

Metode biochimice utilizate in aprecierea efectului poluantilor din mediu asupra organismului

Determinarea sulfiților din sânge

Generalități: prezența sulfiților în sânge a fost considerată ca indicator de expunere la bioxidul de sulf. Incostanta cu care au fost puși în evidență, semnificația acestui indicator bichimic la expunerile la concentrații ridicate.

Principiul metodei: bioxidul de sulf din sânge formează cu reactivul fuxin formolic un complex colorat a cărui intensitate este proporțională cu concentrația.

Reactivi:

- formaldehidă, soluție 40%;
- pararozanilină 3% în soluție alcoolică;
- reactiv fuxin-formolic;
- hidroxid de potasiu, soluție alcoolică 1%;
- soluție saturată de clorură mercurică($HgCl_2$);
- soluție etalon stoc pentru bioxid de sulf;
- soluție etalon de lucru.

Recoltarea probelor de sânge: sângele care se recoltează din deget e un anticoagulant.

Mod de lucru: într-o eprubetă de centrifugă se introduc 0,5 ml soluție alcoolică de KOH 1%, 2,2 ml apă bidistilată și 0,2 ml sânge. Eprubeta se agită timp de 2-3 minute apoi se adaugă 1 ml soluție saturată de clorură mercurică, agitând din nou. Se centrifughează la 4000 turații, timp de 5 minute și apoi se iau cu atenție din supernatant 2 ml și se introduc într-o eprubeta peste care se adauga 4 ml reactiv foxin-formolic. Dupa 5' se citește extincția la spectrofotometru la lungimea de undă de 570 nm în cuva de 1 cm. Valoarea extincției se raportează la curba de etalonare care se întocmește după schema de mai jos:

Concentrația SO_2 /proba	μg	0	1	3	5	7	9	10
Soluția etalon de lucru	ml	0	0,1	0,3	0,5	0,7	0,9	1,0
Apă bidistilată	ml	1,5	1,4	1,2	1,0	0,8	0,6	0,5
Soluția de clorură mercurică	ml	Câte 0,5 ml						
Reactiv fuxin-formolic	ml	Câte 4 ml						

După fiecare adăugare de reactiv se agită eprubetele. Se lasă apoi 5' în repaus și se citește extincția în aceleași condiții ca și proba. Se trasează curba de etalonare.

Calcul: $mg SO_2\% = c/v \cdot 10$

C =concentrația în $\mu g SO_2$ din proba de sânge;

V =cantitatea de sânge luată în lucru, în ml.

Determinarea fluorului din urină

Generalități: calea principală de eliminare a fluorului din organism este cea renală. La o ingestie normală de fluor, concentrația fluorului urinar este proporțională cu ingestia. Dacă

organismul este expus la concentrație crescută de fluor, nivelul fluorului din urină crește, dar fără a se menține proporționalitatea cu gradul de expunere.

Principiul metodei: fluorul este separat din urină prin microdifuzie sub forma de HF, care este prins pe o peliculă de hidroxid de sodiu ca fluorura de sodiu. Dozarea se face colorimetric, prin decolorarea lacului SPANDS- azotat de thoriu, proporțional cu concentrația fluorului.

Reactivi și material necesar:

- hidroxid de sodiu: soluție alcoolică 0,05 N;
- acid percloric 70%;
- azotat de thoriu 0,004M;
- soluție etalon stoc pentru fluor;
- SPANDS, 0,004 M;
- soluție etalon stoc entru fluor;
- soluția etalon de lucru;
- sulfat de argint, pulbere;
- acid clorhidric 0,05;
- 2,5 ml soluție de azotat de thoriu 0,004 M;
- 5,0 ml soluție SPANDS 0,004 M;
- 0,04 soluție de HCl 0,05 N;
- apă bidistilată;
- cutii din polistiren folosite la ambalajul medicamentelor (faringosept sau B complex);
- capace din plastic cu care se astupă flacoanele de vitamina C.

Recoltarea se face din urina din 24 de ore, într-un recipient de polistiren.

Mod de lucru: 2 ml urină se introduc într-un capacel de plastic care se amplasează în capacul unei cutii de polistiren. În corpul aceleiași cutii se introduce 1 ml soluție alcoolică de hidroxid de sodiu și se lasă la etuvă la 60°C pentru evaporarea alcoolului și formarea peliculei de hidroxid de sodiu.

În căpăcelul cu urină se introduc 0,1g sulfat de argint și 2 mg acid percloric, se închide imediat cutia și se lipește o fâșie de leucoplast în jurul cutiei pentru a evita pierderile de fluor.

Paralel cu proba, în condițiile identice se procedează pentru proba martor (apa bidistilată) și 5 etaloane care conțin cantități succesive de fluor (1; 3; 5; 7; 10 μg F) introducându-se în fiecare căpăcel câte 0,1; 0,3; 0,7; și 1,0 ml soluție etalon de lucru de fluorură de sodiu. Se completează apoi volumul cu apă bidistilată până la 2 ml. În continuare se procedează ca și pentru proba de urină. Cutiile bine închise se introduc în etuvă la 58°-60°C, timp de 20 ore pentru realizarea difuziei.

Se scot cutiile de la etuvă și în corpul cutiei unde s-a realizat pelicula de hiroxid și fixarea fluorului se introduc 2 ml apă bidistilată, 4 ml acid clorhidric 0,05 N și 4 ml lac SPANDS-azotat de thoriu. După 10' se citește extincția de la spectrofotometru la lungimea de undă de 580 nm în cuva de 1 cm. Cu valorile extincțiilor obținute pentru proba martor și etaloane se trasează o curbă.

Calcul: $\text{mg F/dm}^3 = c/v$

C =concentrația în μg fluor din proba de urină luată în lucru;

V =cantitatea de urină luată în lucru, în ml;

Obs.: concentrația fluorului în urină la o expunere normală de fluor este între 0,5-1,5 mg/dm³.

Determinarea mercurului din urină

Generalități: creșterea concentrației mercurului în urină poate indica depozitarea de mercur sau intoxicație cu acest metal. Totuși rezultatele sunt neconstatate, după pătrunderea

în organism mercurul dispărând repede din sânge în urină. Mai constant și cu valoare mai ridicată pentru diagnosticul de expunere este determinarea Hg în păr și unghii.

Principiul metodei: mercurul formează cu difeniltiocarbazona un complex colorat la $\text{pH} = 1,5-2,0$.

Reactivi:

- E.D.T.A- Na_2 , soluție 0,1 N;
- acid sulfuric conconcentrat $d = 1,84$;
- acid sulfuric diluat;
- permanganat de potasiu, soluție saturată;
- galben de metanil, soluție 0,1%;
- roșu de fenol, soluție 0,1%;
- ditizonă, soluție stoc 0,1% în cloroform;
- ditizonă soluție de lucru;
- soluție de hidroxilamină 10%;
- soluția e spălare;
- toluen pur;
- soluția etalon stoc pentru mercur;
- amoniac concentrat.

Recoltarea probelor: urina se recoltează din prima emisiune de dimineață sau urina colectată în 24 ore (vasele în care se face recoltarea trebuie bine clătite) cu soluție de acid azotic (1:25) și apoi cu apa bidistilată.

Mod de lucru: într-o capsulă de porțelan se introduc 50 ml urină, 5 ml H_2SO_4 concentrat ($d = 1,840$) și 15 ml soluție saturată de permanganat de potasiu. Se încălzește moderat pe baia de nisip fără a ajunge la fierbere, acoperind vasul cu o sticlă de ceas, până ce lichidul supernatant devine limpede și incolor prezentând pe fundul vasului un precipitat brun. Dacă precipitatul lipsește înseamnă că trebuie să se mai adauge soluție de permanganat de potasiu și se continuă încălzirea până ce lichidul supernatant se decolorează complet. După răcire excesul de permanganat se îndepărtează cu hidroxilamina adăugând picătură cu picătură până la dispariția precipitatului brun și apoi un exces de 5 ml hidroxilamină. Se trece proba cantitativ într-o pâlnie de separare, se ajustează pH -ul la 1,2-2,0 așa cum s-a arătat la determinare mercurului din aer și se procedează în continuare la fel ca și la aer.

Calcul: $\mu\text{g mercur}/\text{dm}^3 \text{ urină} = C \times 20$

$C =$ concentrația în $\mu\text{g mercur}$ din proba de urină luată în lucru $\mu\text{g mercur}/\text{urina}$ din 24 ore = $C \times 20 \times V_{24}$.

$V_{24} =$ cantitatea de urină colectată în 24 ore, în litri.

Obs.: valoarea normală a mercurului în urină este de 30 $\mu\text{g}/\text{urina}$ din 24 ore.

Determinarea mercurului din păr

Principiul metodei: ionii de mercur în mediul acid formează cu difenilcarbazona un complex colorat în portocaliu, ditizonatul de mercur, care se extrage cu toluen și se poate colorimetra.

Reactivi și material necesar:

- acid azotic d= 1.41 și soluții apoase de 2% și 10% în volume;
- acid sulfuric d= 1,84 și soluție apoasă de 50% în volume;
- hidroxid de amoniu soluție 25%;
- permanganat de potasiu soluție saturată;
- clorură stanoasă 10% în HCl concentrat;
- galben de metalin soluție apoasă 0,1%;
- roșu de fenol 0,1;
- ditizonă soluție stoc 0,1% și 0,5%;
- ditizonă, soluția de lucru;
- clorhidrat cu hidroxilamină, soluție 10%;
- E.D.T.A.- sarea de sodiu;
- clorură stanoasă soluție 10%;
- soluția de spălare;
- soluție etalon stoc;
- apă bidistilată în prezent permanganatului de potasiu și hidroxidului de sodiu.

Mod de lucru : în balonul cu fundul rotund de la aparatul de distilat mercur se introduc 2 g păr, câțiva ml de apă bidistilată, 10 ml acid azotic, 10 ml apă oxigenată și 2 ml clorură stanoasă 10% în acid clorhidric. Se fixează balonul la parat și se da drumul la foc foarte încet. Se distilează aproximativ 1/2 oră și se continuă determinarea la fel ca la determinarea mercurului din apă.

Determinarea plumbului în sânge

Generalități: plumbul se găsește în sânge atât sub forma anorganică cât și legat de unele substanțe organice. Cea mai mare parte a plumbului din sânge, se găsește în eritrocite. Concentrația plumbului în sânge ne dă indicații cu privire la indigestia și eliminarea lui în organism, mai precis la cantitatea de plumb pe care organismul o fixează.

Principiul metodei: plumbul are proprietatea de a reacționa cu difenilcarbazona, în mediul alcalin cu care formează un complex colorat în roșu, ditizonatul de plumb, colorimetrabil.

Reactivi:

- acid azotic (d= 1,40);
- acid azotic 1% și 0,05% în cloroform;
- cloroform;
- ditizonă 0,01% și 0,05% în cloroform;
- soluția tampon de citrat;
- soluția de spălare;
- soluția etalon stoc pentru plumb;
- soluția etalon de lucru;
- acid tricloracetic 10% și 5%;
- acid percloric 70%.

Recoltarea: sângele se recoltează prin puncție venoasă cu un ac sterilizat prin fierbere în apă distilată, pe fluorura de sodiu (0,1) ca anticoagulant.

Modul de lucru: 10 ml de sânge bine omogenizat se introduc într-o eprubeta de centrifugă de 50 ml în care se află 10 ml apă bidistilată. Se amestecă bine cu o baghetă de sticlă pentru a se realiza hemoliza și apoi se adaugă 10 ml acid tricloracetic 10%, picătură cu picătură sub agitare continuă. Se lasă apoi o oră în repaus și se centrifughează la 3000 turații, timp de 5'. Supernatantul se trece într-o capsula de porțelan. În eprubeta de centrifugă se mai adaugă 10 ml acid tricloracetic. Se adaugă 5 ml acid azotic 5% și se amestecă bine centrifugându-se din nou. Supernatantul se separă în aceeași capsulă. Peste fracțiunile extrase în tricloracetic se adaugă 5 ml acid azotic concentrat (d = 1,42) și se încălzește pe baia de nisip până rămân aproximativ 5 ml lichid. După ce s-a răcit se adaugă 0,5 ml până la uscare. Dacă reziduul nu este alb se mai adaugă 1 ml acid azotic și 2-3 picături de acid percloric și se evaporă din nou la sec. Se repetă operația până ce reziduul este perfect alb. Se adaugă apoi 2 ml apă bidistilată și se evaporă iarăși până la sec. Peste reziduul uscat se adaugă 10 ml acid azotic (1 :25) și apoi conținutul se trece cantitativ într-o pâlnie de separare cu porțiuni mici de apă bidistilată (să nu depășească volumul final 40 ml). Se adaugă 15 ml soluție tampon și dacă proba se tulbură se mai adaugă soluție tampon până la limpezirea completă.

Paralel se face o probă martor folosind 15 ml acid tricloracetic care se tratează la fel ca și proba. În continuare se procedează la fel pentru determinarea plumbului în apă și aer.

Calcul : $\mu\text{g Pb}/100 \text{ ml s\text{â}nge} = C \times 10$

C = concentrația în $\mu\text{g Pb}$ din proba de sânge luată în lucru;

Obs.: valoarea normală a plumbemiei este de 30 $\mu\text{g}/100 \text{ ml s\text{â}nge}$.

Determinarea plumbului în urină

Generalități: plumbul în urină se găsește sub formă de combinații organice și anorganice. Concentrația plumbului din urină ne poate da unele indicații cu privire la impregnarea organismului cu plumb.

Principiul metodei: plumbul are proprietatea de a reacționa cu ditizona, în mediu alcalin cu care formează un complex colorat în roșu, ditizonatul de plumb, colorimetrabil.

Reactivi:

- acid azotic (d= 1,40) ;
- acid azotic 1% și 0,05%;
- cloroform;
- ditizonă 0,01% și 0,05%;

- soluția tampon de citrat ;
- soluția de spălare;
- soluția etalon stoc;
- soluția etalon de lucru;
- permanganat de potasiu, soluție saturată;
- soluție de hidroxilamină 10%.

Recoltarea: urina se recoltează în vase bine spălate cu detergent și clătite cu o soluție de acid azotic 1:10 și cu apă bidistilată. Recoltarea urinei se face din prima emisiune de dimineață sau din urina colectată în 24 de ore.

Mod de lucru: într-o capsulă de porțelan se introduc 25 ml urină și se adaugă 2,5 ml acid azotic ($d = 1,42$) și 8,5 ml soluție saturată de permanganat de potasiu. Se încălzește pe baia de nisip, moderat, până ce lichidul supernatant devine limpede și incolor. Pe fundul vasului trebuie să persiste un rest de precipitat brun. În caz contrar se mai adaugă câțiva ml de permanganat continuându-se încălzirea. După răcirea parțială a soluției, se tratează excesul de permanganat cu hidroxilamină, adăugându-se picătură cu picătură până la dispariția completă a precipitatului brun și apoi un exces de 2 ml. Paralel cu proba de urina se face un martor cu apă bidistilată și care se lucrează în aceleași condiții ca și proba.

Se trece conținutul din capsulă cantitativ într-o pâlnie de separare cu porțiuni mici de apă bidistilată să nu depășească 40 ml. Se adaugă 15 ml soluție tampon până la limpezirea completă.

$$\text{Calcul: } \mu\text{g Pb/dm}^3 \text{ urina} = c/v \cdot V_{24}$$

C= concentrația în $\mu\text{g Pb}$ din proba de urină luată în lucru

V= cantitatea de urină luată în lucru, în ml

V_{24} = cantitatea totală de urina eliminată în 24 de ore în ml

Obs.: Valoarea normală a plumbului în urină este de 50 $\mu\text{g/urina/24 ore}$.

Determinarea enzimei Δ amino-levulinic Dehidraza (ALA-dehidraza)

Generalități: enzima ALA-dehidraza intervine în biosinteza hemului la etapa de cuplare a celor două molecule de acid Δ amino-levulinic pentru a forma porfobilinogenul, precursorul nucleului porfirinic. Activitatea acestei enzime este inhibată în cazul expunerii organismului la plumb.

Principiul metodei: activitatea ALA-dehidrazei se determină prin dozarea colormetrică a porfobilinogenului din sânge înainte și după incubarea sângelui total cu acid Δ amino-levulinic ca substrat.

Reactivi:

-acid Δ amino-levulinic 0,01 M;

-reactiv;

-deproteinizant: acid tricloracetic 10%;

Recoltarea probelor: sângele se recoltează prin puncție venoasă pe heparină.

Mod de lucru: în 2 eprubete de centrifugă care se notează cu P și M se introduc în fiecare câte 0,2 ml sânge heparinizat și 1,3 ml apă bidistilată, se amestecă ușor și apoi se introduc într-o baie termostat la 37°C timp de 10' pentru realizarea hemolizei. În eprubeta P se introduce 1 ml acid Δ amino-levulinic (substrat) iar în eprubeta M 1 ml acid tricloracetic, se agită și apoi 1 ml acid Δ amino-levulinic. Ambele eprubete se țin la incubat timp de 60' la 37°C. După incubare se adaugă și în eprubeta P 1 ml acid tricloracetic. Se centrifughează ambele eprubete la 3000 rotații timp de 10'. Se ia din supernatant câte 1 ml și se introduce în alte 2 eprubete peste care se adaugă 1 ml reactiv Ehrlich.

Calcul: unități ALA-dehidraza/ml eritrocite = $12,5 \times E_{60} - E_0 / \% \text{ hematocrit} \times 1000$

E_{60} = valoarea extincției probei din eprubeta P.

E_0 = valoarea extincției din eprubeta M.

Obs.: se consideră ca valori normale pentru activitatea ALA-dehidrazei 25 unități/l de eritrocite.

Determinarea hematocritului (volumul eritrocitelor)

Principiul metodei: sângele se centrifughează și se separă eritrocitele de plasmă iar prin evaluarea raportului cantitativ între ele se obține volumul eritrocitelor.

Reactivi și material necesar:

- centrifuga;
- anticoagulant-heparina;
- material pentru recoltarea sângelui prin puncția venoasă;
- hematocrit.

Recoltarea probei de sânge: sângele se recoltează prin puncție venoasă heparina (o picătură de heparină este suficientă pentru 5 ml sânge).

Mod de lucru: sângele se introduce în hematocrit și se centrifughează la 4000 rotații timp de 20'. După centrifugare se măsoară înălțimea „h” a coloanei de eritrocite și înălțimea „H” a coloanei totale de sânge. Dacă tubul este gradat în mm se face citirea direct, dacă nu este gradat, înălțimea se măsoară cu ajutorul unei rigle.

Calcul: hematocrit% = $100 \times h/H$.

h= înălțimea coloanei de eritrocite, în mm;

H= înălțimea coloanei totale de sânge, în mm;

Obs.: valori normale ale hematocritului: bărbați 44,9%; femei 40,7%.

Determinarea acidului Δ amino-levulinic în urină

Generalități: ca și coproporfirinele, concentrația acidului delta-amino-levulinic crește în urină în expunerea organismului la concentrații crescute de plumb în urma perturbării biosintezei hemului produsă de prezența plumbului.

Principiul metodei: acidul Δ amino-levulinic se separă din urină prin reținerea lui pe o coloană cu rășini schimbătoare de ioni, cationică și determinarea colorimetrică cu reactivul Ehrlich.

Reactivi și material necesar:

- hidroxid de sodiu 1 N;
- acid clorhidric 1 N și 2 N;
- tampon acetat, pH = 4,6;
- acetat de sodiu 2 M;
- acid acetic glacial;
- acid acetic soluție 1 M și 0,2 M;
- acetilacetonă;
- acid percloric 70%;
- rășină cationică DOWEX 50 - x 8, granulație 200-400 mesh forma H⁺;

-rășină anionică (pentru îndepărtarea porfobilinogenului) rășină DOWEX 2- x8 sau DOWEX 1- x8 cu granulația de 200-400 mesh sub formă de acetat;
-reactiv Erlich.

Recoltarea probelor: urina se recoltează din prima emisiune de dimineață sau din urina colectată în 24 ore și se lucrează cât se poate de repede.

Mod de lucru: cele 3 coloane se așează una deasupra celeilalte având grijă ca deasupra să fie coloana anionică. Se introduc în coloane 8 ml apă bidistilată și se așteaptă să treacă complet prin cele două coloane [în coloana anionică s-a reținut porfobilinogenul iar în cea cationică acidul Δ amino-levulinic (ALA)].

În coloana cationică se introduc 7 ml acetat de sodiu 1 M care este prins într-o eprubetă gradată de 10 ml. Se completează volumul la 10 ml cu soluție tampon de acetat și se adaugă apoi 0,2 ml acetilacetonă, se agită bine eprubeta se adaugă 2 ml reactiv Ehrlich și se amestecă bine. Se lasă în repaus 15' apoi se citește extincția la spectrofotometru la lungimea de undă de 553 nm în cuva de 1 cm. Citirile se fac față de un martor preparat din 2 ml apă bidistilată și 2 ml reactiv Ehrlich.

Calcul: $\text{mg ALA/dm}^3 \text{ urina} = E_{553} \times 47,6$.

Valoarea normală a acidului Δ amino-levulinic în urină este de 5,2 mg/urina din 24 ore.

Determinare porfirinelor urinare

Generalități: perturbarea biosintezei hemului este unul din efectele toxicității plumbului evidențiată prin creșterea excreției urinare de coproporfirine și acid Δ amino-levulinic.

Principiul metodei: porfirinele urinare sunt extrase și aduse în soluție cu acid clorhidric apoi se măsoară extincția la lungimea de undă maximă a bandei de absorbție caracteristică porfirinelor. Concentrația porfirinelor se calculează pe baza coeficientului de extincție molar.

Reactivi:

- acid acetic glacial;
- eter etilic;
- acetat de etil;
- acid clorhidric soluție 0,1 N și 0,5 N;
- soluție de iod 0,1 N;
- tiosulfat de sodiu, soluție 0,1 N.

Recoltarea: urina se recoltează din prima emisiune de dimineață și se păstrează cel mult 3 ore ferită de lumină, sau urina colectat în 24 ore în care se adaugă 2 ml toluen pentru conservare.

Mod de lucru: într-o pâlnie de separare se introduc 5 ml urină și 1 ml acid acetic.

Dacă proba de urina este proaspătă, se oxidează prin adăugarea a 5 picături de soluție de iod iar excesul se îndepărtează prin adăugarea a 5 picături de tiosulfat. Probele colectate în 24 ore nu se mai oxidează. Se adaugă 30 ml eter etilic și se agită bine proba timp de 3'. Se separă stratul de urină în altă pâlnie. În prima pâlnie se adaugă de 2 ori câte 5 ml de apă bidistilată și stratul apos se separă tot în cea de-a doua pâlnie.

Peste stratul eteric (pâlnia 1) se adaugă porțiuni succesive de câte 1 ml de HCl 0,1 N agitând de fiecare dată pâlnia câte 1' iar extracțiile acide sunt unite într-o eprubetă gradată de 10 ml. Sunt suficiente 4 extracții cu acid și se completează volumul până la 5 ml cu acid. Dacă concentrația porfirinelor este prea mare, culoarea extrasului are o nuanță roz. Se continuă extracția cu acid până ce ultima fracțiune extrasă nu mai prezintă fluorescență roșie la lumina ultravioletă și în acest caz volumul final se completează până la 10 ml cu acid. În extrasul acid sunt conținute coproporfirinele.

În pâlnia a doua în care se află urina și apa de spălare se adaugă 30 ml acetat de etil și se agită pâlnia 3'. Se îndepărtează faza apoasă iar stratul de acetat de etil se spală de 3 ori cu câte 5 ml apă bidistilată. Frațiunile apoase se elimină. Peste acetatul de etil se introduc porțiuni de câte 1 ml HCl, 0,5 N și în stratul acid sunt extrase uroporfirinele. Frațiunile acide sunt unite într-o eprubetă gradată de 10 ml și se completează volumul până la 5 ml acid clorhidric 0,5.

Extincția extraselor acide se măsoară la spectofotometru la mai multe lungimi de undă și anume: 380 nm, 401 nm, 405 nm.

$$\text{Calcul: } \mu\text{g coproporfină/dm}^3 \text{ urina} = [2E_{\text{max}} - (E_{380} + E_{430})]V/V_1 \cdot 817.$$

E_{max} = valoarea extincției la 401 nm;

E_{380} = valoarea extincției la 380 nm pentru interferențe;

E_{430} = valoarea extincției la 430 nm pentru interferențe;

V = cantitatea finală a extraselor acide (în ml);

V_1 = cantitatea de urină luată în lucru, în ml;

$$\mu\text{g uroporfirine/dm}^3 \text{ urina} = [2E_{\text{max}} - (E_{380} + E_{430})]V/V_1 \cdot 831.$$

E_{max} = valoarea extincției la 405 nm.

Obs.: -pentru exprimarea rezultatelor la urina din 24 ore concentrația aflată la litru se raportează la volumul de urină din 24 ore.

-pentru obținerea extincției maxime se fac citiri în zona între 396-410 nm, din 2 în 2 nm;

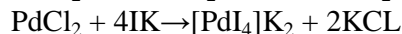
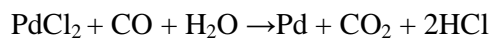
-valorile normale ale coproporfirinelor urinare sunt de 120 μg /urina din 24 ore;

-valorile normale de uroporfirine urinare sunt de 20 μg /urina din 24 ore.

Determinarea carboxihemoglobinei

Generalități: oxigenul și oxidul de carbon concurează pentru aceeași parte a hemoglobinei, dar afinitatea pentru oxidul de carbon a hemoglobinei este de 210 ori mai mare decât pentru oxigen. De aceea într-o atmosferă poluată cu oxid de carbon, oxigenarea țesuturilor este deficitară din cauza creșterii procentului de carboxihemoglobină. Dacă nivelul carboxihemoglobinei este sub 10% din hemoglobina totală, presiunea parțială a oxigenului arterial este normală, totuși la concentrația de 4-10% s-au semnalat modificări fiziologice. Când carboxihemoglobina reprezintă 66% din hemoglobina totală, survine moartea.

Principiul metodei: oxidul de carbon eliberat din carboxihemoglobină reduce soluția de clorură paladoasă proporțional cu concentrația oxidului de carbon. Excesul de clorură paladoasă se determină colorimetric cu iodura de potasiu:



Reactivi și material necesar:

- clorură paladoasă;
- hemolizant de fericianură;
- iodură de potasiu, soluție 20%;
- celula de microdifuzie;
- celula se închide ermetic cu un dop rodat.

Recoltarea probelor: sângele se recoltează prin puncție venoasă într-un tub mic în care s-a introdus în prealabil cca. 10 mg oxalat de sodiu și o bilă de sticlă, umplându-se complet. Se astupă cu un dop de cauciuc fără a lăsa bule de aer în interior și se omogenizează prin răsturnare de 10-15 ori. În felul acesta proba se poate păstra 24 ore la rece.

Mod de lucru: exact 1 ml din clorura paladoasă se introduce în compartimentul central al celulei iar în cel periferic se introduc 5 ml hemolizant de fericianură.

Se măsoară exact 1 ml sânge și se introduce în compartimentul periferic apoi se închide imediat celula. Se amestecă lichidele din compartimentul periferic prin rotire cu

multă atenție. Se lasă celula la temperatura camerei și la întuneric până a doua zi (minimum 6 ore).

Se pipetează cu grijă, lichidul din compartimentul central într-un balon cotat de 50 ml, filtrându-l. Se spală apoi cu porțiuni mici de apă bidistilată până ne-am asigurat că am trecut tot conținutul. Se adaugă apoi în balon 10 ml de IK 20% și se completează la semn cu apă bidistilată.

Paralel cu proba se face un martor în care se pun numai reactivii fără sânge. Se măsoară extincția probei și a martorului la spectrofotometru, la lungimea de undă de 50 nm în cuva de 1 cm.

Calcul: mg PdCl₂ redusă = $E_s - E_p / E_s$.

E_s = valoarea extincției martorului;

E_p = valoarea extincției excesului de clorură paladoasă rămasă în probă;

g COHb % din Hb totală = g COHb/100 ml sânge/ g Hb totală/100 ml sânge x 100.

Obs.: valoarea normală a COHb este de 1,5% din Hb totală pentru nefumători și de 10% din Hb totală pentru fumători.

Determinarea oxidului de carbon din aerul expirat

Principiul metodei: aerul expirat se trece printr-un tub Dräger care are o umplutură de I₂O₅. Oxidul de carbon reduce pentoxidul de iod la iod elementar care colorează în brun suportul alb.

Material necesar:

-o pungă de PVC prevăzută cu un tub de cauciuc la care este atașată o clema și se termină cu un tub de sticlă;

-aparatură Dräger;

-tub Dräger pentru oxid de carbon.

Recoltarea probelor: subiectul este scos din atmosfera poluată cu oxid de carbon și este pus să facă 2-3 inspirații și expirații. Inspiră apoi profund, se menține în apnee 20'' după care suflă forțat aerul într-o pungă de PVC care se astupa bine și se transportă în laborator. Se atașează la punga de PVC, pompa Dräger la care este fixat un tub Dräger pentru a determina oxidul de carbon. Se aspiră aerul din pungă cu ajutorul pompei până când stratul alb din tubul Dräger începe să se îmbruneze, oprind pomparea când îmbrunirea stratului a ajuns la o diviziune exactă. Se ține cont de numărul de pompări care s-au efectuat. Se citesc diviziunile de pe tub până unde s-a îmbrunat suportul și se calculează oxidul de carbon după indicațiile date în prospectul aparatului. Cunoscând cantitatea de oxid de carbon din aerul expirat în ppm, se poate determina carboxihemoglobina, procentual din hemoglobina totală după formula: COHb% din Hb totală = ppm CO/ 5

Determinarea hemoglobinei totale

Principiul metodei: hemoglobina este oxidată de fericianură la methemoglobina care cu cianura de potasiu trece în cianmethemoglobina și este derivatul cel mai stabil al hemoglobinei al cărei coeficient molar de extincție este stabilit.

Reactivi: soluția Drabkin: 0,14 g fosfat monopotasic, 0,05 g cianură de potasiu, 0,2 g fericianură de potasiu $K_3 [Fe (CN)_6]$ se dizolvă în câțiva ml apă bidistilată. Se filtrează printr-o hârtie de filtru cantitativă, se adaugă în filtrat 0,5 g saponină, se agită și se păstrează la rece și în sticlă brună.

Recoltarea sângelui: sângele se recoltează prin puncție venoasă sau din capilare pe un anticoagulant.

Modul de lucru: într-o eprubetă se introduc 5 ml reactivi Drabkin și 0,02 ml sânge bine omogenizat și măsurat cu micropipeta care se descarcă introducând pipeta în lichid fără a barbotă. Se mai spală de 2-3 ori pipeta cu reactiv fără a produce barbotare. Se omogenizează proba prin scuturare și după 10' se măsoară extincția la spectrofotometru la lungimea de undă de 542 nm față de reactivul Drabkin ca martor, în cuva de 1 cm.

Calcul: g Hb totală/ 100 ml sânge= $E_{542} \times 36,8$

Obs.: coeficientul molar de extincție se poate determina dacă avem soluții de hemoglobină standardizată după formulă: $K = \text{conc. Standard a Hb} / \text{extincție}$.

-concentrația standard a Hb este înscrisă pe fiolă. În lipsa standardului de Hb se folosește coeficientul molar de extincție 36,8;

-valori normale pentru Hb sunt: la bărbați – 14–16,5/ 100 ml sânge; la femei – 13- /100 ml sânge.

Determinarea methemoglobinei

Generalități: nitrații și nitriții din mediu în concentrație crescută pot da methemoglobinemii la copii până la vârsta de 1 an hrăniți artificial. Implicații în oxidarea fierului din hemoglobină pentru formarea methemoglobinei sunt nitriții. În apă însă nitriții se găsesc în concentrație mică din cauza labilității lor care în prezența oxigenului trec ușor în nitrați iar absența acestuia face ca ei să se reducă la amoniac. Nitrații în apă pot atinge concentrații crescute și foarte crescute iar la nivelul tubului digestiv al copiilor mici au posibilitatea să se reducă la nitriți, datorită florei reducătoare abundente ce există la acest nivel.

Alte cauze care determină susceptibilitatea copiilor la methemoglobinemii sunt: labilitatea hemoglobinei de a trece mai ușor în methemoglobină, volum mic de sânge, echipamentul enzimatic oxido-reducător, de la nivelul eritrocitelor slab dezvoltat, concentrarea nitraților din apă prin procesul fierberii și prezența de lapte praf a unei cantități crescute de flora reducătoare.

Principiul metodei: methemoglobina se transformă în cianmethemoglobină care e mai stabilă și are un coeficient molar de extincție bine stabilit la lungimea de undă de 630 nm. Prin diferența dintre valoarea extincției înainte și după adăugarea cianurii se obține cantitatea de methemoglobină.

Reactivi:

- soluții tampon de fosfați cu pH=6,6;
- soluția de cianură de sodiu sau potasiu neutralizată;
- acid acetic 12%;
- fericianură de potasiu 20%;
- soluție de amoniac 25%;
- oxalat de sodiu, cristale;
- saponină, substanță.

Mod de lucru: sângele se recoltează din deget într-un tub mic de sticlă pe oxalat de sodiu.

Într-o eprubetă se introduc 10 ml soluție tampon și se adaugă 0,1 ml sânge descărcându-se bine pipeta prin refluxare de 2-3 ori în soluția tampon. Se amestecă bine

conținutul eprubetei apoi se adaugă aproximativ 0,1 g saponină și se agită eprubeta timp de 5' pentru realizarea hemolizei.

Se citește extincția la spectrofotometru, la lungimea de undă de 630 nm în cuva de 1 cm drum optic. După citirea extincției se adaugă direct în cuvă o picătură de cianură neutralizată, se amestecă bine cu o baghetă de sticlă și după 2' se citește din nou extincția la aceeași lungime de undă.

Calcul: $(A-B) \cdot 65 = \text{g\% methemoglobină}$

A= valoarea extincției înainte de adăugarea cianurii;

B= valoarea extincției după adăugarea cianurii;

65= coeficient extracție molar.

Determinarea colinesterazei din sânge

Generalități: activitatea colinesterazei din sânge este sensibil influențată de unele substanțe toxice cum ar fi pesticidele organofosforice. Este indicat să se determine aceeași probă de sânge atât activitatea colinesterazei din eritrocitate cât și cea din plasmă.

Principiul metodei: prin măsurarea acetilcolinei hidrolizată după incubare cu sânge total se poate aprecia activitatea colinesterazei. Acetilcolina rămasă după incubare se determină colorimetric prin reacția cu hidroxilamina cu care formează acetilhidroxilamina care cu clorura ferică dă un complex roșu, foarte stabil. Pentru a diferenția activitatea celor două colinesteraze se folosește un inhibitor specific pentru pseudocolinesterază, numit diparcol.

Reactivi:

-tampon barburic pH = 7,4;

-clorhidrat de dietilamino-etil-fenotiazină;

-acid tricloracetic 10%;

-soluția stoc de clorură de acetilonă;

-soluția de lucru de acetilcolină;

-NaOH soluție 3,5 N;

-HCl soluție 4 N;

-hidroxilamină hidroclorică;

-soluție alcalină de hidroxilamină;

-clorură ferică.

Recoltarea probei de sânge: sângele se recoltează pe heparină sau pe alt anticoagulant.

Mod de lucru: se măsoară 0,2 ml sânge și se diluează cu 1,8 ml apă bidistilată, realizându-se o diluție de 1/10, se agită bine pentru a se face hemoliza. Se citesc extincțiile la spectrofotometru la lungimea de undă de 520 nm în cuva de 1 cm față de martorul de reactivi.

Calcul: activitatea colinesterazei se exprimă în μg acetilonă hidrolizată într-o oră la 38°C de 1 ml sânge total.

Colinesteraza totală = $E - E_1 / E \cdot 100$.

Colinesteraza globulară = $E - E_2 / E \cdot 100$.

Colinesteraza plasmatică: colinesteraza totală – colinesteraza globulară.

E= valoarea extincției etalonului E.

E_1 = valoarea extincției colinesterazei totale.

E_2 = valoarea extincției colinesterazei globulare.

Obs.: valori normale: -colinesteraza globulară = 34,5;

-colinesteraza plasmatică = 16,8.

Raportul colinesteraza globulară / colinesteraza plasmatică = 0,66.

Colinesteraza globulară se poate raporta și la numărul de eritrocite/mm³.

Colinesteraza globulară/mm³ sânge total / colinesteraza (în milioane).

Determinarea cromului din sânge

Generalități: cromul hexavalent are o toxicitate crescută comparativ cu cel trivalent, absorbindu-se ușor pe cale digestivă, respiratorie și prin piele. Este responsabil de frecvența crescută a cancerului pulmonar.

Principiul metodei: după mineralizarea sângelui cromul hexavalent formează cu difenilcarbazona un complex colorat în roz-violaceu a cărui intensitate este proporțională cu concentrația cromului.

Reactivi:

-H₂SO₄ d = 1,84;

-acid percloric 60%;

-acid azotic d = 1,40

-NaOH 10 N;

-permanganat de potasiu 0,1 N;

-azidă de sodiu 5%;

-fosfat monosodic (NaH₂PO₄ · 2H₂O) 60%;

-difenilcarbazonă 0,1% în alcool etilic;

-albastru de timol 0,4%;

-bicromat de potasiu soluție standard.

Mod de lucru: 5 ml de sânge total se introduc într-un flacon Erlenmayer peste care se adaugă 1 ml acid sulfuric, 2 ml acid percloric, 1,5 ml acid azotic și 2-3 perle de sticlă. Se acoperă cu o sticlă de ceas și se încălzește pe baie de nisip până se obține culoarea maronie. Se mai introduc câteva picături de acid azotic când are loc o reacție energetică. Se repetă adăugarea de acid azotic până când nu mai are loc reacția. Se pune proba direct pe flacără pentru îndepărtarea vaporilor albi de acid percloric. Se adaugă 10 ml apă bidistilată și se continuă fierberea pe sită. Se răcește și apoi se adaugă o picătură de indicator albastru de timol și hidroxid de sodiu până la culoarea roz. Se adaugă 0,5 ml permanganat de potasiu și se introduce proba în baia de apă la 80°C. Dacă culoarea roz a permanganatului a dispărut în 10' se mai adaugă 0,3 ml permanganat și se continuă fierberea 20'. Se scoate proba din baie și se adaugă azidă de sodiu picătură cu picătură până la decolorarea completă. Se introduc 2 ml fosfat monosodic, pentru îndepărtarea interferenței fierului și 1 ml difenilcarbazonă. După 5' se citește extincția la un spectrofometru la lungimea de undă de 540 nm în cuva de 1 cm.

Calcul: $\mu\text{g Cr}/100 \text{ ml sânge} = C/V \cdot 100$.

C = concentrația în $\mu\text{g Cr}$ din proba de sânge luată în lucru.

V = cantitatea de sânge luată în lucru în ml.

Observații: valoarea normală a cromului în sângele total este de 10 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ sânge.

Determinarea arsenului din păr

Generalități: arsenul este un toxic cumulativ. O expunere a organismului la un mediu poluat cu arsen face să crească concentrația acestui element atât în sânge cât și în urină. Un test mai fidel al expunerii la arsen îl constituie determinarea lui în firele de păr.

Principiul metodei: proba de păr se mineralizează și arsenul se determină colorimetric cu dietildicarbamatul de argint.

Reactivi:

- alcool etilic;
- eter etilic;
- acid azotic d=1,40;
- acid percloric 70%;
- acid clorhidric 20%;

Mod de lucru: aproximativ 3 g păr tăiat cât mai aproape de rădăcină se țin 3-4 ore în eter etilic pentru degresare. Se filtrează și se spală bine cu apă și detergent, apoi se clătește cu apă bidistilată și în final cu alcool etilic. Se usucă la temperatura camerei între două hârtii de filtru. După uscare se cântăresc exact 2 g păr, se introduc într-un flacon Erlenmayer, peste care se adaugă 10 ml acid azotic concentrat. Se acoperă vasul cu o sticlă de ceas, se încălzește pe baie de nisip până scade volumul la 2-3 ml. După răcire se introduc 5 ml apă bidistilată și 10 ml acid azotic concentrat. Se continuă încălzirea pe baie de nisip până ce lichidul devine limpede, galben pai și nu mai emite vapori bruni. Dacă nu s-a ajuns la acest stadiu se mai adaugă câțiva ml apă bidistilată și 2-3 ml acid azotic și se continuă fierberea cu grijă ca să nu se carbonatizeze. Se răcește proba și apoi se adaugă 1 ml acid percloric și 2-3 ml apă bidistilată. Se continuă încălzirea vasului acoperit cu sticla de ceas până la decolorarea completă. Se ia sticla de ceas și proba se încălzește până la evaporare la sec. Pentru îndepărtarea urmelor de acid percloric se reia reziduul de 2-3 ori cu câte 5 ml apă bidistilată și se evaporă. Reziduul trebuie să fie cristalin și perfect alb. Se trece reziduul, cantitativ, cu 10 ml acid clorhidric 20% în generatorul aparatului de determinat arsenul și se continuă determinarea.

Calcul: $\mu\text{g As}/100 \text{ g păr} = C/g \cdot 100$

C= concentrația în $\mu\text{g As}$ din proba de păr luată în lucru;

G= cantitatea de păr luată în lucru, în g.

Determinarea arsenului în sânge

Principiul metodei: proba de păr se mineralizează și arsenul se determină colorimetric cu dietildicarbamatul de argint.

Reactivi:

-alcool etilic;

-eter etilic;

-acid azotic $d=1,40$;

-acid percloric 70%;

-acid clorhidric 20%.

Mod de lucru: se recoltează sângele venos pe fluorura de sodiu. Se măsoară exact 10 ml sânge și se introduc într-un flacon Erlenmayer peste care se adaugă 10 ml acid azotic concentrat. Se fierbe pe baia de nisip și se procedează în continuare ca la determinarea arsenului din păr.

Calcul: $\mu\text{g As}/100 \text{ ml păr} = C/g \cdot 100$.

C= concentrația în $\mu\text{g As}$ din proba de sânge;

G= cantitatea de sânge luată în lucru, în ml.

Obs.: concentrația normală a arsenului din sânge este de maximum $10 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$.

Determinarea arsenului în urină

Principiul metodei: proba de păr se mineralizează și arsenul se determină colorimetric cu dietildicarbamatul de argint.

Reactivi:

- alcool etilic;
- eter etilic;
- acid azotic $d=1,40$;
- acid percloric 70%;
- acid clorhidric 20%.

Mod de lucru: se recoltează urina din 24 ore. Se iau 200 ml urină și se introduc într-un flacon Erlenmayer peste care se adaugă 10 ml acid azotic concentrat. Se fierbe pe baia de nisip și se procedează în continuare ca la determinarea arsenului în păr.

Calcul: $\mu\text{g As/dm}^3 = C/V \cdot 1000$.

C= concentrația în $\mu\text{g As}$ din proba de urină luată în lucru;

V= cantitatea de urină luată în lucru, în ml.

Obs.: concentrația normală a arsenului în urină se considera a fi de 15-60 $\mu\text{g As/dm}^3$ sau 100 $\mu\text{g As/urina}$ din 24 ore.