edilirler (barbitüratlar, alkaloidler).

c) Metalik zehirler : Biyolojik maddeden kuru veya yaş külleş-tirme (oksidasyon) işlemi ile ayrılırlar (kurşun, arsenik, talyum).

d) Toksik anyonlar : Biyolojik ortamdan dializ veya ion-exchange (iyon değiştirme) teknikleri ile ayrılırlar (klorat, fosfat, tiosiyanat gibi).

e) Çeşitli zehirler : (Özel olarak aranması gerekenler) : Yukarıdaki izolasyon tekniği ile aranmayan ve her biri için özel ekstraksi-

yon işleminin uygulanması gereken maddeleri kapsar (insektisitler, proteinler, glikozitler gibi).

3. Nümune seçimi ve laboratuvara gönderme :

Zehirlenme olaylarında, hasta yaşıyorsa nümune olarak kan, idrar, mide içeriği ve mide yıkantı suyu gönderilebilir.

Toksikolojik analizde nümune seçimi önemlidir. Zehirler organizmada ender olarak homojen bir şekilde dağılırlar. Çoğu zaman kimyasal yapı ve metabolizma şekillerine bağlı olarak belirli yerlerde toplanırlar.

Örneğin kurşun kemiklerde, arsenik saç ve tırnaklarda, lipidsolubl (lipidde çözünen, hidrofob) maddeler ise beyinde toplanırlar. Buna karşın etil alkol bütün vücut sıvısına uniform olarak dağılır.

Bu nedenle, zehirlenme hakkında önceden bir ip ucu varsa, o zaman bir kaç çeşit biyolojik materyal yeterli olabilir. Ancak aranacak zehir hakkında hiç bir bilgi yoksa analiz için çeşitli biyolojik maddeden yeteri derecede örnek almak gerekir.

Ayrıca zehirlerin metabolizmaları ve dışarıya atılış şekilleri (metabolitleri) hakkında çok iyi bilgi sahibi olunmalıdır. Çok kez zehirli maddenin kendi yerine metaboliti aranması gerekir. Örneğin benzen zehirlenmesinde idrarda fenol, trikloroetilenle zehirlenmede kan ve idrarda trikloroasetik asit, heroinle zehirlenmede karaciğer veya idrarda morfin aranması yapılır.

Nümune alınması ve laboratuvara gönderilmesi :

a) Her organ tam alınarak ayrı ayrı nümune kaplarına konur. Keza organ içeriği de aynı şekilde ayrılır. Nümune kapları iyi cins cam veya spesifikasyonu belli iyi cins plastikten olabilir. Önceden bu kapların kimyasal yolla iyi temizlenmesi gerekir.

Kuru kaplar içine alınan nümunelerin ağzı kapatılır, ancak putrifikasyon gazlarının çıkabilmesi için kaplar ağzına kadar doldurulmaz.

Nümune kapları üzerine etiket yapıştırılır. Bu etikette nümunenin alındığı tarih, saat, nümune cinsi ve kime ait olduğu, ayrıca nümuneyi alanın adı ve imzası bulunmalıdır.

Ayrıca nümune kapları mühürlenmelidir. Mühür mumu As, Pb gibi maddeleri ihtiva ettiğinden nümune ile mühürün temas etmemesine dikkat etmelidir.

b) Alınan nümunenin mümkün olduğu kadar çabuk analize gönderilmesi gerekir. Herhangi bir koruyucu madde ilâve edilmemesi genel kaidedir.

Kadavranın dekompoze olması bir çok zehirlerin izolasyon ve tanınmalarını engellemez, fakat prezervatif (koruyucu madde) kullanılması bazı önemli zehirlerin aranmalarını önler.

% 95 alkol veya % 4 lük formaldehit en iyi koruyucudur. Fakat etil alkol, metil alkol, CO, siyanür, P ve fenol aranacaksa kullanılmamalıdır.

Klorlu su, CuSO_4 , fenol gibi dezenfektanlardan kaçınılır.

Dokular kısa bir müddet için (1 kısım tuz + 3 kısım organ) oranında olmak üzere saklanabilir. Distilasyondan sonra, uçucu olmayan organik zehirler alkol veya formaldehit içinde saklanabilir.

Fakat bu gün bir çok laboratuvarlar otomatik soğutma tertiplerine sahip olduklarından, hiç bir kimyasal madde ilâve edilmeksizin analiz zamanına kadar düşük temperatürde saklanabilir. Keza nümune alma yeri ile laboratuvar arası uzaksa, nümuneyi buzla soğutma tertibi içinde yollamak gerekir (Ancak -10 C° den aşağı dondurma sırasında CO, H₂S ve özellikle HCN'nin çözünmüş oldukları organ sıvılarından ayrılabilirler hatırlanmalıdır).

Alınan kan nümunesinin pıhtılaşmaması için % 0.4 - % 0.5 NaF ilâvesi uygunsa da, kanın spektroskopik muayenesinde sulfhemoglobinle karıştırılması ihtimali göz önünde bulundurulmalıdır.

Analize başlamadan önce, gönderilen örnekte şu incelemeler yapılır :

a) Nümune ambalajı açılmadan önce incelenir (büyüklüğü, ambalaj şekli gibi).

b) Ambalaj üzerindeki etiket incelenir (tarih, imza, nümune hakkında verilen ön bilgi).

c) Nümunenin mühürlü olup olmadığı mühürlü ise mühürün okunup okunmadığı saptanır.

d) Nümunenin net ağırlığı saptanır.

e) Nümune açılır, temiz ve kuru uygun kap (porselen kapsül) içinde karıştırılır, 1/3ü, gerektiğinde incelenmek üzere saklanır.

f) Geriye kalan nümune analiz için şu şekilde bölünür (özellikle bilinmeyen bir zehirin aranması konu ise).

Nümune 6 eşit bölüme ayrılır :

i — Ön deneyler yapılması;

ii — Uçucu bileşikler;

iii — Metalik zehirler;

iv — Uçucu olmayan organik zehirlerin aranması;

v — Özel nitelikteki zehirlerin aranması;

vi — Kantitatif tayin yapılması için kullanılır.

Laboratuvara gönderilen biyolojik maddenin ne şekilde alınacağı ve saklanacağı konusuna, özel bölümde zehirlerin kendileri ile ilgili yerde sırası geldikçe değinilecektir.

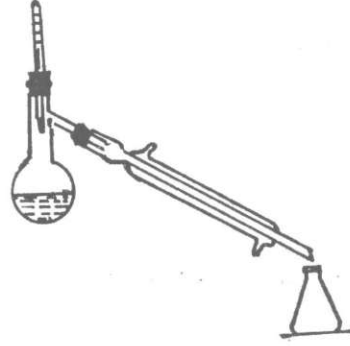
II. Uçucu zehirlerin biyolojik materyalden izolasyon ve aramaları için kullanılan genel teknikler.

Uçucu zehirler biyolojik materyalden, distilasyon veya mikrodüzyon olmak üzere başlıca 2 teknikle ayrılabilirler.

1. Distilasyonla ayırma :

Bilindiği gibi distilasyon sıvı bir maddeyi, kaynama noktasına kadar ısıtarak buhar haline getirmek ve bu buharı yoğunlaştırarak ayrı bir kaptan toplamaktır. Uçucu zehirlerin distilasyonu, kaynama noktası ve su buharı ile sürüklenmelerine göre 2 şekilde yapılmaktadır.

a) Normal distilasyonla kaynama noktaları (k.n.) 100°C altında zehirlerin ayrılmaları :



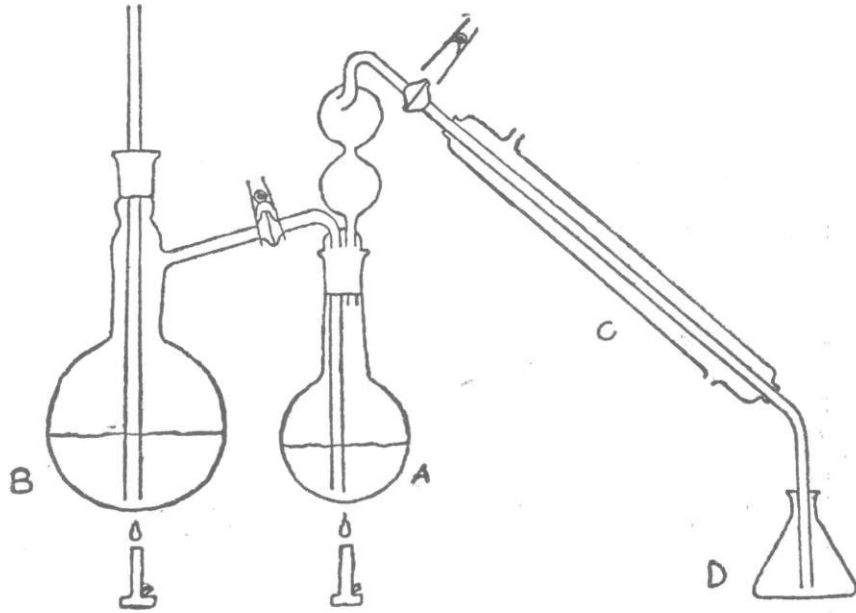
Şekil : 1 Normal distilasyon apareyi.

Bunun için şekil (1) de görülen normal distilasyon apareyi kullanır. Distilasyon balonuna (A) analiz maddesinin (1/5 — 1/6 sı) konur ve kaynar su banyosunda veya bek alevinde yavaş yavaş distile edilir. Bu şekilde soğutucudan (B) geçerek buz içinde soğutulan toplama kabında (C) distilat toplanır. Bu distilat uçucu zehirlerin aranması için kullanılır.

Kaynama noktası 100° altında olan önemli uçucu zehirler aşağıda gösterilmiştir (Tablo : 1).

Tablo : I
K.n. ları 100 °C altındaki uçucu zehirler :

<u>Kimyasal madde</u>	<u>Kaynama noktası (k.n) °C, 760 mm Hg</u>
Eter	34 - 35
Etil bromür	36 - 38
Petrol eteri	40 - 60
Benzin	50 - 75
Etil formiat	54 - 55
Aseton	60 - 62
Kloroform	65 - 67
Metil alkol	70 - 72
Etil iyödür	74 - 77
Etil asetat	76 - 78
Benzen	80 - 82
İzopropil alkol	81 - 84
Etilen klorür	84 - 86
Triklor etilen	86 - 88



Şekil : (2) Su Buharı Distilasyon Apareyi

b) Su buharı distilasyonu :

Prensip: Her sıvı maddenin sıcaklık derecesine bağlı olarak belirli bir buhar basıncı vardır. Bir gaz akımı ile buhar sıvı üzerinden uzaklaştırılırsa, o madde tekrar dengeyi sağlamak için buharlaşır. Pratikte bu maksatla su buharı kullanılır. Genellikle kaynama noktaları suyunkinden oldukça yüksek olan maddelerin içine su buharı yollandığı zaman, bu maddeler o sıcaklığa tekabül eden buharlaşma basıncı oranında buharlaşır. Sonra bu buharlar, su buharı ile birlikte soğutucudan geçerek yoğunlaşırlar.

Şekil (2) de su buharı distilasyonu apareyi görülmektedir. Nümuneye «B» balonuna 1/3 ünü geçmeyecek şekilde konur ve gelen su buharını yoğunlaşmaması için önceden balon «B» ısıtılır. Balona uygun bir soğutucu (C) bağlandıktan ve önüne toplama kabı (D) yerleştirildikten sonra, kuvvetli bir su buharı akımı (A) balon içinden geçirilmeye başlanır. Distilasyona soğutucudan akan damlalar berrak oluncaya kadar devam edilir.

Aşağıda su buharı ile sürüklenen maddeler gösterilmiştir. (Tablo : II).

Tablo : II

Su buharı ile uçan zehirler :

Metil Alkol	Krezoller	Timol
Aseton	Anilin	p - Aminosalisilik asit
Benzen	Kâfur	Asetilsalisilik asit
Nitrobenzen	Kroton yağı	Benzoik asit
Kloralhidrat	Fuzel yağları	Guayakol
Eter	α — Naftol	İyodoform
Aldehitler	β — Naftol	Nitrobenzen
Siyanür	Paraldehit	Salisilik asit
Fosfor (sarı)	Benzin	ve esterleri
Kloroform	Esansiyel yağlar	Tribromoetanol
Formaldehit	Karbon tetraklorür	Toluen
Piridin	Karbonsülfür	Uretan
Fenoller		Ksilen

Su buharı ile uçan zehirleri, distilasyon ortamına göre ikiye ayırabiliriz.

b₁ — Asit ortamda su buharı ile uçan zehirler : Asit veya nötral yapıdaki uçucu bileşikler asit ortamda su buharı ile uçarlar. Bunun için analiz maddesinin 1/6 sı balona konur. Eğer numune asit ise önce doymuş sodyum bikarbonat çözeltisi ile nötrleştirilir. Sonra % 10 tartarik asit veya seyreltik sülfirik asitle pH 5'e getirilir ve 50 ml distilat toplanacak şekilde su buharı ile distile edilir.

b₂ — Kalevi ortamda su buharı ile uçan zehirler : Nümune seyreltik NaOH veya sulp (katı) MgO ile pP 8 olarak şekilde kalevilendirilir, Anilin, amfetamin, kloral, kloroform (kloral hidrat kalevi ortamda kloroforma dönüşerek distile olur), nikotin, koniin alkali ortamda distile olurlar.

2. Distilatta uçucu zehirlerin aranması ve tanımları :

Elde edilen distilatta uçucu zehirler, aşağıdaki şekilde aranır :

a. Distilatın kokusu kontrol edilir. Bir çok bileşikler karakteristik kokusu ile tanımlanabilir (fenol, benzen, CS₂ gibi).

b. Distilatın reaksiyonu kontrol edilir (Turnusol kâğıdı ile asit veya kalevi özelliği araştırılır.

c. Distilatta kimyasal ön denemeler yapılır.

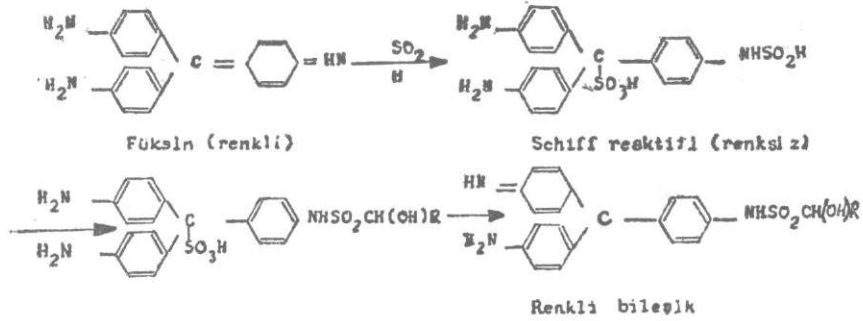
Bu ön denemeler için çok çeşitli reaksiyonları yapmak mümkünse de, en uygun olan fonksiyonel gruplara dayanarak yapılan genel deneylerdir. Organik bileşiğe alkol, aldehit, keton gibi özelliği veren grupların tanıma reaksiyonları ile distilattaki maddenin kimyasal sınıfını tayin etmek mümkündür.

d. Genel grupları tayin edilen maddeyi, hem kendi grubu içinde hangi bileşik olduğunu ve hem de yukarıdaki ilk bulguların sonuçlarını kesinleştirmek için özel reaksiyonlar tatbik edilir. Uçucu organik zehirlerden başka uçucu olmayan organik zehirlere de tatbik edilen bu genel reaksiyonlar ve ayırt edici özel reaksiyonlar aşağıda tablo III de gösterilmiştir.

Tablo : III Önemli fonksiyonel grupların tanıma reaksiyonları

Reaksiyonun ismi ve kimyasal niteliği	Reaksiyonu veren fonksiyonel grup
<p>A. Genel reaksiyonlar</p> <p>1. Oksitlenebilen maddeler ait genel reaksiyon (Asit ortamda kromat veya permanganat ile oksitlenme)</p> <p>a) $3 \text{RCH}_2\text{OH} + \text{C}_2\text{O}_7^{=2-} + 8\text{H}^+ \longrightarrow 3 \text{RCHO} + 2 \text{Cr}^{+3} + 7\text{H}_2\text{O}$</p> <p>b) $5 \text{RCH}_2\text{OH} + 3 \text{MnO}_4^- + 14\text{H}^+ \longrightarrow 5 \text{RCHO} + \text{Mn}^{+2} + 12 \text{H}_2\text{O}$</p>	<p>Alkoller, aldehitler, doymamış hidrokarbonlar</p>
<p>2. Fehling çözeltisinin redüksiyonu</p> $ \begin{array}{c} \text{COONa} \\ \\ \text{CHO} \backslash \\ \quad \text{Cu}^{++} \\ \quad / \\ \text{CHO} \\ \\ \text{COOK} \end{array} + \text{RCHO} + \text{KOH} + \text{H}_2 \longrightarrow \text{Cu}_2\text{O} + 2 \begin{array}{c} \text{COONa} \\ \\ \text{CHOH} \\ \\ \text{CHOH} \\ \\ \text{COOK} \end{array} + \text{RCOOK} $	<p>Aldehitler, kloroform, kloralhidratlar</p>
<p>3. Nessler reaktifi ile</p> <p>a) Renk reaksiyonu</p> <p>b) Nessler reaktifi ile redüksiyon</p>	<p>Alçak moleküllü aminler, NH_3 ve NH_4 tuzları</p> <p>Aldehitler, primer ve sekonder alkoller, CHCl_3, kloralhidrat.</p>

4. Schiff reaktifi ile renk reaksiyonu Aldehitler ve (oksitlenmiş primer alkoller)



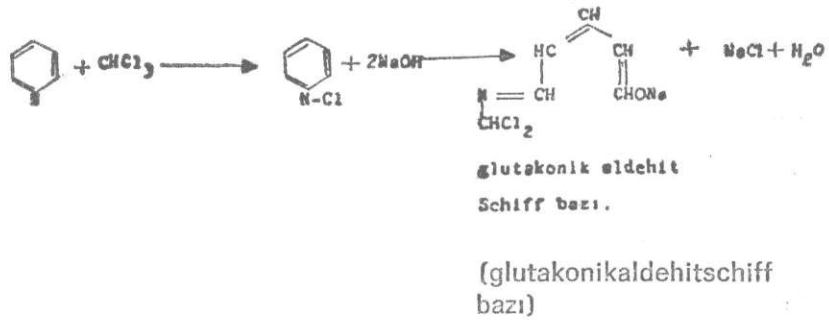
5. Legal deneyi :

Aktif metilen grubu olan bileşikler (ketonlar, asetil, aseton, indol, inden, pirol, rezorsin gibi)



6. Fujiwara reaksiyonu

Polihalojenli bileşikler (kloroform, trikloroasetikasit gibi)



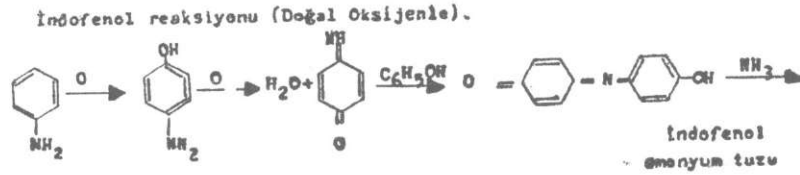
7. İzonitril reaksiyonu

Klorlu hidrokarbonlar ve primer aminler ve hidrolizle bu bileşikleri verenler (asetanilid gibi)

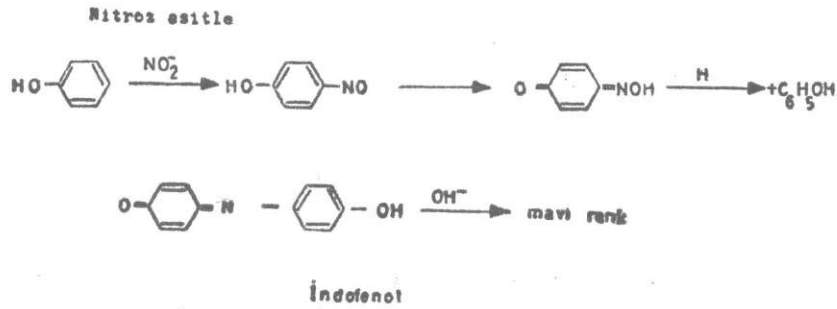


8. İndofenol reaksiyonu

Anilin ve hidrolizle anilin türevi verenler (Asetanilid, fenasetin, anestezin novakain, sulfonamid, dulcin gibi), bir değerli fenoller.



b) Nitroz asitle



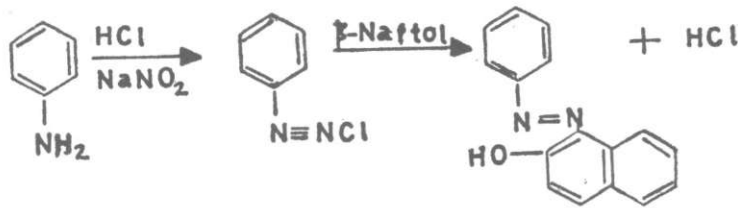
9. FeCl₃

mavi - mor renkler (enol veren iç kompleks meydana gelmesi). bileşiklerle iç kompleks meydana gelmesi].

fenol ve fenol türevleri ve enol durumuna geçen maddeler (asetil aseton), piramidon, tiyosülfat, ferrisiyanür.

10. Millon reaksiyonu : Fenoller (serbest ve p-substitue fenoller)
(Hg + HNO₃ ile nitrolama)

11. Diazo reaksiyonu : Primer aromatik aminler (anilin ve hidrolize anilin verenler (asetanilid, fenasetin gibi)).



Diazo boyar maddesi

12. Ksentogenat teşekkülü : CS₂, primer alkoller
ROH + CS₂ + KOH \longrightarrow S=C $\begin{matrix} \text{OR} \\ \text{SK} \end{matrix}$ + H₂O

13. İodoform reaksiyonu : Etil alkol, asetaldehit, aseton, asit laktik
CH₃CH₂OH + I₂ + 6NaOH \longrightarrow CHI₃ + HCOONa + 5 NaI + 5H₂O

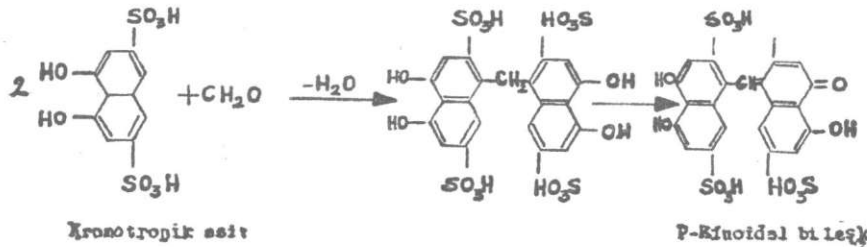
14. Nitrolama asiti ile Aromatik hidrokarbonlar (benzer toluen gibi).

B. Özel reaksiyonlar :

Kullanma yeri :

1) Kromotropik asit deneyi

Oksitlenmiş metil alkol ve formaldehiti tanımak için

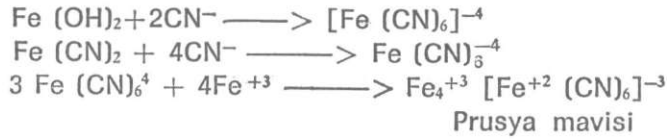


2. Iyodoform reaksiyonu
(A. 13 e bak)

Etil alkolü metil alkolden
ayırt eder.

3. «Prusya mavisi» teşekkülü

(siyanürlerin tanınmasında)



4. Guignard deneyi
(izopurpurat oluşması)

siyanür veya pikrik asit tanımlamasında



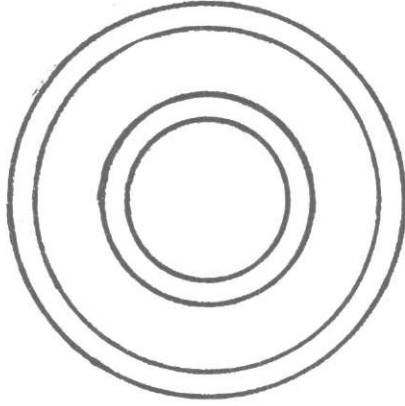
e. Bugün gelişmiş laboratuvarlarda, uçucu zehirlerin tanınması ve miktar tayinlerinde en çok gaz kromatografisi (GC) aпараты kullanılmaktadır. GC mikrogram seviyesindeki uçucu bileşiklerin tanınması ve miktarlarının saptanması için en uygun fizikokimyasal bir tekniktir. Gaz veya sıvı nümunenin doğrudan doğruya cihaza injeksiyonu ile sonuç alındığından (ön bir ekstraksiyon gerekmez) ayrıca, zaman bakımından da ekonomik bir tekniktir.

Gaz kromatografisi dışında kağıt kromatografisi, ince tabaka kromatografisi teknikleri ile ultraviyole spektrofotometresi ve infrared spektrofotometresi gibi fizikokimyasal tekniklerden de uçucu zehirlerin tanınması ve miktarlarının saptanmasında yararlanılır.

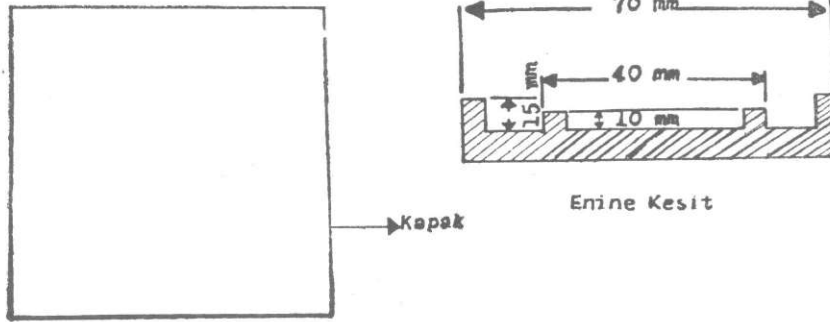
3. Mikrodifüzyon tekniği ile uçucu zehirlerin biyolojik materyalden izolasyonu ve aranmaları :

Az miktardaki uçucu zehirlerin dokulardan ayrılmasında mikrodifüzyon tekniği de kullanılmaktadır. İlk kez Feldstein ve Klendshoj

tarafından ortaya konan bu yöntem Conway'ın mikrodifüzyon aparatı ile uygulanmaktadır. (Şekil 3).



Üsten Görünüş



Enine Kesit

Şekil : 3 Mikrodifüzyon aparatı

Prensip :

Kapalı bir sistemde analizi yapılacak biyolojik materyalle bundan uçucu zehiri açığa çıkaran reaktif (liberating agent) dış odacıkta ve serbest hale geçen uçucu zehiri tutan çözücü (absorban) ise

İç odacıkta bulunur. Oda sıcaklığı veya 37°C de buhar veya gaz halinde geçen uçucu zehir, bu kapalı sistemde difüzyona uğrayarak iç odacıktaki çözücü içinde çözünerek sıvı fazına geçtiğinden, sistemde bozulan buhar basıncı dengesinin sağlanması için biyolojik materyaldeki uçucu zehir bitinceye kadar, buharlaşma, difüzyon ve iç odacıktaki absorpsiyon olayı devam eder. Böylece biyolojik maddedeki uçucu bileşiğin saf bir çözücü içine aktarılması yani izole edilmesi mümkün olur. İç odacığa ilâve edilen uygun bir reaktifte (reactant) uçucu bileşiğin tanınması burada yapılabildiği gibi, uçucu maddeyi çözmüş bulunan iç odadaki çözeltiyi mikro bir tüpe alarak, kalitatif ve kantitatif analizlerini yapmak mümkündür.

Bu tekniği ilk defa Conway, biyolojik materyalde amonyak tayini için geliştirmiştir. Bu nedenle apareye «Conway mikrodifüzyon cihazı» adı verilmiştir.

Deneyin yapılışı : Şekil 3'te görüldüğü gibi Conway mikrodifüzyon apareyi petri kutusuna benzeyen cam veya porselen iki odacıktan bir de dışa sızıntı vermeyen kenarları traşlı bir kapaktan meydana gelmiştir. Genel olarak cihazla aşağıdaki şekilde çalışılır :

a) Conway mikrodifüzyon cihazının dış odacığına, uçucu zehir aranacak biyolojik materyal ilâve edilir. Genellikle 2-4 g kan, idrar veya ezilmiş organ numunesi konur. Aynı yere uçucu zehiri serbest hale geçirecek reaktiften 1 ml ilâve edilir.

b) İç odacığa ise bu uçucu zehiri absorbe edecek ve renk reaksiyonu verecek olan reaktiflerden 2 şer ml ilâve edilir.

c) Bu işlemlerde sonra apareyin ağzı derhal kapatılır ve difüzyon için bekletilir. Genellikle kan ile çalışırken oda sıcaklığında 2 saat, dokularla çalışırken 37°C de 3 saat beklemek yeterlidir.

Tablo IV de, çeşitli uçucu zehirlerin Conway mikrodifüzyon cihazı ile aranmasında kullanılan reaktifler gösterilmiştir.

Tablo III — Conway mikrodifüzyon apareyinde uçucu zehirlerin aranmaları

Aranacak zehir	DIŞ ODACIK	İÇ ODACIK	
	Zehiri açığa çıkarmak için kullanılan reaktif	absorban reaktif	Renk reaktifi ve sonuç
CO	% 10 H ₂ SO ₄	—	PdCl ₂ ———> siyah
Siyanür	% 10 H ₂ SO ₄	% 10 NaOH	FeSO ₄ + HCl ———> mavi çökelek
Klorluhidrokarbonlar	—	1 ml saf toluen	1 ml % 30 NaOH + ml saf piridin ———> kırmızı
Alkoller (etil, metil, izopropil)	Doymuş Na ₂ CO ₃	—	Ansties reaktifi ———> Yeşil
Metil alkol	» »	H ₂ SO ₄	Kromotropik asit ———> (viyole)
Fenoller	% 10 H ₂ SO ₄	% 10 NaOH	Folinfenol reaktifi ———> mavi
Fosfür	Doymuş Na ₂ CO ₃	HNO ₃	AgNO ₃ % 5 ———> Kahverengi çökelek
Sülfür	% 10 H ₂ SO ₄	% 10 NaOH	% 10 Cd asetat ———> sarı çökelek

III. Uçucu olmayan organik zehirlerin biyolojik materyalden ayrılması ve aranması için kullanılan teknik.

Bugün gerek farmasötik (tıbbi) ilaçlar ve gerekse diğer toksik maddelerin çoğu (% 90 ı hemen hemen) uçucu olmayan organik zehirler grubuna girer. Bu nedenle bütün bu bileşiklerin tek bir işlemle biyolojik maddeden izolasyonu mümkün olmaz.

Uçucu olmayan organik zehirlerin izolasyon tekniği başlıca 2 kademede uygulanır.

Birinci aşamada biyolojik maddeden sulu ekstrakt elde edilir. İkinci safhada ise çeşitli ekstraksiyon koşullarına göre bu sulu faz fraksiyonlara ayrılır. Böylece uçucu olmayan organik zehirler kuvvetli asit, zayıf asit, nötral, bazik, ve amfoter maddeler olmak üzere tekrar 5 alt sınıfa ayrılmış olur.

1. Biyolojik materyalden sulu fazın hazırlanması

(Birinci kadame) :--

Sulu fazın hazırlanması için kullanılan toksikolojik yöntemlerin çoğunun dayandığı prensip, biyolojik maddenin ihtiva ettiği protein, lipit, selüloz, boya gibi maddeleri uygun çözücü ve işlemlerle uzaklaştırmağa dayanmaktadır.

Bu amaçla kullanılan yöntemlerin en eskisi ilk kez Stas (1850) tarafından uygulanan ve sonra Otto tarafından modifiye edilen Stas-Otto yöntemidir. Klasik bir yöntem olan Stas-Otto tekniği ile alkaloidlerin (ilk defa bu amaçla kullanılmıştı) ve diğer organik zehirlerin dokulardan izolasyonu uzun ve yorucu bir çalıştırma gerektirdiği ve ayrıca yabancı maddelerin tamamen uzaklaştırılmaması nedeniyle daha sonraki araştırmacılar tarafından modifiye edilmiştir. Bu tekniklerde, çeşitli organik zehirlerin asit veya kalevi ortamdaki çözünürlükleri ile birlikte selektif çözünürlükleri de göz önünde tutulmuştur.

Stas-Otto-Ogier, Feldstein- Klendshoj, Umberger, Daubney- Nickolls'un yöntemleri bu görüşe göre geliştirilmiştir.

Aşağıdaki uygulama alanı geniş ve yüz yıldan fazla bir zamandan beri kullanılmakta olan modifiye Stas Otto tekniği açıklanmıştır.

Modifiye Stas-Otto yöntemi :

200 g dondurulmuş ve kıyılmış doku tartarik asitle asitlendirilir, 400 ml etil alkol ile blenderde homojenize edilir. Karışım su banyosunda bir saat bekletilir. Isıya dayanıksız alkaloidler olma ihtimali varsa, sıcaklık 60°C altında tutulmalıdır. Daha iyisi karışım bir gece bekletilmelidir. (Doku+etil alkol) karışımı soğutularak süzülür. Aynı işlem bir kere daha kalıntıya etil alkol ilâve edilerek tekrar edilir. Geniş ağızlı bir kapsül içinde birleştirilen süzüntüler hafif sıcak hava akımında su banyosu üzerinde uçurulur (vakumda distilasyon tercih edilir). 100 ml sıcak etanol ilâvesiyle şurup kıvamında bir çözelti elde edilir. 100 ml sıcak etil alkol, küçük porsiyonlar halinde ilâve edilerek karıştırılır. Elde edilen ekstrakt dekante edilir. Sonuçta granül halde kuru bir kalıntı kalır. Eğer kalıntı halen yapışkan görünümde ise o zaman sıcak alkolle aynı işleme devam edilir. Dekante edilen süzüntüler birleştirilerek uçurulur. Elde edilen bu kalıntılar bir kaç damla sülfirik asitle asitlendirilmiş 100 ml su ile ekstrakte edilir ve mümkünse bir gece bekletilir. Aksi halde bir erlenmeyer içinde asitli su ile 1 saat çalkalanır. Eğer bakiye yağlı ise sulu ekstrakt dekante edildikten sonra 100 ml asitli su ile ekstraksiyon tekrarlanır. İki ekstrakt soğutulduktan sonra birleştirilir ve süzülür (pilili Whatman No 1 kağıdı). Böylece elde edilen süzüntü ikinci kademedeki fraksiyonlu ekstraksiyon için hazırlanmış olur.

2) Sulu fazın ekstraksiyonu (ikinci kademe) :

Bilindiği gibi ekstraksiyon sulu fazda çözünmüş bir maddenin, su ile karışmayan organik bir çözücüyle çalkalayarak bu organik faza geçirilmesi işlemidir. Sulu fazda çözünmüş bir çok maddeler içinden, uygun ortam ve çözücü seçimiyle arayacağımız organik zehiri organik faza alarak saflandırmak mümkün olur. Biyolojik materyalden ön işlemlerle (Stas-Otto veya modifiye metodları) elde edilen ekstrakt veya kan, idrar gibi sıvılardan ekstraksiyonla organik zehirler ayrılabilir. Prensipte olarak, iyonize halde olmayan organik maddeler, organik çözücü fazına geçirilebilirler. Bu nedenle uçucu olmayan organik zehirlerin ekstraksiyonunda 2 faktör rol oynar.

a) Organik maddelerin kimyasal yapısı (asit, baz, nötral veya amfoter özelliği)

b) İyonlaşmamış halde olan organik maddenin, organik çözücüde çözünebilme özelliği.

Çözücü olarak en çok eter veya kloroform kullanılır. Bunun dışında etil asetat, izopropil alkol, bütil alkol, petrol eteri, benzen, sikloheksan da şartlara göre kullanılabilir.

Sulu fazda bir maddenin iyonlaşma derecesi, o maddenin kimyasal yapısına bağlı olarak pH'a göre değişir. Buna göre asit karakterdeki maddeler asit ortamda, kalevi yapıdaki maddeler ise alkali ortamda serbest organik molekül (iyonlaşmamış) halinde bulunurlar (1 ve 2 nolu denklemler)



Nötral maddeler ise asit veya kalevi ortamda organik faza geçebilirler, çünkü her pH da çoğunlukla iyonlaşmamış şekildedirler.

3) Uçucu olmayan zehirlerin ekstraksiyon koşullarına göre sınıflandırılmaları:

Bu nedenle uçucu olmayan organik zehirleri, organik faza geçebildiği ekstraksiyon şartlarına göre 4 bölümde toplamak mümkündür.

a) Asit ortamda ekstrakte edilebilen zehirler :

Bu maddeler asitli sulu ortamdan (pH 2) eter veya kloroformla ekstrakte edilebilirler. Asit ortamdan organik çözücüye geçen organik maddeler kuvvetli asit, zayıf asit veya nötral özellikte olabilir. O halde bu grubu 3 alt sınıfta toplayabiliriz.

a₁) Kuvvetli asitler : Asitli ortamda eter veya kloroform fazına geçen bu maddeler, sulu sodyum bikarbonatla (NaHCO₃, pH 7.5) ile ekstrakte edilebilirler.

Asetil salisilik asit, p-amino benzoik asit, çinkofen (cinchophen) sitrik asit,, okzalik asit, sakkarin, salisilik asit, sulfisoksazol (sulfisoxazole) örnek verilebilir.

a₂) Zayıf asitler : Bu grup maddeler ise, eter veya kloroform fazından daha kuvvetli kalevi ortamda (NaOH li ortamda) sulu faza geçerler. NaHCO₃ çözeltisinde (pH 7.5) çözünmezler.

Barbitürat türevleri, kolşisin, kâfur, kantaridin, kloral hidrat, diğitoksin, difenilhidantoin, fenol ve türevleri, fenil butazon, pikrik asit, pikrotoksin, üreidler zayıf asitlerdendir.

a₃) Hidrofob nötral maddeler : Asit eterde çözünen maddeler NaOH veya NaHCO₃ lı sulu faza geçirildikten sonra eter veya kloroform fazında nötral maddeler kalır. Bunlar organik fazda çözünebilme özelliğinde olduklarından hidrofob nötral maddeler adını alırlar.

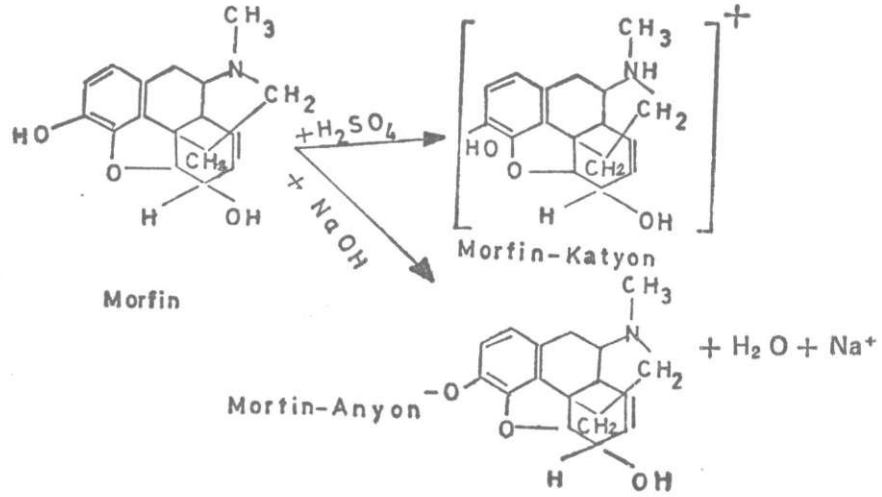
Asetanilid, asetofenetidin, amidopirin, antipirin, bromural, kafein, karbromal, klorobutanol, emetin, meprobamat fenil salisilat, santonin, teobromin, teofilin, trimetadion, uretan hidrofob özelliktedirler.

b) Kalevi ortamda seyreltik NaOH ile kalevilendirilmiş eter veya kloroforma geçen bileşikler :

Kalevi özellikte maddeleri içerirler. Bu nedenle bir çok al-alkaloidler ve sentetik azotlu bazlar bu gruba girerler.

Akonitin, adenin, N— allilnormorfin, aminopirin, amfetamin türevleri atropin, benadril, brusin, butamin, (çinkonin), kokain, koniin, meprobamat, metadon nikotin, niketamid, pamakin, pilokarpin, prokain, emetin, etil morfin, homatropin, hiyosiyamin, lobelin, meperidin, kinin, kinidin, skopolamin, solanin, spartein, striknin, tetrakain, veratrin, yohimbin örnek verilebilir.

c) Amonyaklı ortamda (zayıf kalevi ortamda) eter veya kloroformla ekstrakte edilebilen organik zehirler :



Amfoter özellikteki organik zehirler, ancak NH_3 lı ortamda kloroformla (etilasetat daha iyi bir çözücü) ekstrakte edilebilir. Formülde görüldüğü gibi, morfin amfoter yapıda bir alkaloid olduğu için kuvvetli asit veya bazik ortamda iyonize haldedir.

Tablo V
UÇUCU OLMAYAN ORGANİK ZEHİRLERİN
EKSTRAKSİYON ŞEMASI

1. Kademe

Direkt ekstraksiyon idrar, kan, mide yıkantısı bira, mineral, toz, tablet v.s.

Sıvı nümune asitlendirilir. Katı nünuneler asitli su ile ekstrakte edilir.

veya

Protein çöktürmesi, (idrar, kan, mide içeriği, besin, süt, çay, doku v.s.)

- a) Stas - Otto b) Sodyum tungstat
c) Amonyum sülfat veya
d) Asit dijestiyonla berrak süzüntü hazırlanır.



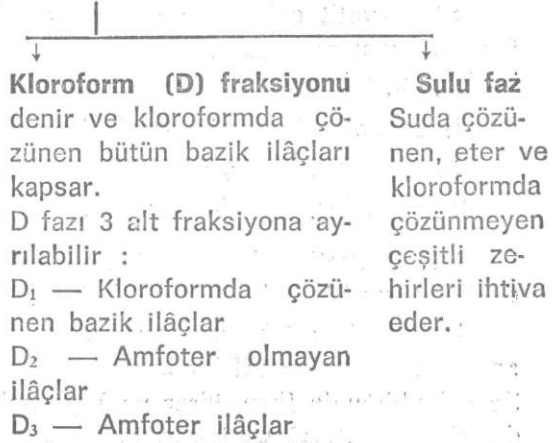
2. Kademe

Eter (A) fraksiyonu. Buna «Asit eter» ekstraktı denir ve eterde çözünen bütün asidik ve nötral ilaçları kapsar.

Sulu faz
Amonyum hidroksitle kalemilendirilir ve $CHCl_3$ ile ekstrakte edilir.

A fazı 3 alt guruba ayrılabilir :

- A_1 — Kuvvetli asitler.
 A_2 — Zayıf asit veya fenolikler
 C — Nötral ilaçlar.



Fakat zayıf alkali ortamda (kalevi ortamda ekstraksiyon yapıldıktan sonra sulu faz önce HCl ile hafif asitlendirilir ve müteakiben NH₃ ile zayıf kalevilendirilir) kloroform fazına geçebilir. Bu gruba morfinden başka :

Apomorfin, kodein, kurarin, digalen, digitalin, dromoran, öykain (eucain), heroin, hidrastin, metapon, prokain amid gibi amfoter bileşikler örnek verilebilir.

d) Yukarıdaki şartlarda organik çözücüyle ekstrakte edilemeyen bileşikler :

Bunlar : d₁) Kuvvetli asit veya baz şeklinde veya d₂) hidrofil nötral bileşiklerdir. Örnek olarak kvaterner amonyum bileşikleri (setil trimetil amonyum bromür gibi) gösterilebilir.

Tablo V de, yukarıdaki prensibe uymakla beraber, pratikteki uygulama şekline göre bazı değişiklikler gösteren ekstraksiyon şeması verilmiştir. Burada tam ayrıntı (çözücü hacmi, pH gibi) bildirilmemiştir. Bu şema bilinmeyen bir organik zehir aranmasına göre düzenlenmiştir ve yukarıdaki ayrıntılar analizi yapılacak örneğe göre değişmektedir.

4) Ekstraksiyon işleminde dikkat edilecek noktalar :

Kan, idrar, kusmuk veya diğer vücut sıvılarını asit veya sıvı ortamda eter, kloroform gibi organik çözücülerle ekstrakte ederken bazı güçlüklerle karşılaşılabilir.

Örneğin :

a) Kuvvetli çalkalama sonucu emülsiyon meydana gelebilir ve faz ayrılması gecikebilir. Bu durumda aşağıdaki işlemlerden bir veya bir kaçını uygulanır.

- i) Organik çözücünün sıcaklığı yükseltilir.
- ii) Karışıma birkaç damla alkol ilâve edilir.
- iii) Sulu faz, yemek tuzu (NaCl) ile doyurulur.

iv) Kuvvetli yüksek devirle santrifüj edilir veya ayırma hunisindeki karışım kendi halinde bekletilir (genellikle bir gece).

b) Toz ilâç, tablet, hap veya drajelerle çalışılırken ekstraksiyon sonunda genellikle saf bir kalıntı elde edilir. Fakat biyolojik materyal ile çalışıldığında (kan, idrar v.s.) çoğunlukla ekstrakt yabancı maddeleri (impurities) de içerir. Böyle bir durum olduğunda:

i) Şüpheli zehir, ekstraktın küçük bir bölümünde ve bareberinde kontrol nümune uygulanarak aranır (örneğin saf biyolojik materyal ile paralel çalışma yapılır: blank).

ii) Ekstraksiyon işlemi tekrarlanır veya selektif çözücüyle ekstrakte edilir.

iii) Kalıntı az bir ısıda ve düşük basınçta süblimleştirilir.

5) Ekstraksiyon için kullanılan apareyler ve selektif (seçici)

Ekstraksiyon :

Çok kez sulu bir fazın içinde çözünen bir maddeyi organik çözücüyle bir kere çalkalamak yerine, daha az hacimde bir kaç kere çalkalamakla (ekstrakte etmekle) daha iyi sonuç alınır. Şöyle ki: Birbiriy-le karışmayan iki çözücü içinde, çözünen bir maddenin, belli bir sıcaklıkta çözünürlüğe bağlı olarak bu iki fazdaki dağılımı, yani konsantrasyonları arasındaki oran sabittir (Nernst dağılım kanunu). C_1 ekstrakte edilen maddenin birinci çözücüdeki konsantrasyonu (mol/litre), C_2 ise aynı maddenin ikinci çözücüdeki konsantrasyonu ise (mol/litre), bu kanun:

$$C_1/C_2 = \text{dağılım kat sayısı} = K \text{ (sabit)}$$

şekilde matematiksel olarak ifade edilir. Ekstraksiyon işleminde amaç, bir çözücüdeki maddeyi ikinci bir seçici (yani o madde için daha iyi bir çözücü) içine geçirerek izole edebilmektir.

Bu nedenle sıvı-sıvı ekstraksiyon işleminden sonuç almak için iki özelliğin olması gerekir :

i) Ekstrakte edilecek maddenin seçici (selektif) çözücüdeki çözünürlüğü, çözünmüş bulunduğu birinci çözücü içindeki çözünürlüğünden çok daha iyi olmalıdır.

ii) Ekstraksiyon için kullanılan çözücü birinci çözücü ile karışmamalıdır.

Yukarıdaki matematiksel ifadeden anlaşılacağı üzere, ekstraksiyon, işleminde selektif çözücü ile bir kere çalkalamak yerine daha az çözücü ile bir çok kere ekstrakte etme ile verim daha iyi olur.

Ayırma Hunileri :

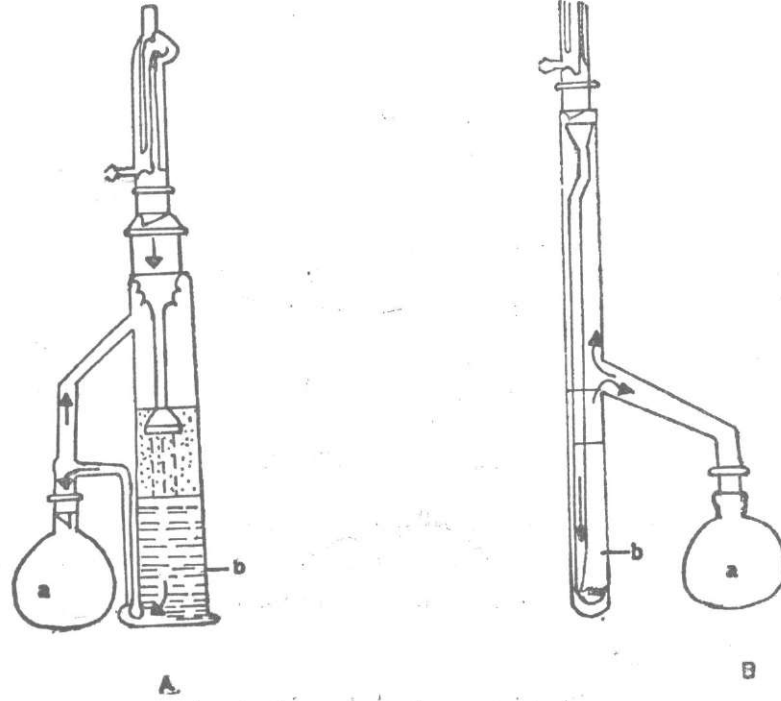
Yukarıdaki özellikleri uygulamak için kullanılan en basit ekstraksiyon işlemi ayırma hunileri ile yapılabilir. Ayırma hunileri birbiri-

le karışmayan ve spesifik ağırlıkları birbirinden farklı fazların ayrılması için uygun bir cam ayardır. Her defasında ekstrakte edilen fazı ayırarak, yerine yeni saf çözücü ilâvesiyle ekstraksiyon işleminin tekrarlanması (repeated extraction) sağlanmış olur.

Devamlı ekstraksiyonu sağlayan ayarder (Continous extractors) :

Organik maddenin sudaki çözünürlüğü eter veya diğer organik çözücülerdeki çözünürlüğünden daha fazla olabilir. Bu durumda bir çok kez ekstrakte etmek yeterli olmaz. Yani organik maddeyi tamamen sulu fazdan ayırmak imkânsız olur. Kesiksiz (continous) çalışan ekstraksiyon ayarderi bu amaçla geliştirilmiştir.

Şekil 4 te iki tip ekstraktör görülmektedir. Burada genel prensip, ekstrakte edilen madde bir distilasyon balonu veya erlen içinde top-



Şekil : 4 Devamlı Çalışan ekstraksiyon ayarderi

lanır (a). Buradan distillenen ekstraksiyon çözücüsü tekrar karışımı içeren bölüme (b) geçer. Böylece devamlı ekstraksiyon sağlanmış olur.

Şekil 4 A, sudan ağır organik çözücülerle, şekil 4 B ise sudan daha hafif çözücülerle yapılan kesiksiz ekstraksiyon için kullanılır. B tipi apareyde, ekstraksiyonun meydana geldiği bölümde (b) uzun bir iç boru vardır. Yoğunlaşan sudan hafif olan çözücü bu boru ile aşağıda toplanır, sonra da (a) distilasyon balonuna geçer.

Sıvı - sıvı kesiksiz çalışma ekstraksiyon apareyleri az miktarda çözücülerle çalışma imkânı nedeniyle ekonomiktir. Ancak ısıtma gerekli olduğundan, ekstraksiyon sırasında maddenin bozulması gibi sakıncası vardır.

Soxhlet ekstraksiyon apareyi :

Katı maddelerin ekstraksiyonu için kullanılır (Şekil 5). Kartuş içine konulan maddenin ağız porselen bir süzgeç veya pamukla kapatılır. Böylece distillenen ekstraksiyon çözeltisi soğutucudan geri damlarken toz maddenin dağılmaması sağlanır. Organik katı maddelerin seçici bir çözücüyle devamlı ekstraksiyonu Soxhlet tipi ekstraksiyon apareyi ile gerçekleştirilir.



Şekil : 5 Soxhlet ekstraksiyon apareyi

Uçucu olmayan organik zehirlerin ekstraksiyonundan sonra yapılan işlemler : .

a) Saflaştırma :

Organik zehirler, biyolojik materyalden izole edilip ekstraksiyonla alt fazlar ayrıldıktan sonra, gereğinde daha ileri safılaştırma gerektiren yöntemler uygulanır. Toksikolojide kullanılan başlıca teknikler :

Kurşun asetat çözeltisiyle saflandırma :

Asit ortamda ekstraksiyon fazına uygulanır. Seyreltik kurşun asetatla asit eter ekstraksiyonu çalkalandığında biyolojik materyalden geçmiş olan yabancı maddelerin (renkli maddeler) sulu faza geçmesi sağlanır. Örneğin idrardan barbitüratların ekstraksiyonundan sonra uygulanan bir işlemdir.

Kalp glikozitlerinin bu işlemle saflandırılması için önce asit-eter ekstraktı uçurulur. Kalıntı % 95 lik etil alkolde çözülür. Seyreltik kurşun asetat çözeltisi az az ilâve edilir, 15 dakika bekletildikten sonra süzülür ve santrifüj edilir. Kurşun iyonunun fazlası sodyum sülfat ile çöktürüldükten sonra tekrar santrifüj edilir. Alkollü çözelti buharlaştırılır ve kalıntı eterde çözünür.

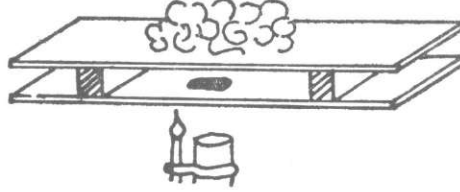
Hayvan kömürü ile saflandırma :

Bir çok organik zehirlerin saflandırılmasında, aktif kömürle saflandırma işlemi yapılır. Bunun için ya aktif hayvansal kömürü ihtiva eden kolondan ekstrakt geçirilir veya ekstrakta ilâve edilerek çalkalanır. Bir müddet sonra da süzülür.

Süblimasyon :

Katı bir maddenin, buharlarının soğutulması sırasında sıvı fazı atlayarak doğrudan doğruya kristal haline geçmesine «süblimasyon» denir. Süblimleşen bir organik zehiri, düşük baskı altında süblimasyona tâbi tutarak ekstredeki karışımlardan ayırmak ve saflandırmak mümkün olur

Süblimasyon basit olarak şöyle yapılabilir: Eşit büyüklükte iki saat camı alınır ve çukur yüzleri içte olacak şekilde kapatılır .Alttaki



Şekil : 6 Süblimasyon tekniği

saat camına süblimleştirilecek ekstre (kalıntı) madde konur. Bunun üzerine camdan daha büyük yuvarlak bir filtre kağıdı konur. Bu kağıdın ortasına iğne ile birkaç delik açılmıştır. İkinci saat camı dış büyük kısmı üstte olmak üzere üstüne kapatılır. Alttaki saat camı küçük alevle ısıtılan bir kum banyosuna oturtulur. Bu sırada buhar haline geçen madde üst saat camının iç yüzeyinde kristallenir. (süblime olur) üst saat camı ıslatılmış gazlı bez, süzgeç kâğıdı veya pamukla soğutulmalıdır.

Yüksek derecede süblimleşen maddeler için düşük baskıda çalışan süblimasyon cihazları kullanılır. Bu maksatla geliştirilmiş Umberger vakum mikro-süblimasyon cihazı örnek verilebilir.

Organik zehirlerden barbitüratlar, benzoik asit, salisilik asit klorobutanol, kafein teobromin, fenasetin, piramidon gibi bir çok maddeler süblimasyonla saflandırılır.

Süblimleşen maddenin süblimasyon derecesinin tayini ve kristal şeklinin mikroskopik incelenmesiyle tanınması da mümkün olur. İlk defa 1931 de ve **L. Kofler** ve **arkadaşlarının** hazırladığı daha sonra **Dr. Boetius** tarafından geliştirilen «Mikroheiztisch» cihazı ile 0.1 mg kadar az maddenin süblimasyon veya erime dereceleri tayini ve mikroskopik kristal incelenmesi yapılmaktadır. Ayrıca lâmdaki kristallere mikrokimyasal reaksiyonların uygulanması ile identifikasyonları da mümkün olmaktadır.

Kromatografi :

Kromatografik yöntem uygulama alanı çok geniş olan bir tekniktir. Kimyasal maddelerin saflandırılması, tanınması ve miktar tayini için kullanılır. Kromatografi hakkında daha ayrıntılı bilgi, fizikokimyasal teknikler - bölümünde verilecektir.

b) Uçurma :

Ekstraksiyon ve saflandırma işleminden sonra ekstraksiyon çözeltili uçurularak kimyasal analize hazırlanır.

Az miktarda çözücülerin uçurulması benzeri üzerinde yapılabilir. Çok miktarda ekstraksiyon çözeltileri ise bir distilasyon aпараты ile uçurulabilir.

Toksikolojide genel olarak az miktarda hacimlerle çalışıldığından mikro distilasyon aпараты ve benzeri aпаратыlardan yararlanır. Sıcakta bozulan maddeler için vakumla çalışan buharlaştırıcılar (vakum evaporatörü) kullanılır.

Havada bozulan maddeler ise azot gibi inert bir gaz akımında uçurulur.

c. Tanıma :

Kimyasal reaksiyona dayanan deneyler

Kimyasal reaksiyonlarla organik bir zehirin tanınmasında, uçucu zehirler bölümünde de görüldüğü gibi o maddenin diğer bir kimyasal madde (reaktif) ile reaksiyona girerek meydana gelen yeni bileşiğin karakteristik koku, renk veya çökelti durumunun incelenmesinden yararlanır. O halde kimyasal yöntemde koku, renk ve çöktürme reaktifleri kullanılır. Burada da organik bileşikler önce **fonksiyonel grup** ve sonra **özel deneyleri** ile aranır.

Koku reaksiyonları :

Bazı organik bileşikler uygun belirteçlerle reaksiyona girdiğinde kendine özgü kokusu olan bileşikler meydana getirirler ve böylece tanınırlar. Örneğin, anilin ve hidrolizle anilin veren uçucu olmayan bileşiklerin kalemli ortamda klorlu hidrokarbonlarla izonitril vermesi, iyodoform deneyi, kakodil, deneyi (As tanınmasında kullanılır), nitrobenzen deneyi, metil salisilat deneyi sayılabilir.

Renk reaksiyonları :

En çok kullanılan kimyasal reaksiyonlardır. Toksikolojide renk deneyleri-mikrotest-şeklinde uygulanır. Buna **damla deneyi** (spot test) denilebilir. Bu teknik şöyle uygulanır: Bir damla analizi yapılacak çözelti mikrotüp veya küçük bir saat camına damlatılır. Uygun reaktiften de bir damla ilâve edilerek reaksiyon koşulları sağlanır (ısı ve pH gibi). Meydana gelen karışımın karakteristik rengine göre tanıma yapılır.

Mikroteknikle renk reaksiyonlarından hem organik ve hem de metalik zehirlerin tanınmasında yararlanılmaktadır. Toksikolojide en çok alkaloidlerin tanınması ve birbirinden ayrılmasında bu teknik kullanılır. Bu prensibe dayanarak, klasik bir yöntem olan Bamford tekniği ile alkaloidler gurup renk reaktifine göre 7 sınıfa ayrılarak tanımlanırlar. Her gruptaki alkaloidler ise özel renk reaktifleri ile birbirinden ayrılabilirler.

Çöktürme reaksiyonu :

Kimyasal bir maddenin aranmasında çökme deneylerinden de yararlanır. Bir maddenin diğer bir madde ile reaksiyona girmesi sonucu teşekkül eden kimyasal bileşik çökelti halinde olabilir. Meydana gelen çökelti karakteristik rengi ve erime noktası tayinine göre tanınarak, asıl maddenin teşhisini mümkün kılar. Çöktürme deneyleri de renk deneylerinde açıklandığı şekilde -damla deneyi: mikro test- şeklinde uygulanabilir.

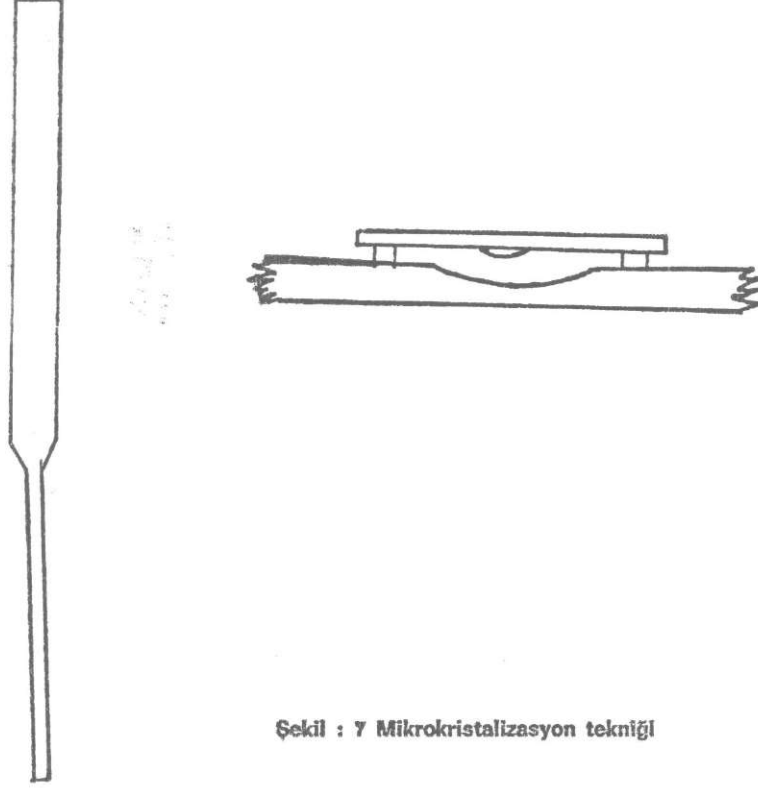
Mikrokristalizasyon ve optik kristallografi :

Mikrokristalizasyon genel bir tekniktir. Mikrokimyasal bir metod olup, çok az miktardaki bir maddenin uygun bir reaktifle verdiği kristal şeklinin mikroskopla incelenmesine dayanır.

Mikrokristal testleri, kimyasal çöktürme deneylerinin hayli ilerlemiş bir uygulamasıdır.

Normal mikroskop dışında, polarizasyon mikroskobu çeşitli kristallerin birbirinden ayırt edilmesi için kullanılmaktadır.

Organik kimyada, mikrokristalizasyon bilhassa azotlu bileşikler için kullanılmaktadır. Başlangıçta-yüzyıllar öncesi alkaloidlere tatbik edilen bu yöntem, bugün antihistaminikler, sentetik narkotikler ve benzeri bileşikler ve diğer ilâçlar için de kullanılmaktadır.



Şekil : 7 Mikrokrizalizasyon tekniği

Teknik (Şekil 7)

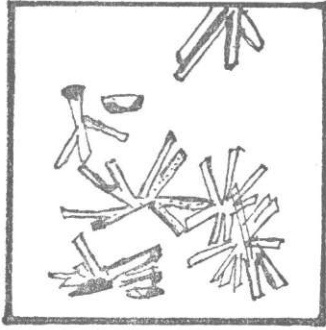
Bir damla nümune çözeltilisine bir damla çöktürme reaktifi ilâve edilerek karıştırılır. Kristal teşekkülü için gerekli bir zaman bekltilir. Karışımından bir damla alınır ve mikroskop lâmininin çukur kısmına konarak mikroskopla incelenir. Meydana gelen kristal şekline göre kimyasal maddenin tanımı yapılabilir. (Şekil 8) de çeşitli kristal tipleri görölmektedir.



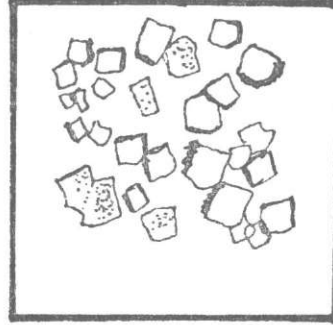
iğne



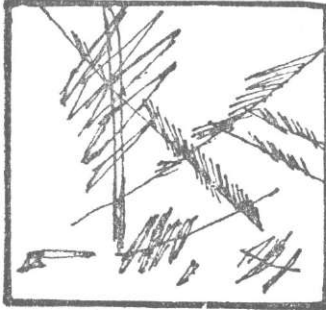
Yaprak



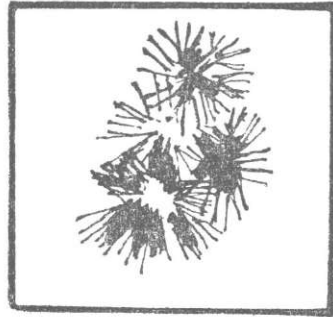
Çubuk



İnce Levha



Tarak



Rozet

Mikrokristalizasyon metodu ile mikrogram ve daha düşük miktardaki maddeleri tanımak mümkündür.

Alkaloidlerin tanınmasında, alkaloidlerle renkli çökelti veren reaktifler kullanılır. Örneğin: Pikrik asit, kloroplatinik asit, fosfomolibdik asit gibi.

Optik kristallografi ise polarizasyon mikroskobu ile kristallerin «optik kristalografik» özelliklerini tesbit ederek maddelerin tanınmasını ve miktar tayinlerini mümkün kılan bir tekniktir. Saydam (transparent) her ilâç kristalinin kendine özgü bu optik özellikleri (örneğin; ekstinksiyon, kırılma indisi gibi) polarizasyon mikroskobu ile saptanır. Elde edilen bu fizik konstantları (sabiteleri) ile ilgili tablolarla karşılaştırılır.

Optik kristallografi, kristal halindeki ilâçlara (antibiyotikler, barbitüratlar, semptomimetik aminler, sulfonamidler ve antihistaminiklere doğrudan doğruya tatbik edilebilir. Bu nedenle aynı apareyin (polarizasyon mikroskobu) kullanılması bakımından mikrokristalizasyona bir derece yakındır, ancak mikrokristalizasyon bir kimyasal yöntemdir. Optik kristallografi ise kimyasal madde kristallerinin optik özelliklerine dayanan fiziksel bir yöntemdir.

Mikrokristalizasyon tekniğinin spesifik (özel) uygulama yerleri:

Mikrokristalizasyon tekniği, bilinmeyen bir maddenin kat'i tanınması için uygulanır. Örneğin kromatografik veya spektrofotometrik analizlerle hangi gurup bir madde olduğu anlaşılan organik maddenin kesin olarak tanımlanmasında destekleyici bir deney niteliğinde (confirmatory test) kullanılır. Bunun dışında mikrokristalizasyonun iki özel kullanma yeri vardır :

a) Kimyasal yapıları birbirine çok yakın olup kromatografik veya spektrofotometrik taramada (screening) farkedilemeyen bileşiklerin tanınmasında, değerli bir tekniktir. Örneğin; fenmetrazin (phenmetrazin) ve fendimetrazinin (phendimetrazin) kağıt kromatografisi

ve ince tabaka kromatografisi ile aynı developman sistemi ile R_f değerleri birbirine çok yakındır. Ultraviyole spektrumları da birbirinden farklı değildir, ilâveten birbirinden farkedilecek bir renk reaksiyonu yoktur. Fakat mikrokristal teşekkülüne dayanan deneylerle birbirinden ayrılmaları mümkündür. Şöyle ki pikrolonik (picrolonic) asitle fennetrazin kesif (yoğun) rozet şeklinde, fendimetrazin ise iğne şeklinde kristaller verir.

b) Mikrokristalizasyonun kullanıldığı önemli bir yer de **optik izomerlerin** ayrılmasıdır. Eldeki madde miktarı yeter derecede olduğu zaman polarimetre bu amacı karşılar. Fakat mikrogram gibi çok az miktarlar için polarimetrik yöntem pratik değildir, ancak mikrokristalizasyon tekniği ile başarılabilir.

Bunu adli tıp yönünden çok önemli olan bir örnekle açıklayabiliriz.

Levafanol (levaphanol) (-) izomeri ve rasemorfan (racemorphan) razemik şekil olarak narkotik ilâçlar grubundadır ve uluslar arası bir kontrol altındadır. Halbuki dekstorfan (dextrophan) (+) izomer olarak analjezik veya alışkanlık yapan (addictive) bir ilâç değildir ve bu nedenle kontrolde değildir. Çok kez adli tıp amacıyla bu iki grup maddeyi ayırmak önemli bir iştir. Mikrokristalizasyon ile bu ayırma şöyle yapılır:

Madde 2N HCl de çözüldükten sonra Na_2CO_3 çözeltisi ile mikrodamlamaya deneyi uygulandığında, rasemorfan 1/2 saat içinde ince tabaka halinde kristal yığını verdiği halde, levorfan veya dekstorfan ile amorf bir çökelti meydana gelir (48 saat bekletildiği halde).

Diğer taraftan (+) ve (-) izomerler ise birbirinden mikrokristalizasyonla şu genel uygulamaya göre ayrılır: 2 N HCl asitlendirilmiş nümune Na_2CO_3 ile mikrokristal deneyi uygulanır. Mikroskopla incelendikten sonra eldeki bilinen aynı maddenin optik izomerinden bir damla daha ilâve edilir. Eğer numüne, bilinen nümune ile aynı

izomer tipinde ise (authentic). bu halde amorf çökelek değişmeyecektir. Fakat tersi ise, bu halde razemik şekil meydana geleceğinden amorf çökelti karakteristik kristal (ince levha) şekline dönüşecektir.

Bu genel bir tekniktir. Bir maddenin razem şekli ile kristal verdiği halde, (+) + veya (—) — izomeri ile amorf çökelek veren uygun bir reaktifle izomerlerinin ayrılması mümkün olur.

IV. Metalik zehirlerin biyolojik materyalden izolasyon ve tanımlarında kullanılan teknikler

1. Yıkılama :

Metalik zehirlerin biyolojik materyalden izolasyonlarındaki prensip, biyolojik materyalin ihtiva ettiği organik maddeleri tahrip etmek (yıkılmak) ve böylece bu yıkılama işlemine dayanıklı olan metallerin anorganik ortamda bulunmasını sağlamaktır.

Bu maksatla kullanılan metodları iki kısımda toplayabiliriz :

- a) Kuru külleştirme
- b) Sulu ortamda külleştirme (yaş külleştirme).

Her iki teknik için de çeşitli yöntemler kullanılır. Bunlardan önemli olanları sırası ile görelim.

a) Kuru külleştirme :

Burada prensip, biyolojik materyalin önce kurutulması ve sonra organik maddelerin 450°C civarında yakılarak tahribine dayanır. Bu metod Hg, As ve Sb dışında (çünkü bu metaller uçucudur) diğer bütün metallerin aranması için tatbik edilir.

Külleştirme çeşitli şekilde yapılabilir :

a₁) Basit külleştirme: Burada genel teknik 50-100 g kadar kıyılmış doku, 100-1000 ml idrar veya 20-100 ml kan önce yavaş ya-

vaş 110°C de kurutulur. Kuru nümune bir fırına konarak yavaş yavaş 450°C ye kadar ısıtılır. Uçucu bileşikler kaybolup gri beyaz bir kül elde edilinceye kadar bekletilir. Genellikle 5-6 st gerekir.

Elde edilen kül, mineral asitlerden birinde (HCl) çözünerek kalitatif ve kantitatif analiz için uygun hale getirilir. Bu metodla Hg, As, Sb ve kısmen Pb uçar. Bu sebeple bu metallerin aranması için kullanılmaz.

a₂) O₂ altında kül etme ve uçucu mineral bileşiklerinin toplanması. Fakat bu teknik pratikte kullanılmaz.

a₃) Kimyasal bir madde mevcudiyetinde kül etme :

Bu metotla, biyolojik materyale kireç, manyezi, (manyezi + KNO₃) gibi kimyasal maddeler ilâve edilerek yakılır. Yanma esnasında bu ilâve edilen kimyasal maddelerle karışımın yüzeyi genişler. Yanma kolaylaştığı gibi, külleşme de daha aşağı sıcaklıkta olur.

b) Yaş usulle külleştirme (yıkılama)

Bugün en çok kullanılan yıkılama metotları, sulu ortamda organik maddenin oksidan maddelerle parçalanmasına dayanır. Bu amaçla kullanılan metotları :

b₁) Klorla yıkılama

b₂) Asit ve asit karışımı ile yıkılama

b₃) Diğer oksitleyicilerle yıkılama (H₂O₂, kromil klorür gibi) olmak üzere inceleyebiliriz.

Burada uygulamada en çok kullanılan (H₂SO₄ + HNO₃ + HClO₄) asit karışımı ile yapılan yıkılama işlemi (asit dijestiyon) açıklanmıştır.

Üçlü asit karışımı ile yıkılama :

Prensip:

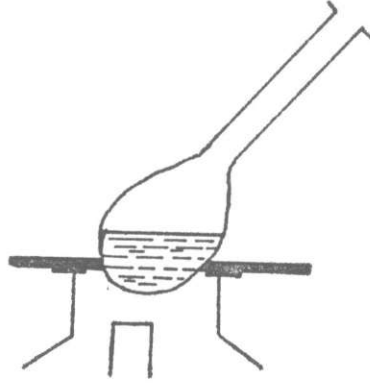
Asitle yıkılamada en çok H₂SO₄, HNO₃ ve HClO₄ (perklorik) asit ikili veya üçlü karışım halinde uygulanır. Asitlerden H₂SO₄ oksitleyici,

dehidrate edici (su çekme) ve azotlu organik maddeler için tutucu (azotu amonyum katyonu haline geçirir) olarak etkilier.

Nitrik asit ve perklorik asit ise kuvvetli oksidan özellikleri ile biyolojik maddenin parçalanmasını sağlarlar.

Teknik :

Yıkılama işlemi için ısıya dayanıklı armut şeklinde ve uzun boyunlu bir balon (Kjeldahl balonu, Şekil 9) kullanılır. Patlama olabilmesi



Şekil 9 — Kjeldahl balonunda yıkılama

nedeniyle işlem iyi çeker kapalı bir ocakta yapılmalıdır.

100 ml idrar veya 10 ml kan 600 ml lik bir Kjeldahl balonuna konur. Düzgün kaynaması için bir kaç cam boncuk, 150 ml konsantre HNO_3 ve 6 ml H_2SO_4 ilâve edilir. Karışım önce köpürmeyi engellemek için yavaş yavaş ısıtılır. Köpürme tehlikesi geçtikten sonra ısı yükseltilir ve hacim 50 ml ye ininceye kadar kaynatılır. Alevden uzaklaştırılır. 50 ml daha HNO_3 asit konur. Sonra çok dikkatle yavaş yavaş 5 ml perklorik asit (72 %) ilâve edilir. Tekrar balon karışımı berber bir çözelti haline gelinceye ve SO_3 dumanları çıkıncaya kadar ısıtılır. Bu duruma genellikle hacim 4 ml ye ininceye kadar devam edilir. (Bazen yıkılama tam olmaz. Bu halde birkaç ml daha HNO_3 ilâ-

vesi gerekebilir). SO_3 dumanları çıkınca birkaç dakika daha ısıtılır. Böylece HNO_3 tamamen uzaklaşmış olur. Balon soğutulur ve hacim 4 ml ve bu miktara çok yakınsa tam olarak distile su ile 40 ml ye seyreltilir. Böylece % 10 H_2SO_4 li bir ortam (asit dijestiyon) elde edilir. Bu çözeltide metalik zehirlerin aranması ve miktar tayinleri yapılır.

Dikkat edilecek noktalar :

a) Perklorik asit bazı koşullarda son derece patlayıcı bir asittir. Bu nedenle, yukarıdaki yıkılama işlemi bu konuda tecrübeli bir kimse tarafından uygulanmalıdır. Yıkılama uzaktan takip edilmelidir, ve kapalı bir çeker ocakta yapılmalıdır.

b) Kurşun aranması ve tayini yapılacaksa bu durumda, yıkılama işleminin son kademesindeki su ile seyreltme yapılmaz.

2. Metalik zehirlerin asit dijestiyonda aranması için kullanılan genel yöntemler :

Biyolojik maddenin yıkılanmasından sonra elde edilen asitli çözeltide metalik zehirler aşağıdaki sistematik analiz yöntemlerinden biri ile aranır. Bunlardan bir kısım, miktar tayini için de kullanılan tekniklerdir.

- a) Klasik sülfür yöntemi
- b) Mikrokristalizasyon
- c) Ring-oven tekniği
- d) Ditizonla ekstraksiyon yöntemi
- e) Spektrografik yöntem
- f) Kromatografik yöntemler (kağıt, ince tabaka, ion-exchange kromatografileri).

a) Klasik sülfür tekniği : Bu yöntem analitik kimyada etraflıca görüldüğünden burada üstünde durulmayacaktır.

Burada prensip : Katyonlar HCl , H_2S , $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ ve $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ ile çökme özelliklerine göre gruplaştırılırlar. Her guruptaki katyonlar uygun çöktürücü ayıraçlarla (reaktif) tekrar alt sınıflara ayrılarak her metal katyonunun kendi yerinde özel kimyasal reaksiyonlarla (renk ve çökelti ayıraçları ile) aranması mümkün olur.

Klasik sülfür yöntemi toksikolojide çok kullanılmaz. Ancak suikast veya intihar gibi zehirlenmelerde tek bir metalin yüksek konsantrasyonda bulunması halinde baş vurulan bir tekniktir.

b) Mikrokrizalizasyon : Mikrokrizalizasyon tekniği metalik zehirlerin tanınması için de kullanılan bir yöntemdir. Biyolojik materyal HCl ve perklorik asitle yıkandıktan sonra, dijestiyon klorlu su ile çalkalanır ve eterle ekstrakte edilir. Böylece talyum (Tl) varsa eter fazına geçer.

Diğer maddeler ise sulu fazın sistematik bir ekstraksiyon işlemine tabi tutulması ile başlıca üç grup halinde ayrılır. Her grubun tekrar uygun çözücülerle birbirinden ayrılmasından sonra her metal kendi yerinde özel kristal reaktifleri ile tanınır (Daha fazla bilgi için: Clinical Toxicology S: 549 - 554'e bakınız Lit no: 25)

c) Ring-oven tekniği :

Bu teknikle, bir damla nümune çözeltisi kullanılarak 35 metalin ayrılması ve tanınması mümkün olur.

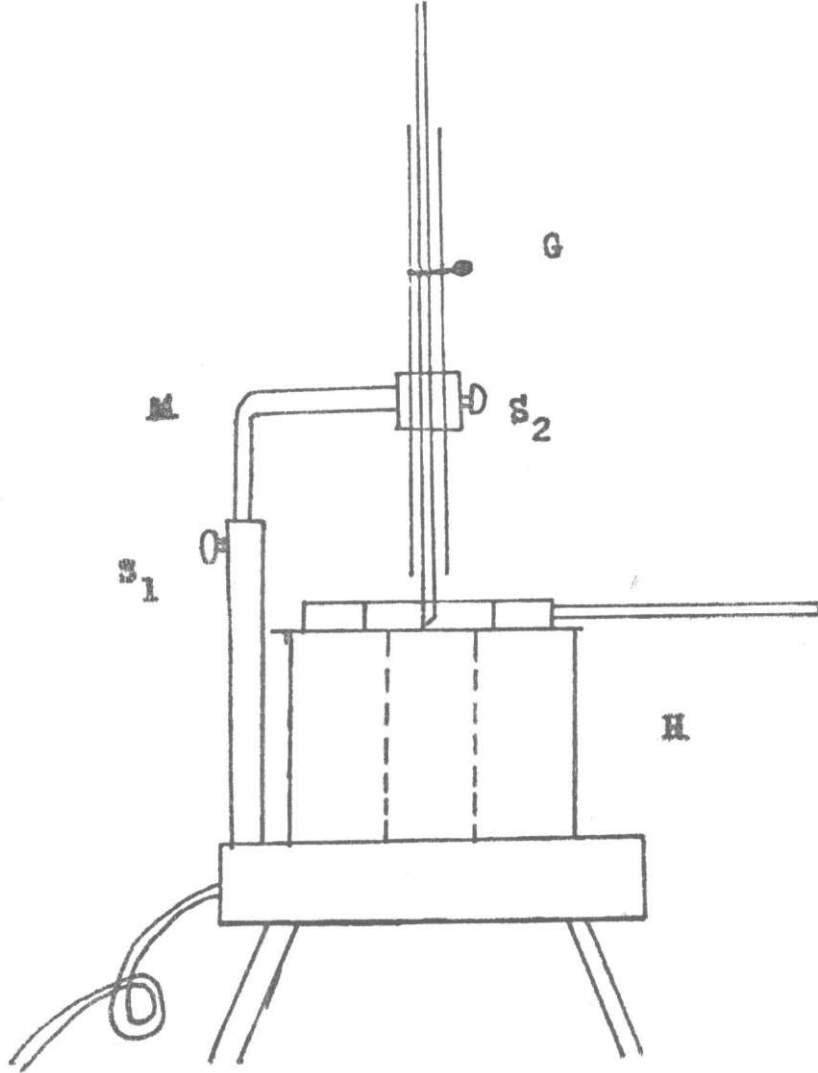
Prensip : Metaller biyolojik materyalden sistematik bir ekstraksiyon şemasına göre guruplandırılır. Her gurup, filtre kağında ve belirli bir sıcaklıkta zon şeklinde (ring-oven) kromatografik ayırmaya tabi tutulur. Her zondaki metal özel renk ayıraçları ile tanınır.

Aparey : Ring oven tekniği için özel bir aparey geliştirilmiştir (Şekil 10).

H, silindir şeklinde, 40 mm yükseklikte ve 70 mm çapta alüminyum silindir bir bloktur. İçinde 22 mm çapında bir boşluk (borhol) vardır. Blok sıcaklık derecesi kontrol edilebilen bir ısıtıcı üstüne oturtulmuştur. M, Alüminyum çubuğu ayarlı bir vida (S₁) ile silindire tespit edilmiştir. Çubuğun ucundaki 500 mm uzunlukta ve yüksekliği S₂ vidası ile kontrol edilebilen cam bir boru vardır (G). Bu boru içindeki kapiler, pipeti tutmağa yarar. Cam borunun bloktan yüksekliği 2-3 mm dir. İç çabı 30 mm olan alüminyum bir halka (ring) silindir üzerindeki filtre kaçını yerinde tutar. Silindir blokun sıcaklığı 80 - 115°C tutulur.

Uygulama : Ekstraksiyon şemasına göre doku ekstraktı ve uygun çözücü bir tüp veya mikrobeherde ekstrakte edilir. Organik faz (ilk ekstraksiyon metil izobütül ketonla yapılır) ring oven apareyinin ka-

piler pipeti yardımı ile, silindir üzerindeki filtre kağıdına absorbe olan leke 0.1 N HCl ile yıkanır. Bu sırada fırın sıcak olduğundan sıvı faz buharlaşır ve metal tuzları yoğunlaşır, (konsantre olur). HCl ile yıkama işlemi 5 - 10 kere yapıldığında metal iyonları bir taraftan kantitatif olarak yoğunlaşırken, diğer taraftan da belirli halkalar şeklinde



Şekil — 10 Ring oven aпараты

birbirinden ayrılır. Bu zonlar ayrı ayrı kesilerek, uygun renk reaksiyonları ile metallerin tanınmaları yapılır.

Sulu faz, şemaya göre organik çözücüyle (dietyl eter - amonyum tiosiyanat) ekstraksiyona tabi tutulur. Organik faza geçen metaller yukardaki gibi ring oven apareyinde zonlara ayrılır. Böylece bir seri ekstraksiyondan sonra her organik fazdaki metalin filtre kağıdı üzerinde ayrılması ve tanınması yapılmış olur.

d) Ditizonla ekstraksiyon :

(Ditizon ekstraksiyon metodu ile metalik zehirlerin aranmaları :)

Ditizon (difenil tiokarbazon) kloroform veya diğer organik çözücülerde (CCl₄ gibi) yeşil renk vererek organik fazda karakteristik renkle çözünürler. Ditizonla, renkli kompleks veren 14 metal bilinmektedir. Bu metallerin en önemlileri Hg⁺⁺, Cu⁺⁺, Bi⁺⁺⁺, Zn⁺⁺, Cd⁺⁺, Pb⁺⁺, Tl⁺, Ni⁺⁺⁺, As⁺⁺⁺ dür.

Ditizon, asit dijestiyonda metallerin aranması ve tayini için kullanılan (yani hem kalitatif ve hem de kantitatif) bir reaktiftir.

Adı geçen metallerin, belirli şartlarda kompleks tuz vermesine dayanarak her metalin selektif çözücü ekstraksiyonu ile ayrılması mümkün olmaktadır. **Strafford ve arkadaşları** tarafından geliştirilen ditizonla ekstraksiyon şemasına göre bu metallerin ayrılması, tanınması ve miktar tayinleri yapılabilmektedir.

Burada prensip : Tablo VI da görüldüğü gibi ekstrakte edilebilen katyonların, **pH ya göre**, değişmesine dayanmaktadır. Ayrıca ortama diğer uygun reaktiflerin ilâvesi ile spesifite artırılmaktadır.

Tablo VI - Ditizonla ekstrakte edilebilen katyonlar

pH (Sulu ortamın)	Ekstrakte edilen katyonlar
<2	Soy metaller ve Hg ⁺⁺
2 — 3	Cu ⁺⁺ , Bi ⁺⁺⁺ , Sn ⁺⁺
4 — 7	Zn ⁺⁺ , Cd ⁺⁺ , Pb ⁺⁺ , Tl ⁺ ve yukarıdaki metaller
7 — 10	Bütün metaller 0.04 N-NH ₃ ile yıkanır- sa Sn uzaklaştırılır. KCN ilâvesi ile Pb ⁺⁺ ayrılması sağlanır. Bi ⁺⁺⁺ önceden uzaklaştırılmamışsa ortamda kalır.

O halde pH değıştikçe ekstrakte edilebilen katyonların sayısı değişmektedir. Bazı reaktiflerle spesifiklik arttırılabilir. Örneğin: KCN ilâvesi, Pb⁺⁺ ve Tl⁺ dışındaki katyonları uzaklaştırılır. Zn ⁺⁺ — ve Cd⁺⁺ — ditizonatları ayırmak için ortama N-NaOH ilâve edilir. Bu takdirde Zn-ditizonat parçalanır, Cd-ditizonat ise CHCl₃ ile çalkalanarak ayrılır.

Ditizon-metal kompleksi, standartlarla karşılaştırılarak spektrofotometrik yöntemle kantitatif tayin için de kullanılabilir (özel bölüme bakınız).

e) Spektrografik yöntem :

Zehirlenmenin niteliği bilinmediğinde, doku ve vücut sıvılarında toksik metallerin aranmasında ve tanınmasında (detection and identification) en elverişli yöntem, spektrografik analizdir. Bu teknik, modern laboratuvarların kullandığı değerli bir tarama (screening) yöntemi olup, ayrıca metalik zehirlerin yarı kantitatif değerlendirmesi de mümkün olmaktadır.

Spektrograf, fiziko kimyasal analitik bir apareydir. Işık kaynağında (elektrik arkı) uyarılmış atomların emisyon spektrumunu kaydeden fotoğraf kamerası ile kombine edilmiş bir spektroskopdur. Bugün geliştirilmiş modern otomatik spektrografla bir metalin cins ve miktarı bir kaç dakikada saptanabilir. Metallerden başka fosfor, silisyum, arsenik, karbon, bor gibi ametal ve yarı metallerin de deteksiyonları yapılabilir.

Teknik : Biyolojik materyalde metalik zehirlerin spektrografik yöntemle aranması için yıkılama işleminin uygulanması gerekir. Reinsch deneyi ile bakır levha üzerinde toplanmış metallerin de tanınması yapılabilir. Analitik toksikolojide uygulanmak üzere, biyolojik maddede metal ve metalloidlerin analiz için geliştirilmiş yöntemler vardır.

Bunlardan **Geldmacher ve arkadaşlarının** (Lit no, 12) geliştirdiği teknikle, 1 g organ, 90-100 ml kan veya idrarda: 1 mikrogram (μg) Pb, Tl, Cd, Hg; 2.5 μg Bi; 5 μg , As, Zn; 10 μg Te 15 μg Sr tanınabilir.

Atomik Absorbsiyon spektrofotometresi (Atomic Absorption spectrophotometre).

Spektrografide, elementlerin emisyon spektrumundan yararlanır. Halbuki atomik absorbsiyon spektroskopisi ise, ışığa enerjisinin, gaz halindeki nötral atomlar tarafından absorbsiyonuna dayanan **bir teknikle çalışır. 1955 yılından sonra geliştirilen bu enstrümental teknikle 68 elementin kalitatif (nicel) ve kantitatif (nitel) analiz yapılabilmektedir. Duyarlık ve kesinlik bakımından üstün bir yöntem olup çoğunlukla 0.005 $\mu\text{g}/\text{ml}$ çözeltideki metalik zehirin tanınması yapılabilmektedir.**

f. Kromatografi

Metalik zehirlerin aranmasında kâğıt ve ince tabaka kromatografisi teknikleri kullanılmakla beraber, organik zehirler için olduğu kadar çok uygulanmamaktadır. Ancak son yıllarda metallerin sistematik olarak İ.T.K. ile analizlerine ait çalışmalara rastlanmaktadır. Bu konuda yapılan araştırmalarda (1970, **Miketuva ve Frei**) sonuçların 0.1-0.00 μg kadar duyar olduğu bildirilmektedir.

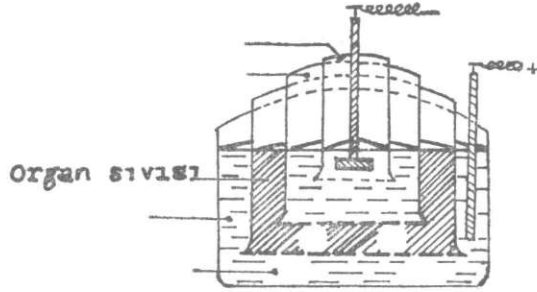
V. Toksik anyonların biyolojik materyalden izolasyonları ve tanımları :

Permanganat, bromür, iyodür, tiosiyanat, klorat, fosfat gibi toksik anyonların izolasyonları ile ilgili sistematik ekstraksiyon yöntemleri azdır. Genellikle bu tip anyonlarla zehirlenmeler, çok miktarda alındığında meydana gelmektedir. Bu nedenle de tanımları kolay olmaktadır. Doğrudan doğruya organ sıvıları süzütüsünde, inorganik analitik arama deneylerinin uygulanması yeterlidir.

Bunun dışında materyalin diyalizine dayanan sistematik bir yöntem de geliştirilmiştir.

1. Diyalizle ayırma :

Diyaliz, kristalloidleri kolloidlerden ayırmak için kullanılan bir tekniktir. Toksikolojide, mide suyunda anorganik anyonların ve bazı suda çözünen organik maddenin ayrılması için kullanılmaktadır.



Şekil : 11 — Diyalizle ayırma

Teknik: (Şekil 11) Diyaliz için kullanılan membran en basit olarak viskoz sosis veya sucuk zarından veya celloidin (Selloidin) den hazırlanır. Diyalizle uygulanacak biyolojik madde bu zar içine konur, Zarın ağzı bir sicim veya ince lâstikle bağlandıktan sonra, bir beher içine asılı olarak yerleştirilir. Anyonların veya diğer diyaliz olabilen maddenin beher içindeki suya geçmeleri için 5—6 saat beklenir. Sonra sulu kısım (diyalizat) sıcakta konsantre edilir. Elde edilen bu çözeltide difüze olabilen anyon, katyon veya suda çözünen organik maddeler uygun kimyasal reaksiyonlarla aranır.

VI. Özel olarak aranması gereken zehirlerin izolasyonları ve aranmaları

Daha önce açıklanan izolasyon teknikleri ile biyolojik materyalden ayıramayan zehirler bu gruba girer. Genellikle bu gruptaki bileşikler ya suda çok çözünen ve böylece hiç bir koşulda organik fazda ekstrakte olamayan ilâçlardır; veya suda hiç çözünmeyen maddelerdir. Örnek olarak borik asit, halojenler, organik asitler (okzalik asit, sitrik asit, sulfonik asit gibi), proteinler, glikozitler, lipitler, hormonlar, enzimler, antibiotikler ve insektisitler gösterilebilir.

Özellikle suda çözünenler için genel bir ekstraksiyon şeması yoktur. Gerek izolasyonları ve gerekse aranmaları için özel yöntemler uygulanır. Bu konu özel kısımda verilecek örneklerle daha iyi anlaşılabilir.

VII. Toksikolojide kullanılan önemli fizikokimyasal teknikler :

Biyolojik materyalden izole edilen zehirli maddelerin kalitatif ve kantitatif analizlerinde daha önce açıkladığımız kimyasal reaksiyonlara dayanan yöntemlerden başka, fizikokimyasal prensibe dayanan aletlerden (enstrümental analiz) de yararlanır. Bu teknikler, duyarlılık ve spesifiklik bakımından kimyasal yöntemlerden çok üstündür. Analitik kimyada kullanılan bütün teknik ve enstrümental yöntemler toksikolojide de kullanılmaktadır.

Bu yöntemlerin başlıcaları :

- 1) Kromatografi (sütun, kağıt, kolon, ince tabaka, gaz, iyon değiştirme kromatografileri).
- 2) Spektral analiz (emiyon spektrumu ve absorpsiyon spektrumuna dayanan teknikler: UV spektrofotometre, infrared spektrofotometresi, alev emiyon spektrofotometresi gibi).
- 3) X-ışını difraksiyon analizi,
- 4) Polarografik,
- 5) Polarimetrik,
- 6) Optik kristallografik,
- 7) Refraktometrik teknikleridir.

Burada hemen her toksikoloji laboratuvarında uygulanan veya bulunması gereken kromatografik (kâğıt ve İTK) yöntemle, ultraviyole spektrofotometresinin toksikolojide kullanılmalarından bahsedeceğiz.

1. Kromatografi :

Kromatografi çok az miktardaki ve kimyasal yapıları birbirine yakın kimyasal madde karışımlarının birbirinden ayrılmasında kullanılan bir tekniktir. Böylece mikrogram düzeyindeki bir maddeyi kromatografi yardımı ile karışımdan ayırmak (**izolasyon**), tanımak, konsantrasyonunu bulmak ve saflığını kontrol etmek mümkün olabilir.

Teknik olarak kromatografik yöntemler başlıca 4 çeşittir :

- a) Sütun kromatografisi
- b) Kâğıt kromatografisi
- c) İnce tabaka kromatografisi (İ.T.K.)
- d) Gaz kromatografisi.

3. Kâğıt Kromatografisinin toksikolojide uygulanması :

1) Kâğıt kromatografisi ilaç ve zehirlerin ayrılması ve tanınmasında kullanılan faydalı bir tekniktir. Her ne kadar İ.T.K. nin kısa zamanda sonuç vermesi, duyarlık ve bir çok hallerde daha iyi sonuç vermesi gibi üstünlükleri varsa da kâğıt kromatografisi, halen toksikolojide kullanılan bir tekniktir. Çünkü uygulama kolaylığı yanında, daha çok madde ile çalışma imkânı olduğundan, kromatogramların elüsyonunu müteakip UV, IR gibi spektrofotometrik yöntemlerle kesin tanımlanmaları için elverişlidir.

Gerek biyolojik materyalden ilk izolasyondan sonra, daha ileride bir **saflandırma** (cleaning) ve gerekse maddelerin diğer fizikokimyasal tekniklerle tanınması için ön işlem olarak uygulanan değerli bir yöntemdir. Duyarlık mikrograma kadar inebilir.

Kâğıt kromatografisi yukarı çıkan (ascending) aşağı inen (descending) tipte olabilir.

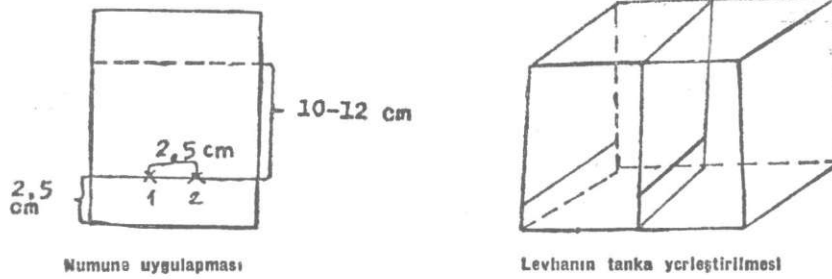
4) İnce Tabaka Kromatografisi :

İnce tabaka kromatografisinde, cam bir levha üzerine ince bir tabaka halinde ve homojen şekilde yayılan adsorban kullanılır. Tabaka kalınlığı genellikle 0.125 mm civarındadır. Adsorban tabaka olarak Silikagel, Kizelgur, selüloz ve türevleri, nişasta, poliamid ve Al_2O_3 gibi organik ve anorganik maddeler kullanılır.

İnce tabaka kromatografisi 1960 yılından beri toksikologların kullandığı bir tekniktir. Kâğıt kromatografisiyle karşılaşılan güçlük İ.T.K. ile çözümlenmiştir. Örneğin bu yıllarda alkaloidleri ayırmak için en az 10-20 mikrogram madde gerekiyordu. Halbuki İ.T.K. ile 0.1 μg la başarıya ulaşılmıştır. Diğer taraftan az miktardaki monoamin oksidaz inhibitörleri İ.T.K. ile daha iyi detekte edilebilmekte, bir çok ilaç kombinasyonları daha çabuk ve kolay ayrılabilir.

Teknik :

İnce tabakanın uygulanması kâğıt kromatografisine benzer, aşağıda bu tekniğin başlıca kademeleri açıklanmış ve şekil (12) de uygulama gösterilmiştir.



Şekil 12 — İ.T.K. tekniği

Şekil İ.T.K. da şu işlemler sırası ile yapılır :

i) Cam levhaya adsorban maddenin yayılması ve aktivite edilmesi. Örneğin Silikagel 105° de 1 saat bekleterek aktivite edilir.

ii) Developman tankının hazırlanması : Kromatografi için ağız cam kapaklı ve traşlı cam kavanozlar kullanılır. Bu tank içine de

velopman solventi denilen ve adsorban madde üzerinde sürükleyici vazifesini görecek çözücü karışımı konur.

Bu çözücü buharı ile tank atmosferinin doyması için ağzı sıkıca kapatılır. Developpe edilecek cam levha bu tanka yerleştirilir.

iii) Nümune tatbiki :

Adsorban madde üzerinde toplu iğne ile alttan 2,5 cm. yükseklikteki yatay doğru üzerine 2-2,5 cm. aralıkta tatbik edilerek nümune yerleri işaretlenir. Kalitatif analizde, kapillerle bir pipetle nümune çözeltisinden 50 - 100 mikrolitre (μ l) yavaş yavaş damlatılır. Bu leke çapı 2 - 3 mm. yi geçmemelidir.

iv) Developman işlemi : Damlatılan nümuneler uygun şekilde kurutulduktan sonra tanka yavaşça konur. Tankın ağzı kapatılır ve çözücü karışımının uygulama noktasından itibaren 10-12 cm yükselmesine kadar bekletilir. Bu bekleme müddetine **developman müddeti** denir.

v) Bu zaman sonunda cam levha tanktan alınır, çözücü sınırı kurşun kalemle işaretlenir ve kurumaya bırakılır.

vi) Kromatogramların değerlendirilmesi : Levhalar kurutulduktan sonra ultraviyole ışığında incelenir ve floresan veren lekeler olup olmadığı, bunların renkleri saptanır. Sonra uygun reaktif püskürtülerek bu lekelerin yeri tesbit edilir. Developmandan sonra ayrılan bu lekeler **kromatogram** denir.

vii) Bu lekelerin R_f değeri hesaplanır.

Ayrıca bilinen maddelerle de paralel çalışarak (standart), analizi yapılacak maddenin tanınması mümkün olur.

viii) Gerektiğinde kantitatif tayin de yapılabilir. Bunun için çeşitli yöntemler vardır. Örneğin leke alanının ölçülmesi, renklendirilmiş kromatogramın fotodansitometrik ölçümü veya lekelerin elüsyonundan sonra spektrofotometrik uygulanması gibi.

5. Absorbsiyon Spektral Analizin Toksikolojide kullanılması :

Absorbsiyon spektrumuna dayanan analiz, optik yöntemlerin en önemlisini teşkil eder. Genel bir tarif olarak absorptimetri elektro-

magnetik enerjinin absorblanması esasına dayanan bir metottur. Bunun en yaygın şekli spektrofotometri (UV, Vizibl, IR) ve kolorimetredir.

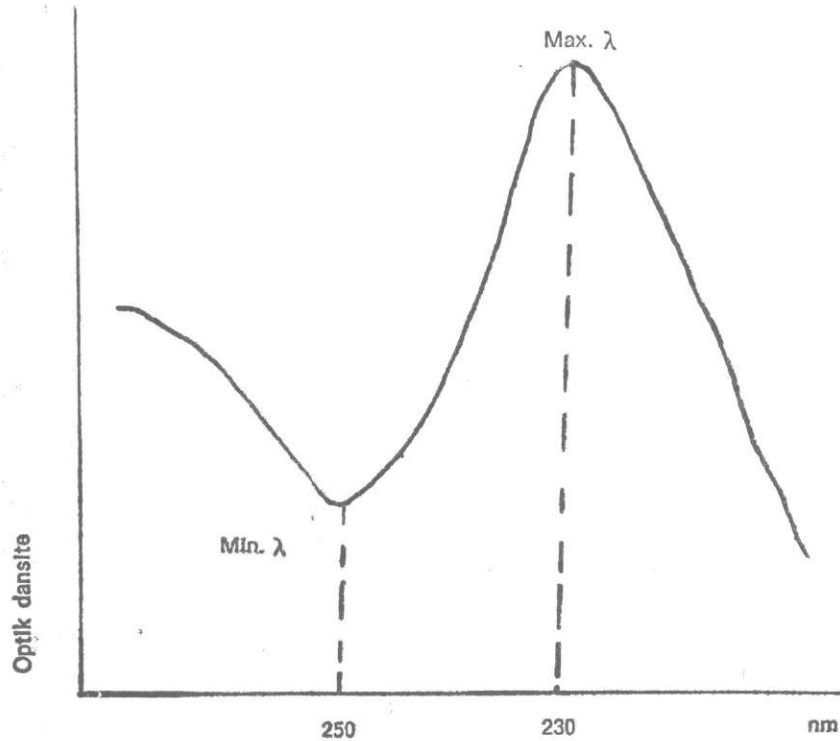
Her ikisinde de rol oynayan ışık kanunları aynıdır.

UV Spektrofotometreleri :

Ultraviyole spektrofotometre, kimyasal maddelerin UV (200 - 380 nm) alanındaki spektrum analizleri için kullanılır. Işık kaynağı olarak, yüksek baskı altındaki hidrojen veya deuterium desarj lambası (200 - 375 nm arasında ışın verir) kullanılır.

Toksikolojide UV spektrofotometresinin kullanılışı :

i. Bilinmeyen bir maddenin UV sahasındaki spektrumunun elde edilmesi ve bunun bilinen standartlarla karşılaştırılması ile o maddenin tanımlanması yapılabilir. (Şekil 13).



Şekil 13 -- UV Spektrumu

λ 'ya karşı okunan, absorpsiyon değerleri bir grafik kağıdı üzerinde noktalanarak birleştirilirse, o maddenin spektrumu elde edilir. Elde edilen spektrum, bilinen madde spektrumu ile karşılaştırılır.

Karşılaştırma, spektrumun şu özelliklerine göre yapılır :

a) UV sahasında elde edilen max. absorpsiyonu gösteren dalga uzunluğu her madde için karakteristiktir (Max. λ).

b) Molar ekstinksiyon katsayısı (A) aynı şartlarda, her madde için sabit ve karakteristiktir bir değer taşır.

c) Minimum (Min) absorpsiyonu gösteren dalga uzunluğu da bir değerlendirilmede yardımcı olur.

Asit özellikteki organik bileşiklerin kanda UV spektrofotometrik yöntemle aranması :

25 ml distillenmiş kloroform bir ayırma hunisine konur ve 5 ml kan ilâve edilir. 1 ml seyreltik HCl ile asitlendirilir ve dikkatle 5 dakika çalkalanır. Fazlar ayrıldıktan sonra, su damlacıklarını uzaklaştırmak için kloroform fazı kuru süzgeç kağıdından süzülür. Süzüntüden 20 ml alınır ve 5 ml 0.5 N NaOH ile ekstrakte edilir. Bu ekstraktı kuvarz küvete konur ve kloroform ile doyurulmuş 5 N NaOH e karşı spektrumu çizilir.

Kalevi özellikteki organik bileşiklerin kanda UV spektrofotometresi ile aranması :

Uçucu olmayan organik zehirlerden alkaloidler ve diğer kalevi özellikte olanlar ise, önce kalevi ortamda (5 ml Kan + 25 ml CHCl_3 + 1 ml dilüe NH_4OH) kloroformla ekstrakte edilir, sonra 0.5 N H_2SO_4 ile sulu faza alınarak spektrumu çizilir.

Uçucu zehirler ise distilatta veya uygun bir çözücü içinde toplandıktan sonra aynı şekilde araştırılır.

B. Kantitatif analizde ise :

Kalitatif olarak tanımlanması yapılan zehrin, max. absorpsiyon okunur. Değerlendirme için, daha önce standart madde ile, max. λ danda konsantrasyona göre hazırlanan bir grafikten yararlanılır.

B. ÖZEL BÖLÜM

ÖNEMLİ ZEHİRLERİN BİYOLOJİK MATERYALDE ARANMALARI

I. UÇUCU ZEHİRLER

1. METİL ALKOL : CH₃OH

Sinonimleri : Odun alkolü, denatüre alkol, metil alkol, metanol.

Kullanıldığı yerler : Çözücü, denatüran, antifiriz, formaldehit ve formik asit yapımında

MLD : 75 ml/70 kg insan için

Tanınması : (1) Su buharı distilasyonu ile izole edildikten sonra distilatta, idrar veya kanda kromotropik asitle şu şekilde aranır :

2 ml kan, 4 ml % 20 lik trikloroasetik asitle karşılaştırılır ve proteinlerin çökmesi için çalkalanır. Karışım Whatman 42 filtre kağıdından süzülür. 0.1 ml filtrata (süzüntüye), 1 damla KMnO₄ (1.5 g KMnO₄, 7.5 ml % 85 lik fosforik asit içinde çözülür ve su ile 50 ml ye seyreltilir. Reaktif kahverengi bir şişede saklanır) ilâve edilerek karıştırılır, tam 1 dakika bekletilir. Fazla olan KMnO₄ ın rengi doymuş sodyum bisülfid çözeltisi damlatılarak giderilir. 0.2 ml % 0.5 kromotropik asit (suda hazırlanmış) ve 4 ml konsantre H₂SO₄ ilâvesinden sonra çalkalanır. Karışım 15 dakika kaynar su banyosunda bekletilir. Ayrıca aynı işlem, kan süzüntüsü yerine 0.1 ml distile su kullanarak ayrı bir tüpte paralel olarak yapılır (blank, kör deney).

Tüpler su banyosundan alınarak renkler karşılaştırılır. Metil alkol varsa nümune tüpün rengi viyole olur.

Kromotropik asit deneyi, metil alkolün $KMnO_4$ ile oksitleyerek ve formaldehitin tanınması için kullanılan özel bir deneydir (genel bölüme bakın Tablo III).

Ayrıca bu deney kantitatif amaçla da kullanılır. Meydana gelen rengin şiddeti **Lambert-Beer** kanuna uygun olarak konsantrasyonla orantılıdır. Su ile 10 ml ye seyreltilmiş renkli çözeltinin absorpsiyonu 570 nm de nümunenin max. da gösterdiği absorbansın değeri bu grafik yardımı ile değerlendirilir.

(2) Conway mikrodifüzyon tekniği ile metil alkolün aranması ve tayini (Feldstein ve Klendshoj metodu).

Bu yöntem doğrudan doğruya kan veya idrara uygulanabilir.

Teknik : Mikro difüzyon apareyinin (genel bölüm, sahife 16 - 17 iç odacığına 2.2 ml % 10 H_2SO_4 konur. Dış bölmeye ise 1 ml kan veya idrar veya 5 ml doku homojenatı (önceden hazırlanmış ve 1 mg dokuya eşdeğer) konur. Önceden silikon veya benzeri bir madde ile traşlı kısmı yağlanmış cam kapak, dış odacığın az bir kısmı açık olacak şekilde yerleştirilir. 1 ml doymuş Na_2CO_3 (K_2CO_3 de olabilir) dış bölmeye ilâve edilir. Hemen kapağı sıkıca kapatılır. Cihaz arada sırada hafifçe hareket ettirilerek karıştırılır. Difüzyonun tamamlanması için kan veya idrarla çalışıldığında oda sıcaklığında 3 saat, doku kullanıldığında 5 saat beklenir.

Bu müddet sonunda, iç odacıktaki H_2SO_4 tarafından absorblanan metil alkolün aranması ve tayini şöyle yapılır :

İç odacıktan 1 ml H_2SO_4 alınarak bir tüpe konur. 1 damla 5 % $KMnO_4$ ilâve edildikten sonra oksitlenme işleminin tam olması için 10 dakika karışım bekletilir. Fazla permanganatın rengi 1 kaç damla doymuş sodyum bisülfid çözeltisi ile giderilir. **(1) deneyde** açıklandığı şekilde kromotropik asit ve H_2SO_4 ilâve edilerek deneye devam edilir.

Kromotropik asit deneyi metil alkol (oksitlenmiş) ve formaldehit için özel olduğu gibi, çok duyar bir reaksiyondur. 3.5 mikrogram metil alkolle sonuç alınabilir (yani duyarlık 3.5 µg metil alkol).

3) Distillatta metil alkolün aranması için kullanılan diğer deneyler ve formaldehitten ayrılması:

a) Oksitlenebilen maddelere ait genel reaksiyon :

1 ml distilat, 5 ml 0.05 N $K_2Cr_2O_7$ % 50 H_2SO_4 içinde hazırlanmış) çözeltilisine ilâve edilir ve karışım 10 dakika kaynar su banyosunda bekletilir. Bikromat çözeltilisinin sarı renginin yeşile dönmesi distillatta oksitlenebilen maddeler (alkoller, aldehytler, doymamış hidrokarbonlar, terpenler gibi) olduğunu gösterir. Ancak putrifiye (bozulmuş) doku distilatına uygulandığı zaman bu test az değer taşır. Çünkü putrifikasyon olayı sırasında meydana gelen maddeler reaksiyonun pozitif sonuçlanmasına sebep olur.

b) Schiff reaktifi ile deney (oksitlenmiş primer alkol ve aldehytler için genel reaksiyon) :

10 ml distilat, kızdırılmış bakır teli 8-10 kere distilata daldırılarak oksitlenir. Bu esnada tüp akar su altında soğutulur.

Böylece oksitlenmiş distilattan 1 ml alınarak 0.5 ml Schiff reaktifi ilâve edilir. Oda sıcaklığında 15 dakika bekletilir. Konsantrasyona bağlı olarak pembe-viyole rengin meydana gelmesi primer bir alkol varlığını gösterir. Aldehytler, Schiff reaktifi ile doğrudan doğruya reaksiyon verirler. (Deney metil alkol ve formaldehitte yapılır)

c) Kromotropik asit (1.8 dihidroksinaftalin-3,6-disulfonik asit) deneyi :

Oksitlenmiş metil alkol ve formaldehit aranması için, metil alkol deneyindeki oksitlenme kademesi gerekmez. 1 ml distilata, 0.2 ml % 0.5 kromotropik asit ve 4 ml kons. H_2SO_4 ilâve edilerek kuvvetle karıştırılır. Karışım 15 dakika kaynar su banyosunda bekletilir. Viyole rengin meydana gelmesi formaldehit olduğunu gösterir.

2. ETİL ALKOL : C₂H₅OH

Sinonimleri : Etanol, hububat alkolü (grain alcohol), alkol.

Kullanılma yerleri : İçki olarak; tıpta ilâç taşıyıcısı, endüstride, yakıt, çözücü olarak.

MLD : 250 - 500 g alkol/70 kg insan (Örneğin, çok kısa zaman içinde 500 - 1000 ml viski alınması halinde; viski % 40 - 50 alkol ihtiva eder).

Distilatta Etil Alkol Aranması :

a) Oksitlenebilen maddelere ait genel reaksiyonu etil alkol de verir.

b) Bakır telle oksitlenmiş etil alkol (asetaldehit) Schiff reaktifi ile pozitif sonuç verir. Meydana gelen rengin metil alkol (formaldehit) veya etil alkol (asetaldehit) ile ilgili olup olmadığını ayırtetmek için renk teşekküllü için bekleme zamanı sonunda tüp içine 2 ml konsantre H₂SO₄ ilâve edilir ve karıştırılır. **Formaldehitin Schiff reaktifi ile verdiği renk bu halde sabit kalır.** Fakat asetaldehitin verdiği renk kaybolur.

c) Ksentegonat deneyi (genel) :

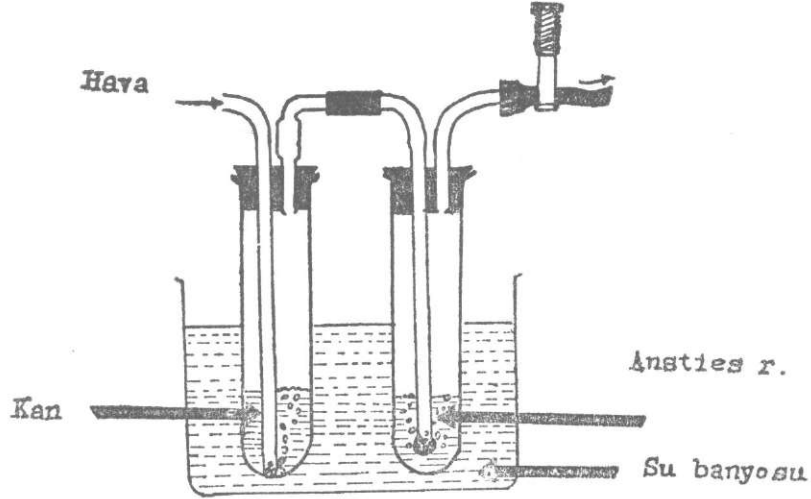
1 ml distilata 0.2 gr. KOH ilâve edilerek ısıtılır. Soğutulduktan sonra 2-3 damla karbon sülfür konarak tüp iyice çalkalanır. Asetik asit (HAc) ile ortam asitlendirildikten sonra 1 damla % 1 CuSO₄ ilâve edildiğinde sarı çökelek görülmesi primer veya sekonder alkol olduğunu gösterir.

d) **İyodoform deneyi** (etil alkolü metil alkolden ayırt edici özel deney).

3 ml distilat % 10 NaOH ile kalevilendirilir. 3-5 damla iyot çözeltisi ilâvesinden sonra karıştırılarak hafifce ısıtılır. Etil alkol varsa iyodoform meydana gelir. İyodoform karakteristik kokusu ve sarı kristalleri ile tanınır (aynı reaksiyonu asetaldehit ve aseton da verir).

Kanda Alkol tayini (Modifiye Bogen testi)

Bu metod idrar, serebrospinal sıvı veya mide içeriğinde etil alkol tayini için de kullanılabilir.



Şekil 14 — Kanda etil alkol tayini

Aparey : (Şekil 14) de görüldüğü gibi 30x210 mm boyutunda iki tüpe iki delikli mantar geçirilir. Giriş ve çıkış boruları (cam) yerleştirildikten sonra, ara bağlantılar iyi yıkanmış lâstik boru ile yapılır. Aparey kaynar su banyosuna daldırılır ve hava akımı bir aspiratör (su trompu ile sağlanır).

Prensip : Kan, idrar veya mide içeriğindeki alkol, distilasyonla serbest hale geçer ve ikinci tüpte (B tüpü) bulunan reaktif (**Ansties reaktifi** $K_2Cr_2O_7 + H_2SO_4$) tarafından tutulur ve reaksiyona girerek yeşil renk meydana gelir. Yeşil rengin şiddeti, etil alkol miktarı ile orantılıdır. Deney koşullarında ve 4 ml kanla çalışıldığında, %0.05 - %0.30 g etil alkol Lambert-Beer kanununa uyar. Yeşil renkli çözeltinin absorbanası, kör deneye karşı 605 nm de uygun bir spektrofotometrede okunur. Sonuç daha önce standart etil alkolle hazırlanmış kalibrasyon kurvundan okunur.

Deneyin yapılışı :

a. A tüpünde 4 ml etil alkol tayin edilecek biyolojik materyal (kan, idrar, mide içeriği), 4 ml **Scott Wilson** reaktifi, 2 ml su ve köpük önleyici madde (Silicon antifoam A içeren mineral yağ) ilâve edilir.

B tüpüne ise 9 ml Ansties reaktifi konur.

b. Tüplerin ağzı derhal sıkıca kapatılır ve kaynar su banyosunda 20 dakika bekletilir. Bu sırada trompla uygun hava akımı sağlanır. Hava akımı bir Mohr pensu (ayarlı vida) yardımı ile düzenlenebilir.

c. 20 dakika sonra, benmariden çıkarılan B tüpü soğutulur ve dikkatle 10 ml lik cam kapaklı bir mezüre boşaltılır. Eksik hacim su ile tamamlanır.

d. Ayrıca aynı şartlarda deney içinde alkol bulunmadığı bilinen biyolojik madde ile de yapılır. (spektrofotometrede blank olarak kullanılır).

e. Renk şiddetinin değerlendirilerek etil alkol miktar tayini iki şekilde yapılabilir :

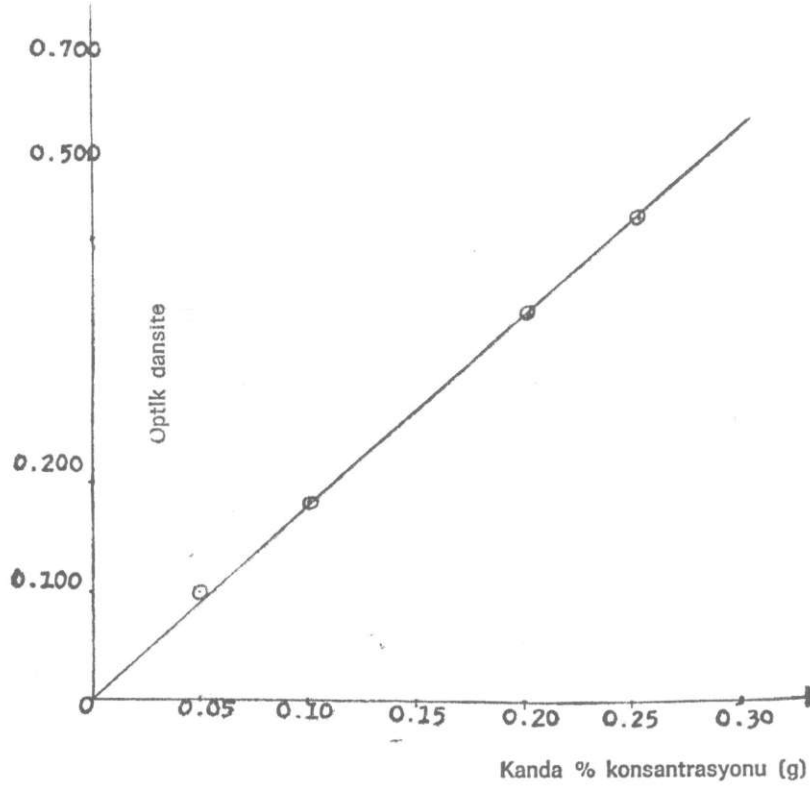
i) **Spektrofotometrik metot** : Mezür içinde tam 10 ml ye seyreltilmiş renkli çözelti spektrofotometre küvetine konur. Blank (kör deney) olarak hazırlanmış çözeltilde diğer bir küvete boşaltıldıktan sonra 605 nm de renkli çözeltilinin absorbanı köre karşı okunur. Bu sonuç, önceden hazırlanan kalibrasyon kurvundan değerlendirilerek etil alkol miktarı % g olarak bulunur.

Kalibrasyon kurvunun hazırlanması :

Önce, kesin (duyar) olarak % 2 lik (ağırlık olarak) standart etil alkol çözeltisi hazırlanır. Bunun için tam 2.53 ml mutlak alkol, 50 ml su ihtiva eden 100 ml lik bir balonjojeye bir pipet veya büret yardımı ile

ilâve edilir. Balonjoje su ile 100 ml ye tamamlanarak karıştırılır ve ağzı sıkıca kapatılır.

Alkol olmadığı bilinen 4 ml lik kan nûmunelerine, sırası ile 0 ile 0.8 ml arasında bu standart alkol çözeltisinden ilâve edilir. Teknik kısımda açıklandığı şekilde **modifiye Bogen** usulü distilasyona tâbi tutulur. Standartların, Ansties reaktifi ile verdiği rengin optik dansitesi blank'a karşı 605 nm da spektrofotometrede okunur. Bu absorban değerleri ve tekabül ettiği alkol konsantrasyonu bir grafik kağıdında işaretlenerek kalibrasyon kurvu hazırlanır (Şekil 15).



Şekil 15 — Kanda spektrofotometrik olarak alkol tayini eğrisi (kurvu)

Aşağıda alınan alkol standartı miktarına (ml) göre kanda (% g) tekabül ettiği alkol miktarı gösterilmiştir (4 ml kanda çalıştığına göre).

<u>Alınan alkol standartı (ml) % 2 likten</u>	<u>Tekabül ettiği kanda %g alkol</u>
0	negatif
0.1	0.05 %
0.2	0.10 »
0.3	0.15 »
0.4	0.20 »
0.5	0.25 »
0.6	0.30 »
0.7	0.35 »
0.8	0.40 »

ii) Standartlarla yaklaşık değerlendirme (yarıkantitatif tayini) :

Spektrofotometre bulunmadığında, bir seri alkol standartı ile bir renk eşeli hazırlanır. Bunun için spektrotometrik metotdaki kalibrasyon eğrisinin hazırlanmasında olduğu gibi % 2 lik alkol çözeltisinden uygun miktarlarda (0-0.8 ml arasında) 4 ml biyolojik maddeye (kan idrar gibi) konulur. Standartlar **Bogen** metodu ile distile edilerek Ans-ties reaktifi ile reaksiyona sokulur ve su ile 10 ml ye tamamlanır. Seri haldeki renkli çözeltiler aynı boyuttaki tüplere aktarılarak ağızları sıkıca kapatılır. Bu şekilde elde edilen skala karanlıkta 6 ay dayanabilir.

Alkol tayini yapılacak nümune ile elde edilen renk, yukarıda açıklandığı şekilde hazırlanan renk eşeli ile karşılaştırılarak gözle yaklaşık bir tayin yapılabilir.

Sonucun yorumlanması :

Bu metod % 0.01 g alkole kadar duyardır. Genel olarak kanda % 0.1 g alkol, sarhoşluğa sebep olur. Kanuni açıdan kabul edilen bu değer çeşitleri ülkelerde değişiktir. Örneğin Norveçte kanda % 0.05

g; İsveçte % 0.08 g; Danimarkada % 0.10 g üstünde alkol tesbiti sarhoşluk belirtisidir ve bu şekilde araba sürmek bir suçtur. Türkiye'de ise eser miktarda alkole dahi müsaade edilmemektedir. (Lit No. 7).

3. KLORLU HİDROKARBONLAR

Toksikoloji yönünden önemli olan hidrokarbonlar karbon tetraklorür, kloroform ve kloralhidratdır. Ayrıca kuru temizlemede kullanılan ve kronik zehirlenmeye neden olan trikloroetilen de bu sınıfa girer.

Kloralhidrat ($Cl_3CCHO \cdot H_2O$) : Kloral, Mickey Finn, «knock out drops» triklorasetaldehit olarak da bilinir. Kuvvetli bir hipnotik olup, konvülfif nöbetleri durdurmak için kullanılır. **MLD** : 7 g/70 kg insandır.

Kloroform ($CHCl_3$) : Trikloroetan kimyasal ismidir. Anestetik, tıbbi amaçla dezenfektan olarak kullanıldığı gibi, endüstride çözücü olarak ta önemli bir yeri vardır. **MLD** : yaklaşık 25 ml/70 kg insandır.

Karbondotetraklorür (CCl_4) : piren (pyrene), karbona (carbona) sinonimleridir. Temizleme, yağ eritici, yangın söndürmede, antihelmintik ve kuru temizlemede kullanılır. **MLD** : yaklaşık 4 ml/70 kg insandır.

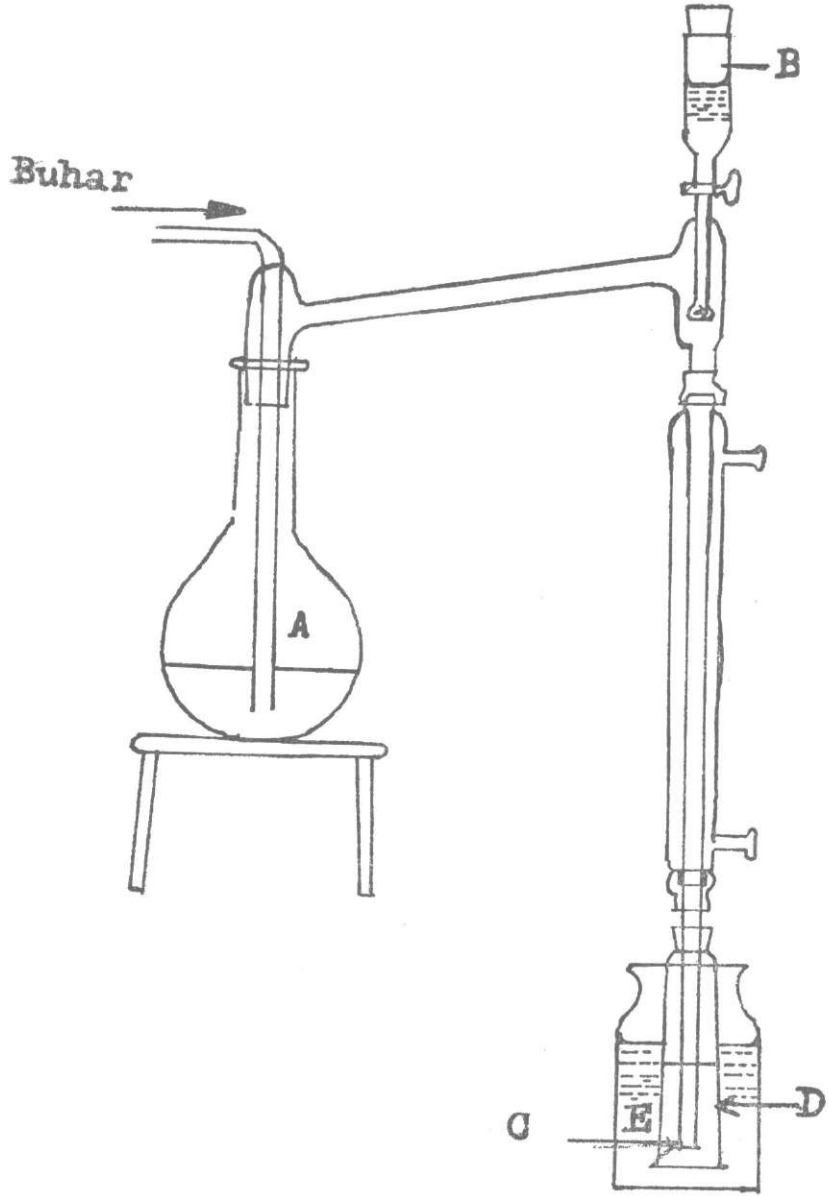
Trikloro etilen ($CHCl_2CCl_2$) : Trilen, trikol, tiriol gibi sinonimleri vardır. Yağlı madde ekstraksiyonunda, ilaç ve parfüm endüstrisinde, kuru temizlemede insektisit olarak kullanılır.

Klorlu hidrokarbonların biyolojik materyalden izolasyonları

Klorluhidrokarbonlar doku veya kandan su buharı distilasyonu ile izole edilirler. Asit ortamda bütün klorlu hidrokarbonlar su buharı ile sürüklenirler. Kalevi ortamda ise yalnız kloralhidrat distile olur. Distilatta kısmen kloral ve kloroforma şekilde bulunur.

Teknik : Bunun için su buharı distilasyonu apareyi kullanılır. Kantitatif analizde yapılacak şekil 16 daki distilasyon apareyini kullanmak yerinde olur.

Habgood ve Powell tarafından kullanılan bu apareyin A balonuna nümune konur. 1-10 g kan veya kıyılmış doku, 100 ml su ile karıştırıldıktan sonra A balonuna konur. Köpük giderici maddeden birkaç damla ilâve edilir.



Şekil 16 — Klorlu hidrokarbonların biyolojik maddeden İzolasyonu

Distilat 50 ml lik ve dereceli ağız cam kapaklı silindirde (D) toplanır. Silindir içine önceden 1.5 - 5 ml arasında belirli bir hacimde toluen konulur (C). Toluen içinde toplanan hidrokarbon miktarı (0.4 mg/ml yi geçmemelidir).

Bu silindir, buz banyosu (E) içine daldırılır. Su buharı distilasyonuna 40 ml distilat toplanıncaya kadar devam edilir. Distilasyondan sonra, soğutucu bir kaç ml su ile (B) ayırma hunisi yardımı ile yıkanır. Nümuneye toplama kabı yerinden alınır. Ağız kapatıldıktan sonra çalkalanır. Böylece klorlu hidrokarbonun, toluen fazına geçmesi sağlanır. Fazlar ayrıldıktan sonra, toluen fazı ayrılır ve 1 ml si kantitatif analiz için saklanır.

b) Distilatta klorlu hidrokarbonların aranması :

b₁) **Fujiwara reaksiyonu** (genel reaksiyon) : 5 ml distilat, 2 ml saf piridin, 2 ml % 20 NaOH ilâve edilir. Karışım tam 5 dakika kaynar su banyosunda bekletilir. Klorlu hidrokarbonlardan birinin bulunmasında, piridin fazı pembe-kırmızı olur. (Bu renk şiddeti konsantrasyona bağlı olduğundan kantitatif tayin için de kullanılır).

b₂) **İzonitril deneyi** (genel, primer amin ve klorlu hidrokarbonlar için) : 1 ml toluen fazı, 3 damla anilin ve 5 damla % 20 NaOH ile bir kaç dakika ısıtıldığında karakteristik fenil izonitril kokusu duyulur.

b₃) Nessler reaktifi ile ayırt edici deneyler :

1 ml distilata, 1 ml Nessler reaktifi ilâve edilir. Bu halde aşağıdaki sonuçlar elde edilir:

Klorlu karbonlar	Nessler ilâvesi ile renk	
	5 dakika sonra, soğukta	ısıdan sonra
Karbontetraklorür	_____	_____
Kloroform	_____	Kahverengi-siyah
Kloral hidrat	Sarı portakal, sarı siyah	Siyah

b₄) Kloral hidrat için özel deney :

5 ml distilata, 1 ml doy. Na₂CO₃ ve 10 damla suda doymuş, rezorsin ilâve ederek karışım 30 dakika oda sıcaklığında bekletilir. Sonra 10-15 ml su ile seyreltildiğinde yeşil floresans meydana gelmesi kloralhidrat olduğunu gösterir.

Not : Kalitatif analiz için, distilatın toluen içinde toplanması gerekmez.

c) Klorlu hidrokarbonların Fujiwara reaksiyonu ile tayini

1 ml toluen fazına (klorlu hidrokarbonun toplandığı) 10 ml saf piridin (tekrar distilenmiş veya taze analitik özellikte) ve 5 ml 20 NaOH ilâve edildikten sonra, karışım tam 5 dakika kaynar su banyosunda bekletilir. Buz banyosunda soğutulduktan sonra renkli piridin fazı hemen ayrılır.

Piridin fazı, distile su ile 15 ml ye seyreltilir. Bu renkli çözeltinin optik dansitesi 530 nm de blanka karşı bir spektrofometrede okunur. Sonuç önceden aynı şekilde standart hidrokarbonla hazırlanmış kalibrasyon kurvundan hesaplanır. Bu teknikle, 1 ml toluen içinde en fazla 0.4 mg hidrokarbon tayin edilebilir.

Habgood ve Powell 1 ml aseton ilâvesi ile karbon tetra klorürün piridin fazında verdiği rengin şiddetlendiğini, kloroform olduğunda azaldığını ve trikloroetilen ile meydana gelen rengin ise etkilenmediğini göstermişlerdir.

d) İdrarda Fujiwara reaksiyonu ile trikloroasetik asit (TCAA) tayini (Soucek ve Vlachova modifikasyonu) :

Trikloroetilenle kronik zehirlenme, yukarıdaki yöntemle kanda tri tayini yapılarak anlaşılabilir. Ancak idrarda trikloro etilenen başlıca metaboliti olan TCAA tayini yapılması pratik açıdan daha uygundur.

Bunun için 2 ml idrara, 8 ml saf piridin ve 5 ml % 20 NaOH ilâve edilir. Karışım 70° de 15 dakika su banyosunda bekletilir. Buz banyosunda soğutulduktan sonra piridin fazı (7.5 ml) 3 ml su ilâve edilerek seyreltilir. Renkli çözeltinin optik dansitesi 530 nm de blanka karşı okunur. Sonuç, 1-100 mikrogram arasında hazırlanan TCAA standartlarıyla elde edilen kalibrasyon kurvundan hesaplanır.

Sonuç 1 litre idrarda mg TCAA (mg/l) olarak verilir.

İdrarda 20 mg/l TCAA bulunması, önemsiz derecede tri'ye maruz kalındığını, bu değer (150 mg/l TCAA) üstünde bulunması ise havada müsaade edilen limit üstünde, (MAC) bir miktarda trikloroetilene maruz kalındığını ifade eder.

4. BENZEN : C₆H₆

Sinonimleri : Benzol, phenylhydride, coal-naphta.

Kullanma yeri : Çözücü, boya yapımı, temizleme ve yağ alma maddesi, kauçuk endüstrisinde.

MLD : 15 ml/70 kg insan (yaklaşık olarak).

a) Biyolojik maddeden izolasyonu ve aranması :

Benzen dokulardan, asit ortamda su buharı distilasyonu ile izole edilir. Bunun için 10 g doku (veya 4 ml kan) distilasyon balonuna konarak 50 ml su ile karıştırılır. (Şekil 2). 1 ml konsantre H₂SO₄ ilâvesinden sonra, uzun soğutuculu bir su buharı distilasyonu apareyinde distillenir. Soğutucunun uç kısmının nümune toplama kabının karbon tetraklorür ihtiva eden kısmına kadar uzanan bir adaptörle tespit edilmesi, benzenin uçmasını engeller. Benzen kokusu duyulmayınca kadar distilasyona devam edilir. Nümune kabında toplanan, distilat toplanır ve CCl₄ fazının ayrılması için beklenir. Benzen CCl₄ içinde çözüneceğinden bu faz alınarak benzen aranır:

Benzen-karbon tetraklorür karışımına (5 ml kadar), nitrolama asit karışımı ilâve edilir (8 ml konsantre sülfirik asit üzerine, 7 ml HNO₃ ilâve edilerek hazırlanır), karışım çalkalanırken ısının 60°C üstüne çıkmaması için soğutulur.

Karbon tetraklorür, su banyosunda 60°C de uçurulduktan sonra, nümune soğutulur. Meydana gelen nitrobenzen karakteristik kokusu ile (ayakkabı cilâsı kokusu) tanınır.

Bu karışımdan nitrobenzen şöyle ayrılır :

Soğutulmuş nümuneye, 50 ml su ilâve edildikten sonra, bir ayırma hunisinde 3 defa 25 ml eterle ekstrakte edilir. Toplanan eter fazları bir su banyosunda uçurulur. Nitrobenzen sarı yağ şeklinde toplanır.

Not : Benzen bir çok büyük veya küçük iş yerlerinde çözücü, eritken olarak kullanıldığı gibi, izinsiz olarak kuru temizleme iş yerlerinde de kullanılır. Bu nedenle benzenin kan ve dokuda araştırılması kronik benzen zehirlenmesi bakımından önemlidir. Ayrıca, idrarla atılan metaboliti fenol olduğundan kronik benzen zehirlenmesinin saptanmasında diğer araştırmalar (kan formülü, hemogram, hematokrit gibi) yanında, fenol tayini değerli bir kriterdir (fenol bölümüne bakınız).

5. FENOLLER : C₆H₅OH

Sinonimler : (C₆H₅OH) : Karbolik asit, asit fenik.

Türevleri : Krezoller (CH₃C₆H₅OH); timol (C₆H₃CH₃C₂H₇OH)

Kullanma yerleri : Dezenfektan, prezervatif, antiseptik antipruritik (kaşıntılara karşı) ve endüstride **MLD** : Yaklaşık 10 ml/70 kg insan (adi fenol için).

a) Biyolojik materyalden izolasyonları :

Fenoller, kan, idrar veya dokulardan asit ortamda su buharı distilasyonu ile izole edilir. Bunun için su buharı distilasyonu apareyini

(Şekil 2.) B balonuna 25 ml kıyılmış doku veya idrar, 4 ml (1 + 1) oranında seyreltilmiş sülfirik asit konur ve 5 ml su ile balon yukarıdan aşağıya doğru yıkanır. Karışım su buharı akımında distile edilir, distilasyona 100 ml distilat toplanıncaya kadar devam edilir.

b) Distilatta fenol aranması :

(1) Para pozisyonu substitüte edilmemiş veya nitro grubu bulunmayan fenollere **Liebermann'ın** indofenol testi, genel grup deneyi olarak uygulanabilir. Deney şöyle yapılır :

10-20 ml distilat ,2 defa 20 ml eterle ekstrakte edilir. Birleştirilen eter ekstresi bir kaç gram susuz Na_2SO_4 ilâvesiyle kurutulur. Cam pamuğundan süzülür ve 2 ml kalıncaya kadar uçurulur.

Böylece konsantre edilmiş eterli ekstreden bir kaç damla, küçük bir porselen kapsülde oda ısısında uçurulur.

Kalıntıya, 1 damla taze % 1 NaNO_2 (Konsantre sülfirik asit içinde hazırlanmış) çözeltisi konur, bir bagetle karıştırıldıktan sonra bir damla su ilâve edilir. Genellikle su ilâvesi rengin şiddetlenmesine sebep olur. Karışım soğutulduktan sonra 1 damla 4 N NaOH ile kalevilendirilir ve meydana gelen renk değişmesi kaydedilir. Fenol ile mavi \longrightarrow kırmızı \longrightarrow yeşil; krezollerle koyu kahverengi; timol ile yeşil \longrightarrow kırmızı \longrightarrow mavi renkler görülür. Bu deneyle 1 mikrogram (μg) fenol tanınabilir.

(ii) — FeCl_3 ile arama :

1 ml distilata, 1 damla % 10 FeCl_3 ilâve edildiğinde viyole renk meydana gelir. Salisilik asitten farklı olarak, bu renk, mineral asit, amonyak veya alkol ilâvesiyle kaybolur.

(Bu deney doğrudan doğruya 10 ml idrara 1 ml % 10 FeCl_3 ilâvesiyle de yapılabilir. Meydana gelen viyole renk ısıya dayanıklıdır).

(iii) **Millon deneyi :**

Küçük bir kapsüle, 1 damla distilat veya eterli ekstreden konur ve 1 damla **Millon reaktifi** damlatılır. Karışım bir kaç dakika bekletilir. Eğer bir renk değişimi görülmezse ısıtılır. Fenol, soğukta Millon reaktifi ile kırmızı renk verdiği halde, diğer fenoller ancak ısıtmadan sonra renk verirler. Bu deneyle 1µg fenol tanınabilir.

c) İdrarda fenolün diazolandırılmış p-nitroanilin ile tayini :

Fenol yukarıda açıklandığı gibi asit ortamda su buharı distilasyonu ile idrardan izole edilir. Elde edilen distilatın ağzı kapalı olarak soğukta saklanması gerekir. **Walkley et al** tarafından modifiye edilen diazolandırılmış p-nitroanilinle fenol tayini için, 100 ml toplanan distilatın, 10 ml alınarak cam kapaklı dereceli bir mezüre (20 ml lik) konur. 1 ml 50 sodyum asetat ve 1 ml diazo çözeltisi (reaktif no 12) konduktan sonra karışım tam bir dakika bekletilir. Aradan 2 ml % 20 Na₂CO₃ ilâve edilir ve su ile 20 ml ye tamamlanır. 3 dakika sonra meydana gelen rengin optik dansitesi 525 nm de bir spektrotometrede okunur.

Sonuçlar önceden 0-100 µg arasındaki fenol standartlarıyla elde edilen kalibrasyon kurvundan okunur ve litrede mg fenol olarak verilir.

(Not : Fenol doku proteinlerinin putrifikasyonu sonucu meydana gelebildiği gibi, deri yolu ile absorbe olarak, idrarla atılır. Toksikolojide fenol, benzenin metaboliti olduğu için önem taşır. Kronik benzen zehirlenmesinin teşhisinde bir iş günü müddeti sonunda toplanan idrarda, yukarıdaki teknikle fenol tayini yapılır. Bu metodla ortalama fenol atılımı normal olarak 30 mg/litre (15-50 mg) saptanmıştır. Sonuçların bu miktar üstünde, bulunması diğer destekleyici bulgularla beraber olmak üzere, kronik benzen zehirlenmesine ve MAC üstünde bir miktarda benzen buharına maruz kalmaya işaretler).

Methemoglobin olmadığında, siyanür ilâvesinden sonra da, optik dansite değerinde bir değişme olmaz. Eğer varsa, a_1 ve a_2 farklı olur. Sonuç şu şekilde hesaplanır:

$$(a_1 - a_2) \times 36 = g \% \text{ methemoglobin kan n\u00fcmunesinde.}$$

Ayrıca hemoglobin tayini yapılarak % oran saptanır.

Not : I) Methemoglobin, oda sıcaklığında zamanla hemoglobine dönüşür. Deney hemen yapılmıyorsa kan soğukta (buzlukta) saklanır.

ii) Kontrol için, 30 mg potasyum ferri siyanür 100 ml kana ilâve edilir. Bu halde % 100 methemoglobinli kan elde edilmiş olur.

7. SİYANÜRLER : (HCN, NaOH, KCN)

Türevleri : Sodyum siyanür, potasyum siyanür, purussik asit (hidrosiyanik asit), bitkilerdeki amigdalin glukozitleri, hidrolizle siyanür ve glukoz verirler.

Kullanma yerleri : Metal cilâsı, böceklerin yok edilmesinde, metalurjide.

Özellikleri : HCN çok uçucu bir sıvıdır. (K.n 26°C); KCN ve NaCN ise kristal tuzlardır, alkali reaksiyon gösterirler.

MLD : 150 mg (potasyum siyanür); 200 mg/70 insan (NaCN); 100 mg/70 insan hidrosiyanik asit)

a) Doku veya vücut sıvılarında doğrudan doğruya siyanür aranması (Schönbein deneyi) :

Şerit halinde kesilmiş filtre kağıdı önce % 10 alkollü gayak ve arkadan % 0.1 bakır sülfat çözeltisine batırılarak emprenye edilir. Şüpheli biyolojik materyal yanına veya üstüne bu kağıt yerleştirilir. Siyanür olduğunda kağıdın rengi mavi olur. Bu çok duyar bir deneydir. 100 g maddedeki 0.005 mg siyanür tanınabilir. Fakat hidrojen peroksit, ozon, klor, azot oksitleri gibi oksidanlarla da pozitif sonuç alınır. Renk oluşması, miktara bağlı olarak hemen veya 15 dakika içinde görülür.

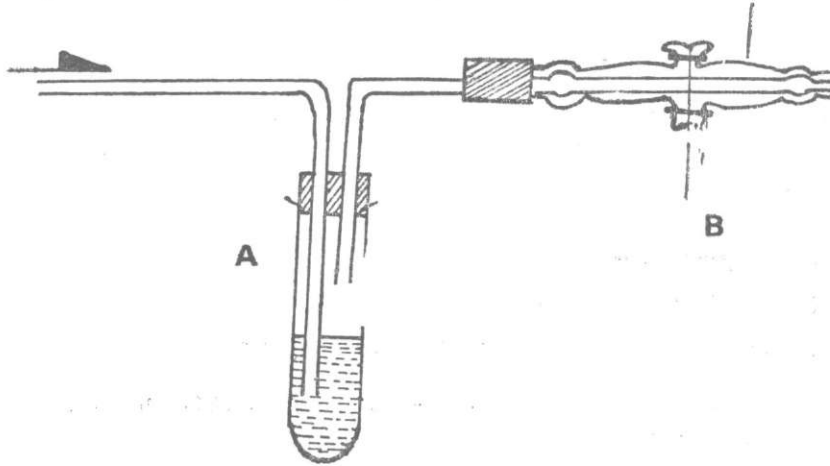
b) Siyanürün biyolojik materyalden izolasyonu ve aranması

Siyanür biyolojik materyalden asit ortamdan su buharı distilasyonu ile izole edilir. Distilat siyanür kaybını önlemek için % 10 NaOH içinde tutulur. Distilatta siyanür şu deneylerle aranır:

i) **Prusya mavisi reaksiyonu ile** : 5 ml distilat, 1 ml % 50 NaOH ile kalevilendirilir. 3 damla taze hazırlanmış % 10 demir 2 - sülfat (ferrözsülfat) ve 3 damla taze hazırlanmış % 3 demir - 3 - klorür (ferriklorür) ilâve edilir. Karışım kaynama noktasına kadar ısıtılır ve soğutulur. Kahverengi demirhidroksit çözününceye kadar karışıma konsantre HCl ilâve edilir. Mavi renk meydana gelmesi (zamanla çökelek haline geçer) siyanür bulunduğunu gösterir.

ii) **İzopurpurik asit reaksiyonu ile** : 4 ml kalevi distilata, 3 ml doymuş pikrik ilâve edilir, ve hafifçe ısıtılır. Meydana gelen kırmızı renk (purpurik asit) siyanür varlığını gösterir. Bu reaksiyonu, kreatin ve kan şekeri ile de pozitif sonuç verir.

c) Kanda siyanür aranması ve tayini
(Gettler ve Goldbaum yöntemi) :



Şekil 17 — Siyanür tayini

Prusya mavisi teşekkülüne dayanan bu deney, şu şekilde yürütülür.

Şekil (17) de görüldüğü gibi, apareyin 30x210 mm boyutundaki A tüpüne siyanür aranacak 3 ml kan konur. B kanatları arasına FeSO₄ ve NaOH ile empenye edilmiş filtre kağıdı (Whatman No: 50) yerleştirilir. A tüpüne 2 ml % 15 trikloroasetik asit çözeltisinden ilâve edilir ve tüpün ağzı şekilde gibi kapatılır. Aparey 5-10 dakika hafif bir hava akımına tutulur. (Su trompu kullanılabilir) gerekirse hafifçe ısıtılabilir.

Bekletme zamanı sonunda empenye filtre kağıdı alınır ve % 30 HCl içine daldırılır. Siyanür mevcudiyetinde belirgin mavi renk teşekkül eder (**Prusya mavisi**). Bu testle 10 ml kandaki 0.005 mg (5 mikrogram) siyanür tanınabilir ve miktarı saptanabilir.

Miktar tayini : Önceden, miktarı belli siyanür çözeltileri ile yukardaki deney uygulanır. Seri halde, empenye filtre kağıdı ile renk tonları konsantrasyona bağlı olan mavi renk sakalası hazırlanır. Bu nümune renkler, cam levha arasında ve hava ile temas olmayacak şekilde saklanır. Nümune ile elde edilen renk, standart renkle karşılaştırılarak yarı kantitatif bir tayin yapılır.

Not : Filtre kağıdının empenye edilmesi :

Whatman no : 50 filtre kağıdı % 10 FeSO₄ içine daldırılarak 5 dakika bekletilir ve sonra kurutulur. Arkadan % 20 NaOH içine daldırılır. 5 dakika sonra çıkarılarak kurutulur. Empenye kağıtlar deneyden hemen önce taze olarak hazırlanmalıdır.

8. FOSFOR : P

Sinonimleri : Sarı fosfor

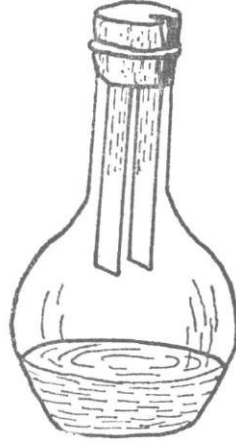
Kullanma yerleri : Sıçan paste, kibrit, yangın.

Özellikler : Uçucu, sarımsak kokusunda, kolayca alevlenir, karanlıkta fosforesans gösterir.

MLD : 0.3 g/70 kg (sarı fosfor çok toksiktir. Allotropu olan kırmızı fosfor ise toksik değildir).

a) Biyolojik materyalde fosfor aranması (Scherer testi) :

Ön deney olarak biyolojik madde Scherer testi ile fosfor aranmasında prensip, fosforun AgNO_3 ile siyah gümüş fosfür vermesine dayanmaktadır. 5 g kadar kıyılmış doku bir erlenmayer içine konularak 10 ml su ile karıştırılır. Ağız bir mantarla kapatılır. Mantarın iki kenarına, biri AgNO_3 ile diğeri kurşun asetat çözeltisi ile nemlendirilmiş şerit halinde iki filtre kağıdı yerleştirilir. (Şekil 18)



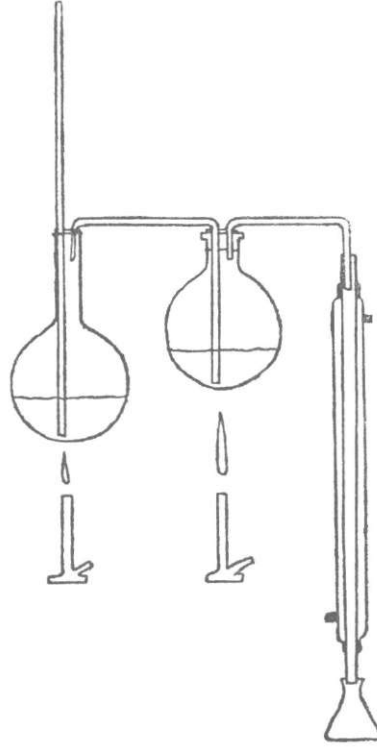
Şekil 18 — Scherer deneyi

15-20 dakika balon $40-50^\circ\text{C}$ de su banyosu üzerinde bekletilir.

Bir müddet sonra AgNO_3 lı filtre kağıdı karardığı halde, diğesinde bir renk değişmesi olmazsa, sarı fosfor olma ihtimali vardır. Eğer her ikisinde de siyah renk meydana gelmişse sülfürler de, bu reaksiyonu vereceğinden bir sonuca varılmaz. Ayrıca indirgen maddeler de pozitif sonuca sebep olurlar. Bunun için **madifiye Scherer testi** uygulanması gerekir.

b) Biyolojik maddeden fosforun izolasyonu

Fosfor asit ortamda su buharı distilasyonu ile biyolojik maddeden izole edilir. Distilasyon sırasında karanlıkta verdiği fosforesans özelliğinin incelenmesine destekleyici bir deneydir. **Mitscherlich'e** göre bu amaçla (Şekil 19) de görülen distilasyon apareyi kullanılır.



Şekil 19 — Mitscherlich deneyi

Kıyılmış doku ve biyolojik madde, distilasyon balonuna konarak tartarik asit (% 10) çözeltisi ile hafifçe asitlendirilir. Soğutucunun ucu nümune toplama kabında bulunan bir kaç ml suya değecek şekilde yerleştirilir.

Su buharı yollarken, biyolojik maddenin bulunduğu distilasyon balonu da kaynama noktasına kadar yavaş yavaş ısıtılır. Fosforesansın gözlenebilmesi için distilasyon işlemi karanlık bir odada yapılmalıdır. Fosforesans-soğutucudaki suyun sıcaklığına bağlı olarak genellikle soğutucunun üst kısmında - parlak bir halka şeklinde görülür. Bu deneyle 200 ml çözelti içindeki 30 - 60 µg (mikrogram) fosfor tanınabilir.

Fosfor çok miktarda olduğunda, distilatın toplandığı kaptaki damlalar şeklinde birikir. Bu fosfor karbon sülfürle ekstrakte edilerek konsantre edilir. CS₂ in uçurulması ile karanlıkta ışıldayan bir bakiye elde edilir.

Etil alkol, eter, asetik asit, fenol, kloroform, kloralhidrat kükürtlü hidrojen, terpenit ve diğer eterik yağlar, metal tuzlarını bulunması fosforansı önlerler. Bu nedenle distilatta fosfor aranarak kesin sonuçta varılır.

c) Distilatta fosfor aranması

Su buharı distilasyonu ile elde edilen distilat 4 - 5 kısma bölünerek her birinde aşağıdaki deneyler uygulanır :

i — 20 ml distilata, 5 ml % 10 AgNO₃ ilâve edildiğinde kahverengi çökeleğin meydana gelmesi fosfor olduğunu gösterir (Ag₃P).

ii — 20 ml distilat 5 ml konsantre nitrik asit ilâvesiyle, ortofosfata oksitlenir. 1 ml % 10 amonyum molibdat ilave edildiğinde, kanarya sarısı çökeleğin meydana gelmesi fosfor ile ilgilidir (amonyum fosfomolibdat)

iii — 20 ml distilat, 5 ml konsantre nitrik asitle ortofosfata oksitlenir. 1 ml % 10 AgNO₃ ilâve edildiğinde kanarya sarısı çökelek meydana gelirse fosfor bulunduğu anlaşılır (gümüş fosfat).

d) Gutzeit apareyinde fosfor aranması :

Fosfin (PH_3), arsin (AsH_3) gibi HgCl_2 veya HgBr_2 ile emprenye edilmiş kağıdı sarartır. Bu nedenle Gutzeit deneyi, fosfor aranması için de kullanılır.

Asit ortamda biyolojik madde distile edilerek, distilat 5 ml % 10 AgNO_3 içinde toplanır. Distilasyona 75 ml oluncaya kadar devam edilerek ayrılır. Fazla AgNO_3 az miktar su ile çökeleğin yıkanması ile uzaklaştırılır. Ag_3P Gutzeit apareyine (Gutzeit deneyine bakınız) konur. 10 ml % 20 sülfirik asit ilâve edilir. HgBr_2 ile emprenye edilmiş kağıt cam kanatları arasına yerleştirildikten sonra aparey kapatılarak 30 dakika çalışmaya bırakılır. Filtre kağıdında kanarya sarısı rengin meydana gelmesi fosfor olduğunu gösterir (destekleyici deney). Renk şiddeti standartlarla karşılaştırılarak istenildiğinde, deney kantitatif amaçla da kullanılabilir.

8. KARBON MONOKSİT : CO

Karbon monoksit ile zehirlenme solunum yolu ile olur. Başlıca kaynaklarını havagazı, sentetik gaz (su gazı), jeneratör fırınları, egzoz gazı ve tam yanmamış yakıtların dumanı oluşturur.

Kullanıldığı yer : Yakıt, aydınlatma gazı.

MLD : % 40 Karboksihemoglobin satürasyonu meydana getirecek miktar. Karbon monoksit kanda hemoglobin ile birleşerek karboksihemoglobin (COHb) meydana getirir. Kanda oksijen yerine karbonmonoksitle birleşen hemoglobin yüzdesine «**Kanın satürasyon yüzdesi**» veya «**karboksihemoglobin satürasyon % si**» denmektedir. Kanda COHb satürasyonu % 20 üstünde olduğunda akut zehirlenme belirtileri başlar. Bu değer % 40 a ulaştığında koma ve ölüm görülebilir.

a) **Kanda % 20 ve üstündeki COHb satürasyonunun saptanması**

i — İki küçük porselen kapsül alınır. Birine 1 ml zehirlenme şüphesi olan kan, diğerine normal kan konur ve su banyosunda ya-

vaşça ısıtılırlar. Normal kan kömürleşerek kahverengi - siyah renk aldığı halde, diğeri tuğla kırmızısı renkte kalır (% 40 COHb satürasyonu saptanabilir).

ii — 1 damla, nümune kan, bir tüpte 10 - 15 ml su ile seyreltilir. Aynı şekilde seyreltilmiş normal kan ile karşılaştırılır. Karbon monoksit bulunan kanın rengi pembedir. (% 50 ve üstünde satürasyon olduğunda).

Bu seyreltilmiş nümunelerine, 5 er damla % NaOH ilâve edilerek karıştırılır. Normal kan, hemen saman sarısı renge dönüştüğü halde, CO miktarı ile orantılı olduğundan kantitatif tayin de yapılabilir. Bu deney spesifik (CO için özel) olup, % 20 COHb tanınabilir.

b) Piro-tannik asitle COHb % si tayini :

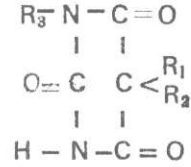
Yarı kantitatif özel bir deney olan bu testle % 20 ve üstündeki COHb satürasyonu saptanabilir. Bunun için 1 ml kan cam kapaklı 25 ml lik bir tüp veya mezür içinde 9 ml su ile seyreltilir. 10 ml pirotannik asit çözeltisi ilâve edilir. Tüpün ağzı kapatılır ve çalkalandıktan sonra 15 dakika bekletilir. Normal kan gri kahverengi bir çökelek verdiği halde, CO ihtiva eden kan pembe renk alır. Rengin şiddeti satürasyon % sine bağlıdır. Renk şiddeti belli miktarda CO ihtiva eden kan nümuneleri ile hazırlanmış standartlarla karıştırılarak miktar tayini yapılır.

Not : a) Piro-tannik asit hazırlanması : 1 gr pirogallik (pyrogallik) asit ve 1 gr tannik (tannic) asit 100 ml suda çözülür.

b) CO ihtiva eden kan standartlarının hazırlanması : Normal kan % 100 COHb verecek şekilde saf CO ile doyurulur % 20 - 100 COHb ihtiva eden standartlar uygun miktarda normal kanla seyreltilerek hazırlanır. Deney kısmında olduğu gibi, normal kan ve COHb ihtiva eden standart kanlarla, pirotannik asitle çöktürme işlemi yapılır. Bu standartlar ağızları sıkı kapalı olarak karanlıkta saklanırsa 6 ay bozulmadan kalabilir.

II. UÇUCU OLMAYAN ORGANİK ZEHİRLERİN BİYOLOJİK MATERYALDEN İZOLASYONLARI ve TANIMLARI

I. BARBİTÜRATLAR :



Barbitürik asit türevleri hiptonik, narkotik ve antikonvülzan olarak kullanılan geniş bir ilâç gurubudur. Malonil üre yapısında olan barbitüratların özellikleri, R₁, R₂, R₃ ve radikallerine göre değişir.

Özellikleri : Genel olarak barbitüratlar kokusuz, acı lezzette beyaz kristal toz halindedir, zayıf asit yapısında olup, suda çözünmezler.

MLD : Barbitürat çeşitlerine göre 1-6 g/70 kg insan arasında değişir. Kısa etkililer daha çok, uzun etkililer ise daha az toksiktir.

a) Biyolojik materyalden barbitüratların izolasyonu ve tanınmaları :

İdrardan izolasyonları : Barbitüratlar idrardan asit ortamda ekstraksiyonla izole edilirler.

100 ml idrar bir ayırma hunisine konularak N HCl veya seyreltik H₂SO₄ ile pH 3 e getirilir. 2 defa 50 ml eterle ekstrakte edilir. Eter ekstraktları 2 katlı kuru filtre kağıdından süzülerek eser miktardaki suyun uzaklaştırılması sağlanmış olur. Eter fazı ılık su banyosunda uçurulur.

Kalıntı sarı renkte ise, 15 ml kloroformda çözülür. Az bir miktar (kibrit çöpü başı büyüklüğünde) hayvansal kömür konarak karıştırılır. Karışım küçük bir behere süzülür. 1-2 ml kalıncaya kadar uçurulur.

Kloroform ekstraktında barbitüratların aranması :

i — **Parri deneyi** : Bir kaç damla kloroform ekstresi mikro bir tüpe konur. 2 damla % 1 kobalt nitrat veya kobalt asetat (susuz metil alkolde hazırlanmış) ilâve edilir. Karışıma 3 damla % 5 izopropilamin (susuz metil alkol içinde) yavaşça damlatılır.

Mavi - viyole rengin belirmesi barbitürat mevcudiyetini gösterir **Dilantin, doriden** ve **diğer üreidlerle** de reaksiyon pozitifdir. Fenobarbital, kobalt tuzu ile ancak izopropilamin ilâvesiyle mavi renk verir. Diğer barbitüratlar ise kobalt nitrat (veya asetat) ile mavi renk verirler ve bu renk izopropil aminle şiddetlenerek leylâk rengine döner.

ii — **HgNO₃ ile çökme deneyi** : Kloroform kalıntısından bir miktar alınarak suda doymuş çözeltisi hazırlanır. 1 damla (Hg + HNO₃) reaktifinden damlatılır. Fenobarbital (luminal), noktal (noctal), fanadorm (phanadorm), veronal ile beyaz bir çökelek meydana gelir. Evipan (heksobarbital), prominal ile çökelek olmaz.

iii — **KMnO₄ ile redüksiyon** : 0.2 g kadar kalıntı, 2 ml su ile ısıtılır, ve soğuduktan sonra süzülür. Süzüntüde, doymamış bağlı radikaller ihtiva eden barbitüratlardan (evipan, noktal, fanadorm gibi) varsa, iki damla % 0,1 KMnO₄ çözeltisi damlatıldığında, bir dakika içinde permanganatın rengi kaybolur.

Luminal, veronal, prominal ise çift bağlı radikalleri olmadığından indirgenmezler

b) Barbitüratların İ.T.K. ile aranmaları ile ayrılımları :

İdrardan yukardaki teknikle izole edilen kalıntıların İ.T.K. ne uygulanarak hangi barbitürat olduğunu tanımlamak mümkündür, İ. T. K. ile, daha az miktarda idrarla (20 ml) sonuç alınabilir.

Bu nedenle aşağıdaki kendi laboratuvarımızda uyguladığımız ekstraksiyon ve İ.T.K. tekniği verilmiştir.

i — Gerekli cihaz ve reaktifler :

1. Saf aktif maddeler : (Metanolde % 0.1 lik)

Barbital (Dietyl barbitürik asit)

Phenobarbital (Etilfenil barbitürik asit)

Pentobarbital (Etilpentil barbitürik asit)

Phanadorm - (İpnos) (Siknohekzenil etil barbitürik asit)

Itobarbital (Allil isobutil barbitürik asit)

2. Püskürtme reaktifleri :

a) % 2 HgNO₃ (% 1 HNO₃'te)

b) % 0,1 Rhodamin B (Etil alkolde)

Kullanılmadan önce (a) ve (b) eşit hacimde karıştırılır.

c) % 0,04 Flourscein (Etil alkolde)

3. Developman çözeltileri :

a) Kloroform : absöü etanol : % 25 NH₃ : (50 : 40 : 10) hacmen (D₁)

b) (Kloroform : aseton : % 25 NH₃) : (40 : 72 : 8) hacmen (D₂)

4. DESEGA ince tabaka kromatografisi (İ.T.K.) takımı

5. Mikropipetler (0,02 ml lik)

6. Ultraviyole lambası (366 nm)

7. Adsorban tabaka

Silikagel-G (İ.T.K. için) - 250 mμ (Stahl'a göre aktive edilmiş)

8. Santrifüj ve 100 ml'lik tüpleri

9. Sitrata tamponu (pH 2,2)

10. Aktif kömür (Hayvansal)

İİ — **Teknik:** 20 ml idrara, 10 ml tampon (pH 2.2) ve 15 ml kloroform ilâvesinden sonra cam kapaklı bir erlenmayerde 15 dakika sık aralarla çalkalanır. Santrifüj tüpüne aktarılarak 1500 r.p.m de 30 dakika santrifüj edilir. Kloroform fazı ayrıldıktan sonra, aynı işlem 15 ml kloroform ile tekrarlanır. Birleştirilen kloroform fazları 500 mg aktif hayvansal kömürle 5 dakika kadar çalkalanır ve süzöldükten sonra da oda ısısında uçurulur.

Kalıntı pek az metanolde çözülererek, adsorban tabakaya 20 μl kadar nümune uygulanır (İ.T.K. için s: bakınız). Developmandan sonra kromatogramlarının değeriendirilmesi için yalnız HgNO₃ veya HgNO₃ ve arkadan (HgNO₃ + Rhodamin B) reaktifi püskürtölür. Barbitüratlar HgNO₃ ile beyaz leke verir (duyarlık 5 μg). HgNO₃ ve (Rhodamin B + HgNO₃) reaktiflerinin kombine uygulamasında ise pembe-viyole renk elde edilir. Aşağıda tabloda bazı barbitüratlarla elde edilen R_f değeri gösterilmektedir.

Tablo — VII

Bazı developman çözeltileri ile barbitüratların sillkagel -G tabakada verdikleri R_f değerleri.

<u>Barbitüratlar</u>	<u>R_{f1}</u>	<u>R_{f2}</u>
Fenobarbital	0.45	0.25
Barbital	0.59	0.30
Fanodorm	0.66	0.32
Itobarbital	0.68	0.38
Pentobarbital	0.78	0.48

Not : R_{f1} : D_1 ile; R_{f2} : D_2 ile elde edilen değerler.

İstenildiğinde, belirli miktar standartların İ.T.K. da verdikleri leke alanları, nümune alanı ile karıştırılarak yarı kantitatif bir değerlendirme yapılabilir.

c) Ultraviyole spektral analiz ile barbitüratların kanda aranmaları :

5 ml kan, 1 damla % 5 H_2SO_4 ile hafifçe asitlendirilir, 25 ml kloroform ile ekstrakte edilir. Kloroform fazı, kuru bir filtre kağıdından süzöldükten sonra 5 ml 0.5 N NaOH ile çalkalanır. Santrifüj edilerek kloroform damlacıklarından kurtarılır. 5 N NaOH e karşı UV alanında spektrumu çizilir.

Barbitüratlar 255 nm de maksimum, 235 nm de ise minimum absorpsiyon göstermeleri ile karakterize edilirler. (Yalnız pentotal 300 nm de maksimum ve 260 nm de minimum absorpsiyon verir). Bu yöntemle 5 ml kanda 2 μg barbitürat tanınabilir. UV yöntemi barbitüratların kanda tayinleri için de kullanılır.

Sonuçların değerlendirilmesi : Uzun etkili barbitüratların organizmadan atılmaları yavaştır. Bu nedenle barbital, fenobarbital alındığında, 1 hafta ve daha uzun müddetle kan ve idrarda teşhis edilebilir. Koma halinde kanda % 9 mg civarında bulunurlar.

Delvinal, amital gibi barbitüratlar ise orta etkili olup, koma halinde kan seviyeleri %4 mg dir. Pentobarbital, nembotal ise kısa etkili olup kandaki seviyeleri %2 mg olduğunda koma görülür.

2. ALKALOİDLERİN ARANMALARI VE TANINMALARI

Alkaloidler ve sentetik benzerleri, kavevi ortamda kloroform ile ve amfoter özellikle olanları ise NH_3 lı ortamda kloroformla ekstrakte edilirler.

Organik faza geçen alkaloidlerin aranması için, kloroform ekstresinin dikkatle uçurulması gerekir. Morfin, kokain ve akonitin gibi bazı alkaloidler ısıya dayanıklı değildir. ayrıca uçma ile kaybı önlemek için ekstrakta bir damla HCl ilâve edilmelidir. Alkaloidlerle zehirlenmede, kendilerinin ve metabolitlerinin aranması için en uygun biyolojik madde, idrardır.

Alkaloidlerin tanınmaları

a) Çöktürme reaktifleri :

Alkaloidler baz karakterinde olup, genellikle çift tuzlarla, çok değerli asitlerle veya bazı soy metal tuzları ile çökerler. Çoğu bu çöktürücü reaktiflerle renk ve yapı bakımından karakteristik kristaller meydana getirirler.

Dragendorff reaktifi (KIBiI_3) : Alkaloidlerle portakal rengi çökelek verir.

Mayer reaktifi (K_2HgI_4) : Genellikle alkaloidler beyaz veya açık sarı renkli çökelek verirler. Kolşisin veya kafein bu reaktifle çökmez.

Solanacea alkaloidleri, nikotin, morfin ve koniinin ise ancak derişik çözeltide kızılımsı kahverengi çökelek verirler.

Pikrik asit (doymuş) : Alkaloidler sarı renkli pikratları vererek çökerler. Morfin çökmez.

Bu çöktürme reaktifleri dışında Wagner (I_2 çözeltisi), Marme ($\text{CdI}_2 + \text{KI}$), AuCl_4 , H_2PtCl_6 , Scheibler (Fosfotungstik asit), Schulze (fosfoantimonik), Sonnenschein (Fosfomolibdik asit) reaktifleri de vardır.

Teknik : Kalıntıya, 1-2 damla çöktürme reaktifi ilâve edilir. Çökelek olup olmadığı ve çökeltilinin rengi incelenir.

Alkaloid çöktürme reaktifleri genellikle alkaloidleri, diğer uçucu olmayan organik zehirlerden ayırt etmeye yarar. Ancak nötral karakterdeki ilâçlardan antipirin ve piramidon da bir çok alkaloid reaktifleri ile çökerler.

b) Çökme reaktifleri ile alkaloid oldukları anlaşılan kalıntının, renk reaktifleri ile hangi alkaloid olduğu anlaşılabilir.

Aşağıdaki renk reaktiflerini sıra ile uygulayarak, alkaloidlerin guruplarını ve özel renk reaktifleri ile de kendilerini tanımak mümkün olur. (1 damla kalıntıya, 1 damla reaktif ilâve edilir).

1. gurup : Konsantre H_2SO_4 ile karakteristik renk verenlerdir. Tebain, narkotin, narsein, hidrastin, solanin, veratrin, kolşisin örnek verilebilir.

Kalıntı + 1-2 damla H_2SO_4 —> Sarı renk kolşisin ile; sarı-turuncu-majentaya değişen renkler veratrin ile meydana gelir.

2. gurup : Marquis reaktifi (5 ml kons. H_2SO_4 + 5 ml formaldehit) ile renk veren alkaloidleri içine alır. Bu guruptaki alkaloidler H_2SO_4 ile az veya hiç renk vermezler fakat Marquis reaktifi ile viyole renk tonları (morfin, apomorfin, heroin, kodein, dionin gibi), veya kiraz kırmızısı (lobelin) renk verirler.

3. Gurup : a) Vitali deneyi ile pozitif sonuç verenler : Atropa alkaloidleri (atropin, skopolamin, hiyosiyamin) örnek verilebilir.

Kalıntı + 3-4 damla dumanlı HNO_3 —> uçur ve soğukta, 1-2 damla KOH ilâvesinde viyole renk (Vitali testi: atropin ile)

b) Konsantre HNO_3 ile renk verenlere ise brusin, fizostigmin (ezerin) örnek verilebilir.

Kalıntı + 1-2 damla kons. HNO_3 —> Kırmızı renk (brusin)

4. Gurup : (Kons. H_2SO_4 + sulp $K_2Cr_2O_7$) ile renk verenler : Striknin, yohimbin, kurar gibi.

Kalıntı + (1-2 damla kons. H_2SO_4 + 1-2 kristal $K_2C_2O_7$ sarı, turuncu, viyöle renkler (striknin).

5. Gurup : H_2SO_4 le asitlendirilmiş p-dimetil amino benzaldehit ile renk veren alkaloidlerdir. Bunlar ya sıcakta (pilocarpin, nikotin, meskalin) veya soğukta (sentetik lokal anestetiklerden novakain, anestezin, pantokain ve stovain) renk vermelerine göre 2 alt sınıfa ayrılırlar.

Kalıntı + p-dimetil aminobenzaldehit ———> sarı, kenarlarda pembe (pilocarpin).

6. Gurup : Bu gruptaki alkaloidler, doğal haldeki klorla ya doğrudan doğruya veya amonyak ilâvesinden sonra renk verirler. Kinin, kinidin, kafein, emetin örnek verilebilir.

Kalıntı + (2-3 damla HCl + sulp 1-2 kristal KClO₃) ———> bakiyenin rengi kontrol edilir. Soğuk bakiye + 1-2 damla NH₃ veya buharı ———> rengi kaydedilir. (Kinin ile) kahverengi ve NH₃ buharından sonra yeşil renk meydana gelir.

Kinin için özel test :

2-3 damla kinin çözeltisi + 1-2 damla kons. H₂SO₄ + 1 ml. H₂O ———> (mavi flöresan), flöresan gidinceye kadar bromlu su (3-4) damlatılır ve NH₃ damla damla ilâve edilince yeşil renk görülür (Thalleiochin testi).

7. Gurup : Belirli bir gurup reaktifi yoktur. Ancak KMnO₄ ile karakteristik kristal vermelerine göre ikiye ayrılırlar. Kokain, psikain, tropakokain, akonitin, KMnO₄ ile karakteristik kristaller verirler. KMnO₄ ile kristal vermeyenlere (KMnO₄ ı hemen indirgerler) kinamil kokain, α-öykain (α-eucain), β-öykain (β-eucain) örnek verilebilir.

Ayrıca bu gurupta 3. bir alt sınıf olarak su buharı ile uçan alkaloidlerden koniin, lupinin ve arekolin vardır. Bunlar özel reaktifler ile aranılırlar.

Kokain aranması :

Kalıntı + 2-3 d. kon. HNO₃ ———> uçur ———> 2-3 alkollü KOH ———> Etil benzoat kokusu (Ayrıca mikrokristalizasyona bakınız).

c) Mikrokristalizasyon tekniği ile alkaloidlerin aranmaları :

Mikrokristalizasyon, bir maddenin kimyasal bir reaktifle verdiği çökeleğin, zamanla karakteristik kristaller meydana getirmesi ve bu

kristallerin mikroskop altında incelenerek tanınması prensibine dayanan genel bir tekniktir. Bir çok anorganik ve organik bileşiklere uygulanabilir.

Toksikoloji ve adli tıp gayesi ile alkaloidlerin tanınmasında mikrokristalizasyon tekniği kullanılabilir. Ancak diğer destekleyici (confirmatory tests) deneylerin de beraber yapılması gerekir.

Teknik :

Çok iyi temizlenmiş porselen bir kapsül alınır. İçine bir damla reaktif ve bir damla test çözeltisi damlatılır. Bir baget yardımı ile iyice karıştırılır. Karışımdan bagetle bir damla alınarak bir lamele tatbik edilir.

Lamel ters çevrilerek çukur lam üzerine kapatılır. Mikroskopta incelenir.

i) Kodein ve morfinin mikrokristalizasyon tekniği ile ayrılması

Kristal reaktifi: 0.4 ml $KI.I_2$ reaktifine 20 ml glacial asetik asit, 2.0 ml H_3PO_4 ilâve edilerek karıştırılır.

($KI.I_2$ reaktifi : 10 g I_2 , 35 gm KI ile birlikte 100 ml suda çözülür. Bu reaktif buz dolabında saklanır.)

Yukarıda açıklanan teknik uygulanır. 5-10 dakika sonra mikroskopla incelenir. Kodein üçgen şeklinde dikroik (çeşitli renkler gösteren) kristaller verir. Morfin ise, siyah iğneler halinde kümelenir veya kahverengi kırmızı levha veya koyu kırmızı şeklinde kristallenir (Duyarlık 10 mg civarındır).

ii) Kokain ile :

Reaktif : 2 g $KMnO_4$ 5 damla H_3PO_4 ilâve edilir ve su ile 100 ml ye tamamlanır.

Kokain $KMnO_4$ ile hafif asitli ortamda çok karakteristik kristal verir (bir kenarı kırık, dikdörtgen şeklinde).

3. NARKOTİKLER

Narkotikler, ilâç alışkanlığına sebep olan maddeler arasında olduğu için metabolitlerinin ve kendilerinin dokulardan izolasyonu ve tanıma yöntemlerinin geliştirilmesi analitik toksikoloji için çok önemlidir. Elde ediliş kaynaklarına göre narkotikler üç geniş sınıf altında toplanabilir :

- a) Tabii narkotikler
 - a) Kannabis (Cannabis : Marihuana)
 - b) Koka yaprağı (Coca leaf)
 - c) Opium
- b) İşlenmiş tabii kaynaklı narkotikler
 - a) Opiatlar (Morfin, eroin gibi)
 - b) Koka alkaloidleri (kokain)
- c) Sentetik narkotikler
 - opioidler (petidin, metadon gibi)

Narkotikler kalevi ortamda ekstrakte edilebilen organik zehirlerdendir. Burada örnek olarak morfinin ekstraksiyonu ve tanınması örnek alınmıştır.

Morfinin idrardan ekstraksiyonu ve tanınması

Gerekli reaktifler ve araç :

Silikagel-G (İ.T.K için)

Ekstraksiyon karışımı : 960 ml kloroform, 40 ml izopropanol ile karıştırılır.

Tampon çözelti : pH 9.5, 100 ml doymuş amonyum klorür çözeltisine pH 9.5 oluncaya kadar konsantre amonyak ilâve edilir.

Developman sistemi (İ.T.K. için) : 170 ml etil asetat, 20 ml metil alkol ve 10 ml konsantre amonyum hidroksitle karıştırılır.

Püskürtme reaktifleri :

- i) Dragendorff reaktifi
- ii) İyodoplatinat reaktifi

İ.T.K takımı

Kapiler pipetler (75 mm boy XI.2 — 1.3 mm çap)

UV lambası (kısa dalgalı : 254 nm).

Whatman No : 3, 15 cm çapında

Teknik : 10 ml idrara, 1 ml tampon çözeltisi (pH 9.5) ve 50 ml ekstraksiyon çözeltisi ilâve edilerek cam kapaklı bir erlenmayerde 5 dk. kuvvetle çalkalanır (daha iyisi bir çalkalama makinesi ile karışmayı yapmaktadır). Fazların ayrılması için beklenir. Organik faz ayrılarak kuru filtre kağıdından süzülür. Uçurma sonlarına doğru (amon-yak kokusu kalmayınca) 0.1 HCl den bir damla ilâve edilir. Kalıntı bir kaç ml metilalkolde çözülür ve 25 ml kalıncaya kadar uçurulur.

i) Ekstrakte edilmiş morfinin İ.T.K. ile aranması : Kalıntının hemen hepsi 250 ml kalınlığında hazırlanmış ve 105°C de 1 saat aktive edilmiş adsorban tabakaya tatbik edilir.

Ayrıca 10 µg morfin ilâve edilmiş normal idrar nümunesi de aynı işlemle ekstrakte edilir ve standart olarak adsorban tabakaya kapiler pipetle damlatılır.

Tabaka, çözücü yüksekliği 10 cm oluncaya kadar developpe edilir. Önce oda ısısında çözücü buharları uzaklaşmaya kadar bekletilir ve arkadan 75°C de dk. kurutulur. Soğutulduktan sonra renk reaktiflerinden biri püskürtülür. İyodoplatinat çözeltisi ile morfin koyu mor renk verir. (Duyarlık 5 µg)

Not : Morfinin büyük miktarı (% 90) glukronik asitle konjuge olarak atılır. İlk 8 saatte % 50 si, 54 saatte % 90 atılır. 48 saat sonra detekte edilebilecek kadar idrarda bulunur. Diasetil morfin (Diamorfin, heroin) nin de çoğu idrarla morfin glukuronid ve morfin şeklinde atılır.

Ekstrakte edilmiş morfinin alkaloid çöktürme reaktifleri ile aranması :

Kalıntı 1 ml kadar % 2 lik asetik asitte çözülür. Bir damla alınarak aşağıdaki reaktiflerle çökelti olup olmadığı ve çökeltinin rengi incelenir.

Asitli çözelti + Mayer r. ———> Beyaz çökelti
Asitli çözelti + Dragendoff r. ———> portakal renkli çökelti
Asitli çözelti + doy. pikrik asit ———> Çökelti yok (heroinden farklı)

iii) Ekstrakte edilmiş morfinin alkaloid gurup renk reaktifleri ile aranması :

Kalıntı + 1 damla konsantre H₂SO₄ ———> renk yok (ısı ile mor renk)

Kalıntı + 1 damla Marquis r. ———> kırmızı, viyole ve mavi viyoleye kadar değişen renkler (gurup reaktifi) (duyarlık 0.05 µg.)

Kalıntı + 1 damla % 1 FeCl₃ ———> mavi renk nötral ortamda; asit veya alkol ile renk bozulur.

iv) Ekstrakte edilmiş morfinin mikrokristalizasyon tekniği ile aranması :

(Bu konu için alkaloidler bölümüne bakınız).

III. METALİK ZEHİRLER

1. Bazı metallerin biyolojik materyalde yıkılmadan (doğrudan doğruya) aranmaları :

Reinsch deneyi :

Prensip : Reinsch deneyi biyolojik materyalde arsenik, civa gümüş, bizmut antimon, selenyum ve tellüryum, sülfür gibi metallerin aranması için uygulanan bir ön deneydir. Doğrudan doğruya yıkılama işlemi gerekmeksizin biyolojik madde (kan, idrar, doku) kullanılabilir. Bakır levha veya bakır spiral tel üzerinde toplanan metal veya metal karışımlarının kesin tanımlanmaları, Gettler ve Kaye tarafından geliştirilmiş bir seri kimyasal deneylerle (confirmatory tests) yapılır.

Teknik : Biyolojik materyal olarak mide içeriği, böbrek veya idrar kullanılabilir. 25 g doku Waring blender veya benzeri bir homojenizatörde uygun bir miktar su ile masere edilir. Nümune olarak idrar kullanılacaksa 10 ml, organ içeriğinden ise 10 g alınır.

Bir erlenmayer içine konulan biyolojik madde üzerine 3-5 ml kons. HCl ilâve edilir, nümunenin asit konsantrasyonu % 2-8 arasında kalmalıdır.

Deneyin yapılışı :

1 cm² den daha büyük olmayan bir bakır levha kullanılır. Bakır levhayı tutmak için platin veya nikrom telden yararlanılır. Bakır levha (1:1)seyreltik HNO₃ içine ve sonra distile su içine daldırılarak temizlenir. Bakır levha asitli karışım içine daldırılır ve nümune kaynar su banyosu üzerinde 1-2 saat ısıtılır. (bizmut 2 saat ister). Karışımın azalan hacmi, % 10 HCl ile ısıtma esnasında ilâve edilerek, tamamlanır. 1 saat sonra bakır levha alınır ve distile su ile yıkandıktan sonra levha, filtre kağıdı arasında bastırmadan kurutulur.

Bakır üzerinde toplanmış maddenin rengi, metalik zehirin cinsi hakkında bize ön bilgi verir. Şöyle ki :

- a) Tel üzerindeki gümüşü bir renk; **civa**,
- b) Parlak siyah renk; **bizmut**,
- c) Mat siyah renk : **arsenik**
- d) Mor renk : **antimon** olduğunu gösterir. (Bu test ile 20 ml çözeltilde bulunan 50 µg civa, 5 µg arsenik, 20µg antimon, 20 µg bizmut tanımlanabilir).

Bakır levha üzerinde toplanan metalin kesin tanımlanması

Civa aranması :

Bir saat camına filtre kağıdı yerleştirilir ve sırası ile: 1-2 damla (KI + Na₂SO₃) ve 1-2 damla % 5 CuSO₄ ilâve edilir. Distile su ile yıkanmış ve kurutulmuş bakır levha bu karışım üzerine konur. Saat camı ile kapatılır. 1 saat bekletilir. Bakır levha üzerindeki birikinti civa ise, sarı kırmızı bir renk belirir.

Bizmut aranması

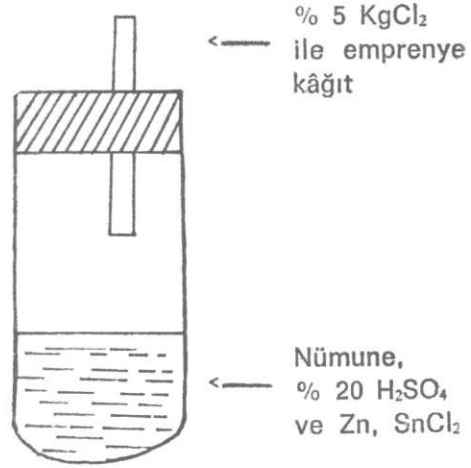
Hg aranmasından sonra bakır levha alınır bir tüpe konur. Üzerine sırası ile 1 ml % 5 Na₂SO₃, 1 ml HNO₃ % 15 konarak karışım 5 dakika çalkalanır. Bizmut varsa çözeltiye geçer. Çözelti diğer bir tüpe aktarılır. Üzerine 1 ml. H₂O, 1 ml kinin-KI reaktifi ilâve edilir. Bizmut olduğunda turuncu renk oluşur.

Arsenik ve Antimon aranması :

Bakır levha 0,5 ml % 10 KCN ile çalkalanır. As çözeltiye geçer. Bu nedenle çözeltide As, bakır levhada ise antimon Gutzeit testi ile aranır.

Gutzeit Deneyi

i) Gutzeit deneyi en basit şekli ile bir tüp içinde yapılır. (Şekil 20). Deney tüpünün içine 1 ml. çözelti (veya kalıntı olan bakır levha) 1 ml. % 20 H₂SO₄, 1-2 saf granül çinko, 1-2 damla SnCl₂ ilâve edilir ve tüpün ağzı sıkıca bir mantar tıpa ile kapatılır. Arsenik varsa, mantarın kenarındaki % 5 HgCl₂ veya AgNO₃ ile emprenye edilmiş filtre kağıdında konsantrasyona bağlı olarak sarı turuncu kahverengi siyah renge kadar değişen renk tonları (AgNO₃ ile siyah) görülür. Gutzeit testi, antimon mevcudiyetinde de pozitif sonuç verir. Fakat bu halde meydana gelen renk sarı-siyahtır ve renk daha geç meydana gelir. Ayrıca kons. HCl dumanları ile temasta, antimon ile meydana gelen renk kayb olduğu halde arsenik ile meydana gelen renk sabit kalır.



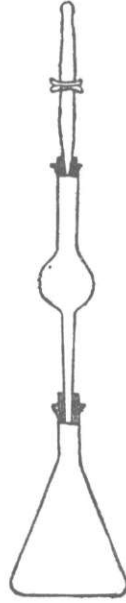
Şekil 20 — Gutzeit deneyinin basit uygulaması

ii). Bu deney As ve seyrek olarak ta Sb aranması ve tayini için kullanılır. Reinsch deneyinden sonra Hg ve Sb nun ayrılmasından sonra elde edilen KCN lü çözelti (As için) veya bakır levha Gutzeit deneyi için kullanılabilir. Organik maddeleri yıkılanmış, idrar, kan, saç, tırnak gibi biyolojik materyal çözeltisi (asit dijestiyon) de kullanılabilir. Yarı kantitatif teknikte, şekil 21 deki aparey kullanılır.

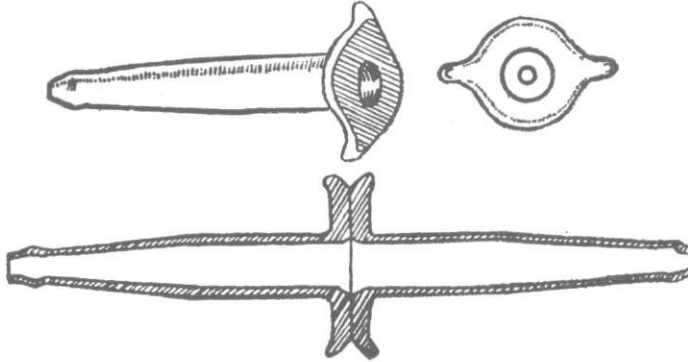
Prensip :

(Zn + H₂SO₄) karışımı ile meydana gelen AsH₃ ün, filtre kağıdına emdirilmiş HgCl₂ veya HgBr₂ ile sarı-turuncu-kahve rengeye kadar değişen renkler vermesine dayanır. Bu renkler AsH₃ ün Hg⁺⁺ tuzları ile As (HgCl)₃ ve As₂Hg₃ bileşiklerini vermesinden dolayıdır.

Deney : (Şekil 21 apareydeki erlenmayere :



20 ml. nümune, 20 ml % 20 ml H₂SO₄ 4 damla SnCl₂ % 1, 1-2 kristal CuSO₄ ve 5 g granüle çinko konur ve 1 saat oda ısısında bekletilir. Filtre kağıdında meydana gelen renk önceden, çeşitli miktarlardaki As nünuneleri (standart) ile hazırlanmış renk tonları ile (skala) karşılaştırılır. Böylece yaklaşık bir miktar tayini yapılabilir. (Duyarlık 5 µg arsenik bu deneyle tanınabilir).



Şekil 21 — Gutzeit apareyi

2. KURŞUN : Pb

Türevleri : Bütün suda çözünen kurşun tuzları (kurşun nitrat, kurşun asetat)

Kullanma Yerleri : Boya, akümülatör, benzinin katkı maddesi (geri tepmeyi önlemek için), seramik, porselen, alaşımlarda, insektisit, vulkanize kauçuk, kurşun su boruları, çocuk oyuncakları v.s yapımında.

Özellikleri : Kurşun ağır bir metaldir. Tuzları beyaz kristal halindedir. Tetraetil kurşun (TEK) ise sıvıdır, suda çözünmeyen tuzları midede suyunda çözünebilir.

MLD : Suda çözünen tuzları için 10 g/70 kg insan, TEK için bu değer 100 mg/70 kg insandır.

a) Kurşunun kan ve idrarda aranması ve tayini (ditizon yöntemi ile)

Prensip : Bu yöntemde kurşun pH 8 e ayarlanmış asit dijestiyondan, ditizon çözeltisi (kloroform) ile ekstrakte edilir. Ditizonun fazlası, seyreltik (NH₃ + KCN) karışımı ile uzaklaştırılır. Ekstraktaki Pb miktarı, ditizon-Pb kompleksinin spektrofotometrik olarak tayininden hesaplanır.

Reaktifler :

1 — %10 KCN çözeltisi (Stok) deiyonize suda hazırlanır.

2 — Amonyum trisitrat çözeltisi : 500 g madde 500 ml suda çözülür. Eser kurşunu uzaklaştırmak için, çözelti bir ayırma hunisinde, kloroformlu ditizon çözeltisi ile bir kaç kere çalkalanır. (kloroform fazının rengi yeşil oluncaya kadar). Kloroform fazı atılarak, sulu kısmı saklanır.

3. KCN tampon çözeltisi : 10 ml saf % 0.88 amonyak çözeltisine, 3 ml amonyum trisitrat, 100 ml kadar deiyonize su ve sonra 30 ml % 10 KCN ilâve edilir. Deiyonize su ile 1 litreye tamamlanır.

4. Amonyum sitrat tamponu : 50 ml % 0.88 amonyak, 30 ml amonyum trisitrat çözeltisi ile karıştırılır.

5. KCN yıkama çözeltisi : Bu ayırma hunisinde, 20 ml % 0.88 amonyak üzerine 2 litre su ve sonra 20 ml % 10 KCN konarak karıştırılır. Bir miktar kloroformda çalkalanır ve bir kaç dakika bekletilir. Kloroform fazı atılır. Böylece kloroformla doymuş hale getirilen KCN yıkama çözeltisi bir filtre kağıdından süzülür.

6. Ditizon çözeltisi : 25 mg saf ditizon 1 litre kloroformda çözülür. Karanlıkta ve serin bir yerde saklanır.

7. Standart karışım çözeltisi : (Kalibrasyon kurvu için)

a) Stok çözelti : 1.598 g saf kurşun nitrat % 0.1 HNO₃ ile litreye tamamlanır. (1 ml : 1 mg Pb)

b) Seyreltilmiş çözelti : 1 ml stok çözelti % 0.1 HNO₃ ile 100 ml tamamlanır. (1 ml : 10 µg Pb).

8. HNO₃ : Saf olmalı ve distillenmelidir.

Not : Kullanılan bütün cam apareylerin pyrex gibi kurşun ihtiva etmeyen iyi bir camdan yapılmış olması gerekir. Ayrıca temizleme sırasında en son konsantre nitrit asit, saf su ile arkadan amonyak ve su ile çalkalanarak, eser kurşununun uzaklaştırılması sağlanmalıdır.

Teknik : 20 ml idrar veya 2 ml kan, 1 ml konsantre H₂SO₄, 2 ml HClO₄ (% 60) ve 5 ml HNO₃ karışımı ile 100 ml lik bir Kjeldahl balonunda yıkılanır. Kaynatma işlemine 1 ml kadar çözelti kalıncaya kadar devam edilir. (SO₂ dumanları çıkıncaya kadar).

Asit dijestiyon çözeltisi soğutulur, 10 ml bidistile su ve 4 ml amonyum sitrat çözeltisi ilâve edilerek karıştırılır. Karışım kantitatif olarak ağız cam kapaklı fiyole (30 mm x 210 mm boyutunda) aktarılır.

Burada amonyum trisitat tamponu ile pH 8 e getirilir. 5 ml KCN tampon çözeltisi ve 8 ml ditizon çözeltisi ilâve ederek kuvvetle 30 saniye kadar çalkalanır. (Kloroform fazının yeşil kalması gerekir, rengin kırmızı olması, ditizon miktarının Pb ekstraksiyonu için yeterli olmadığını gösterir). Üst faz dekante edilir.

Pb-ditizon kompleksini içeren alt faz, 4-5 kere 10 ml KCN yıkama çözeltisi ile yıkanarak fazla ditizon uzaklaştırılır. Geriye saf Pb ditizon kompleksi kaldığı parlak kırmızı rengi ile anlaşılır. Bu rengin absorbansı 515 nm de aynı şekilde saf su ile hazırlanmış kör deneye karşı (blank) okunur. Değerlendirme kalibrasyon kurvundan yapılır.

Kalibrasyon : Önceden 0-40 µg arasında kurşun standartları ile yukardaki işlem tekrarlanarak bir kalibrasyon kurvu hazırlanır.

Sonucun değerlendirilmesi : İdrar nümunesi 24 saatlik olmalıdır. Sonuç µg/litre idrar olarak verilir. Genellikle 80 µg günlük idrar ve 50 µg/100 ml kanda Pb miktarı normal kabul edilir.

b) İdrarda Koproporfirin III aranması

Kronik kurşun zehirlenmesinin bir belirtisi de koproporfirin III artmasıdır. Bu nedenle kronik zehirlenmelerde, kan ve idrarda kurşun tayini ile beraber idrarda koproporfirin de aranır :

2 ml idrar (asit olmalıdır), 1 ml asetat tamponu (1 kısım doymuş sodyum asetat + 4 kısım asetik asit) ilâve edilir. 5 ml eterle çalkalanır. Eter fazının verdiği flöresans, Woodlight UV lambasında 3660 Å° (Angstrom) da incelenir. Pembe flöresansın görülmesi, sonucun pozitif olduğunu gösterir. Normal idrarla paralel çalışarak karşılaştırma yapmak gerekir.

3. TALYUM : TI

Türevleri : Talyum sülfat, talyum asetat.

Kullanma yerleri : Depilatör, fare zehiri, cam ve boya endüstrisi.

Özellikleri : İnorganik kristal bir tuz olup, bütün yollarla absorbe olabilir. Saç ve deride toplanır.

MLD : Yaklaşık 300 mg/70 kg insan.

a) İdrarda talyum aranması :

Prencip : Talyumun, asit dijestiyonda, Rhodamin B ile kırmızı flöresan bir kompleks bileşik vermesine dayanır.

Reaktifler :

Kadmiyum sülfat - % 2.5

Sodyum hidroksit - % 4 çözeltisi

Sodyum sülfür - kristal

Hidroklorik asit - 6 N

Brom çözeltisi : 10 g NaBr, 10 ml suda çözülür. 20 ml 6 N HCl ve arkadan 2.5 ml sıvı brom ilâve edilir. (Bu reaktif çeker ocakta ve dikkatle hazırlanmalıdır. **(Brom buharları solunum yolu ve cilt için çok tehlikelidir).**)

Sulfosalisilik asit : 1 kısım doymuş sulfosalisilik asit, 2 kısım 6 N hidroklorik asitle karıştırılır.

Rhodamin. B : konsantre HCl içinde % 0.05 lik çözeltisi hazırlanır.

Benzen

Teknik : 100 ml idrara 2 ml kadmiyum sülfat konur. 10 ml sodyum hidroksit içinde 0.25 g sodyum sülfür kristalinin çözülmesi ile elde edilen karışım, idrar bir bagetle karıştırılırken ilâve edilir.

Bir saat veya 1 gece bekletilir. Üst kısım atılır ve altta toplanmış sediment az miktar bir su ile dereceli santrifüj tüpüne aktarılır. Santrifüj edilir. 1 kısım sedimente 2 kısım 6 N HCl ilâve edilir. H₂S nin uzaklaşması için karıştırılır. Karışıma renk sarı kalıncaya kadar

damla damla bromlu su damlatılır. 5-10 dak. bekledikten sonra fazla brom, sarı renk gidinceye kadar sulfosalisilik asit çözeltisinin damlatılmasıyla giderilir. Soğutulan karışıma 0.2 ml Rhodamin B reaktifinden konulur, iyice çalkalanır. Bir ayırma hunisine alınarak 10 ml benzenle çalkalanır. Karışım santrifüj edilir. Talyum bulunduğu benzen fazı kırmızı flöresan veren bir renk alır. Bu deneyle 2 mikrogram talyum tanınabilir. Bu teknik kantitatif bir yöntem olarak kullanılabilir.

b) Talyumun idrar ve kanda doğrudan doğruya aranması

Prensip : $(TlCl_4)^-$ ün Brillant yeşili (Brilliant green) ile verdiği tuz yapısındaki bileşiğin benzen veya toluenle ekstrakte edildikten sonra, mavi yeşil renk vermesine dayanır. Bu renk 610 nm maksimum absorpsiyon gösterir (Duyarlık 0.1 μ g talyum).

Reaktifler :
Konsantre HCl
5 N HCl çözeltisi
N $NaNO_2$ çözeltisi

Brillant yeşili : % 1 (% 25 etil alkolde hazırlanmış)
Benzen veya toluen

Teknik : i) İdrar için : 2 ml idrara 2 ml konsantre HCl konarak, su ile 5 ml ye tamamlanır. 2 ml N $NaNO_2$ konur, çalkalanır ve 5 dakika bekletilir. Brillant yeşili reaktifinden 0.3 ml ilâve edilir. 15-30 saniye kadar çalkalandıktan sonra, toluen fazının yeşil rengi, talyum olduğunu gösterir. İstenilirse bu test kantitatif olarak kullanılabilir.

ii) Kan için : 0.1 - 0.2 ml kan, 0.8 - 0.9 ml su bulunan bir deney tüpüne konur. 4 ml 5 HCl ilâve edildikten sonra, 5 dakika kaynar su banyosunda bekletilir. Soğutulur ve su ile 5 ml ye tamamlandıktan sonra 2 ml N $NaNO_2$ ilâve ederek, deneye idrarda yapıldığı gibi devam edilir.

IV. ÖZEL OLARAK ARANMASI GEREKEN ZEHİRLER

1. ORGANİK FOSFORLU İNSEKTİSİTLER

Pestisitler genellikle bitkilerin yetişmesi, bitkisel besin maddelerinin depolanması esnasında zarar veren haşereler ve mikroorganizmalarla (böcek, kemiriciler, mantar, küf v.s.) savaş için kullanılan kimyasal maddelerdir.

Pestisitler arasında önemli yer tutan bir sınıf organik fosfor esterleridir. Çünkü bunlar kullanılmaları esnasında sıcak kanlılara olan toksisiteleri yüzünden çeşitli yollarla zararlı ve hatta ölüme sebep olabilmektedirler.

Analitik toksikoloji bakımından organik fosforuların (1) kullanıldıkları besin maddelerinde kalan miktarının müsaade edilen limit altında olup olmadığını tayin etmek ve (2) ayrıca zehirlenme olaylarında biyolojik materyalde aranması ve gerektiğinde miktar tayini yapmak önem taşır.

a) Organik fosforlu insektisitlerin izolasyonları :

i — Organik fosforlu insektisit kalıntıları bitkisel besin maddelerinden etilasetat gibi uygun bir çözücü ile ekstrakte edilir.

Kolon kromatografisi ile, yabancı maddelerden temizlenir ve sonra İ.T.K ile tanınmaları ve tayinleri yapılabilir.

ii — Hayvansal dokulardan (ölüm halinde) organik fosforlu insektisitleri ve metabolitlerini izole etmek için ön ekstraksiyon % 5 tartarik asitli ortamda alkolle yapılır. Duruma göre doğrudan doğruya benzen veya petrol eteri de kullanılabilir. Böylece uygun bir teknikle (ekstraksiyonla) ilk sınıflandırılması yapılan kalıntı etil alkol, etil asetat gibi bir çözücü içinde İ.T.K ne uygulanır. Burada bazı önemli organik fosforlu insektisitlerin preparatlarından (formülasyonlarından) izole ederek ince tabaka kromatografisi ile tanınmaları gösterilecektir.

b) Organik fosforlu insektisitlerin İ.T.K ile tanınmaları :

İnce tabaka kromatografisi takımı (Tank, yayıcı, püskürtücü, pl-pet gibi). UV. lambası

Renk reaktifi : a) % 1 AgNO₃ (3 : 1 oranında su + aseton karışımında)

b) % 0.5 bromfenol çözeltisi (asetonda); kullanılırken 100 ml (a) çözeltisi, 10 ml (b) çözeltisi ile karıştırılır.

Aseton

Al₂O₃ - G (TLC için adsorban madde)

(Benzen : aseton) : (80 : 20) developman sistemi

Asit sitrik % 1 lik (suda).

Teknik : (İ.T.K. hakkında, verilen ön bilgiye müracaat)

i) Önce adsorban tabaka Al₂O₃ - G ile hazırlanarak aktive edilir. Tabaka kalınlığı : 250 m μ .

ii) Formülasyonlardan organik fosforların izolasyonu :

Emülsiyon veya toz halindeki nümuneden 200 mg alınır. 10 ml asetonla sık sık çalkalanarak oda temperaturünde ekstrakte edilir. (Cam kapaklı bir erlen veya daha iyisi bir mezür içinde). Şartlar uygunsa bir gece bekletmek yerindedir. İcabında süzülerek belirli bir hacme (10 ml ye) tamamlanır.

iii) Nümunenin tabakaya tatbiki : Önceden hazırlanmış 0.04 ml nümune (kantitatif tayinde miktar önemli) çapları 5 mm yi geçmeyecek şekilde damlatılır. Oda ısısında kurutulur.

4) Adsorban tabaka, daha önceden developman sistemi konmuş ve çözücü atmosferi ile doymuş tanka yerleştirilerek genellikle çözücü yüksekliği başlangıçtan 10-12 cm yükselinceye kadar bekletilir. Developman zamanı ve oda sıcaklığı kaydedilir.

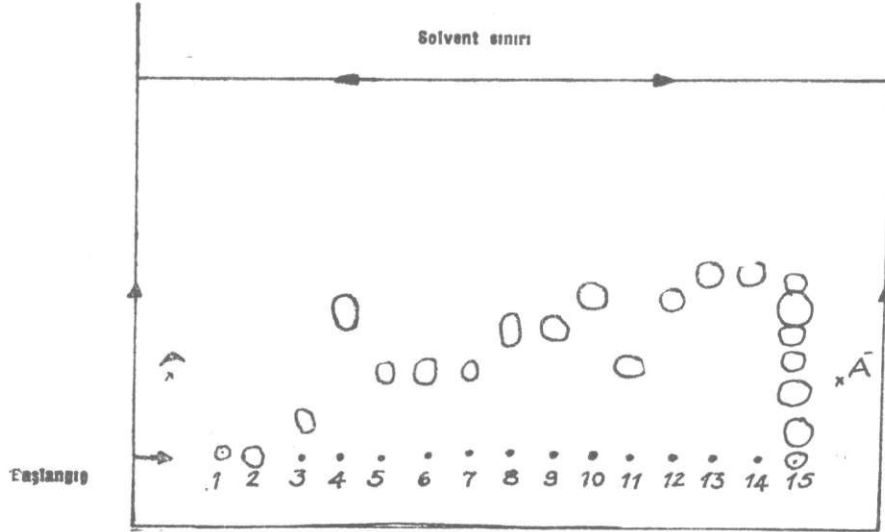
5) Tanktan çıkarılan adsorban tabaka oda temperaturünde kurutulur.

6) Kromatogramların belirli hale getirilmesi : Reaktif karışımı adsorban tabakaya püskürtülür ve levha 50 - 60°C de 10 dakika kurutulur. Mavi zemin üzerine tioorganik fosforlu insektisitler viyole renk tonları verir. Bu rengin belirgin hale gelmesi için, % 1 lik asit sitrik püskürtülerek veya levha brom buharına tutularak mavi olan zemin rengi giderilir.

Çok hafif renkli olan lekeler ise 5-10 dakika U.V. de bekletildiğinde belirgin hale gelirler.

7) Kromatogramların R_F değerleri saptanarak standartlarla karşılaştırılır. Böylece organik fosforlu insektisitlerin cinsi tesbit edilmiş olur.

8) Sonuçlar bir tablo halinde ve Şekil üzerinde gösterilir.
ÖRNEK :



Şekil : 22 Organik fosforluların İTK ile kromatogramları

Adsorban : Silikagel-G; Developman : (Hekzan + aseton : 80 + 20) ile 1 — Me-
tasystox 2 — Rogor 3 — Gusathion 4 — Diazinon 5 — Malathion 6 — Metil
parathion 7 — Delnav 8 — Parathion 9 — Lebaycide 10 — Thiometon 11 — Folithion
12 — Ethion 13 — Trithion 14 — Phenkapton 15 — Karışım renk reaktifi : Renk
R. (Bromfenol mavisi + AgNO₃)

Tablo VIII. Bazı organik fosforlu insektisitlerin R_f leri

Madde	R _f	Renk reaktifi ile elde edilen renk
Rogor	0.10	Mavi
Gusation	0.10	viyole
Paration	0.34	mavi viyole
Diazinon	0.39	mavi viyole

Tablo VIII bazı organik fosforlu insektisitlerin R_f leri verilmiştir.

c) Paration (parathion) zehirlenmesinin teşhisi :

Organik fosforlu insektisitlerin arasında paration en toksik olanlar arasına girer.

Sinonimleri : E-605-Niran, Thiophos, Dietil-p-nitrofenil trifosfat, harp gazı, sinir gazı.

Özellikleri : Sarımsı renkte bir sıvı; su kerozen veya benzende çözünmez; alkol, aseton ve ksilende çözünür. K.n 375°C.

MLD : Çok toksik 15 mg/70 kg insan için

İdrar ve kanda p-nitrofenol aranması :

Parationun idrarla atılan metaboliti **p-nitrofenoldür**. Bu nedenle paration zehirlenmesinde, idrar ve kanda p-nitrofenol aranır. Bunun için idrar önce su buharı akımında distillenir. Distilat % 30 NaOH ile kalevilendirilir. Kuvvetli sarı renk meydana gelmesi p-nitrofenol olduğunu gösterir (Max. λ 276 nm)

Not : % 0.01 mg veya üstünde bir miktarda idrarda p-nitrofenol bulunması tehlikeli miktarda parationa maruz kalındığını gösterir. Akut zehirlenmelerde ve ölüm olaylarında bu miktar % 0.16-1.16 mg arasında değişir.

ii — **Kanda p-nitrofenol aranması :** 3-5 ml kan, aynı hacimde % 20 trikloroasetik asitle muamele edilerek proteinler çöktürülür ve süzülür. Süzüntü iki tüpe bölünür. Tüplerden birine % 30 NaOH den 4-8 damla damlatılır. Eğer yeter derecede p-nitrofenol varsa, soğukta bile süzüntü sararır. Diğer tüpün rengi ile karşılaştırılır.

Renk şiddetine göre p-nitrofenol miktarı yaklaşık (yarı kantitatif) tayin edilebilir :

Açık sarı renk % 1 mg,

Sarı renk % 2-5 mg,

Koyu sarı renk (doymuş pikrik asit rengi) % 5 mg üstünde kanda p-nitrofenol olduğunu gösterir. Akut paration zehirlenmesinde kandaki p-nitrofenol miktarı % 5 mg üstündedir. Subtoksik dozda bir paration absorpsiyonunda ise, % 1 mg altında p-nitrofenol bulunur.

Biyolojik maddede paration aranması :

50 g nümune (doku veya organ sıvıları) % 96 etil alkol (200 ml) ve 100 ml distile su ile karıştırılır. Alkol yüzdesi % 80 altına düşmemelidir. Karışım 24 saat oda ısısında bekletilir. 2500 rpm de 10 dakika santrifüj edilir.

Alkollü ekstrakt, bir kapsüle aktarılarak uçurulur. Bakiye % 96 etil alkolle süspansiyon haline getirilir, süzülür ve tekrar uçurulur. Kalıntı mutlak alkolde çözüldükten sonra süzme uçurma işlemi tekrarlanır. Kalıntı 20 ml distile suda çözülür ve % 5 tartarik asitle asitlendirilir. Bir ayırma hunisine aktarılarak 3 defa 30 ml petrol eteri ile ekstrakte edilir. Petrol eteri fazları birleştirilerek sıcak hava akımında uçurulur.

Elde edilen kalıntı 0.5- 1 ml etil asetatda çözülerek, belirli bir miktar İ.T.K ile parationun aranması için kullanılır.

C. BİYOLOJİK DENEYLER

Sıcak ve soğuk kanlı hayvanlar, irili ufaklı çeşitli canlılar, protozoer yaratıklar, doku kültürleri toksikolojik araştırmalarda izlenecek kimyasal ayırım yöntemini veya tanımayı sağlama amacına ulaşmak için çok yararlı görev yapmaktadırlar.

Bu canlılardan bazıları her zaman kolayca elde edilebildiği gibi içlerinde özel yetiştirme, bakım ve devamlılığı oluşturacak olanaklara zorunluluk gösterirler.

Biyolojik deneylerde kullanılan hayvanlar özel hallerde çok spesifik, belirgin reaksiyonlar gösterirler. Kimyasal yolla ulaşılamayan tanıma, aktiviteyi saptamada, çok saf olmayan analiz materyalini değerlendirmede yardımcı olurlar. Biyolojik standardizasyon, toksisite (akut, kronik, teratojenik aktivite) ilaç ve zehirlerin metabolitlerinin saptanmasında kendilerinden yararlanma zorunluğu da vardır.

Burada laboratuvar olanaklarımızın yettiği ölçüde bazılarında söz edilecektir. Daha geniş uygulamalar özellikle izole organlarla çalışmalar farmakolojik denemelerin konusuna girer.

I. Kurbağa

Bütün hayvan digital preparatlarının miktar tayininde kullanılır.

Uyarıcılar : Striknin % 0,2 lik çözeltisinden göğüs lenf kesesine 0,5 ml miktarında enjekte edildikten birkaç dakika sonra uyarılmalara kasılma ile karşılık verir. Erkeklerde ön ayaklar kavuşur, dişide ise gerilir.

Fenol : % 0,5 fenol çözeltisinden 0,6 ml göğüs lenf kesesine enjekte edildikten 15 ilâ 20 dakika sonra zaman zaman ve kısa aralıklarla oluşan ve bazan bir taraf bazan diğer tarafta görülen titreme ve kasılmalar, uyarılmalarda klonik kramplara ve çömelik oturuşa döner.

Pikrotoksin : % 0,1 lik çözeltiden 0,5 ml lik enjeksiyonlar bacakların yana açılması ile belirgin görünüş alırlar.

Kardiyazol : % 1 lik çözeltiden 0,7 ml/40 g kurbağa 15 dakika sonra (bazan biraz daha geç) ekseriya bağırmalarla birlikte kramplar ve ön ve arkaya doğru çeşitli hareketlerle birlikte pikrotoksin duruşu, sırt üstü dönmelerle birlikte vücut köpükle kaplanır, belirtiler birkaç saatte kaybolur.

Morfin : % 3 lük sulu çözeltiden 1 ml şırınga edilmesinden sonra dokunma ile bacakların sıkılması, sırt üstü çevirme denemeleriyle baştan başlayıp arkaya doğru oluşan santral sinir sistemi felç belirtileri görülür. Önce kendiliğinden oluşan hareketler kalkar, koordinasyon bozuklukları, anormal oturuşlar, beceriksiz sıçramalar sonra görülmez olur, sırt üstü yatar kalır ve solunum durmuş görünüştedir. Tetanik kramp, reflekslerin kaybolması ve felç hali oluşur.

Nikotin : % 0.1 lik çözeltiden 1 ml deri altı verildikten bir kaç dakika sonra santral etki ile karakteristik ön ayaklar (parmaklar açılmış olarak) ve arka ayaklar öne doğru gergin oturuş hali bazan arka ayaklar sırtta birbirine kavuşur görünüşle karakterize vücut duruşu, hayvan yirmi dört saat sonra normalleşir.

Kürar : % 0.8 tuzlu su ile % 1 lik ana kürar çözeltisi kullanılacağı zaman 1:10 sulandırılır ve 0.1 ilâ 0.2 ml sırt lenf kesesine enjekte edildikte hayvan hareketsiz olarak 24 saat kalır.

Uretan : % 10 luktan 1 ml göğüs lenf kesesine verildikten 5 ilâ 10 dakika sonra hayvan sırt üstü çevrildikte eski haline dönemez, göğüste solunum belirtisi görülmez olur.

Kurbağanın izole organları ile çeşitli araştırmalar yapılabilir :

Göz : Pupil (vejetatif fonksiyonlar) üzerinde etkiyen sempatik ve parasempatik ilâçlar incelenir.

Kalp : Akonitin, digital etkileri kalp üzerinde incelenir.

Kurbağanın çeşitli kas preparatları, örneğin :

Rektus abdominis : asetik kolin, ezerin, kolinesterazinhibisyonu, d-tubokurarin.

Kalp pervüzyonu : Venöz basınç, kalsiyum, adrenalin ve üabain.

Aort : Kan damarına etkiyen ilâçlar.

Beyaz fare (ve kobay) : Akonitin (A. napellus), protoveratrin ve veratrin, Delphinium staphisagria (genel ekstrakt kalıntısı), Rhododendron (Flavum ve ponticum), zehirli bal etken maddeye göre ayarlanılabilen sulu çözeltilerin deri altına 0,5 ml verildikten 10 ilâ 15 dakika sonra «**Özel respirasyon belirtisi**» ile karakteristik kusma hareketine benzer solunum belirtisi gösterirler.

Opium ekstraktları ve morfin :

0,02 mg/Kg deri altı verilmesiyle kuyruğun sırtın üstünde yatay durumu veya (S) şeklinde kıvrılmış duruşu (Straub fenomeni) özeldir.

Bütün analeptik maddeler uyarma, çirpınma ve kramp gösterirler, Örneğın :

Kardiyazol 1 mg/25 g İ.P.

Striknin 0.02 mg/20 g Sbc.

Kafein ofisinel çözelti 0.3 ml/15-20 g fare.

Pupil : Enjeksiyon veya göze damlatma ile pupil üzerinde etkiyen maddeler hatta pupil çapının ölçülmesi ile bu maddelerin kantitatif tayinlerde bile kullanma olanağı vermektedir.

Kanlı gözyaşı (Ratlarda da) :

Kolinesteraz inhibitörleri uygun çözeltilerinin (her preparat için ön denemelerle miktar saptandıktan sonra) deri altı (Sbc) veya periton içi (İ.P. şırınga edilmeleriyle hafif kanlı gözyaşı (Chromodacryorrhoe) belirtisi karakteristiktir.

Beyaz fareler; akut. kronik zehirlenmeler ve teratojenik aktivitenin araştırılması ve hesaplanmasında da kullanılmaktadır.

2. Rat :

Ucuz ve beslenmesi kolay oldukları için birçok farmakolojik ve toksikolojik denemelerde kullanıldıkları gibi çeşitli izole iç organ preparatlarının hazırlanmasına da yararlar.

3. Tavşan :

Tavşan duodenum veya jezinum'u (asetilkolin, adrenalin, noradrenalin, efedrin, eserin, atropin Vb), avrikul (adrenalin, noradrenalin, histamin, asetilkolin, eserin, kalsiyum ve potasyumklorür), kalp perüzyonu (adrenalin, hipofiz önlop ekstresi, kafein, nikitamit, karbakol, efedrin vb.) izole kulak damarı (adrenalin hipofiz önlop ekstresi Vb.) araştırmalarında kullanılır.

4. Kobay :

İleum (spazmolitik aktivite için) atropin, asetilkolin inhibisyonu vb. Peristaltik hareket kontrolü: ganglionu bloke eden maddeler, kokain araştırmalarında kullanılır.

5. Güvercin :

Bir insektisit madde olan benzen hekza klörür (BHC) in kusturucu etkisi miktar tayini yapmaya bile elverişlidir. Anagirin, stisin'in uygun çözeltileri veya tohumlarının dekoksasyonu deri altı veya kas için enjeksiyonları ile karakteristik kramp hali gösterir.

Soğuk kanlı deneme hayvanları

1. Balık :

Balıklar; fazla duyarlılıkları nedeni ile insektisit, saponil tutandrolar, nehir, çay ve göl sularındaki zehirli maddelerin, uyku ilâcı ve narkotik maddelerin araştırılmasında kullanılırlar.

Ateş salamanderleri, balık, kurbağa larvaları analeptik ve narkotiklere duyarlıdır.

2. Yer solucanı, sülük, tubifex (balık yemi kurt) :

Antelmentik etkili ilâçların denemelerinde kullanıldıkları gibi solucan ve sülükten hazırlanan izole kas preparatlarıyla bazı ilâç ve zehir (nikotin, asetilkolin, eserin vb.) etkilerin incelenmesinde kullanılırlar.

Hamam böceği, kara sinek, meyve sinekleri insektisitlere olan duyarlıklarına göre iyi deneme hayvanı görevini yaparlar.

Laboratuvarda üretilmiş yetişkin (**Araneus diadematus Cl., Araneus sericatus, Zygiella X-notata**) örümceklerinin normal ağ deseni ile geometrik olarak çeşitli ilâç ve zehirlerin, dependens yapan maddelerin verilmesinden sonra ördükleri ve her madde için özel desenin kıyaslanması sonucu; d-amfetamin, meskalin, psilosibin, kafein, strikinin, fenobarbital, diazepam, klorpromazin, imipramin, iproniazit, d-lizerjik asit dietilamid, fizostiknin, atropin, skopolamin, dietil eter, karbon monoksit, karbon dioksit, nitrozoksit, adrenokrom gibi maddelerin çok az miktarlarının saptanması için denemeler yapılmıştır.

İnsanlar; yüzyıllar boyu bitki, hayvan metal gibi doğa ürünlerini çeşitli hastalık belirtilerine karşı, nedenini bilerek veya bilmeden kullanmışlardır.

Bu konu çeşitli tarihsel dönemlere, bugünkü deyim ile, biyolog veya hekimin simgesini taşımaktadır (Hipokrat, Galenos).

Giderek ilâç denemeleri hastaya yatakta uygulanmaya başlanmış ve gelişerek bu bir bilim dalı olarak klinik farmakolojiye dönüşmüştür.

Almanya'da **O. Schmiedeberg R. Buchheim** deneysel farmakolojinin temelini atmışlardır. **J. Liebig** ve **R. Koch** bu dönemin temsilcileridir.

Artık deneyler hayvan ve bunların izole organları üzerinde yapılmaya başlanmış olduğu için hayvanları koruma ve insancıl davranışlar yasalarda yer almış bulunmaktadır.

Bu amaçlara ulaşmak için çeşitli sıcak ve soğuk kanlı hayvanlar kullanılmıştır.

D. ÖN DENEMELER

I. Fiziksel Özelliklere Dayanan Ön Denemeler

Bilinmeyen bir zehirin aranmasında, ön denemelerle önemli ip ucu elde edilebilir. Bunlardan bir kısım aşağıda gösterilmiştir.

1. Nümunenin kokusu :

Nümuneye sıvı ise bir damla veya katı ise pek az alınarak avuç içinde sürülür, kokusu kontrol edilir. Bazı karakteristik kokularla ya o madde veya belirli bir fonksiyonel grup hakkında ön bilgi elde edilir. Şöyle ki :

a) Aromatik kokular

fenolik koku ———> fenoller, kreozotlar

eterli koku ———> eter

tatlımsı koku ———> kloroform, aseton

acı badem kokusu ———> siyanür

menekşe kokusu ———> turpentin

tütün kokusu ———> nikotin

meyvemsi kokusu ———> alkol ve esterler

ayakkabı cilâsı kokusu ———> nitrobenzen

armut kokusu ———> kloralhidrat

ile ilgilidir. Bunun dışında benzen, piridin, naftalin, metil salisilat formaldehit anilin, merkaptanlar, amilhidrat, bromoform, iyodoform, vanilin v.b. kendine özgü kokuları ile tanınırlar.

b) **Batıcı koku** : Anorganik asitler uçucu organik asitler ve formaldehit.

c) **Sarımsak kokusu** : Elementel beyaz fosfor, arsenik kakodil oksit deneyinden sonra) ile ilgilidir.

d) Burunda **aksırtıcı etki** ve **kokulu salisilik asit** ve veratrin tarafından verilir.

2. Nümunenin rengi :

a) Mide suyunun rengi :

Anorganik tuzlar veya boyalar mide suyuna kendi renklerini verirler. Örneğin: Potasyum permanganat: pembe, viyole

Bakır tuzları: Yeşil, mavi

Nikel tuzları : Yeşil

Kobalt tuzları : Pembe

Pikrik asit, nitrik asit : Sarı

Merkurokrom : Parlak kırmızı

Florür, striknin veya
Civa - 2 - klorüre ilâve edilen boyalar } (mavi veya yeşil)
Sülfürik asit, okzalik asit : siyah ve kahve telvesi şeklinde granül-
ler.

Hidroklorik asit : Kahverengi

İyot : Mavi-kahverengi

Kapsüller :

Kırmızı : Sekonal (Seconal); Sarı (nembutal, efedrin, pronestril, metaprilin); mavi (amital, bentil) yeşil (etotral); turuncu (delvinal); beyaz-kırmızı band: (dilantin), beyaz-mavi band (karbital) ile ilgilidir.

b) İdrarda renklenme :

Koyu renk bekleme ile şiddetlendiğinde: naftol, nitrobenzen, fenoller, prigallol rezorsinol, krezol, porfirinler.

Kırmızı-kahverengi renk: amidopirin, çinkofen, antipirin, fenotiazin, pikrik asit, sulfonal, kronik kurşun ve civa zehirlenmesinde, TNT (trinitrotoluen).

Alkali ortamda kırmızı : fenoltalein, santonin,

Sarı : fenasetin, pikrik asit, santonin, Kinakrin (quinacrine)

Turuncu : Azo-gantrisin, pyridium (HNO₃ ile renk pembeye döner)

Sarı-kahverengi (asit idrar) : Kaskara (cascara), fenolftalin rubarb santonin,

Yeşil mavi : metilen mavisi, tetralin, rezorsin, timol, fenoller ile görülür.

II. YÜKSEK DOZDA ALINAN BAZI ÖNEMLİ İLAÇLARIN HEMEN TANINMASI İÇİN KULLANILAN ÖN DENEYLER

Doğrudan doğruya idrara uygulanan deneyler

1. Alkoller için bikromat deneyi : 1 ml idrara 1 ml % 10 sodyum bikromat (% 50 H₂SO₄ içinde) ilâve edilir. Eğer idrarda % 50 mg üstünde alkol varsa, 10 saniyede % 75 mg üstünde alkol varsa 45 saniye içinde yeşil renk meydana gelir. Deney sıcakta yapılırsa (çözelti ısıtılırsa) % 20 mg kadar alkol tanınması mümkün olur.

Diğer alkoller de bu deneyle, olumlu sonuç verdiklerinden, her alkol için distilatta ayırd edici (destekleyici) deneyler uygulanmalıdır. (Özel kısma bakınız.)

2. Demir - 3 - Klorür deneyi (genel) :

2 ml idrara, 2 damla demir - 3 - klorür (ferri klorür) çözeltisi damlatılır. Soğukta salisilatlarla viyole renk elde edilir. Bunun dışında fe-

nol, enol gurubu içeren bileşiklerle : a) 1 dakika soğukta bekleme
b) Sıcakta c) 3 damla 2N. HCl ilavesinden yeniden ısıtma ile aşağıdaki
renkler elde edilir. (Tablo IX)

Tablo IX
FeCl₃ ile çeşitli ilaçların verdiği renkler

Meydana gelen renk veya çökelek rengi			
1 dakika sonra	Isıtmadan sonra	3 damla 2N-HCl ilâvesinden ve ısıtmadan sonra	Renk veren maddeler
RENKLER			
Mavi	Kırmızı	—	Pirogallol
Mavi-viyole	Kahve rengi	açık sarı	Bir değerli fenoller (fenol, krezol morfin, dilaudid gibi).
Mavi-viyole	Kahverengi açık sarı	açık sarı	Fluroglusin, pirazoller (piramidon, novaljin, veramon), rezorsin.
Viyole	Viyole	Viyole	Salisilik asit ve salisilatlar, kodein, santonin
Yeşil	Kırmızı, kahverengi	Kırmızı kahverengi	Apomorfin, adrenalin, guajakol
Yeşil	Beyaz çökelek	—	β -naftol
Kırmızı	Açık kırmızı	Açık kırmızı	Antipirin
ÇÖKELEK			
Kırmızı sarı	Kırmızı sarı	Çözünme olur	Benzoat, ftalat ve kâfur
Beyaz	Viyole	*	α -naftol
Mavi	Mavi	Mavi	Ferro siyanür
Mavi	Mavi	Çözünür	Gallik asit ve tuzları

3) Salisilat aranmasında destekleyici deney :

0.5 ml idrar veya plazmaya, 0.04 N nitrik asitte hazırlanmış % 0.55 lik demir-3-klorürden 4.5 ml ilâve edilir. Salisilat konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak mor bir renk elde edilir.

Meydana gelen bu rengin salisilat ile ilgili olduğunu kesinleştirmek için **Wintergreen** deneyi yapılır.

4) Wintergreen deneyi :

Bu deney metil alkol, etil alkol ve salisilat için kesin sonuç verir. İdrar veya kan su buharı distilasyonuna tabi tutulur. Etil veya metil alkol olduğu şüpheli olduğunda, 1 ml distilat, 1ml konsantre sülfirik asit ve 0.1 g sodyum salisilat karışımı dikkatle kaynatılır. Metil salisilat (Winter green) kokusu metanol veya etanol (ester kokusu) bulunduğunu gösterir. Salisilat aranması için salisilat asit ortamda biyolojik materyalden ekstrakte edilir. 0.1 g kalıntıya 1 ml metil alkol ve 1 ml konsantre sülfirik asit ilâve ederek kaynatılır.

5) Fujiwara deneyi (trikloro bileşikleri için) :

1 ml % 10 NaOH ve 1 ml tekrar distillenmiş piridin 2 dakika kaynar su banyosunda tutulur. Hiç bir renk meydana gelmezse 2 ml idrar ilâve edilir, ve tekrar ısıtılır. Piridin fazında pembe kırmızı rengin meydana gelmesi trikloro bileşiklerinin (kloroform, kloral, klorbutal, trikloroetanol, trikloroasetik asit) bulunduğunu gösterir.

6) Forrest deneyi : (İmipiramin, dezpiramin ve trimipiramin) için, 1 ml idrara, 1 ml Forrest reaktifi ilâve edilir. İmipiramin, dezpiramin veya tripiramin olduğunda yeşil renk meydana gelir.

7) FPN deneyi (fenotiazinler için) :

1 ml idrara 1 ml FPN reaktifi ilâve edilir. Fenotiazin türevlerinden birinin mevcudiyetinde pembe, kırmızı, turuncu viyole ve maviye kadar giden bir renk değişimi görülür.

8) α -naftol-sodyum nitrit deneyi

(primer aminler için) :

Seyreltik hidroklorik asitle asitlendirilmiş 2 ml idrara, 3 damla % 1 Na NO₂ ve 3 damla taze hazırlanmış % 1 α -naftol [% 10 NaOH

içinde) ilâve edilir. Pembe rengin varlığı **p-aminofenol veya diğer primer amin** içeren bileşiklerden birinin olduğunu gösterir. p-amino-fenol, fenasetin ve paraasetamol ve anilinin metabolitidir.

9) Fehling deneyi :

1 ml idrar, 1 ml Fehling karışımı (Fehling I ve II) ile yarım saat kaynar su banyosunda bekletilir veya sarı kırmızı çökeleğin meydana gelmesi, serbest aldehit veya keton gurubu olan bileşiklerin (glukoz fruktoz, dekstrin, glukuronik asit, laktoz, mannoz) veya kloroform, kloralhidrat, trikloroetilen ve çok değerli fenoller, turpentin, morfin, salisilatlar, amigdalın, mentol, ANTU (naftol tloüre) gibi bileşikler ile ilgilidir.

Doğrudan doğruya kana uygulanan deneyler

1) Karboksihemoglobin aranması (CO zehirlenmesinde)

% 20 COHb veya daha yüksek konsantrasyonlarının aranması için kan 0.01 N amonyum hidroksit ile 1:20 oranında seyreltilir. Paralelinde normal kan ile deney tekrarlanır. Pembe rengin olması karboksi-hemoglobin olabildiğini gösterir.

Destekleyici deney olarak: kan, 0.01 N amonyum hidroksitle 1:200 oranında seyreltilir. Spektroskopta incelenir. Normal hemoglobin alfa bandlarının kayması karboksihemoglobin olduğunu gösterir ve bu kayma miktarı karboksihemoglobin konsantrasyonu ile orantılıdır.

Karboksihemoglobin miktarının tayini :

1:200 oranında: 0.01 N amonyum hidroksitle seyreltilmiş kanın 541, 560 ve 576 nm de absorpsiyonu okunur. 541:560 ve 575:560 nm deki absorpsiyon oranları, karboksihemoglobin konsantrasyonu bilinen örneklerle karşılaştırılarak bir grafik hazırlanır. Nümuneye elde edilen absorpsiyon oranları bu grafikten değerlendirilerek % COHb miktarı bulunur.

Nümuneye ekstraktlarında uygulanan deneyler

1) Asit + eter ekstraktı :

10 ml, 25 ml idrar veya 5-20 ml mide içeriğinin pH sı 3-4 e getirilir ve iki defa 25 ml eterle ekstrakte edilir. Susuz sodyum sülfat ile kurutulduktan sonra uçurulur. Kalıntıda şu deneyler yapılır :

1 — Barbitüratlar (Koppany deneyi)

Kalıntı 1 ml kloroformda çözülür. Bunun yarısı ayrı bir tüpe alınarak 2 damla taze hazırlanmış % 1 kobalt asetat (metanolde) ve yine taze hazırlanmış % 1 lik lityum hidroksitden damla damla ilâve edilir. Damlanın değdiği bölgede mavi halka belirmesi barbitürat olduğunu gösterir.

Ayrıca ince tabaka kromatografisi (özel bölüme bakınız) ve gaz kromatografisi ve UV ile destekleyici deneyler yapılır.

2. Diazepam aranması

Kalıntı 3 ml 2 N HCl de 10 dakika çalkalanarak çözülür. Ultraviyole alanında (200-300 nm) absorpsiyon spektrumu alınır ve aynı şekilde hazırlanmış diazepam standartları ile karıştırılır. Asit ortamda diazepam 240 ve 280 nm de maksimum absorpsiyon verir.

Not : Gerek de diazepamın metaboliti ve gerekse klordiazepoksit (chlordiazepoxide) asit hidrolizle aynı bileşiği (2-amino-5-klorobenzofenon) verirler. Bu nedenle pozitif sonuç yalnızca diazepam olduğunu göstermez.

3. Ergot alkaloidleri :

Yalnızca mide suyu ekstraktında aranır. Ergotamin veya liserjid (lysergide) ihtiva eden ergot alkaloidlerinin idrarda çabuk aranmasını mümkün kılan basit bir deney yoktur. Ancak mide içeriği veya kusmuk ekstraktında çok duyar olmamakla beraber şu deneyler uygulanır (içerik 4 misli hacim eterle 15 dakika çalkalanır ve eter ekstraktı 3 e ayrılır):

a) Eter ekstraktının bir bölümüne 5 ml % 10 potasyum hidroksit çözeltisi ilâve edilir ve dikkatle su banyosu üzerin ısıtılır. Trimetilamin (balık kokusu) duyulması ergotamin ile ilgilidir.

b) Eter ekstraktının diğer bölümüne 3 ml sülfirik asit dikkatle ilâve edilir. Sıvıların birleşme noktasında maviye döner turuncu renk ergotamin olduğunu gösterir.

c) Üçüncü bölüm eter ekstraktına 2 g sodyum karbonat ilâve edilir ve karıştırılır. Ergotamin olduğunda kırmızı-viyole renk meydana gelir.

d) Ergot alkaloidleri ultraviyole ışığında parlak mavi bir flöresan verir, ayrıca p-dimetilaminobenzaldehitte viyole renk verir. (Sülfirik asit içinde hazırlanmış % 1 lik p-dimetilaminobenzaldehitten kalıntıya 1-kaç damla ilâve ederek ısıtılır).

4) Salisilik asit :

Demir-3-klorür deneyi ile aranır (s : 108)

Alkali-Kloroform ekstraktı

Asit-eter ekstraksiyonu ile ayrılan sıvı faz seyreltik amonyak ile kalevilendirilir (pH 10) ve iki defa 25 ml kloroform ile ekstrakte edilir. Ekstraktlar birleştirilir ve 5 ml su ile yıkanır. Susuz (anhidr) sodyum sülfatla suyu uzaklaştırılır ve kurutulur. Kalıntıda şu deneyler yapılır:

1. Klordiazepoksit aranması :

Kalıntı 5 ml 6N HCl de çalkalayarak çözülür. Eser kloroform hafif ısıtma ile giderilir. Asit ekstraktı, likit (sıvı) parafin banyosunda 125°C de 30 dakika ısıtılır. Hacim su ile 5 ml ye tamamlanır ve soğutulur. 0.5 ml % 0.1 sodyum nitrit ilave edilir ve 3 dakika bekletilir. 0.5 ml % 0.5 amonyum sulfamat ilâvesinden sonra tekrar 3 dakika daha bekletilir. En son 0.5 ml % 0.1 N-1-naftiletilediamin çözeltisi ilâve edilir. Pembemsi (mauve) rengin belirmesi klordiazepoksit olduğunu gösterir.

Not : Klordiazepoksit ve diazepam metaboliti asit hidrolizle aynı maddeyi (2-amino-5-klorobenzenon) verirler. Bu nedenle pozitif sonuç yalnızca klordiazepoksit bulunması ile ilgili değildir.

2. Kodein aranması :

Kalıntı 1 ml etil alkolde çözülür. Bir damlası bir filtre kağıdı üzerine damlatılır ve 1 damla Marquisir ilâve edilir. (Damla deneyi). Kırmızıdan mavi viyoleye geçen renk değişmesi kodeinden ileri olabilir. (Diğer opium alkaloidleri ile de aynı sonuç alınır).

Etil alkollü çözeltiden alınan diğer bir damla üzerine, 1 damla % 0.5 amonyum vanadat (suda) çözeltisi ilâve edilir. Yeşilden maviye değişen renk kodein olduğunu gösterir.

Destekleyici deney olarak mikrokristalizasyon (sayfa: 85) deneyi ve ince tabaka kromatografisi ile aranması yapılır.

3. Meprobamat ve diğer karbamatlar :

Kalıntı 1 ml eterde çözülür. 1 damla filtre kağıdına damlatıldıktan sonra 1 damla % 1 lik furfural (etil alkolde) damlatılır. Oda sıcaklığında kurutulur. Sonra hidroklorik asit dumanına tutulur. Karbamat olduğunda mavi-siyah renk meydana gelir.

Destekleyici deney olarak : eterli çözelti kuruluğa kadar uçurulur. 1 ml sülfirik asitle çözülür ve 20 dakika kaynar su banyosunda ısıtılır. Soğuduktan sonra 400-500 nm arasında UV absorpsiyon ölçülür. Standard nümune ile karşılaştırılır. (H_2SO_4 ile meydana gelen turuncu renk 450 nm de maksimum absorpsiyon gösterir).

4. Kinin ve Kinidin :

Kloroform ekstraktı 3 ml % 10 sülfirik asitle çalkalanır. Mavi flöresan (UV de daha belirlenir) kinin veya kinidin ile ilgili olabilir.

Destekleyici deney olarak flöresan emisyonu ölçülür. 250 m μ da eksite edildiğinde (exciting wavelength 250 nm de maksimum emisyon göstermesi kinin veya kinidin ile ilgilidir.

LABORATUVARDA İLK YARDIM

Kimya laboratuvarlarında çeşitli nedenlerle kazalara raslanmaktadır. Bu kazalar, kullanılan apareylerin kırılması, patlaması ile ilgili olabildiği gibi, çoğu kez çalışılan toksik kimyasal maddelerin inhalasyonu, göz, deri veya ağıza temasla veya ağız yolu ile indirim yoluna geçmesi ile meydana gelen zehirlenmeler şeklinde olmaktadır. Bu hallerde ilk yardım olarak laboratuvarda hemen uygulanması gereken tedbirler vardır. Her kimya laboratuvarında çalışanların bilmesi gereken bu tedbirler aşağıda açıklanmıştır: **(Gattermann, Muir)**

1. Laboratuvarda çalışırken, korunulması gereken en önemli organ gözlerdir. **Vakum** veya **yüksek baskı** altında çalışan apareyleri (Vakum desikatörü, otoklav) kullanırken, patlama tehlikesi olasılığına karşı, kalın camlı sağlam bir korunma gözlüğü takmalıdır.

Patlayıcı maddelerle çalışırken de korunma gözlüğü takmak zorunludur. Bilinmeyen bir maddenin patlayıcı olup olmadığını, bu maddenin az bir kısmı metal bir spatülle alevde ısıtılarak anlaşılabilir.

Metalik sodyum ve potasyum bu tür kazalara yol açan iki metaldir. Bu nedenle bu metallerin kırıntıları açık havada bırakılmamalı, lâvabo veya çöp sepetlerine atılmamalıdır. Ayrıca bunlarla yapılan reaksiyonlar, su banyosu yerine yağ veya kum banyosunda yapılmalıdır. Bu metaller miktarlarınının 15-20 misli alkolle yok edilmeli veya orijinal şişeleri içinde saklanmalıdır.

Bu nedenle yukarıdaki koşullarda çalışırken, hiç olmazsa normal bir gözlük takmak yerinde olur.

2. **Eter ve diğer uçucu yanabilen** organik çözücülerle çalışırken bunların yanında alev bulundurmamalıdır. Yangın çıktığı takdirde yanabilen her şey uzaklaştırılır. Alev üzerine ıslak paçavra veya karbon tetraklorür dökerek yangın söndürülür. En iyisi, yangın bombası kullanılmaktadır.

3. **Gaz veya çözücü buharlar** ile çalışırken inhalasyon yolu ile bir zehirlenme olduysa, şahıs derhal laboratuvardan uzaklaştırılır ve yatırılarak sıcak tutulur. Solunumu zorlayan elbise, saat kayışı gibi eşyalar gevşetilir. Hafif şok görüldüğünde çay veya kahve verilebilir.

Tıbbî bir bakım gerekip gerekmediği, hastanın bu ilk yardımdan sonraki durumuna bağlıdır. Amonyak, hidroklorik asit buharı ile hafif bir inhalasyon durumunda bile hasta hemen hastahaneye yollanır veya doktor çağırılır.

4. Ağız, deri veya gözün kimyasal madde buharı veya kendisi ile temasında, ilk yapılacak iş bol su ile temas yerini yıkamaktır. Arkadan, eğer asit özellikte bir madde ise, sodyum bikarbonat çözeltisi ile; kalvi bir madde ise seyreltik asetik asitle temas yerini yıkamak gerekir. Çoğunlukla bu maddeler cilt üzerinde tahriş edici etkiye sahip olduklarından yıkama işleminden sonra, bir yanık pomadı (vazelin v.s.) sürmelidir. Özellikle, gözde bu durum olduysa tıbbi bakım da yapılmalıdır. Yıkama için her laboratuvarında bulundurulması, mümkün olan apacey (Şekil 23) görülmektedir.



Şekil 23 — Göz yıkama şişesi

5. Özel Antidotlar :

Korrozif ve zehirli kimyasal maddelerle çalışan laboratuvarlarda, bu maddelerin özel antidotlarının bulunması gerekir. Örneğin :

a) Brom, formik asit, hidroflorik asit ve benzeri, diğer yakıcı asitlerle meydana gelen deri yanıklarının tedavisinde (magnezyum + gliserin) pomadı kullanılabilir. 200 g magnezyum oksit, 240 ml gliserinle pasta haline getirilir ve bundan yanık kısma doğrudan doğruya sürülür. Ayrıca 1 hacim amonyağın (d: 0,88) su ile 15 kere sulandırılması ile elde edilen seyreltik amonyak, brom, formik asit ve hidroflorik asitle meydana gelen yanık şiddetini azaltmakta yararlıdır.

b) Hidrosiyanik asit, siyanür tuzları ve nitrillerle (hidrolize HCN verirler) meydana gelen zehirlenmelerde, aşağıdaki şekilde hazırlanan antidot karışımı, hemen ilk yardım olarak hastaya verilebilir.

A. 158 g demir-2sülfat ($\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$) ve 3 n sitrik asit BP soğuk suda eritilerek bir litreye tamamlanır. (Bu çözelti bozulduğunda kullanılmamalıdır).

B. 60 g susuz Na_2CO_3 bir litre suda çözülür. (A) çözeltisinden 50 ml geniş ağızlı ve polietilen kapaklı bir şişeye konur. Üstüne açıkca okunacak şekilde «SİYANÜR ANTİDOTU A» yazılı bir etiket yapıştırılır. Aynı şekilde (B) çözeltisinden de 50 ml alınarak ikinci bir şişeye konur ve «SİYANÜR ANTİDOTU B» yazılır. Anı bir zehirlenmede, bu iki şişe içindeki çözelti birbiriyle karıştırılır ve hastaya içirilir. Bu şekilde, bunda demir-2-hidroksit hem emetik olarak etkir, hem de siyanürle toksik olmayan demir bileşiği meydana getirir.

Burada önemle belirtilecek nokta şudur : Siyanür zehirlenmesinde ancak yukarıdaki şekilde bir ilk yardım laboratuvarında uygulanabilir. Bunun dışında hemen doktora başvurmalıdır. Intravenöz olarak antidot uygulamasını, ancak doktor yapabilir.

6. İyot içilmesi halinde, derhal % 1 lik sodyum tiyosülfat içilme-lidir. Deri üstündeki iyot lekeleri de, aynı şekilde sodyum tiyosülfat çözeltisi kullanarak uzaklaştırılabilir.

7. Fosforla cilt yanmalarında, yanık yer % 3 bakır sülfat ile yıkanmalıdır.

8. Ayrıca büyük laboratuvarlarda, solunum zehirlenmelerinde ya-
pıy solunum yaptıran apareyler bulundurulması da yararlıdır.

ÖNEMLİ REAKTİFLERİN HAZIRLANMASI

Ansties reaktifi :

3.70 g. saf potasyum dikromat 150 ml distile suda çözülür. 280 ml saf konsantre sülfürik asit yavaş yavaş karıştırılarak ilâve edilir. Distile su ile 500 ml ye tamamlanır.

Alkol Standart çözeltisi :

100 ml lik balonjojeye 50 ml distile su konur. 2.53ml absö mutlak etil alkol hassas bir pipet veya büretten ilâve edilir. Bu sırada büret veya pipetin ucu su yüzeyine çok yakın olmalıdır. Su ile 100 ml ye tamamlanır. Bu şekilde hazırlanan alkol standartı % 2 liktir.

Alkollü potasyum hidroksit çözeltisi :

35 g KOH, 20 ml distile suda çözülür. Saf etil alkol ile 1 litreye tamamlanır.

Bakır sülfat çözeltisi (Reinsch deneyi Hg için) :

5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, 100 ml 1 N HCl de çözülür.

Borat tamponu (pH 9.4) :

24.8 g H_3BO_3 (borikasit), 0.2 N NaOH ile 1 litreye tamamlanır. Bu çözeltiden 80 ml alınarak tekrar 20 ml 0.2 N NaOH ilâve edilir.

Brillant green (yeşili) reaktifi :

1 g. Brillant yeşili, 100 ml % 25 etil alkolde çözülür.

Bromfenol mavisi reaktifi (TLC de org. fosforular için) :-

a) 0.05 g bromfenol mavisi 10 ml asetonda çözülür ve 100 ml % 1 AgNO_3 (Aseton + su : 1 + 3 da hazırlanmış) ile karıştırılır.

Bromlu su :

5 g sıvı brom cam kapaklı bir şişeye konarak 100 ml su ilâve edilir.

Civa-2-klorür (veya bromür) çözeltisi (Gutzeit deneyi) :

0.05 g bromfenol mavisi 10 ml asetonda çözülür ve 100 ml ye tamamlanır.

Cıva nitrat çözeltisi (Barbitüratlar için) :

(HgO - HNO₃) çözeltisi : 0. 1g HgO 10 damla % 25 HNO₃ içinde çözülür. Berrak kısım kullanılır.

Demir-3-klorür (ferri klorür) çözeltisi :

- a) % 5 lik : 5 g FeCl₃. 6 H₂O, 100 ml suda çözülür.
- b) % 1 lik 1 g FeCl₃. 6 H₂O 100 ml suda çözülür.

Diazo çözeltisi (fenol tayini için) :

a) p. nitroanilin çözeltisi : 0.75 g p-nitroanilin 10 ml suda çözülür ve 20 ml konsantre HCl ilâvesinden sonra 250 ml ye tamamlanır.

b) % 5 lik NaNO₂ (suda)

Kullanmadan hemen önce 1,5 ml (b) çözeltisi, 25 ml (a) çözeltisi ile karıştırılır.

Dragendorff reaktifi :

- a) 2 g hizmet subnitrat, 25 ml asetik asit ve 100 ml suda çözülür.
- b) 40 g potasyum iyodür 100 ml suda çözülür.

Kullanırken 10 ml (a), 10 ml (b), 20 ml asetik asit ve 100 ml su karıştırılır.

Fehling reaktifi

a) 35 g CuSO₄. 5 H₂O 50 ml suda çözülür (Fehling I)

b) 5 g Sodyum hidroksit, 17.5 g senyet tuzu (sodyum potasyum bitartarat) 50 ml suda çözülür (Fehling II)

Kullanılmadan önce, iki çözelti eşit hacimde karıştırılır.

Fenol çözeltisi

a) Stok (Standart çözelti) : 0.5 g saf fenol 10 ml suda çözülür ve 4 ml konsantre HCl ilâvesinden sonra su ile 500 ml ye tamamlanır.

b) Seyreltilmiş fenol standardı : 1 ml stok fenol çözeltisi su ile 100 ml ye seyreltilir. Bu çözelti 1 ml de 10 mikrogram (µg) fenol ihtiva eder.

c) (Genel) % 2 lik: 2 g fenol 100 ml suda çözülür.

Flourscein reaktifi (İ.T.K. için) :

0.04 g flourscein 100 ml etil alkolde çözülür.

Forrest reaktifi :

25 ml % 0.2 potasyum dikromat (suda),
25 ml % 30 sülfirik asit (ağırlık/ağırlık),
25 ml % 20 perklorik asit (ağırlık/ağırlık) ve
25 ml % 50 nitrik asit (ağırlık/ağırlık) karıştırılarak hazırlanır.

FPN reaktifi :

% 5 ferriklorür, 45 ml % 20 perklorik asit (ağırlık/ağırlık) ve 50 ml % 50 nitrik asit (ağırlık/ağırlık) birbiriyle karıştırılır.

Fröhde reaktifi :

0.1 g sodyum molibdat 100 ml konsantre sülfirik asit içinde çözülür.

Gibbs reaktifi :

0.1 g 2,6-dibromokinon-klorimid 25 ml % 95 etanolde çözülür. Cam kapaklı renkli şişede ve buz dolabında saklanmalıdır. Çözeltinin rengi kahverengiye dönüştüğünde kullanılmaz.

İyot çözeltisi :

a) Genel (% 2): 2 g iyot ve 4 g potasyum iyodür 100 ml suda çözülür.

b) N-iyot çözeltisi : 12-13 g I₂ ve 20-25 g KI 100 ml suda çözülür.

İyodoplatinat çözeltisi :

1 g platin klorür 10 ml suda çözülür ve 200 ml % 30 luk KI içine ilâve edilir. Su ile 200 ml ye tamamlanır. Karışım karanlıkta saklanmalıdır.

İzopropil amin çözeltisi (Barbitüratlar için) :

5 g izopropil amin 100 ml susuz metil alkol içinde çözülür.

Kinin - KI reaktifi (Bizmut için) :

1 g kinin sülfat 100 ml % 0.5 lik HNO₃ te çözülür. 2 g KI ilâve edilir. Kahverengi şişede saklanır.

Kobalt nitrat çözeltisi (Barbitüratlar için) :

1 g kobalt nitrat veya kobalt asetat 100 ml susuz metil alkol içinde çözülür.

Kromotropik asit çözeltisi :

0.5 g Kromotropik asit (1,8-dihidroksinaftalin-3,6-disülfonik asit) su ile 100 ml ye tamamlanır.

Kurşun asetat çözeltisi :

10 g kurşun asetat suda çözülür ve 100 ml ye tamamlanır.

Mandelin reaktifi :

1 g amonyum vanadat 100 ml konsantre sülfirik asit içinde çözülür.

Marme reaktifi :

30 g kadmiyum iyodür ve 60 gm potasyum iyodür 180 ml suda çözülür.

Marquis reaktifi :

3 ml konsantre asite 3 damla % 40 lık formaldehit (formalin) damlatılır. Kullanılmadan hemen önce hazırlanmalıdır.

Mayer reaktifi :

1.4 g cıva-2-klorür (merkürü klorür, HgCl₂) ve 5 g potasyum iyodür 100 ml suda çözülür.

Mecke reaktifi (alkaloidler için) :

0.5 g seleniöz asit 100 ml konsantre sülfirik asitte çözülür.

Millon reaktifi :

10 g cıva, 20 ml konsantre nitrit asitle çözülür ve eşit hacimde su ilâve edilerek karıştırılır.

N-1-naftiletilediamin reaktifi :

100 mg N-1-naftiletilediamin etil alkolde çözülerek, 100 ml ye tamamlanır.

Nessler reaktifi :

a) 2 g $HgCl_2$, 6 g KI ile birlikte az miktar suda çözülür. 17 g KOH az miktar suda çözülerek ilâve edilir. Karıştırıldıktan sonra 100 ml ye tamamlanır.

b) 3.5 g potasyum iyodür ve 1.25 g cıva-2-klorür ($HgCl_2$) 80 ml suda doymuş $HgCl_2$ çözeltisinden bu karışıma hafif kırmızı bir çökelek meydana gelinceye kadar karıştırılarak ilâve edilir. 12 g KOH bu çözelti içinde çözülür, az miktar doymuş $HgCl_2$ ilâve edildikten sonra su ile 100 ml ye tamamlanır. Bir gece bekletilir, dekante edilerek berrak kısım kullanılır.

Palladyum klorür çözeltisi (CO için) :

a) 0.22 g $PdCl_2$, 250 ml 0.01 N HCl de çözülür. Gerektiğinde hafifçe ısıtılır.

b) 1 g $PdCl_2 \cdot H_2O$ 100 ml seyreltik HCl de (35 ml konsantre HCl su ile 100 ml ye tamamlanır) çözülür. Çözünmenin tamamlanması için hafifçe ısıtılmalıdır.

p-dimetilamin benzaldehit reaktifi (alkaloidler için) :

a) (Alkollü çözelti) : 1 g madde, 100 ml etil alkolde çözülür ve 2 damla konsantre sülfirik asit damlatılır.

b) (Asitli çözelti) : 1 g madde 40 ml konsantre H_2SO_4 ihtiva eden 100 ml seyreltik asitli suda çözülür.

c) (Asitli çözelti) : 1 g madde 100 ml konsantre H_2SO_4 içinde.

Pikrik asit çözeltisi (alkaloidler için) :

Suda doymuş çözeltisi hazırlanır.

Potasyum triiyodür (KI - I_2) çözeltisi (asitli)

Mikrokristalizasyon için :

a) 10 g iyot ve 35 g KI 100 ml suda çözünür. Bu çözeltinin 0.4 ml sine 20 ml glasiyal asetik asit ve 2.0 ml fosforik asit (H_3PO_4) ilâve ederek karıştırılır.

Potasyum iyodür - Na_2SO_3 (Reinsch deneyi için) :

5 g KI ve 20 g $Na_2SO_3 \cdot 7 H_2O$, 100 ml suda çözülür.

Potasyum permanganat çözeltisi :

a) (Kromotropik asit deneyi için) : 1.5g $KMnO_4$, 7.5 ml % 85 fosforik asit içinde çözülür ve su ile 50 ml ye tamamlanır.

b) % 5 lik (suda) : 5 gm $KMnO_4$, suda çözülerek 10 ml ye tamamlanır.

c) Mikrokristalizasyon için : 2 g $KMnO_4$ su ile 100 ml ye tamamlanır ve 5 damla H_3PO_4 ilâve edilir.

Pirctannik asit çözeltisi (CO için) :

1 g pirogallik asit ve 1 g tannik asit 100 ml suda çözülür.

Rhodamin B :

a) (İ.T.K de püskürtme reaktifi) : 0.1 g Rhodamin B 100 ml etil alkolde çözülür.

b) Talyum için : 0.05 g Rhodamin B 100 ml konsantre HCl içinde çözülür.

Saponin çözeltisi (methemoglobin için) :

100 mg saponin, 10 ml borat temponu (pH 9.4) içinde çözülür ve su ile 100 ml seyreltilir.

Schiff reaktifi :

0.2 g bazik füksin veya p-rozanilin hidroklorür 120 ml sıcak suda çözülür. Soğuduktan sonra, 20 ml distile suda çözülmüş 2 g anhidr sodyum sülfid ve 2 ml konsantre HCl ilâvesinden sonra ağzı sıkı kapalı şişede saklanır.

Scott - Willson reaktifi :

a) 5 g cıva-2-siyanür 300 ml suda çözülür

b) 90 g sodyum hidrokisit 300 ml suda çözülür.

c) 1.45 g gümüş nitrat 200 ml suda çözülür.

(c) Çözeltisine tamamen soğuk (b) çözeltisi ilâve edilir ve karıştırılır, sonra (a) çözeltisi ilâve edilirken devamlı karıştırılır. Bu reaktif 6 ay dayanabilir. Bulanıklık veya çökelek meydana gelmesi halinde atılır. Zehirli olduğu için pipet kullanmamalıdır.

Sitrat tampon çözeltisi (pH 2.2)

a) 1,187 g $Na_2HPO_4 \cdot 2 H_2O$ distile su ile 100 ml ye tamamlanır.

b) 0.1 M sitrik asit.

20 ml (a) ile 980 ml (b) çözeltisi karıştırılır.

İ N D E K S

A

Absorptimetri	49
Akonitin	21
Alkaloidler	2
Çöktürme reaktifleri	82
Tanımlama	82, 83, 84
Alkol tayini (etil) - kanda	56
Alkol standardı	59, 118
Ametal	44
Amfetamin	21
Aminobenzen	68
Amital	81
Amonyum fosfo molibdat	84
Amonyum tyosiyanat	44
Anilin	8, 68
Ansties reaktifi	56, 57, 59
Antimon	89, 90
Antipirin	21
Antripruritik	65
Arsenik	3, 89, 90
Ascending	48
Asetanilid	21
Asetil salisilik asit	20
Aseton	55
Asit dijestiyon	37, 39
Asit fenik	65
Asit karışım ile yıkılama	37
Atomik absorpsiyon	44

B

Balık deneyleri	106
Bamford tekniği	31

Barbitüratlar	3, 78, 112
İTK ile aranması	79
İzolasyonu	78
Barbitürik asit (UV spektrumu)	81
Benzen	7, 8, 64
Benzin	7
Biyolojik deneyler	103
Biyolojik materyalden izolasyon	2
Barbitürat	79
Klorlu hidrokarbonlar	60
İzolasyonu	74
Paration aranması	102
Bizmut aranması	89, 90
Boetius	29
Bogen testi (modifiye)	56

C

Celloidin	45
Cıva aranması	89, 90
Conway mikrodifüzyon	15, 17
Coalnafta	64
Confirmatory test	34
Cu ⁺⁺ — ditizonat	43

D

Daubney Nikolls m.	13
Demir -3- klorür	
Delvinal	81
Developman müddeti	49

Dezenfektan	4	Fosfor	5, 72
Descending	48	FPN deneyi	110, 120
Dextrorphan	35	Fujiwara	11
Diazepam	112		
Diazo r.	13	G	
Dietil -p- nitrofenil tiofosfat	101	Gaz kromatografisi	14, 47
Difüzyon	2	Geldmacher tek.	44
Digitalin	24	Gettler - Goldbaum t.	71
Distilasyon	5	Glikozitler	3, 23
Distilatta Metil alkol	52, 54	Guignard deneyi	
Etilalkol	55	Gutzeit apareyi	76, 92
Klorluhidrokarbon	62	fosfor aranması	76
Fenol aranması	66	Gümüş nitrat	75
Fenol tayini	67	Çökme deneyi	75
Fosfor aranması	75		
Dokuda CN ⁻	75	H	
E		Harb gazı	101
Ekstinksiyon	51	Heroin	3, 24
Ekstraksiyon	3, 19		
Morfin aranması	99	I	
Şeması	23	İdrarda	
Ekstraktör	25, 26, 27	TCAA tayini	63
Eter	7, 8, 78	Koproporfirin	95
Etil alkol	7, 8, 14, 55	p - nitrofenol	101
E -605- Niran	101	İndofenol reaksiyonu	12
F		İnsektisitler	3
Fehling deneyi	119	İnfrared	14
Feldstein Klendshoj m	14, 53	İ.T.K. tekniği	48, 49
Fenasetin	12, 21	İyodoform r.	14, 15 55
Fenilamin	68	İzopurpurik asit t.	14, 71
Fenilizonitril	62		
Fenol	8, 12, 17, 65	L	
Fenmetrazin	34, 35	Laboratuvarda ilk yardım	135
Fendimetrazin	34, 35	Lambert Beer k.	53, 56
Formaldehit	8, 54, 55	Legal deneyi	11
Forrest deneyi	110, 120	Levaphanol	35
		Liebermann indofenol	66

M

Manyezit	37
Metil izobütil keton	40
Metil alkol	52
Metanol	52
Methemoglobin	69, 70
Metalik zehirler	36
Arama yöntemleri	36, 40, 42
İzolasyonları	36, 37, 38
Millon deneyi	62
Mikrokristalizasyon	31, 32, 40
Uygulama	34, 35
Mitscherlich deneyi	74
Morfin	22, 82, 83, 85
ekstraksiyonu	86, 87

N

N-allylnormorfin	21
Narkotikler	86
Nembutal	81
Nernst dağılım kanunu	25
Nessler reaktifi	62
Nikotin	9, 83
Nitrobenzen	8, 65
Numune kokuları	107
Numune renkleri	107

O

Occupational	1
Odun alkolü	52
Optik kristallograf	31, 34, 46
Optik izomerler	35
Organik fosforlu insektisitler	98
İzolasyonu	98
İ.T.K. ile tanınması	98, 99
Ortofosfat	84

Ö

Önemli reaktifler	118
Özel zehirler	2, 97
Özel olarak aranan zehirlerin izolasyonu	46

P

Paration tanımlanması	101
Parri deneyi	79
Pentobarbital	79
Perklorik asit	37, 38, 39
Pestisitler	98
Petrol eteri	7
Phenilhydride	64
Piramidon	21
Piren	60
Pirotonnik asit	77
Polarimetri	46
Potasyum siyanür	70
Proteinler	3, 23
Prusya mavisi	14, 16, 72

R

Rat	105
Racemorphan	35
Refraktometri	46
Reinsch deneyi	44, 89
Rezorsin	13, 63
Rf değerleri	35, 49
Ring - oven tekniği	40
Apareyi	41

S

Saf aktif maddeler	79
Saponin reaktifi	69, 123
Scherer testi	73
Schiff reaktifi	11, 54

Scott Wilson reaktifi	57	Tiriol	60
Schönbein deneyi	70	Toksik anyonlar	3, 45
Silikon	57	Tayini	71
Sinir gazı	101	Toluen	60
Siyanür	8, 70	Trikloroasetaldehit	60
izolasyonu	70	Triklor asetik asit	4, 63
Spektrofotometri	50	Trikloretan	60
Spektroskop	44	Triklor asetik asit	4, 63
Spektral analiz	46	Trikloretan	60
Spektrum	50	Trikloroetilen	60
Soucek ve Vlachova modifikas- yonu	63	Tubifex deneyi	106
Soxhlet apareyi	27	U	
Standart etil alkol çöz.	59	Uçucu zehirler	2, 52
Stas - Otto yöntemi	18, 19, 20	Uçucu olmayan zehirler	2, 78
Striknin	21	UV spektrumu	50
Süblimasyon	23	UV spektrofotometreler	50
Sülük deneyi	106	V	
Sodyum - siyanür	70	Vakum evaporatörü	29, 115
Spektrografik yöntem	34, 43	Vitali testi	83
T		W	
Talyum	43, 44 96	Winter green deneyi	110
Talyumun idrar ve kanda aran- ması	96, 97	Y	
Tavşan deneyleri	105	Yaş usulle külleştirme	36
Thalleiochin testi	84	Yer solucanı deneyi	106
Thiophos	101	Yıkılama	36, 37
Timol	65		
Tiosiyanat	2		

FAYDALANILAN KİTAP ve ARAŞTIRMALAR

- 1) **Bamann, E; Ulmann, E.** Chemische Untersuchung von Arznergemischen Arzneyspezialitäten und Giftstoffen, Wissenschaftliche verlagsgesellschaft M.I.H. stuttgart 2. baskı (1960)
- 2) **Bamford, F.**, Poisons, Their Isolation and Identification, 3. baskı, Churchill, London (1951)
- 3) **Bernard D, Petri, N, Babington Q.**, A Thin-Layer chromatographic screening procedure for detecting drug abuse
The Amer. J. clin. path. 50, s: 714 (1968)
- 4) **Buchner M; Nowack A; Dietza, J.**, Leitfaden Der Toxikologisch - chemischen Analyse verlag Theodor Steinkoff Dresden (1968)
- 5) **Burn, J.H.** : Practical Pharmacology Blackwell Scientific Publications, Oxford, I. Baskı (1952)
- 6) **Castagnou, R; Guyotjeannin, Ch.**, Toxicologie Industrielle Medicamentouse et Agricole Tome VII, Librairie Moloine, S.A. Editeur (1969)
- 7) **Ceylan S.**, Organik fosforlu insektisitlerle zehirlenmelerde bunlardan başlıcalarının kimyasal yol ile araştırılması.
A.Ü. Vet. F. yayını 274 çalışmalar 176 Ankara Ü. Basımevi, Ankara (1971)
- 8) **Council of Europe.**, European Public Health Commitles Co-ordinated Medical Research Fellowships :
Structure and organisation of Road Accident Prevention with reference
(Report presented by R. Vannugli) Strasbourg (1970)
- 9) **Clarke, E.G.C.**, Isolation and Identification of Drugs, London, The pharmaceutical press, reprinted (1971)
- 10) **Duvivier J. ve arkadaşları.**, Method For the determination of thallium in toxicology
Anal. Abs. Abs. no: 4668 (1965)
- 11) **Fulton C.C.**, Modern Microcrystal tests for drugs, Willey - Interscience, Toronto (1969)

- 12) **Gattermann-Wieland.**, (Çeviren: Ergener), Organik Kimya Laboratuvarı L. Matbaası 28. Baskı (1947).
- 13) **Geldmacher, M, et al.**, Gleichzeitige spektrographische prüfung au 25 metalle und Metalloide in biologischen Material Arch. Toxikol. **25**, 5-18 (1969)
- 14) **Güley, M; Vural, N; Söylemezoğlu, T; Karakaya, A;**
Barbitürik Asit Türevlerinin İdrardan izolasyonları ve İ.T.K. ile semikantitatif tayinleri
A.Ü. Eczacılık F. Mec. **3**, ,, 95 (1973)
- 15) **Güley, M .**, Özel respiration işareti, veren Delphium Staphisagria L. (Ranunculaceae)
A.Ü. Vet. Fak. Mec. **VIII**, 3, 255-268 (1961)
- 16) **Güley, M.**, Organik Fosforlu İnsektisitlerle husule gelen zehirlenme olayı dolayısı ile bu bileşiklerin laboratuvar imkânlarımız içinde tesbiti üzerinde bir araştırma
A.Ü. Vet. Fak. Mec. **VIII**, 2, 217-238 (1961)
- 17) **Güley, M.**, Zur Frage des Nachweises von der Anagyris Foetiedt (Leguminosae) Alkaloideen
A.Ü. Vet. F. Mec. **XII**, 4, 259-263 (1965)
- 18) **Güray Ö.**, Profesyonel Kurşun Zehirlenmeleri
Lepra Mec. **3**, S: 157 (1972)
- 19) **Jacobs, M.**, The Analytical chemistry of Industrial Poisons, Hazards and Solvent 2. Baskı, Interscience Publishers London (1949)
- 20) **Kaye, S.**, Handbook of Emergency Toxicology, Charles C Thomas publisher, springfield 2. Baskı (1961)
- 21) **Miketova, V; Frei R W.**, The Thin-Layer chromatographic properties of trace metals.
J. chromatog. **47**, 427-434 (1970)
- 22) **Muir, G D.**, Hazards in the chemical laboratory, London, the Royal of chemistry, 1. Baskı (1971)
- 23) **Stewart, C. P.**, Stolman, A, Toxicology Mechanisms and Analytical Methods V: I ve V. II Academic Press (1961)

- 24) **Reis, N.V.**, A new method for the Microdetermination of thallium in urine, blood and Faeces
Anal Abs. Abs. no: 4229 (1958)
- 25) **Sungur, T.**, Solvent zararları, Çalışma Bakanlığı işçi Sağ. Gnl. Md. Başnur Matbaası, Ankara 1969
Ref: Brit. Ind. Med, 17, 60 (1960)
- 26) **Ther, L.**, Pharmakologische Methoden Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft M.A.H, Stuttgart (1949)
- 27) **Thienes, C; Haley J.**, Clinical Toxicology Lea and Febriger, Philedelphia, 4. Baskı (1964)
- 28) **Vural, N.**, Memleketimizde kullanılan organik fosforlu insektisitleri nince tabaka kromatografisi ile incelenmesi
A.Ü. Ecz. F. Doktora Tezi No: 1, Ongun Kardeşler Matbaası, Ankara (1969)
- 29) **Witt, P.N.; Reed Ch. F.**, A spiders Web, Problems in Regulatory Biology Springer - Verlag Berlin (1968)
- 30) **Walkley, J.F.**, The measurement of phenol in Urine as an Index of Benzene Exposure
Am, Indust Hyg, 22, 362 (1961).