

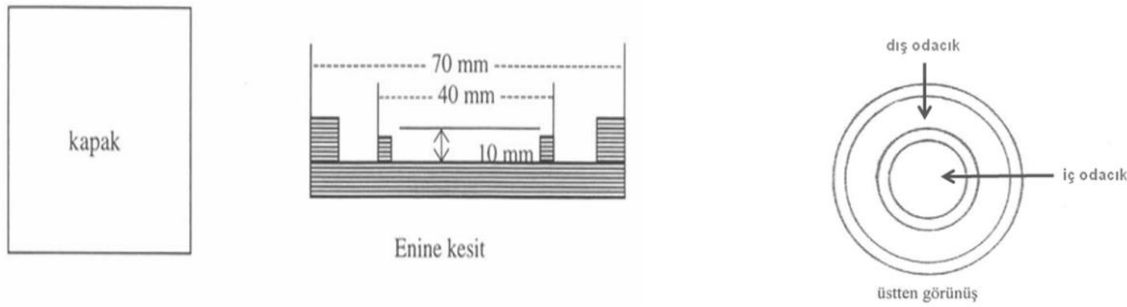
FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ LABORATUVAR FÖYÜ

DENEY NO 1: KANDA ETİL ALKOL TAYİNİ (Mikrodifüzyon Yöntemi)

Yöntemin Esası

Conway mikrodifüzyon düzeneğinde reaksiyon kapalı sistem içerisinde ve iki odacıkta gerçekleşir. Dış odacıkta uçucu zehri açığa çıkaracak reaktif ve analizi yapılacak biyolojik materyal, iç odacıkta ise uçucu zehirle reaksiyona giren reaktif bulunur.

Yöntem, dış odacıktaki açığa çıkarılmış uçucu zehirle iç odacıkta bulunan reaktifin reaksiyona girmesi esasına dayanır. Oda sıcaklığı veya 37°C de buhar veya gaz haline geçen uçucu zehir, kapalı sistemde difüzyona uğrar, iç odacıktaki çözücü içinde çözünerek sıvı faza geçer ve reaksiyon gerçekleşir.



Şekil 1. Conway mikrodifüzyon düzeneği

Deney Protokolü

Çözeltiler:

Doymuş Na_2CO_3 çözeltisi: Na_2CO_3 'ün 100 ml suda doymuş çözeltisi hazırlanır.

Ansties reaktifi: 3,70 g potasyum bikromat 150 mL distile suda çözülür. Üzerine 280 ml derişik H_2SO_4 yavaşça karıştırılarak ilave edilir. Distile su ile 500 mL'ye tamamlanır.

Alkol standardı (%160 mg=160 mg/100 ml): 0,1 mL %96 etilalkol 50 mL ye su ile tamamlanır.

Deneyin Yapılışı:

Conway mikrodifüzyon düzeneğinin **dış odacığına**;

1. Uçucu zehrin aranacağı biyolojik materyal (1 mL kan) ve uçucu zehiri serbest hale geçirecek reaktiften (1 mL doymuş Na_2CO_3 çözeltisi) konur.
2. Kantitatif tayin için standart ve kör örnekler de yapılmalıdır.

3. Standart örnek için 1 mL biyolojik materyal yerine %160 mg alkol içeren standart çözelti ilave edilir.
4. Kör örnek için ise 1 mL biyolojik materyal yerine alkol içermeyen kan örneği kullanılır.

Conway mikrodifüzyon düzeneğinin **iç odacığına ise;**

5. Uçucu zehirle reaksiyona girecek olan ansties reaktifinden 2 ml ilave edilir.
6. Düzeneğin ağzı derhal kapatılır.
7. Difüzyon için 37°C de 1 saat bekletilir.
8. Uçucu zehir (alkol) varlığında ansties reaktifi sarıdan yeşil renge döner.

Kantitatif tayin için:

9. Difüzyon tamamlandıktan sonra iç odacıktaki çözelti balon jøjeye alınarak distile su ile 10 mL'ye tamamlanır.
10. Spektrofotometre küvetlerine 1,5 mL hacimde örnek, standart ve kör çözeltiler konur.
11. Çözeltinin absorbanısı 450 nm dalga boyunda suya karşı ölçülür.

Değerlendirme için:

12. Standart ve numune çözeltilerinde bulunan alkolle reaksiyona girmeyen potasyum bikromat çözeltisi aşağıda belirtilen formül ile hesaplanır. (A-A_s) standarttaki, (A-A_n) ise numunedeki potasyum bikromat miktarını gösterir.
13. Alkol konsantrasyonu ile absorban ters orantı gösterir (Alkol konsantrasyonu arttıkça potasyum bikromat miktarı azalacağından absorbanısı düşer).
14. Alkol miktarı, kalibrasyon eğrisi hazırlanarak hesaplanabileceği gibi, tek standart yöntemi kullanılarak da hesaplanabilir.
15. Tek standart yöntemine göre kantitatif tayinde;

$$C_n = C_s \frac{(A - A_s)}{(A - A_n)}$$

C_n: Kan örneğindeki alkol konsantrasyonu (mg/100 ml kan)

C_s: Alkol standardının konsantrasyonu (mg/100 ml kan)

A: Kör örneğin absorbanısı

A_n: Numunenin absorbanısı

A_s: Standardın absorbanısı

DENEY NO 2: ALKALOİDLERİN TEŞHİSİ

Alkaloidlerin teşhisinde çeşitli renk ve çöktürme reaksiyonları kullanılır. Bu reaksiyonlarda alkaloidlerin saf ve genelde alkoldeki çözeltileri tercih edilir.

Öncelikle, örneğin hafif asitlendirilmiş sulu çözeltilisine alkaloid çöktürme reaktifleri ilave edilerek örnekte alkaloid olup olmadığı tespit edilir.

Çöktürme reaktifleri:

- a) Mayer reaktifi (K_2HgI_4) ile beyaz veya açık sarı bir çökelti meydana gelir.
- b) Wagner reaktifi (I_2 çözeltisi) ile kızılımsı kahverengi çökelti meydana gelir.
- c) Pikrik asit ile sarı renk meydana gelir.

Çöktürme reaktifleri ile alkaloid veya bazik bir azot bileşiği içerdiği saptanan örnek, çeşitli alkaloid renk reaktifleri (=grup reaktifleri) ile muamele edilerek hangi grup reaktifine cevap verdiği belirlenir. Kullanılacak grup reaktifleri sırası ile:

- 1) Konsantre sülfürik asit
- 2) Marquis reaktifi
- 3) Vitali reaktifi
- 4) Sülfürik asit ve katı potasyum bikromat
- 5) p-Dimetilaminobenzaldehid (kons. H_2SO_4 ile asitlendirilmiş alkollü çözeltisi)
- 6) Potasyum klorat'dır

Bu reaktiflerle belirgin bir renk reaksiyonu vermeyen alkaloidler, türevlerinin kristal şekillerinin mikroskopta incelenmesi amacıyla 7. grup altında toplanırlar.

Her renk reaksiyonu için porselen kapsül veya saat camı (beyaz bir zeminde incelenmek üzere) üzerine alkaloid çözeltisinden 1 damla alınır, tercihen uçurulduktan sonra 1 damla renk reaktifi ilave edilerek değerlendirme yapılır.

I. GRUP (Grup reaktifi: Saf derişik H₂SO₄)

Bu grupta derişik H₂SO₄ ile belirgin renk veren *Narkotin*, *Tebain*, *Hidrastin* ve *Ergotoksin* gibi alkaloidler incelenir.

Narkotin

Konsantre sülfürik asit:	derhal limon sarısı
Marquis reaktifi:	mavimsi mor, çabuk koyulaşır, önce kenarları sarımsı yeşil olur, sonra ortası zeytin yeşili kenarları kahverengi olur
Mecke reaktifi:	yaprak yeşili, koyulaşır, sonra sarı turuncumsu kahverengi ve nihayet turuncu-kırmızı olur
Fröhde reaktifi:	soluk yeşil

II. GRUP (Grup reaktifi: Marquis reaktifi)

Bu grupta derişik H₂SO₄ ile az veya hiç renk vermeyen, fakat Marquis reaktifi ile belirgin renk veren *Morfin*, *Apomorfin*, *Heroin*, *Kodein*, *Dionin*, *Oksikodon*, *Hidrokodeon*, *Lobelin*, *Efedrin*, *Papaverin* gibi alkaloidler incelenir.

Kodein

Marquis reaktifi:	kırmızı nüanslı mavi
Mecke reaktifi:	sonra parlak açık maviye dönen yeşilimsi mavi, neticede parlak yeşil
Fröhde reaktifi:	sonra yeşile dönen sarı, neticede mavi

Dionin

Marquis reaktifi:	kırmızı nüanslı mavi
Mecke reaktifi:	yeşil, önce kenarları mavi zeytin yeşili, sonra tüm leke zeytin yeşili olur
Fröhde reaktifi:	sonra yeşile dönen sarı, neticede mavi

Papaverin

Marquis reaktifi:	sarımtırak sonra soluk mor (hassas değil)
Mecke reaktifi:	gittikçe koyulaşan yeşil, sonra mavi, daha sonra kenarları kırmızı
Fröhde reaktifi:	sırasıyla yeşilimtrak, mavi ve sarı

III. GRUP (Grup reaktifi: Vitali testi)

Bu grupta Vitali testinde pozitif sonuç veren veya dumanlı nitrik asitle renk veren alkaloidler aranır. *Atropin*, *Hiyosiyamin* ve *Skopolamin* gibi alkaloidler Vitali reaktifi ile renk verirler (Grup III a). *Fizostigmin*, *Brusin*, *Aminofenazon* renk vermezler (Grup III b).

Vitali testi: Bir iki damla örnek kapsülde buharlaştırılır. Artığın üzerine 1 damla dumanlı HNO_3 ilave edilir ve su banyosunda tekrar buharlaştırılır. Kapsül soğutulduktan sonra 1 damla alkollü KOH çözeltisi ilave edilir. Grup III a'daki alkaloidler kahverengi-mor renk verir.

Grup III a'daki alkaloidleri birbirinden ayırt etmek için lam üzerine 1 damla alkaloid çözeltisi ve 1 damla çöktürme reaktifi (Wagner veya Pikrik asit) konur ve kristal şekiller ya da yağlı damlalar mikroskop altında incelenir.

Atropin

Wagner Reaktifi: kristaller

Pikrik asit çöz: kristaller

Skopolamin

Wagner Reaktifi: yağlı damlalar

Pikrik asit çöz: yağlı damlalar

Brusin teşhisi için birkaç damla örneğin buharlaştırılmış artığı 1-2 damla derişik H_2SO_4 'de çözülür. 1 damla derişik HNO_3 ilave edilir. Renk koyu portakal rengi olursa test olumludur. Oluşan renk SnCl_2 çöz. ile kaybolur; HNO_3 ile yeniden ortaya çıkar.

IV. GRUP (Grup reaktifi: derişik H_2SO_4 'li ortamda potasyum bikromat)

Bu grupta derişik H_2SO_4 'li çözeltilerine küçük bir kristal potasyum bikromat atıldığında renk veren *Striknin*, *Yohimbin*, *Kotarnin*, *Hidrastinin* ve *Gelsemin* gibi alkaloidler bulunur.

Striknin

Potasyum bikromat: mavi mor, sonra kırmızı mor, daha sonra kırmızı ve nihayet turuncu

Mecke reaktifi: renk vermezler

Yohimbin

Potasyum bikromat: önce mavi-mora, daha sonra yeşil'e dönen mavi

Mecke reaktifi: sonra yeşile dönen yeşilimsi mavi

Kotarnin

Potasyum bikromat: pembe, sonra yeşile döner Mecke reaktifi: sarı, kahverengine döner

V. GRUP (Grup reaktifi: p-Dimetilaminobenzaldehid reaktifi, kons. H₂SO₄ ile asitlendirilmiş alkollü çözeltisi)

Bu grupta p-dimetilaminobenzaldehid reaktifi ile reaksiyon veren *Nikotin*, *Meskalin*, *Pilokarpin*, *Novokain (=Prokain)*, *Anestezin (=Benzokain)*, *Pantokain (=Tetrakain)*, *Atovain*, *Tutokain* gibi alkaloidler ve sentetik lokal anestezipler bulunur.

Novokain

p-Dimetilaminobenzaldehid reaktifi ile oda sıcaklığında kuvvetli sarı renk meydana gelir. Karışım kuruluğa kadar buharlaştırıldığında renk kırmızımsı turuncuya döner. Ayrıca Wagner ve Pikrik asit çözeltileri ile mikroskopta incelendiğinde yağlı damlalar gözlenir.

Pilokarpin

p-Dimetilaminobenzaldehid reaktifi ile kuruluğa kadar buharlaştırıldığında kenarları pembe, kuvvetli sarı renk oluşur.

Pilokarpinin varlığını gösteren en iyi test nötr ortamda potasyum kromat ile verdiği reaksiyondur. Birkaç damla örnek deney tüpüne alınır. Üzerine küçük bir kristal potasyum kromat katılarak uçurulur. Elde edilen artığa 1 mL kloroform ve 1 mL H₂O₂ çözeltisi ilave edilip çalkalandığında kloroform fazı mavi, sulu faz pembe bir renk alır.

Anestezin

p-Dimetilaminobenzaldehid reaktifi ile oda sıcaklığında kuvvetli sarı renk meydana gelir. Karışım kuruluğa kadar buharlaştırıldığında renk kırmızımsı turuncuya döner.

Çöktürme reaktifleri (Wagner veya Pikrik asit) ile mikroskopta incelendiğinde;

Wagner reaktifi: çoğu yağlı damlalar

Pikrik asit çöz: uzun iğneler gözlenir

VI. GRUP (Grup reaktifi: Hidroklorik asit veya Amonyak)

Bu grupta hidroklorik asit veya amonyak ile renk veren *Kafein*, *Kinin*, *Kinidin*, *Sparteın*, *Emetin*, *Perkain* gibi alkaloidler bulunur.

Kafein

Birkaç damla örnekten elde edilen artık 1 damla derişik HCl'de çözülür. Küçük bir kristal $KClO_3$ ilave edilerek su banyosunda kuruyuncaya kadar ısıtılır. Kenarları kırmızı sarı bir renk oluşur. Oluşan renk artığın amonyak buharlarına tutulması ile erguvan rengine döner.

Kinin

Birkaç damla örnekten elde edilen artık 1 damla kons. HCl de çözülür. Küçük bir kristal $KClO_3$ ilave edilerek su banyosunda kuruyuncaya kadar ısıtılır. Kenarları kırmızı sarı bir renk oluşur. Oluşan renk artığın amonyak buharlarına tutulması ile yeşile döner.

Thaleioquin testi: Kinin, kinidin ve bazı diğer cinchona alkaloidleri için pozitifdir, VI. grubun diğer alkaloidleri ile reaksiyon olmaz. Üç-dört damla alkaloid deney tüpüne alınarak, uçurular, artığın üzerine 3-4 damla su ilave edilir. 1-2 damla 2N H_2SO_4 ile asitlendirildiğinde mavi floresans gözlenir.

VII. GRUP

Bu grupta teşhisleri yukarıdaki grup reaktifleri ile uygun renk reaksiyonları vermeyen *Kokain*, *Tropakokain*, *Psikain*, *Alipin*, *Sinnamil*, *Kokain*, α -*eukain*, *Akonitin*, *Koniin*, *Lupininin* ve *Arekolin* gibi alkaloidler toplanmıştır. Alkaloidlerin türevlerinin kristal şekilleri mikroskopta incelenir.

Kokain

Bir iki damla alkaloid uçurular, artık 1 damla suda çözülür ve üzerine küçük $KMnO_4$ kristali eklenerek mikroskopta incelenir. Kısmen birbiri üzerinde ve ağaç manzarasında birleşmiş dikdörtgen şeklinde plaklar gözlenir.

Arekolin

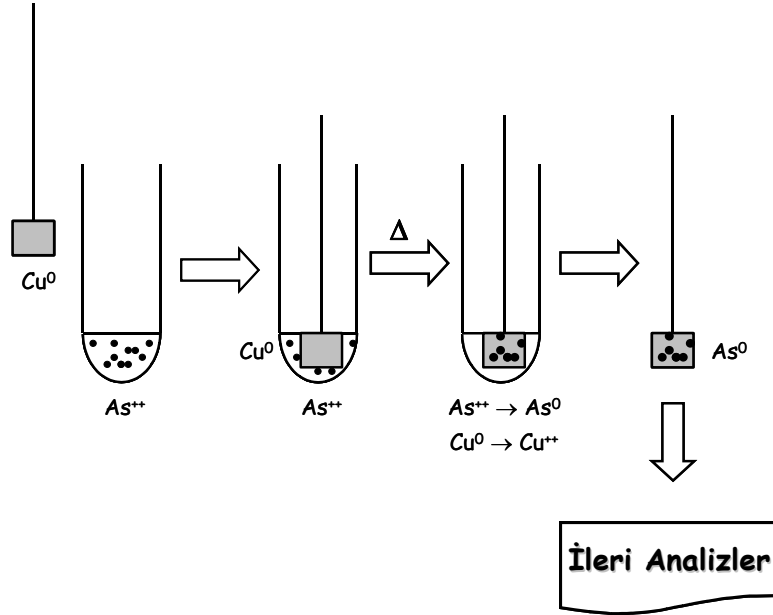
Bir iki damla alkaloid uçurular. Mikroskopta incelendiğinde Wagner reaktifi ile yağlı damlalar gözlenir; Pikrik asit çözeltisi ile reaksiyon vermez.

DENEY NO 3: METALİK ZEHİRLERİN TESPİTİ (Reinsch Testi)

Testin Esası

Biyolojik materyaldeki metalik zehirleri teşhisinde parçalama işlemine gerek duyulmaksızın doğrudan biyolojik materyal üzerine uygulanan “Reinsch Testi” metallerin teşhisinde önemli yer tutmaktadır. Bu test ile arsenik, civa, gümüş, bizmut, antimon gibi toksik metaller basit ve hızlı bir şekilde teşhis edilebilirler.

Testin esası “metal iyonlarının asit ortamda indirgenerek bakır levha üzerine toplanmalarına” dayanır. Bu durum, bir elementin (Cu^0) normal potansiyeli kendininkinden daha az negatif olan element (As^{++}) için redüktör etkisi oluşturması sonucu gerçekleşir ve elektrokimyasal bir analiz yöntemidir. Bu test; mide yıkama suları, kusmuk, idrar, dışkı, karaciğer, böbrek gibi çeşitli vücut sıvı ve organlarına da uygulanabilir.



Deney Protokolü

Çözeltiler

Kinin sülfat-KI reaktif: 1 g kinin sülfat, 100 mL %0.5'lik HNO_3 içinde çözülür. 2 g KI ilave edilir.

Deneyin Yapılışı

1. 1 cm² büyüklüğündeki bakır levha önce %50 HNO₃ ve daha sonra distile su ile yıkanarak temizlenir.
2. Temizlenmiş bakır levha, asitli numune çözeltisinin bulunduğu tüpe konarak, kaynar su banyosunda 15-20 dk bekletilir (Bizmut için daha uzun süre beklenmelidir).
3. Aranacak metallerin bakır levha üzerinde toplanması sonucu bazı renkler oluşur. Bakır levhanın rengi, metalik zehrin cinsi hakkında bize ön bilgi verir:

- | | |
|-----------------------|---------------------------------|
| - Gümüşü renk: | Civa |
| - Parlak siyah renk: | Bizmut |
| - Mat gri-siyah renk: | Arsenik |
| - Mor renk: | Antimon olabileceğini gösterir. |

Bakır levha üzerinde toplanan metalin kesin tanımlanması

Ön deneyler ile örnekte var olduğu düşünülen metal ile ilgili aşağıdaki testler yapılır:

Civa aranması

1. Saat camına filtre kağıdı yerleştirilir ve üzerine sırasıyla, 1-2 damla %5 KI, 1-2 damla %5 Na₂SO₄ karışımı ve 1-2 damla %5 CuSO₄ ilave edilir.
2. Distile su ile yıkanmış ve kurutulmuş üzerinde civa toplandığı düşünülen bakır levha bu karışım üzerine konur.
3. İkinci bir saat camı ile üzeri kapatılarak yaklaşık 40 dk bekletilir.
4. Civa varlığında bakır levha üzerinde sarı-kırmızı renk belirir.

Bizmut aranması

Üzerinde bizmut toplandığı düşünülen bakır levha bir tüpe alınır, üzerine sırayla 1 mL %5 Na₂SO₃, 1 mL %15 HNO₃ konur ve 5 dk çalkalanır. Bizmut varsa çözeltiliye geçer.

1. Çözelti bir başka tüpe aktararak üzerine 1 mL su, 1 mL kinin sülfat-KI reaktif karışımı ilave edilir.
2. Bizmut varlığında çözeltide turuncu renk oluşur.

Arsenik ve Antimon aranması

Üzerinde arsenik veya antimon toplandığı düşünülen bakır levha bir tüpte 0.5 mL %10 KCN ile çalkalanır. Arsenik varsa çözeltiliye geçer (antimon ise bakır levha üzerinde kalır). Arsenik ve antimon aranmasına Gutzeit testi ile devam edilir.

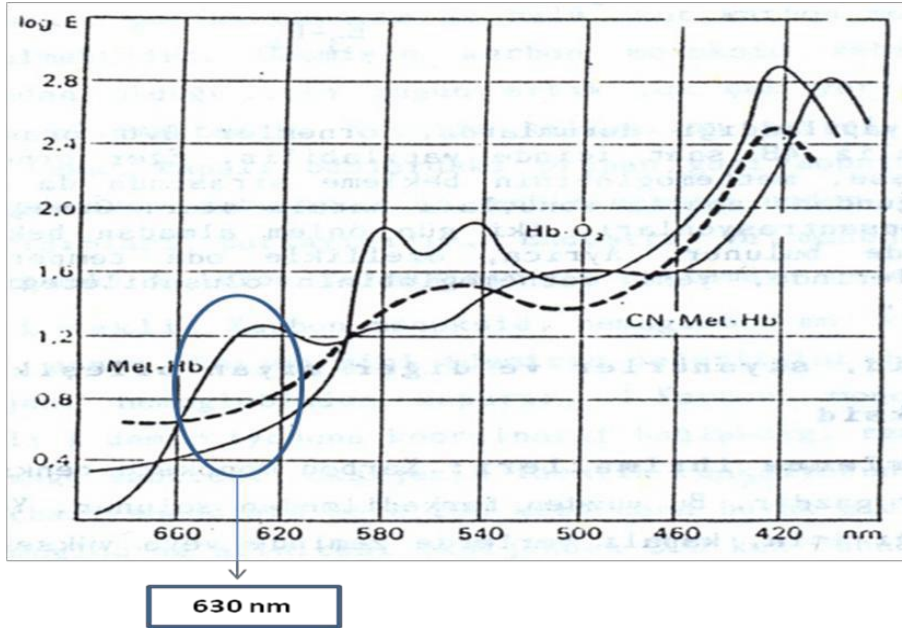
- Gutzeit Testi

1. 1 mL çözeltili (arsenik varlığından şüphelenilen) veya bakır levha (antimon varlığından şüphelenilen) bulunan tüp içerisine 1 mL %20 H₂SO₄, 1-2 saf granül çinko, 1-2 damla %5 SnCl₂ ilave edilir ve tüpün ağzı sıkıca bir mantar tıpa ile kapatılır.
2. Kapatma esnasında mantarın kenarına 1 damla %5 HgCl₂ veya 1 damla %5 AgNO₃ emdirilmiş filtre kâğıdı yerleştirilir.
3. Arsenik varlığında; 20-30 dk içinde HgCl₂ emdirilmiş filtre kağıdında konsantrasyona bağlı olarak sarı-turuncu-kahverengi-siyah değişen renk tonları, AgNO₃ emdirilmiş filtre kağıdında ise siyah renk görülür.
4. Antimon varlığında; oluşan renk sarı-siyahtır ve daha geç meydana gelir.
5. Ayrıca konsantre HCl dumanları ile temasta, antimon ile oluşan renk kaybolduğu halde arsenik ile oluşan renk sabit kalır.

DENEY NO 4: KANDA METHEMOGLOBİN TAYİNİ (Siyanür Metodu)

Testin Esası

Metod, methemoglobinin 630 nm'de görülen maksimum absorpsiyon bandının siyanür ilavesi ile kaybolması esasına dayanır. Oluşan siyano-methemoglobin bileşiği (CN-Met-Hb), bu dalga boyunda çok düşük bir absorpsiyon gösterir (Şekil 1). İki absorpsiyon değeri arasındaki fark, çözeltideki methemoglobin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.



Şekil 1. Oksihemoglobin, methemoglobin ve siyano-methemoglobinin absorpsiyon spektrumları

Deney Protokolü

Çözeltiler:

$K_3[Fe(CN)_6]$ çözeltisi: 0,5 g madde 10 mL suda çözülür (Taze hazırlanır).

KCN çözeltisi: 0,05 g madde 10 mL suda çözülür (Taze hazırlanır).

Fosfat tamponu çözeltisi (pH 6,9): 5,5 kısım çözelti A (11,876 g $Na_2PO_4 \cdot 2H_2O/L$) ve 4,5 kısım çözelti B (9,078 g KH_2PO_4/L)'nin karıştırılması ile laboratuvar esnasında taze hazırlanır.

Deneyin Yapılışı:

1. Santrifüj tüpüne 5 mL su konur.
2. Yaklaşık 4-5 damla kan bekletilmeden içinde su bulunan santrifüj tüpüne konur, iyice karıştırılır ve 10 dakika bekletilir.
3. Hazırlanan hemolizat üzerine 5 ml fosfat tamponu çözeltisi eklenir, karıştırılır ve 5 dk 1000 devir/dk ile santrifüj edilir.
4. Üstteki analiz çözeltisinden iki ayrı spektrofotometre küvetine (1 cm'lik) 1,5 mL konur.
5. Böylece, 1. ve 2. ile 3. ve 4. ölçümlerde kullanılacak çözeltiler hazırlanmış olur.

Spektrofotometrede ölçümler

1. ve 2. ölçüm:

6. Spektrofotometre küvetindeki 1,5 mL analiz çözeltisine 1 damla su ilave edilir, karıştırılır. Çözeltinin absorbanı 630 nm dalga boyunda suya karşı ölçülür (**=A₁**).
7. Sonra küvetteki çözeltiliye 1 damla KCN çözeltisi ilave edilir ve karıştırılır. Çözeltinin absorbanı 5 dk sonra tekrar ölçülür (**=A₂**).

3. ve 4. ölçüm:

8. Diğer spektrofotometre küveti içerisindeki 1,5 mL analiz çözeltisine ise 1 damla K₃[Fe(CN)₆] çözeltisi ilave edilir, karıştırılır. 3 dk sonra çözeltinin absorbanı 630 nm dalga boyunda suya karşı ölçülür (**=A₃**).
9. Küvetteki çözeltiliye 1 damla KCN çözeltisi ilave edilir ve karıştırılır. Çözeltinin absorbanı 5 dk sonra tekrar ölçülür (**=A₄**).

NOT: Spektrofotometrede 1. ve 3. ölçümler ile 2. ve 4. ölçümler paralel olarak ölçülür.

Sonucun hesaplanması:

$$\% \text{Met-Hb} = \frac{(A_1 - A_2) \times 100}{(A_3 - A_4)}$$

DENEY NO 5: SİTOTOKSİSİTE TESTLERİ (MTT ve TRİPAN MAVİSİ TESTİ)

MTT TESTİ

Testin esası

MTT bileşiğinin yapısında bulunan tetrazolyum halkasının canlı ve mitokondriyal fonksiyonları bozulmamış hücrede mitokondriyal bir enzim olan süksinat dehidrojenaz enzimi ile formazana dönüşmesi esasına dayanır.

Soluk sarı renkli MTT, tetrazolyum halkasının parçalanması sonucu koyu mavi-mor renkli formazan ürününe dönüşür. Böylece canlı ve mitokondriyal fonksiyonları bozulmamış hücreler mor renge boyanırken ölü ve mitokondriyal fonksiyonu bozulmuş hücreler boyanmaz. Oluşan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak 590 nm'de ölçülür.

Deney Protokolü

Çözeltiler:

Fosfat tampon çözeltisi (PBS): 150 mM NaCl (8,766 g/L) + 1,9 mM NaH₂PO₄ (0,296 g/L) + 8,1 mM Na₂HPO₄ (2,9 g/L)

MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolyum bromür) çözeltisi: 10 mg/mL PBS (4°C'de ve karanlıkta saklanmalı)

Çözündürme karışımı: 10 g SDS + 99,4 ml DMSO + 0,6 ml glasiyel asetik asit H₂O₂ çözeltisi: %30 H₂O₂ çözeltisi 8,8 M'a tekabül eder.

0,1 M H₂O₂ çözeltisi: 11,5 µl %30 H₂O₂ üzerine 988,5 µl distile su eklenir.

0,2 M H₂O₂ çözeltisi: 23,0 µl %30 H₂O₂ üzerine 977,0 µl distile su eklenir.

0,4 M H₂O₂ çözeltisi: 46,0 µl %30 H₂O₂ üzerine 954,0 µl distile su eklenir.

0,8 M H₂O₂ çözeltisi: 92,0 µl %30 H₂O₂ üzerine 908,0 µl distile su eklenir.

Yanak epitel hücresinin elde edilmesi:

Ağız suyla çalkalanarak temizlenir. Pamuklu çubukla sürterek ağızdan alınan yanak epitel hücreleri 1,5 mL PBS içerisine alınır.

Deneyin yapılışı:

1. Yanak epitel hücrelerinin PBS'deki süspansiyonu 2 ayrı mikrosantrifüj tüpüne her biri 1080 µL olacak şekilde konur.
2. Kontrol grubuna (1. mikrosantrifüj tüpü) 120 µl distile su ilave edilir.
3. Hasar oluşturulacak gruba (2. mikrosantrifüj tüpü) farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış olan H₂O₂ çözeltisinden 120 µL ilave edilir.
4. Her iki mikrosantrifüj tüpü 37°C'de 30 dk inkübasyona bırakılır.
5. Her iki mikrosantrifüj tüpüne 40 µl MTT çözeltisi eklenir.
6. 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakılır.
7. 5000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek üstteki sıvı atılır (Çökeltinin dökülmemesine dikkat edilmeli!).
8. Çökeltiye 1,2 mL "çözündürme karışımı" ilave edilir ve 5 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır.
9. 5000 rpm'de 5 dk santrifüj edilir.
10. Oluşan rengin şiddeti 590 nm'de ölçülür.

Sonucun hesaplanması:

Kontrol grubundan elde edilen absorbans değeri %100 canlılığı ifade eder.

Hasar oluşturulan örnekteki canlı hücre oranı, kontrol grubunun absorbans değeri ile kıyaslanarak % cinsinden hesaplanır.

Bu değer 100'den çıkarıldığında ölü hücrelerin % cinsinden oranı hesaplanır. Buradan hareketle %50 ölüme sebep olan konsantrasyon hesaplanarak IC₅₀ değeri (%50 inhibisyona sebep olan konsantrasyon) bulunur.

TRİPAN MAVİSİ TESTİ

Testin esası

Ölü hücrenin bozulmuş hücre membranlarından dolayı tripan mavisi boyasını içerisine alırken, canlı hücrenin boyayı içine almaması esasına dayanır. Işık mikroskobu ile incelendiğinde; canlı hücrelerin sadece membranları soluk mavi renkli, ölü hücrelerin ise tamamı mavi renge boyanmış halde gözlenirler.

Deney Protokolü

Çözeltiler:

Tripan mavisi çözeltisi: 100 µL tripan mavisi üzerine 300 µL distile su eklenir.

H₂O₂ çözeltisi: %30 H₂O₂ çözeltisi 8,8 M'a karşılık gelmektedir.

0,1 M H₂O₂ çözeltisi: 11,5 µl %30 H₂O₂ üzerine 988,5 µL distile su eklenir.

0,2 M H₂O₂ çözeltisi: 23,0 µl %30 H₂O₂ üzerine 977,0 µL distile su eklenir.

0,4 M H₂O₂ çözeltisi: 46,0 µl %30 H₂O₂ üzerine 954,0 µL distile su eklenir.

0,8 M H₂O₂ çözeltisi: 92,0 µl %30 H₂O₂ üzerine 908,0 µL distile su eklenir.

Yanak epitel hücrelerinin elde edilmesi:

Ağız suyla çalkalanarak temizlenir. Pamuklu çubukla sürterek ağızdan alınan yanak epitel hücreleri 1,5 mL PBS içerisine alınır.

Deneyin yapılışı:

1. Yanak epitel hücrelerinin PBS'deki süspansiyonu 2 ayrı mikrosantrifüj tüpüne her biri 225 µL olacak şekilde konur.
2. Kontrol grubuna (1. mikrosantrifüj tüpü) 25 µL distile su ilave edilir.
3. Hasar oluşturulacak gruba (2. mikrosantrifüj tüpü) farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış olan H₂O₂ çözeltisinden 25 µL ilave edilir.
4. Her iki mikrosantrifüj tüpü 37 °C'de 30 dk inkübasyona bırakılır.
5. Hücre süspansiyonlarından 15'er µL alınarak iki ayrı temiz mikrosantrifüj tüpüne aktarılır.
6. Üzerlerine 15 µL tripan mavisi çözeltisi eklenir ve iyice karıştırılır.
7. Tripan mavisi ile boyanmış hücre süspansiyonundan 12 µL "Hemasitometre lamı"na yerleştirilir. Yükleme yapılmadan önce hemasitometre lamının (hücre sayım lamı; thoma lamı) lamel ile iyi bir şekilde kapatılması gereklidir (Şekil 1).

FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ÖĞRENCİ LABORATUARI RAPORU - 1

GRUP:

TARİH:

AD SOYAD:

ÖĞRENCİ NO:

İMZA:

DENEY NO 1: KANDA ETİL ALKOL TAYİNİ

DENEYİN ESASI:

SONUÇ:

DENEY NO 2: ALKALOİDLERİN TEŞHİSİ

DENEYİN ESASI:

SONUÇ:

FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ÖĞRENCİ LABORATUARI RAPORU - 2

GRUP:

TARİH:

AD SOYAD:

ÖĞRENCİ NO:

İMZA:

DENEY NO 3: METALİK ZEHİRLERİN TESPİTİ (Reinsch Testi)

DENEYİN ESASI:

SONUÇ:

DENEY NO 4: KANDA METHEMOGLOBİN TAYİNİ

DENEYİN ESASI:

SONUÇ:

FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ÖĞRENCİ LABORATUAR RAPORU - 3

GRUP:

TARİH:

AD SOYAD:

ÖĞRENCİ NO:

İMZA:

DENEY NO 5: MTT TESTİ

DENEYİN ESASI:

SONUÇ:

DENEY NO 6: TRİPAN MAVİSİ TESTİ

DENEYİN ESASI:

SONUÇ: