**OZNACZANIE ACETAMINOFENU W SUROWICY W ZATRUCIU OSTRYM**

Paracetamol (acetaminofen) jest stosowany samodzielnie lub w skojarzeniu z innymi lekami w złożonych preparatach przeciwbólowych i przeciwgorączkowych. Paracetamol dobrze i szybko wchłania się z przewodu pokarmowego i ulega biotransformacji w wątrobie. Następnie jest metabolizowany w procesie sprzęgania z kwasem glukuronowym, jonami siarczanowymi i glutationem. Dawka śmiertelna paracetamolu dla dorosłych wynosi 10-15 g. Toksyczność paracetamolu zwiększa się dodatkowo u ludzi starszych i małych dzieci, a także u osób nadużywających alkohol.

Paracetamol po przekroczeniu dawek terapeutycznych wywiera silne działanie hepatotoksyczne, za które odpowiada aktywny metabolit paracetamolu - N-acetylo-p-benzenochinonoimina. Wyczerpanie rezerw glutationu (podczas przyjęcia toksycznej dawki paracetamolu), powoduje że N-acetylo-p-benzenochinonoimina łączy się z białkami hepatocytów i doprowadza do martwicy komórek wątroby.

**Reakcje identyfikacyjne paracetamolu w materiale biologicznym**

**ODCZYNNIKI:**

- 0,5% Acetaminofen

- 10% HCl

- 1% roztwór chlorku żelaza (III)

- Odczynnik Ehrlicha (1% roztwór aldehydu 4-dimetyloaminobenzoesowego w 10% kwasie solnym)

**1 próba - Reakcja z chlorkiem żelaza (III)**

Do 0,5 ml badanego roztworu dodać kilka kropel (ok.5) świeżo przygotowanego 1% roztworu chlorku żelaza (III), NIE MIESZAĆ. Powstanie niebiesko-fioletowego zabarwienia świadczy o obecności paracetamolu w badanej próbce.

**2 próba - Reakcja po hydrolizie w środowisku kwaśnym**

Do 0,5 ml badanego roztworu dodać 4 krople 10% HCl. Roztwór ogrzewać 2 minuty we wrzącej łaźni, a następnie dodać 3ml wody destylowanej i wymieszać. Pobrać 1ml z otrzymanego roztworu, dodać 1ml odczynnika Ehrlicha i dokładnie wymieszać. Pojawi się żółte zabarwienie, które świadczy o obecności paracetamolu w badanej próbce.

**Oznaczanie stężenia paracetamolu w surowicy**

**ZASADA METODY**

Acetaminofen w reakcji z azotanem sodu III tworzy nitro pochodną, przyjmującą w roztworze alkalicznym barwę żółtą:

**Acetaminofen + azotan sodu III = 3-nitro-acetaminofen** (jon o barwie żółtej) **+ NaOH**

**ODCZYNNIKI**

1. Roztwór standardowy acetaminofenonu: 200µg/ml

2. 3% Kwas trichlorooctowy (TCA)

3. 0,07M Azotan sodu III(NaNO2)

4. 8M Wodorotlenek sodu (NaOH)

**WYKONANIE ĆWICZENIA**

1. **krzywa wzorcowa**

Z roztworu standardowego przygotować następujące stężenia do **krzywej wzorcowej**:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Stężenie acetaminofenonu  (µg/ml) | Roztwór standardowy acetaminofenonu: 200µg/ml  [µl] | Woda dejonizowana  [µl] |
| **Próba ślepa**  **(odczynnikowa)** | - | 400 |
| **20** | 40 | 360 |
| **40** | 80 | 320 |
| **60** | 120 | 280 |
| **80** | 160 | 240 |
| **120** | 240 | 160 |
| **160** | 320 | 80 |

1. Do szklanych probówek zawierających po 0,4ml odpowiedniego stężenia należy dodać 4ml 3% TCA i dokładnie wymieszać
2. Następnie przenieść do szklanych probówek po 3,2ml roztworu, dodać 0,8ml 007M NaNO2, dokładnie wymieszać i inkubować 10 min. W łaźni wodnej w 37°C.
3. Po inkubacji dodać 150µl 8M NaOH, wymieszać i po 10 min odczytać absorbancję przy długości fali λ=430nm za pomocą spektrofotometru wobec próby ślepej odczynnikowej. Pomiaru absorbancji należy dokonać do 30 min. od wykonania.
4. Wykreślić krzywą standardową.
5. **próba badana**

Próbkę badaną ( 0,4ml ) wykonać analogicznie do krzywej. Na podstawie absorbancji próbki badanej wyznaczyć jej stężenie odnosząc się do krzywej standardowej.

1. **interpretacja wyników**

Stężenie acetaminofenonu we krwi powyżej 20 mg/l (1,3mmol/l) po 4 godzinach od chwili spożycia leku jest stężeniem potencjalnie toksycznym. Stężenie większe niż 200 mg/l łączy się ze znacznym uszkodzeniem wątroby.