الجلسات العملية الثانية و الثالثة و الرابعة

التحليل السمي السريع للبول

الكشف المباشر لبعض السموم الدوائية في البول

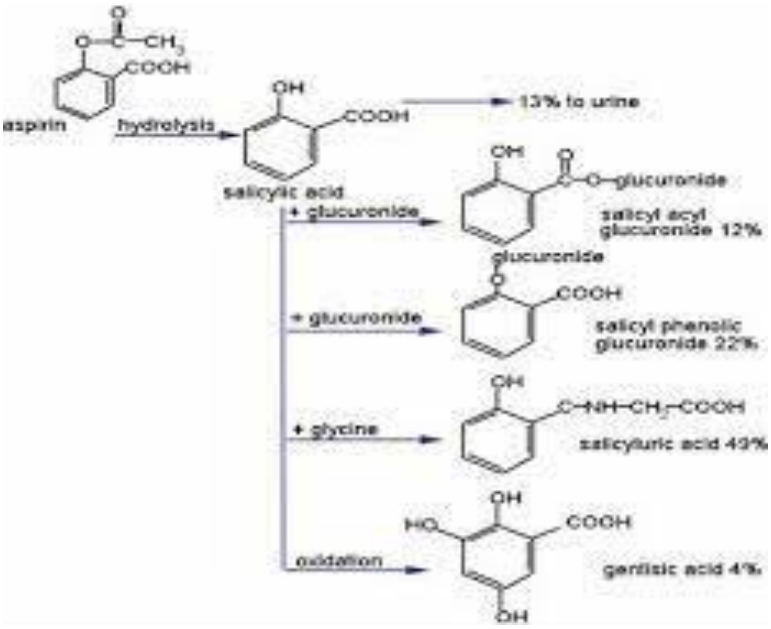
يعتبر البول مفيد لاجراء الاختبارات السمية لانه متوفر بكميات كبيرة و غالبا يحتوي على تراكيز عالية من المواد السامة و الادوية اكثر منم الدم و توجد فيه مستقلبات الادوية و السموم الاخرى .
50 مل ممن البول للكبار كافية من اجل اجراء التحاليل تجمع في وعاء نظيف و معقم و محكم الاغلاق و على الغالب لا يحتاج الى اضافة مواد حافظة , و العينة يجب ان تؤخذ حالما يمكن ذلك .
يمكن ان تجري على البول بعض التحاليل السمية السريعة التي تكون كيفية اكثر منها كمية و تتميز بسرعة و بساطة اجرائها , و يعمد الى تطبيقها في الحالات التي تتطلب معرفة المادة السامة في البول حيث يجب تقدير امر ما خلال فترة قصيرة من الزمن .
من اهم خصائص الكشف المباشر :
1 – هي تفاعلات لونية تجري مباشرة على البول دون استخلاص مسبق
2 – هي تفاعلات سريعة و حساسة و لكنها لا تتمتع بنوعية مطلقة
3 – يجب التاكد من وجود السموم اذا كانت النتيجة ايجابية بطرق اخرى
4 – يمكن ان تتاثر بوجود ادوية او مركبات تظهر في بعض الحالات المرضية (اصبغة صفراوية , البومين , اجسام كيتونية ....)
5 – يجب ان تقارن النتائج مع تفاعلات مماثلة مع بول طبيعي خالي من المادة السامة و بول مضاف اليه مادة سامة كما يجب الاشارة الى ان درجة PH البول يمكن ان يكون له بعض الدلائل .
6 – يكون البول ملون في بعض التسممات (لون ازرق في مركبات ديبنزوازيبين مثل الايميبرامين)
7 – البول الحمضي لا يحوي الا على اثار من الباربيتوريات في حالة تسمم اكيد بها (الباربيتوريات لا تظهر في البول بشكل واضح الا اذا كان البول قلوي)

و كامثلة على المركبات التي تجري عليها التحاليل السمية السريعة في البول :

- الصفصافات
- الباراسيتامول
- مركبات الفينوتيازين (كلوربرومازين)
- مركبات البنزوديازيبين (ديازيبام)
- مركبات الديبنزوازيبين (ايميبرامين)
- الكحول الايتيلي
- مركبات البروم
- هالوجينات الفحوم الهيدروجينية

الكشف عن الساليسيلات :

تطرح في البول بشكل حمض الصفصاف قسم منه حر و القسم الاكبر مقترن مع حمض الغلوكوروني او حمض الكبريت



يمكن تطبيق التفاعلات التالية على البول :

1 - قطرة بول مع قطرة فوق كلور الحديد 5% يعطي لون بنفسجي يزول بقليل من حمض الكبريت 50%
هذا التفاعل يتم مع الجزء غير المقترن من حمض الصفصاف (مستقلب الاسبيرين في البول)
(بوجود الفينوتيازينات يظهر لون بنفسجي و لكنه لا يزول باضافة حمض الكبريت)
لتطبيق التفاعل يؤخذ 4 انابيب اختبار :

رقم الانبوب	المادة	الكاشف	النتيجة
1	1مل بول متسمم بالأسبيرين	كلور الحديد	لون بنفسجي
2	1مل بول شاهد	=	-
3	1مل ماء مقطر	=	-
4	1مل بول طبيعي مضاف له أسبيرين و مغلي مع الحمض او مضاف له حمض الصفصاف	=	لون بنفسجي

2 – كاشف ترينذر Trinder :
2مل بول + 100مكروليتر كاشف يمزج لعدة ثواني فيظهر لون بنفسجي
(يجري التفاعل في 4 انابيب مثل التفاعل السابق)

يتركب كاشف تريندر من :

- 40غ كلور الزئبق
- 85 مل ماء مقطر
- 120مل حمض كلور الماء 1مول / ل (8.3 ml حمض مركز في 100مل ماء)
- 40غ نترات الحديد المائية ($Fe(No)_3\ 9H_2\ O$)

يكمل الى ليتر بالماء المقطر

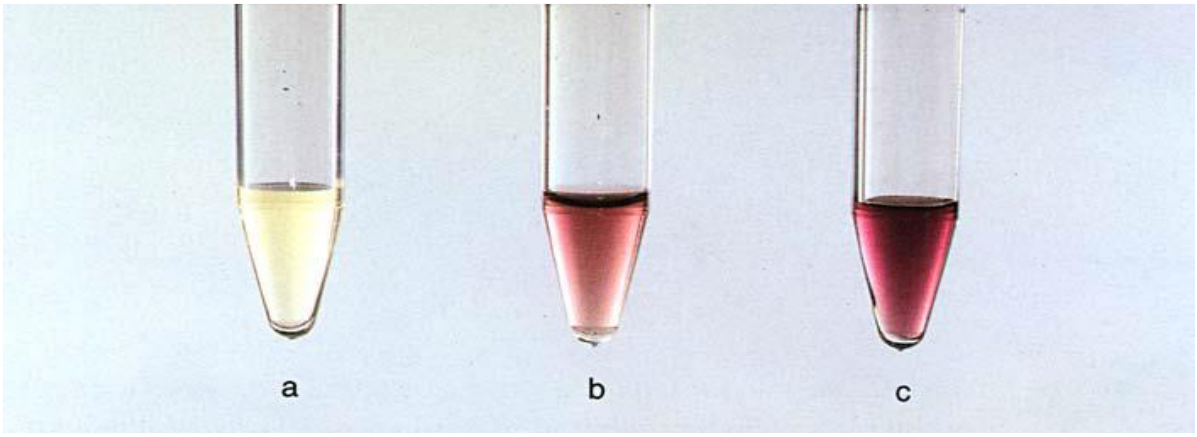


Plate 1. *Qualitative test for salicylic acid (Trinder's test): (a) urine blank, (b) weak positive result, (c) strong positive result.*

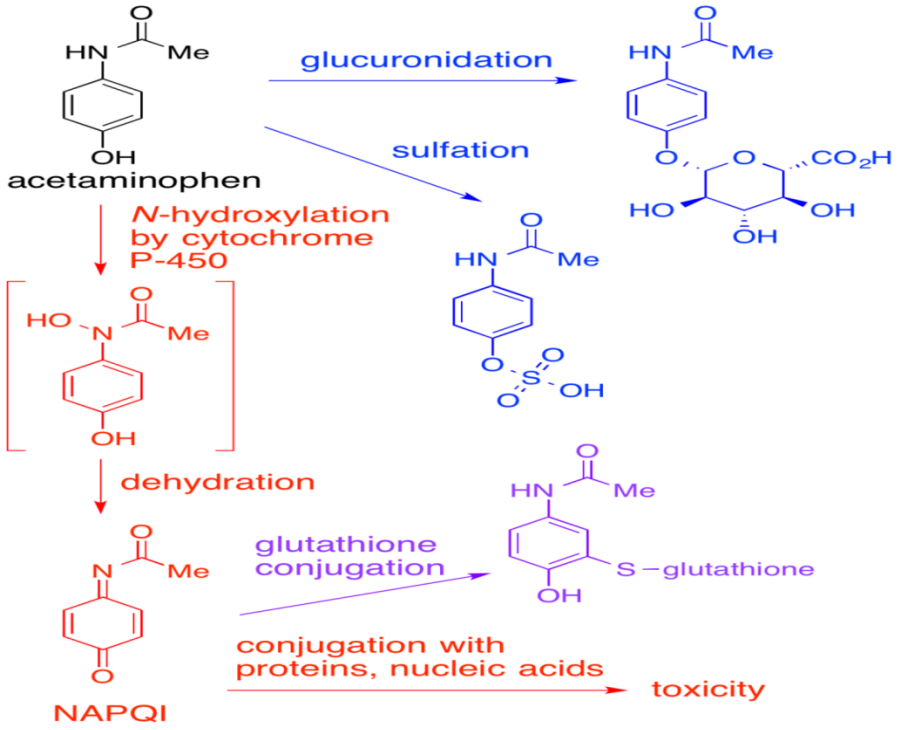
ملاحظة : بوجود الفينوتيازينات يعطي لون بني

3 – مع اليود في وسط قلوي يعطي أحمر لوتمان (تترايودوديفينيل كينون)

الكشف عن الباراسيتامول :

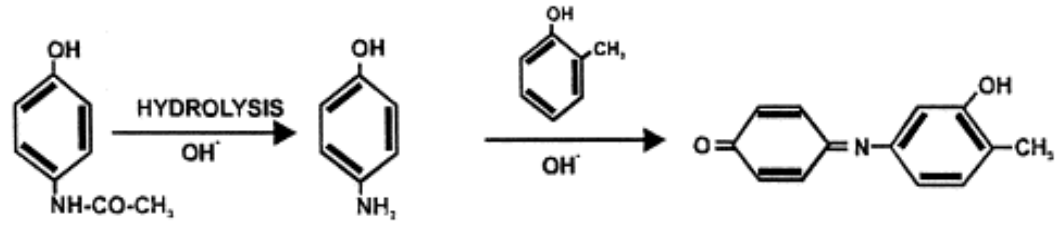
يطرح في البول مقترنا مع السلفات أو الغلوكورونيك أسيد لذلك الكشف عن هذا المركب يجب ان يسبق بعملية فك لهذه المقترنات باضافة حمض كلور الماء المركز فيتشكل بارا امينوفينول الذي يكشف عنه

استقلاب الباراسيتامول :



من أجل الكشف عن الباراسيتامول في البول :

- يؤخذ 0.5 مل بول + 0.5 مل حمض كلور الماء المركز (كثافته 1.18) يغلى لمدة 10 دقائق ثم يبرد
- يضاف 1مل من اورثوكريزول (10غ /ل) الى عدة قطرات من المزيج السابق
- يضاف 2مل من هيدروكسيد الأمونيوم 4 مول /ل (28 مل أمونيا كثافته 0.88 يمدد الى 100مل بالماء المقطر)
- يمزج لعدة ثواني فيتشكل لون أزرق (اندوفينول)

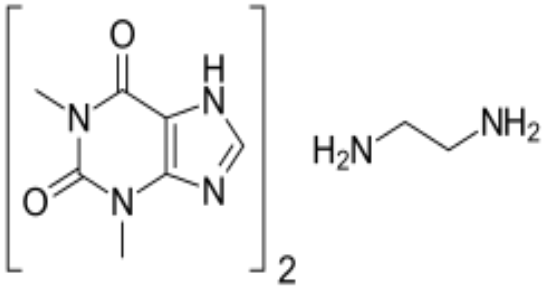


يطبق التفاعل مع شواهد كما يلي :

يؤخذ 4 أنابيب كما في الكشف عن الاسبيرين يضاف لكل انبوب 1مل حمض كلور الماء المركز و يغلى لمدة 10 دقائق في حمام مائي ثم يبرد , ثم يؤخذ من كل انبوب نصف مل و يضاف له 1مل اورثوكريزول 10% و 2 مل هيدروكسيد الامونيوم و بعد المزج يظهر لون أزرق في الانابيب الحاوية على الباراسيتامول , و لكن مع البول يكون اللون أفتح .

ملاحظات :

- التفاعل مع الاورثوكريزول حساس و يمكن الكشف عن الباراسيتامول في البول لمدة 24-48ساعة
- عند غلي الباراسيتامول مع حمض كلور الماء يتحول الى باراأمينوفينول
- الامينات العطرية مثل الانيلين و المركبات النترية العطرية مثل النتروبنزن و التي تستقلب في الجسم الى بالراامينوفينول و تطرح في البول بشكل مقترن مع الغلوكورونيك و السلفات و بعد اجراء عملية الحلمهة بالحمض يمكن ان تتداخل في هذا التفاعل .
- ايتيلين دي امين الناتج عن استقلاب الامينوفيللين يعطي لون أخضر في هذا التفاعل



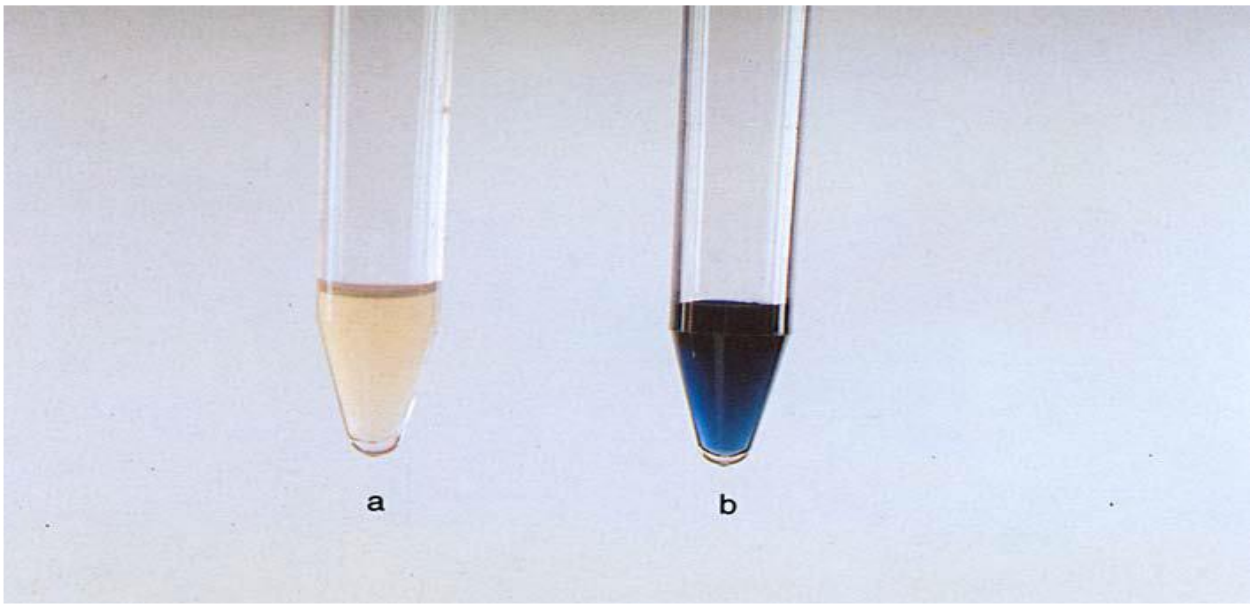
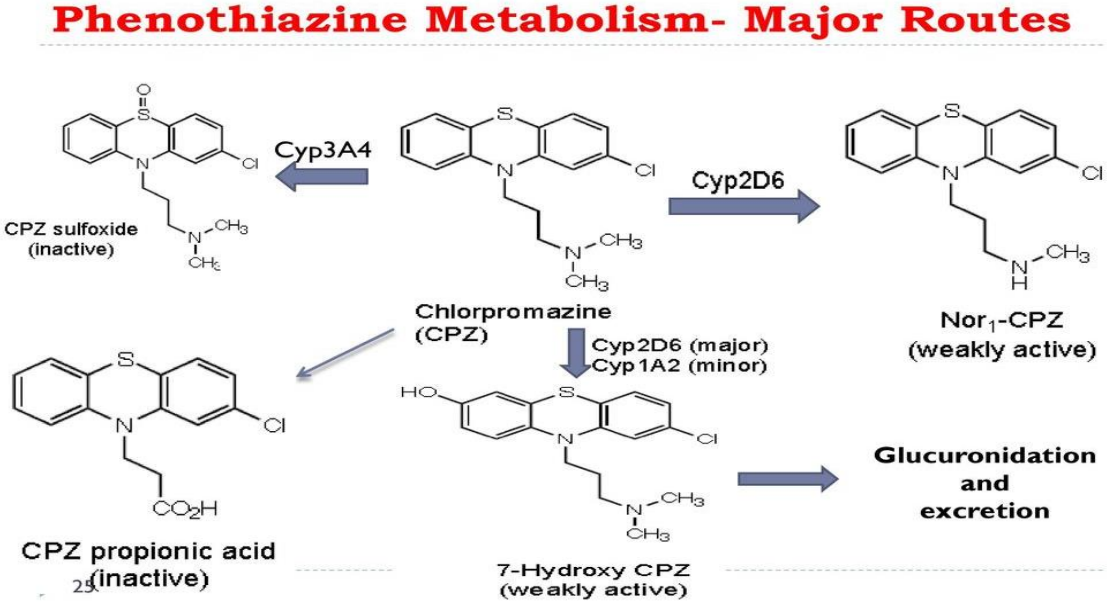


Plate 5. *Qualitative test for paracetamol and phenacetin (o-cresol/ammonia test): (a) blank, and (b) positive result.*

الكشف عن الفينوتيازينات : مثل الكلوربرومازين

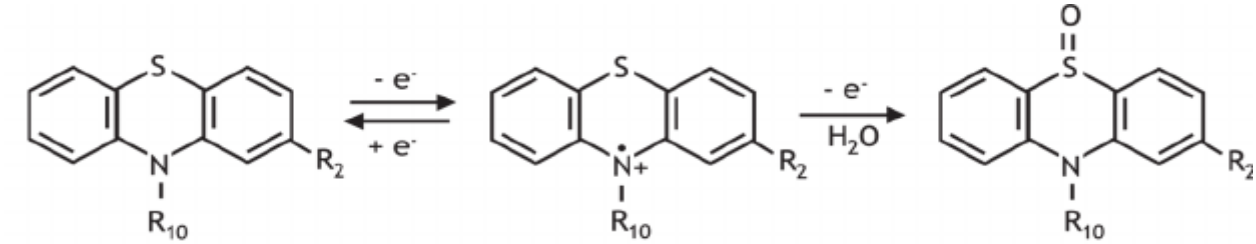
يظهر البول في بعض الاحيان و اذا كان التسمم شديد بلون احمر خمري او بني

يكشف في البول عن الفينوتيازين و مشتقاته و مستقلباته التي تكون كما في الشكل التالي :

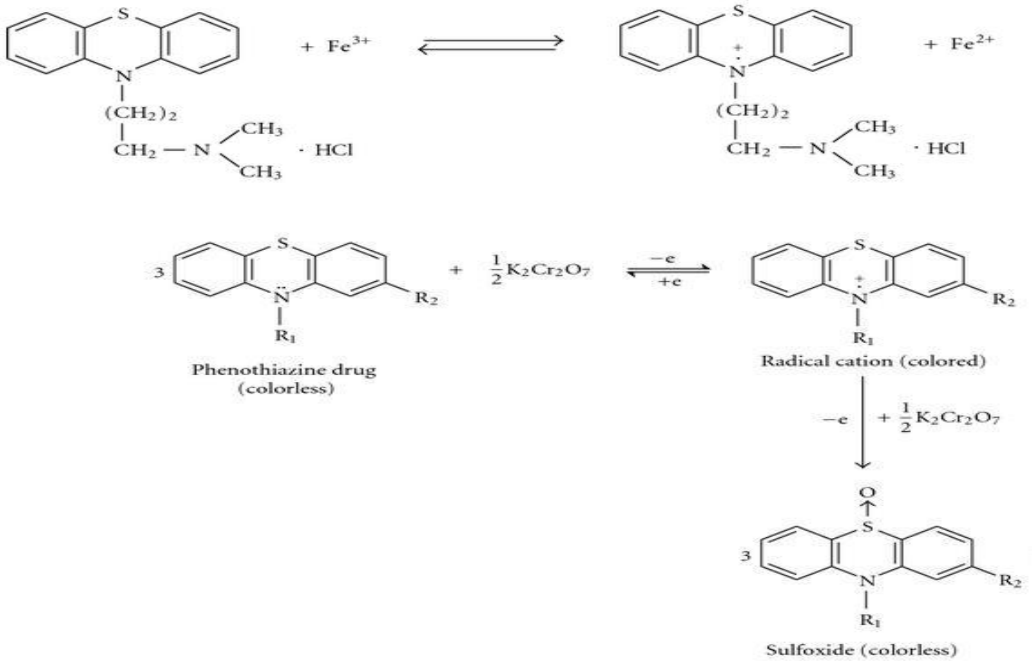


يتم الكشف عن مركبات الفينوتيازين في البول بتفاعلات الاكسدة بوجود مواد مؤكسدة مثل الحديد الثلاثي أو ثاني كرومات أو حمض فوق الكلور ....و تتشكل مركبات ملونة نتيجة التفاعل

و هذ الاشكال التالية تبين تحولات الفينوتيازينات و يبين صيغ بعض الفينوتيازينات :



Compound	R_2	R_{10}
Chlorpromazine	- Cl	$-(CH_2)_3N(CH_3)_2$
Trifluoperazine	$-CF_3$	$-(CH_2)_3$-N N-CH_3
Thioridazine	$-SCH_3$	$-(CH_2)_2$-N-CH_3
Phenothiazine	- H	- H
2-Trifluoromethyl(phenothiazine)	$-CF_3$	- H



و من التفاعلات أو الكواشف الحساسة لكشف الفينوتيازينات في البول كاشف FPN الذي يتركب من :

- 5 مل من كلور الحديد (50غ/ل)
- 45 مل من حمض فوق الكلور (200غ/كغ)
- 50 مل حمض الآزوت (500مل/ل)

يطبق التفاعل باضافة 1 مل من الكاشف الى 1 مل بول فيتشكل لون وردي محمر أو بنفسجي أو أزرق حسب المركب الفينوتيازيني .

يجري التفاعل مع شواهد مثل حالات الكشف عن السموم السابقة .

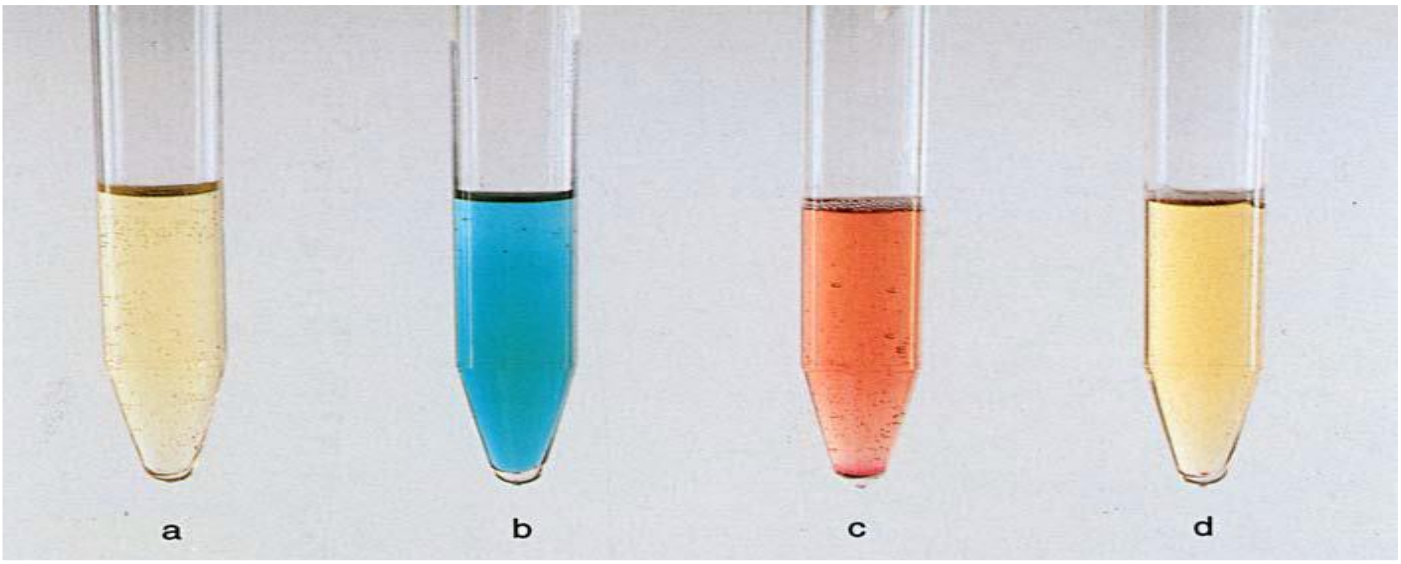
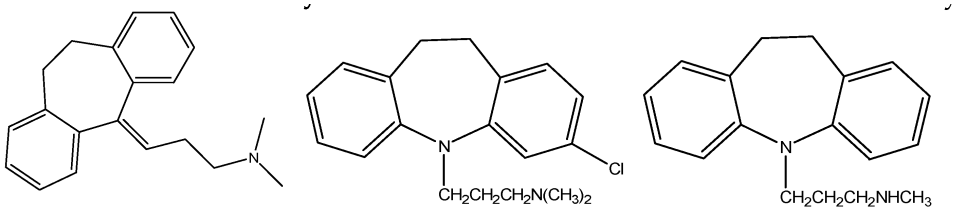


Plate 2. *Qualitative test for phenothiazines (FPN test): (a) blank urine, (b) thioridazine, (c) perphenazine, (d) trifluperazine.*

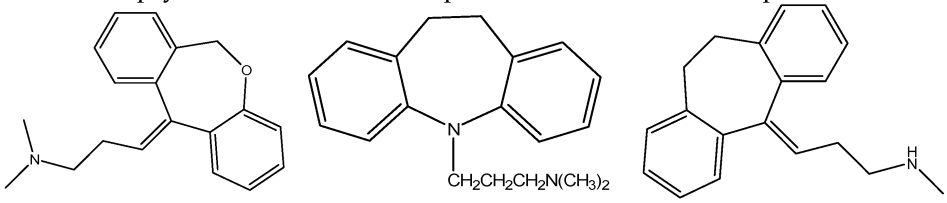
الكشف عن مركبات البنزوآزيبين الثنائية (ديبنزوآزيبين) : مضادات الاكتئاب ثلاثية الحلقة مثل الايميبرامين

تسبب احتباس بول

يتلون البول بلون ازرق

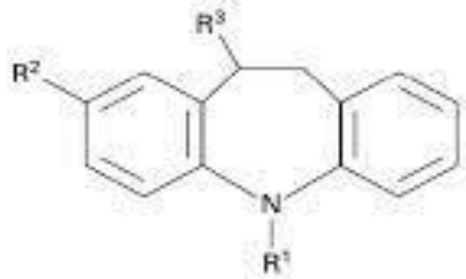


Amitriptyline Clomipramine Desipramine Protriptyline



Doxepin Imipramine Nortriptyline

و أهم المستقلبات التي تطرح في البول : (الشكل التالي يبين مستقلبات الايميبرامين)



Imipramine	$R^1 = (CH_2)_3N(CH_3)_2$; $R^2 = R^3 = H$
Desipramine	$R^1 = (CH_2)_3NHCH_3$; $R^2 = R^3 = H$
2-hydroxyimipramine	$R^1 = (CH_2)_3N(CH_3)_2$; $R^2 = OH$; $R^3 = H$
10-hydroxyimipramine	$R^1 = (CH_2)_3N(CH_3)_2$; $R^2 = OH$; $R^3 = H$
Iminodibenzyl	$R^1 = R^2 = R^3 = H$
Imipramine-*N*-oxide	$R^1 = (CH_2)_3N(CH_3)_2$; $R^2 = R^3 = H$ ↓ O

و من أهم تفاعلات الكشف عن هذه المركبات في البول :

1 – 1 مل بول + 1 مل حمض فوق الكلور 60% + عدة قطرات من نتريت الصوديوم 0.5% يعطي :

- فلورة خضراء صفراء بوجود الكاربامازيبين
- لون أزرق بوجود ايميبرامين , كلوميبرامين , و غيرها من ادوية TCA
- في حال وجود الفينوتيازينات في البول يظهر ألوان مختلطة (من الأحمر الى البنفسجي) نتيجة اضافة حمض فوق الكلور , لذلك في مثل هذه الحالة يجب اضافة كمية اضافية من نتريت الصوديوم لتخريب هذه الالوان و في اللحظة التي يحدث فيها هذا التخريب يظهر اللون الازرق كدليل واضح على وجود الايميبرامين و مشتقاته .

2 – مع كاشف فورست Forrest :يتكون كاشف فورست من :

- 25 مل من ثاني كرومات البوتاسيوم (2 غ/ل)
- 25 مل من حمض الكبريت (300 مل/ل)
- 25 مل حمض فوق الكلور (200 غ/كغ)
- 25 مل حمض الازوت 0 500 مل/ل)

يطبق التفاعل باضافة 1 مل من الكاشف الى 1 مل بول و يمزج لمدة 5 ثوان فيظهر لون أصفر الى اخضر ثم أخضر غامق زيتي.

ملاحظات :

- بوجود الكاربامازيبين لا يظهر لون
- وجود الفينوتيازين بكمية كبيرة يعرقل حدوث التفاعل

3 – 1 مل من البول + 1مل حمض كبريت 10% + قطرة ثاني كرومات البوتاسيوم 1% يتشكل لون ازرق حاد يتحول تدريجيا الى بني .

تجري التفاعلات السابقة بوجود شواهد .

ملاحظة : يتم التاكد من وجود المركبات السابقة بطريقة الاستشراب على طبقة رقيقة بعد الاستخلاص بمحل عضوي في وسط قلوي من البول أو محتويات المعدة .

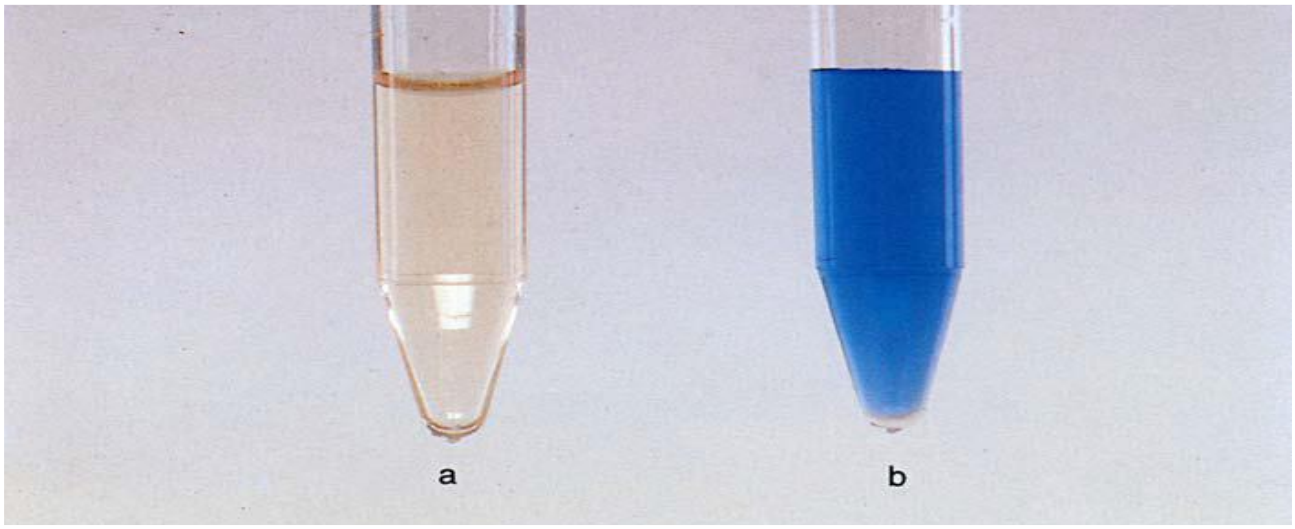
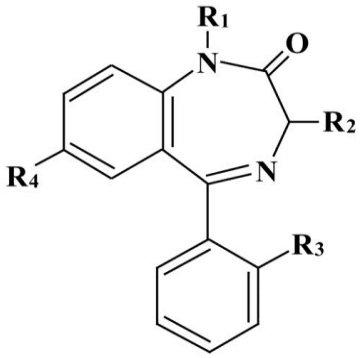
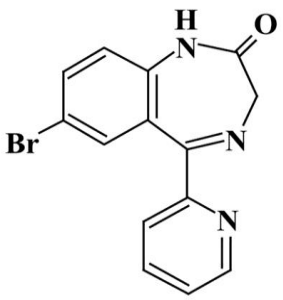


Plate 3. *Qualitative test for imipramine (Forrest test): (a) blank, (b) positive result.*

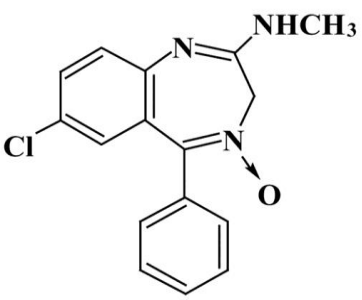
الكشف عن مركبات البنزوديازيبين : ديازيبام



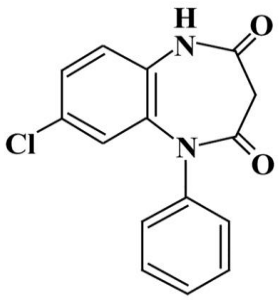
Benzodiazepine	R_1	R_2	R_3	R_4
Clonazepam	H	H	Cl	NO_2
Desmethyldiazepam	H	H	H	Cl
Diazepam	CH_3	H	H	Cl
Flunitrazepam	CH_3	H	F	NO_2
Flurazepam	$CH_2CH_2N(C_2H_5)$	H	F	Cl
Lorazepam	H	OH	Cl	Cl
Nimetazepam	CH_3	H	H	NO_2
Nitrazepam	H	H	H	NO_2
Norfludiazepam	H	H	F	Cl
Oxazepam	H	OH	H	Cl
Temazepam	CH_3	OH	H	Cl



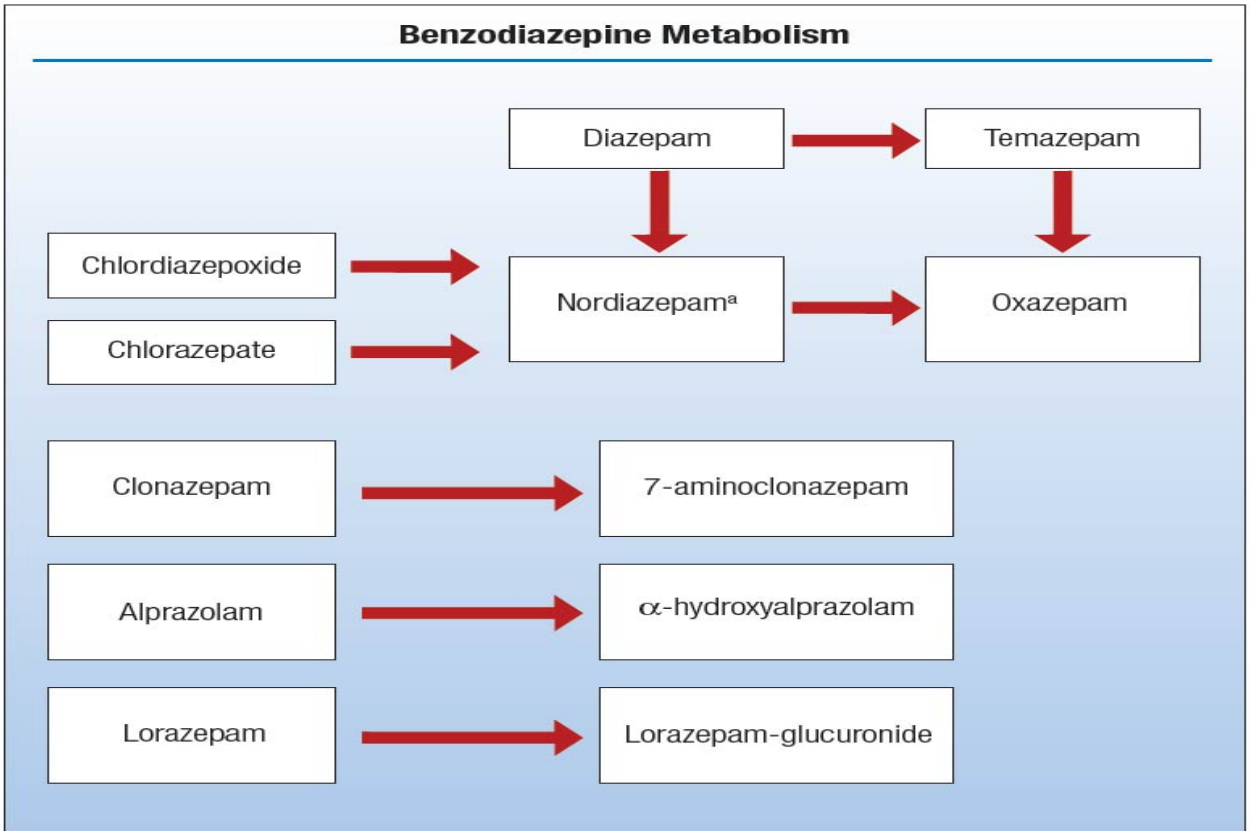
Bromazepam



Chlordiazepoxide

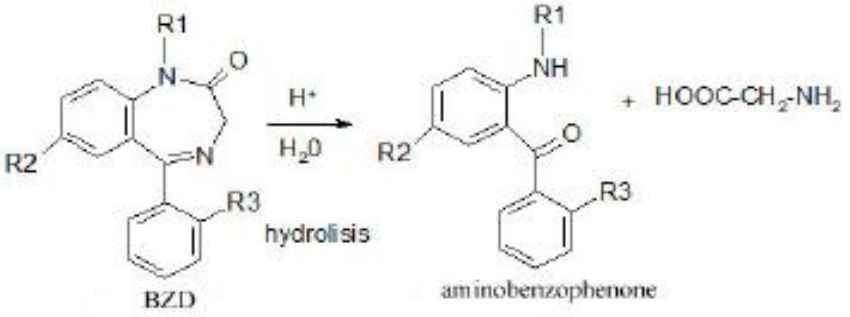


Clobazam

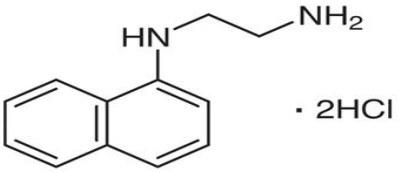


يتم الكشف عن الديازيبام في البول كما يلي :

1 – يحلمه البول بواسطة حمض كلور الماء المركز بالحرارة فيتحول الديازيبام الى مركب اميني هو كلورو امينو بنزوفينون



2 – يتم التاكد من المركب السابق بتفاعل دي آزو مع مركب نافتيل ايتيلين دي امين



تطبيق الكشف :

20 مل بول في دورق مع مبرد صاعد + 4 مل حمض كلور الماء مركز نقي , يسخن حتى درجة الغليان و يترك يغلي لمدة 45 دقيقة , ثم يبرد المزيج ثم تضاف ماءات الصوديوم حتى تصبح درجة PH تساوي 10 , يستخلص بالايتر ثم تغسل الخلاصات الايترية ببضع ميلليلترات من محلول كبريتات الصوديوم 6 نظامي , ثم يؤخذ انبوبي اختبار أحدهما للشاهد و الثاني لتفاعل الكشف و يوضع فيهما :

- انبوب الشاهد يوضع فيه 3 مل حمض كلور الماء 6 نظامي + 2مل ماء مقطر + 0.5 ml نتريت الصوديوم 0.1%
- انبوب التجربة يوضع فيه 1 مل خلاصة ايتيرية + 2مل حمض كلور الماء مركز + 2 مل ماء مقطر + 0.5 ml نتريت الصوديوم 0.1%

يحرك المزيج و ينتظر 3 دقائق ثم يضاف للانبوبين 0.5 ml كبريتات الامونيوم 0.5% يحرك لمدة 10 دقائق ثم يضاف 0.5 ml من محلول كلورهيدرات نفتيل ايتيلين دي امين 0.1% يسخن 10 دقائق فيظهر لون أحمر بنفسجي ببطء .

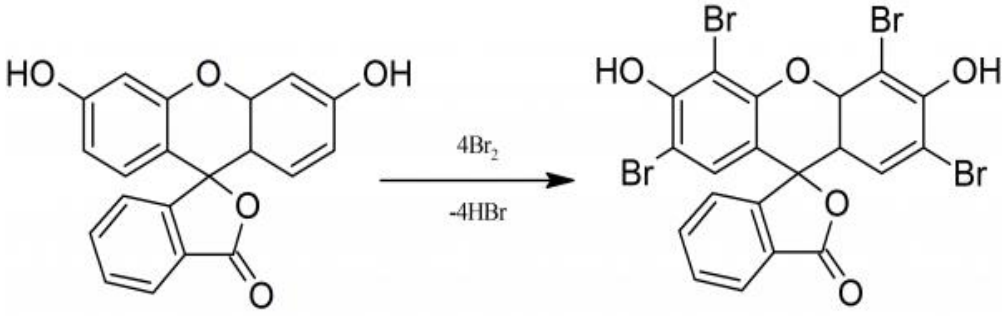
يمكن تطبيق الكشف عن مركبات البنزوديازيبين بطريقة اسرع و هي :

- عينة حاوية على البنزوديازيبين + 3مل HCL (6 نظامي) + 2 مل ماء مقطر + 0.5 ml نتريت الصوديوم 0.1% يحرك قليلا
- ثم يضاف بعد 3 دقائق 0.5 ml كبريتات الامونيوم 0.5% يحرك لمدة 10 دقائق
- ثم يضاف 5 مل من محلول كلورهيدرات نفتيل ايتيلين دي امين 0.1% يسخن حتى 60 درجة مئوية و يترك لمدة 5 دقائق فيتشكل لون وردي الى بنفسجي يتضح تدريجيا بالبرودة (ببطء بالبرودة و بسرعة بالحرارة)

ملاحظة : عند الغليان يعطي البول الطبيعي لون ازرق لان البول يحوي على البولة التي تعطي مع النفتيل ايتيلين دي امين لون ازرق .

الكشف عن مركبات البروم :

يوضع في انبوب اختبار 1 مل بول + 2 قطرة من محلول كحولي لمادة الفلوريسيئين 50% + 10 قطرات حمض الخل الثلجي + 10 قطرات ماء اوكسيجيني 100 حجم ثم يسخن في حمام مائي غالي لمدة 5 دقائق فيتشكل لون احمر هو الايوزين .



Fluorescein Eosin

الكشف عن الايتانول :

يطرح قسم منه كما هو في البول او بشكل ايتيل غلوكورونيك

يكشف باضافة 1مل ثاني كرومات البوتاسيوم 10% + حمض الكبريت الكثيف الى 1 مل من البول فيتشكل بوجود الكحول لون ازرق مخضر غامق .

الكشف عن هالوجينات الفحوم الهيدروجينية :

1 مل بول + هيدروكسيد الصوديوم 20% + 1 مل بيريدين يسخن لمدة دقيقة واحدة في حمام مائي غالي فيعطي لون احمر

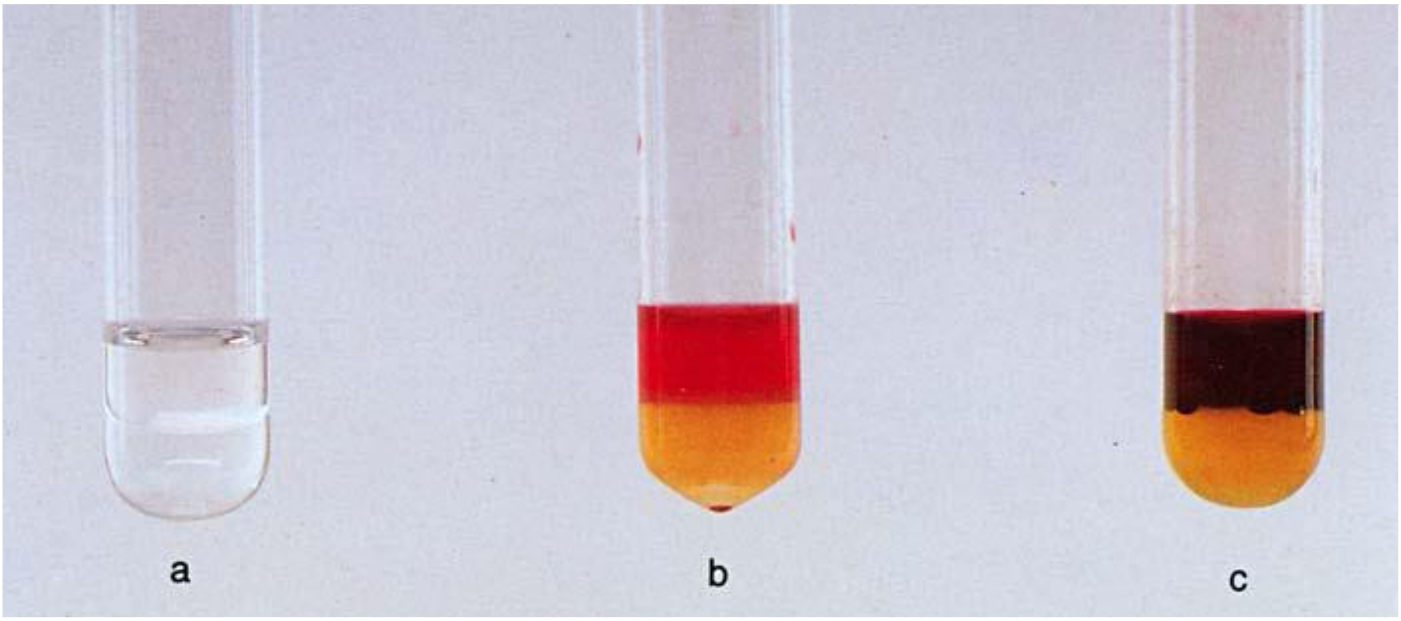


Plate 4. *'Spot' test for trichloro compounds (Fujiwara test) in urine: (a) reagent blank, (b) positive result, and (c) strong positive result.*

تفسير النتائج في التحاليل السمية السريعة للبول :

- في معظم الحالات فان الغياب الكامل لكل التفاعلات اللونية المباشرة في البول تسمح بالقول بان النتيجة سلبية
- كل نتيجة ايجابية يجب ان يتم التحقق منها بتفاعلات ملونة مباشرة او باستخدام طرائق تحليلية أخرى مثل (TLC , HPLC , GC) او التفاعلات المناعية .
- التفاعلات اللونية السابقة لا يمكن استخدامها على البلاسما الا بعد اجراء عملية استخلاص او تجريد للتخلص من البروتينات بترسيبها .

التقرير

جدول يلخص التفاعلات السابقة :

المادة السامة / الكااشف	ساليسيلات	باراسيتامول	فينوتيازينات	ديبنزوازيبين	بنزودي ازيبين	بروم	ايتانول	هالوجينات الفحوم الهيدروجينية
تريندر أو كلور الحديد								
أورثوكريزول								
FPN								
فورست								
نفتيل ايتيلين دي امين								
فلوريسيئين								
المزيج السلفوكرومي								
بيريدين في وسط قلوي كاشف فوجيوارا								

ملاحظات الطالب :

ملاحظات المشرف :

توقيع المشرف :