

Stanovenie lobelínu v biologických tekutinách

E. HRADSKÝ, K. BARNA

*Katedra lekárskej chémie Univerzity P. J. Šafárika,
Košice*

Vypracovala sa turbidimetrická metóda stanovenia lobelínu v biologickom materiáli, t. j. v krvnom sére a v moči. Metóda je založená na reakcii tvorby zákalu lobelínu s Nesslerovým činidlom. Koncentračná závislosť 2—20 µg/ml v moči a 5—50 µg/ml v krvnom sére je lineárna a v kyslom prostredí špecifická. Výsledky meraní sú v uvedenom koncentračnom rozmedzí pre biochemické analýzy vyhovujúce a dobre reprodukovateľné.

Za posledné roky sa v literatúre objavila zpráva bez bližšieho uvedenia pôvodu [1] a práca J. Debefa [2] o pokuse farmakologicky ovplyvniť návyk na fajčenie podávaním hydrochloridu lobelínu, resp. síranu lobelínu silným fajčiarom *per os*, resp. podkožne.

Na bližšie overenie mechanizmu účinku lobelínu sme potrebovali presnú metódu jeho stanovenia v biologických tekutinách, najmä v moči a v krvnom sére. Z literatúry [3—5] je známe, že lobelín, ktorý má ketoskupinu konjugovanú s dvojitou väzbou, redukuje sa na ortuťovej kvapkovej elektróde. F. Šanta v ý [4] zistil, že lobelín poskytuje pri pH 6—7 polarografickú vlnu. Klasická polarografia sa však na priame stanovenie lobelínu v biologických tekutinách nehodí. Preto sme hľadali vhodnú a pomerne jednoduchú metódu stanovenia lobelínu v biologických tekutinách.

Pri vypracovaní metodiky stanovenia sme vychádzali zo známej skutočnosti [6], že niektoré zlúčeniny zo skupiny kurarových látok, ako je napríklad dekametylén-1,10-bis(trimetylamóniumjodid) (dekametónium), ďalej zo skupiny antihistaminík, ako je *N*-(2-dimetylamínopropyl)fenotiazín (prometazín), tvoria s Nesslerovým činidlom zákal, ktorý sa dá využiť na ich stanovenie. Podľa [6] podobný zákal dáva s Nesslerovým činidlom aj lobelín. Títo autori už merali vplyv pH v oblasti 7—12 na tvorbu zákalu lobelínu s Nesslerovým činidlom, čo sme v našej práci využili na jeho kvantitatívne stanovenie.

Experimentálna časť

Chemikálie a roztoky

Použil sa hydrochlorid lobelínu (Spofa), HgCl₂ p. a. (Merck), 2 N-NaOH, 10% roztok HCl v ľadovej kyseline octovej, 0,5 M-NaCl, Nesslerovo činidlo, pripravené podľa [7].

Príprava štandardného roztoku lobelínu

V alikvotnej časti normálneho moču (10 ml) alebo ľudského krvného séra (5 ml) sa rozpustilo toľko hydrochloridu lobelínu, aby sa získali roztoky o koncentráciách stú-

pajúcich po 2 μg , resp. po 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, v moči od 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ do 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a v krvnom sére od 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ do 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Čistota lobelínu sa kontrolovala oscilopolarograficky podľa [8]. Bod topenia použitého preparátu bol 184,1 °C (Kofler).

Stanovenie lobelínu v moči

Do 10 ml čerstvo odobratého normálneho moču sa pridalo 100 mg tuhého HgCl_2 a 1 ml 2 N-NaOH. Vzniknutá tmavosfarbená zrazenina sa odfiltrovala cez filtračný papier (Schleicher & Schull, modrá páska). Do filtrátu, ktorý je slabo zakalený, pridali sa 2 ml 10 % HCl v ľadovej kyseline octovej; po dôkladnom premiešaní sa získal číry filtrát, z ktorého sa odpipetovalo vždy po 5 ml a pridalo sa 0,2 ml Nesslerovho činidla. Vzniknutý zákal sa zmeral vždy po 20 minútach na spektrofotometri Spekker (Hilger H 590) pri 580 nm oproti slepému pokusu, obsahujúcemu moč bez lobelínu, ktorý sa spracoval obdobne ako vzorky obsahujúce lobelín. Premeraním štandardných vzoriek moču so stúpajúcou koncentráciou lobelínu v porovnaní so vzorkami toho istého moču bez prídavku lobelínu (slepý pokus) sa získali hodnoty extinkcie, ktoré sa použili na zostrojenie kalibračného grafu (obr. 1).

Ako vidieť z grafu na obr. 1, závislosť extinkcie od koncentrácie lobelínu v moči v uvedenom rozsahu (2—20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) je priamková. Prítomnosť amoniaku a močoviny podľa našich skúseností stanovenie neruší.

Lobelín treba v moči stanoviť do 30 minút, aby nedochádzalo k zjavnému rozkladu lobelínu na acetofenón. Preto je nevyhnutné pracovať pri laboratórnej teplote, keďže rozklad lobelínu sa pri vyššej teplote urýchľuje. Podľa našich skúseností k zjavnému rozkladu lobelínu dochádza asi po 1 hodine.

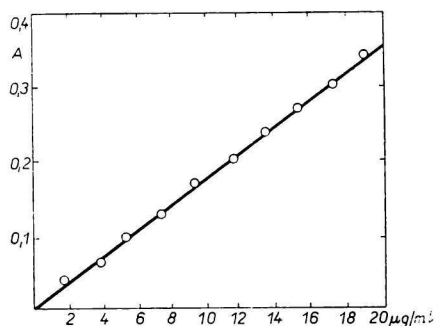
Stanovenie lobelínu v krvnom sére

Hlavným problémom pri stanovení lobelínu v krvnom sére je vhodná deproteinácia séra. Samo Nesslerovo činidlo čiastočne zraža krvné bielkoviny, čím dochádza aj k strate lobelínu. Ďalej zrážanie pomocou HgCl_2 dáva zakalený supernatant. Z týchto dôvodov sme použili dialyzačnú deproteináciu modifikovanú podľa [9]. Jej podstata je v tom, že vzorky krvného séra sa dialyzujú cez vhodnú membránu, v našom prípade cez celofán bežnej výroby, proti 0,5 M-NaCl. Lobelín sa potom stanoví v alikvotnej časti dialyzátu po okyslení a pridaní Nesslerovho činidla. Pri tomto spôsobe dialyzovania nedochádzalo v našich pokusoch k rozkladu lobelínu, ani k jeho strate. Prítomnosť amoniaku stanovenie neruší, pretože v čerstvej krvi je jeho koncentrácia taká malá, že nedochádza ani k reakcii s Nesslerovým činidlom. Obdobne to zistili Freund a Lüstig (pozri [10]).

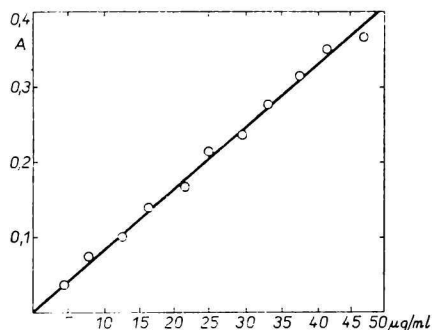
Deproteinácia krvného séra

Dialyzovalo sa vždy 5 ml krvného séra za stáleho miešania 24 hodín proti 10 ml 0,5 M-NaCl [9]. Na dialýzu sa použili celofánové vrecúška bežnej výroby z jednej výrobnej šarže. Do 5 ml dialyzátu sa pridal 1 ml 10 % HCl v ľadovej kyseline octovej a 0,2 ml Nesslerovho činidla. Po 20 minútach sa vzniknutý zákal zmeral obdobne ako pri stanovení lobelínu v moči. Merania sa robili oproti slepému pokusu, pripravenému obdobnou dialýzou vzoriek krvného séra proti 0,5 M-HCl (bez lobelínu). Na pokusy sa použilo normálne ľudské krvné sérum. Premeraním štandardných vzoriek krvného séra so stúpajúcou koncentráciou lobelínu v porovnaní so vzorkami krvného séra bez prídavku lobelínu sa zistené hodnoty extinkcie použili na zostrojenie kalibračného grafu (obr. 2).

Z nameraných údajov vidieť, že závislosť extinkcie od koncentrácie lobelínu v krvnom sére je v uvedenom rozsahu koncentrácií 5—50 $\mu\text{g/ml}$ lineárna. Reakcia je špecifická. Treba pripomenúť, že prídavkom silne alkalického roztoku Nesslerovho činidla aj pri stanovení v moči, aj pri stanovení v krvnom sére výsledná reakcia je slabo alkalická. Podobne ako zistili G. Moricca a spolupracovníci [6] pri stanovení dekametónia v biologických tekutinách, aj pre lobelín platí podľa nášho zistenia, že reakcia s Nesslerovým činidlom je špecifická v alkalickom prostredí.



Obr. 1. Závislosť extinkcie od koncentrácie lobelínu v moči.



Obr. 2. Závislosť extinkcie od koncentrácie lobelínu v krvnom sére.

V našich pokusoch sme použili iba čerstvú krv, ktorá podľa Parnasa obsahuje len niekoľko stotín $\text{mg}\%$ amoniaku. Podľa Freunda a Lustiga sa však amoniak nedá v čerstvej krvi, odbielkovanej za studena (dialýza), ani Nesslerovým činidlom dokázať. Naše skúsenosti potvrdzujú zistenie týchto autorov [10].

Na overenie presnosti a citlivosti metódy sme premerali rozličné druhy moču a krvi

Tabuľka 1

Porovnanie presnosti výsledkov stanovenia lobelínu v moči

Vzorka	Pridané mg/ml	Zistené mg/ml	Relatívna chyba %
1	2	2,04	-2,5
2	4	4,05	+2,1
3	6	6,07	+1,8
4	8	8,08	+1,5
5	10	10,08	+1,2
6	12	12,07	+1,0
7	14	14,07	-0,8
8	16	16,04	-0,7
9	18	18,05	-0,4
10	20	20,06	-0,3

Každá zistená hodnota je priemerom z 10 stanovení. Celkový objem každej vzorky je 5 ml.

s obsahom lobelinu. V skúmaných vzorkách čerstvo odobratého moču sa vyskytoval amoniak v nepatrnej koncentrácii. Výsledky pokusov sme zostavili do tab. 1 a 2. Výsledky štatistického spracovania ukazujú dobrú koreláciu medzi pridaným a zisteným množstvom lobelinu v moči a v krvi. Priemerná chyba je $\pm 1,2\%$ pre stanovenie v moči a $\pm 1,4\%$ pre stanovenie v krvnom sére, čo pre väčšinu biochemických analýz je vyhovujúce.

Tabuľka 2

Porovnávanie presnosti výsledkov stanovenia lobelinu v krvnom sére

Vzorka	Pridané mg/ml	Zistené mg/ml	Relatívna chyba %
1	5	5,12	+2,4
2	7	7,15	+2,2
3	10	10,21	+2,1
4	15	15,27	+1,8
5	20	20,30	+1,6
6	21	21,32	+1,5
7	30	30,40	+1,2
8	35	35,30	+0,8
9	40	40,30	+0,7
10	50	49,75	-0,5

Každá zistená hodnota je priemerom z 10 stanovení. Celkový objem každej vzorky je 5 ml.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛОБЕЛИНА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ

Э. Градски, К. Барна

Кафедра медицинской химии Университета П. И. Шафарика,
Кошице

Был разработан турбидиметрический метод определения лобелина в биологическом материале, а именно — в кровяной сыворотке и моче. Метод основан на реакции образования помутнения лобелина с реактивом Несслера. Концентрационная зависимость является от 2—20 $\mu\text{g/ml}$ в моче и 5—50 $\mu\text{g/ml}$ в кровяной сыворотке линейной. В щелочной среде эта реакция является характерной для лобелина. Результаты измерений в вышеприведенном интервале концентраций отвечают требованиям биохимического анализа и хорошо воспроизводимы.

Определение лобелина в моче: к 10 мл свежеполученной мочи прибавляется 100 мг твердого HgCl_2 и 1 мл 2 н- NaOH . Полученный осадок отфильтровывается. К 5 мл фильтрата прибавляется 2 мл 10 % HCl в ледяной уксусной кислоте и 0,2 мл реактива Несслера. Образовавшееся помутнение измеряется через 20 минут на спектрофотометре при 580 нм в сравнении с аналогично проведенным слепым опытом.

Определение лобелина в кровяной сыворотке: проводится диализ 5 мл кровяной сыворотки с 10 мл 0,5 м- NaCl . К 5 мл диализата прибавляется 1 мл 10 % HCl в ледяной уксусной кислоте и 0,2 мл реактива Несслера. Образовавшееся помутнение измеряется через 20 минут таким же самым образом, как в случае мочи. Нулевым раствором служит диализированная сыворотка без лобелина.

Средняя относительная ошибка измерения $\pm 1,2\%$ для мочи и $\pm 1,4\%$ для

кровяной сыворотки, что является достаточным для большинства биохимических анализов.

Preložila T. Dillingarová

BESTIMMUNG VON LOBELIN IN BIOLOGISCHEN FLÜSSIGKEITEN

E. Hradský, K. Barna

Lehrstuhl für medizinische Chemie an der P. J. Šafárik-Universität,
Košice

Es wurde die turbidimetrische Methode zur Bestimmung von Lobelin in biologischen Materialien, u. zw. im Blutserum und Harn ausgearbeitet. Die Methode beruht auf einer Trübungsreaktion des Lobelins mit dem Neßlers Reagenz. Die Konzentrationsabhängigkeit im Bereich von 2—20 µg/ml im Harn und im Bereich von 5—50 µg/ml im Blutserum ist linear; im alkalischen Milieu konnte eine spezifische Konzentrationsabhängigkeit festgestellt werden. Die Meßergebnisse sind in den angeführten Konzentrationsbereichen für biochemische Analysen befriedigend und gut reproduzierbar.

Bestimmung von Lobelin im Harn: 10 ml von frischem Harn werden mit 100 mg HgCl₂ und 1 ml 2 N-NaOH versetzt. Der ausgeschiedene Niederschlag wird abfiltriert. Dem aliquoten Teil des Filtrats (5 ml) werden 2 ml 10%iger HCl-Lösung (im Eisessig) und 0,2 ml vom Neßlers Reagenz hinzugefügt. Die erzeugte Trübung wird nach 20 Minuten mit einem Spektralphotometer bei 580 nm gegen die in analoger Weise hergestellte Blindlösung gemessen.

Bestimmung von Lobelin im Blutserum: Ein aliquoter Teil des Blutserums (5 ml) wird gegen 10 ml 0,5 M-NaCl dialysiert. 5 ml des Dialysats werden mit 1 ml 10%iger HCl-Lösung (im Eisessig) und 0,2 ml Neßlers Reagenz versetzt. Die erzeugte Trübung wird nach 20 Minuten gegen ein in analoger Weise dialysiertes Serum ohne Lobelin gemessen.

Der relative Fehler der Lobelinbestimmung im Harn beträgt $\pm 1,2\%$ und im Blutserum $\pm 1,4\%$.

Preložil M. Liška

LITERATÚRA

1. *Ars Medici* **1959**, 11.
2. Debef J., *Farmakoterapeutické zprávy Spofa* **5**, 534 (1961).
3. Šantavý F., *Čas. čs. lékár.* **56**, 1 (1943).
4. Šantavý F., *Čas. čs. lékár.* **57**, 109 (1944).
5. Uffelle O. F., *Pharm. Weekbl.* **87**, 646 (1952).
6. Moricca G., Giovanella B., Manni C., Cavaliera R., *Experientia* **17**, 216 (1961).
7. Kľučnikov N. G., *Príručka anorganických syntéz*, 274. Slovenské vydavateľstvo technickej literatúry, Bratislava 1957.
8. Dušínský G., *Chem. zvesti* **9**, 556 (1955).
9. Giovanella B., Manni C., Moricca G., *Experientia* **15**, 393 (1959).
10. Hamsík A., Šantavý F., *Lékařská chemie IV. Biochemie*, 545. Státní zdravotnické nakladatelství, Praha 1962.

Do redakcie došlo 10. 1. 1963

V revidovanej podobe 2. 1. 1964

Adresa autora:

Inž. Ernest Hradský, doc. dr. Konštantín Barna, C. Sc., Katedra lekárskej chémie Univerzity P. J. Šafárika, Košice, Kuzmányho 12.