

## Laboratorium 4

### Toksykologia leków

#### Literatura zalecana:

Szymonik A, Lach J. 2012. Zagrożenie środowiska wodnego obecnością środków farmaceutycznych. Inżynieria i Ochrona Środowiska 15(3): 249-263.

#### Zadanie 1. Wykrywanie salicylanów

##### Odczynniki, szkło laboratoryjne:

10% FeCl<sub>3</sub>  
Etanol  
Probówki, pipety

##### Wykonanie:

1. Do probówki wprowadzić 0,5cm<sup>3</sup> badanej próby i dodać 0,5cm<sup>3</sup> 10% FeCl<sub>3</sub>. Wymieszać. Pojawienie się fioletowego zabarwienia świadczy wstępnie o obecności kwasu salicylowego.
2. Dodać kilka kropli etanolu. Jeśli zabarwienie nie zniknie (jak to jest w przypadku fenolu), potwierdza to obecność kwasu salicylowego.

#### Zadanie 2. Wykrywanie paracetamolu

##### Odczynniki, szkło laboratoryjne:

stęż. HCl  
1% r-r o-krezolu  
0,4M r-r NH<sub>3</sub>  
Łąźnia wodna  
Probówki, pipety

##### Wykonanie:

1. Do probówki wprowadzić 1 cm<sup>3</sup> badanej próby.
2. Dodać 1 cm<sup>3</sup> stęż. HCl i ogrzewać w łąźni wodnej.
3. Pobrać 0,5 cm<sup>3</sup> ogrzanego r-ru, dodać 10cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>O i zamieszać.

4. Dodać 1 cm<sup>3</sup> 1% r-u o-krezolu oraz 4cm<sup>3</sup> 0,4M NH<sub>3</sub>.
5. W obecności paracetamolu pojawi się niebieskie zabarwienie.

### **Zadanie 3. Badanie wpływu wybranych farmaceutyków na aktywność osadu czynnego**

Odczynniki, szkło laboratoryjne:

Osad czynny

ibuprofen, naproksen, paracetamol

0,2 % r-r TTC (chlorek 2,3,5-trifenylo-tetrazolowy),

1 mM r-r TF (trifenyloformazan - do wykonania krzywej kalibracyjnej)

Zlewki, pompki membranowe do napowietrzania, probówki, pipety

Wykonanie:

1. Wlać osad czynny do 4 zlewek.
2. Do jednej zlewki wprowadzić ibuprofen, do drugiej naproksen, do trzeciej paracetamol, a w
3. czwartej zlewce osad nie poddawać działaniu farmaceutyków (próba kontrolna).
4. Osady we wszystkich zlewkach napowietrzać i odżywiać.
5. Po tygodniu zbadać aktywność dehydrogenazową wszystkich osadów za pomocą testu TTC.

Badanie aktywności dehydrogenazowej:

Wykonanie krzywej kalibracyjnej

1. Do 7 cylindrów Nesslera o poj. 50 cm<sup>3</sup> odmierzyć kolejno: 0,5; 1; 2; 4; 6; 8; 10 cm<sup>3</sup> 1 mM r-u TF i uzupełnić alkoholem metylovym (lub acetonem) do objętości 50 cm<sup>3</sup>. Tak przygotowane wzorce zawierają odpowiednio stężenia: 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2 μM TF.
2. Zmierzyć absorbancję każdego wzorca przy długości fali  $\lambda = 490$  nm. wobec metanolu.
3. Wykreślić krzywą kalibracyjną zależności absorbancji (oś Y) od stężenia TF (oś X)

### Badanie aktywności dehydrogenazowej (test TTC):

Metoda opiera się na redukcji bezbarwnego związku TTC do barwnego TF pod wpływem aktywności dehydrogenazowej. Intensywność powstałej barwy jest proporcjonalna do badanej aktywności enzymatycznej.

1. Do próbki wprowadzić pipetą 1 cm<sup>3</sup> buforu Tris o pH 8,4 i 1 cm<sup>3</sup> danego osadu czynnego.
2. Dodać 0,5 cm<sup>3</sup> 0,2 % r-u TTC i wymieszać.
3. Inkubować w temp. 37<sup>0</sup>C przez 30 min.
4. Po inkubacji próby odwirować przez 2 min. przy 5000 obrotów na min i odrzucić supernatant.
5. Do osadu wlać 2 cm<sup>3</sup> alkoholu metylowego (lub acetonu), wytrząsnąć i ponownie odwirować, tym razem przez 6 min.
6. Zbadać absorbancję supernatantu przy długości fali  $\lambda = 490$  nm. wobec metanolu.
7. Obliczyć suchą masę badanych osadów odsączając 10 cm<sup>3</sup> każdego osadu na uprzednio zważonym po wysuszeniu sączku bibułowym i ważąc sączek z osadem po wysuszeniu w suszarce do stałej wagi w temp. 105°C. Sucha masa osadu jest różnicą mas wysuszonego sączka z osadem i samego wysuszonego sączka [w gramach].

Określić stopień toksyczności badanych leków na podstawie wzoru:

$$ST = AD_0 - AD_T / AD_0$$

gdzie:

ST – stopień toksyczności (bezwymiarowy),

AD<sub>0</sub> – podstawowa aktywność dehydrogenaz [mg TF/h·g<sub>sm</sub>]

AD<sub>T</sub> – aktywność dehydrogenaz po dodaniu określonej ilości substancji toksycznej

[mg TF/h·g<sub>sm</sub>]

### **Zadanie 4. Badanie toksycznego wpływu antybiotyków na bakterie – antybiogram**

W metodzie tej używa się krążków bibułowych wysyconych znaną ilością antybiotyku, który dyfunduje do zestalonej agarowożywnicy i ogranicza wzrost posianych na niej mikroorganizmów.

#### Odczynniki, szkło laboratoryjne:

płytki Petriego z podłożem Muellera – Hinton (wyciąg mięsny 3g; kwaśny hydrolyzate kazeiny 17,5 g; skrobia ziemniaczana rozpuszczalna 1,5 g; agar 17 g; H<sub>2</sub>O dest – do 1000 cm<sup>3</sup>; pH 7,4)

18 – 24 godzinna hodowla bulionowa *Escherichia coli*

r-r fizjologiczny w probówkach

krążki o średnicy 6 mm, nasycone różnymi antybiotykami (m. in. penicylina, streptomycyna)  
pipety automatyczne, pęsety, alkohol do sterylizacji, paski papieru milimetrowego

Wykonanie:

1. Rozcieńczyć hodowlę bakterii 1:1000 w r-e fizjologicznym.
2. 1 cm<sup>3</sup> rozcieńczonej zawiesiny przenieść na powierzchnię podsuszonego podłoża Muellera – Hinton na płytce Petriego.
3. Rozprowadzić zawiesinę po całej powierzchni pożywki, a następnie zebrać dokładnie nadmiar płynu pipetą.
4. Ułożyć sterylnie pęsetą krążki z antybiotykami na powierzchni posianej pożywki - równomiernie, po 4 krążki na płytkę.
5. Pozostawić płytki w temp. pokojowej przez 30 minut w celu umożliwienia dyfuzji antybiotyków do podłoża (okres preinkubacji).
6. Po tym czasie wstawić płytki do cieplarki o temp. 37°C na 24 godziny (czas inkubacji).
7. Po zakończeniu inkubacji zmierzyć średnicę stref zahamowania wzrostu wokół poszczególnych krążków i wyciągnąć wnioski odnośnie wrażliwości bakterii na badane antybiotyki.