

SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE TOXOGONINA U URINU I KRVNOM SERUMU

N. Burger, Z. Smerić i V. Hankonyi

*Zavod za kemiju i biokemiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu,
Zagreb*

(Primljeno 18. X 1983)

Stvaranje obojenog u vodi topljivog kompleksa u reakciji Toxogonina s natrij-aminpentacijanoferatom(II) (AmPF) ili s natrij-nitrozilpentacijanoferatom(II) (NP) upotrijebljeno je za spektrofotometrijsko određivanje Toxogonina u urinu i krvnom serumu. Kod analize urina s oba reagensa može se odrediti Toxogonin u koncentracijama od 100 do 1000 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ urina (ako se za analizu uzme 0,1 cm^3 nativnog urina). Koeficijent varijacije kod postupka s AmPF kreće se od 2,66 do 5,31% a kod postupka s NP od 1,92 do 3,75%. Za analizu seruma može se upotrijebiti samo NP. Za područje koncentracija od 50 do 500 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ seruma koeficijent varijacije se kreće od 1,98 do 2,24%.

U ranije objavljenom radu (1) bile su prikazane dvije jednostavne spektrofotometrijske metode određivanja 1,3-bis(4-hidroksiiminometil-1-piridinio)-2-oksapropan-diklorida (poznatog pod nazivima Toxogonin i obidoksim-klorid) u vodenim otopinama i injekcijama. Kao reagensi bili su upotrijebljeni natrij-aminpentacijanoferat(II) (AmPF) i natrij-nitrozilpentacijanoferat(II) (NP). Metode se osnivaju na stvaranju plavo obojenog kompleksa u reakciji Toxogonina s pentacijanidnim spojevima željeza. Kompleks s AmPF nastaje u približno neutralnoj otopini dok je za reakciju s NP potreban lužnati medij. Uz oba reagensa dobiva se isti obojeni kompleks koji nastaje preko zajedničkog međuprodukta akvo-pentacijanoferat(II)-iona. On se brzo stvara pri otapanju AmPF u vodi (2, 3) odnosno u reakciji NP s hidroksid-ionima (4, 5). Maksimum apsorbancije kompleksa u neutralnoj otopini je kod 610 nm a u jako lužnatoj otopini se neznatno pomiče na 615 nm.

Budući da je Toxogonin poznati antidot pri trovanju organskofosfor-nim spojevima (pesticidi, nervni bojni otrovi) htjeli smo ispitati da li se

navedene metode mogu primijeniti i u analizi biološkog materijala. U ovom radu prikazana je mogućnost određivanja Toxogonina u urinu i krvnom serumu uz upotrebu navedenih reagensa, AmPF i NP.

MATERIJAL I METODE

Aparati

Apsorbancije su mjerene na Unicam SP 600 UV spektrofotometru uz upotrebu kiveta debljine sloja od 1 cm. pH je mjereno na pH-metru MA 5701 IEV (Ljubljana).

Otopine reagensa

Otopina $\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NH}_3] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (AmPF), $0,02 \text{ mol dm}^{-3}$, priređivana je proizvodom »Touzart i Matignon« i upotrebljavana je nakon stajanja od 10 minuta.

Otopina $\text{Na}_2/\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (NP), $0,02 \text{ mol dm}^{-3}$, priređena je otapanjem spoja tvrtke »Kemika«. Stabilna je više dana ako se čuva u mraku.

Standardna otopina Toxogonina koncentracije $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ priređena je otapanjem spoja tvrtke »Merck«. Stabilna je više dana.

Britton-Robinsonov pufer pH 6,06 (6) priređen je miješanjem 100 cm^3 smjese octene, boratne i fosfatne kiseline ($0,04 \text{ mol dm}^{-3}$) s $42,5 \text{ cm}^3$ otopine natrij-hidroksida ($0,2 \text{ mol dm}^{-3}$). Otopina NaOH bila je $0,35 \text{ mol dm}^{-3}$, otopina $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, 48 g dm^{-3} , otopina $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 g dm^{-3} i otopina NaCl, 200 g dm^{-3} . Urin i serum bili su uzeti od zdravih osoba.

Metode određivanja

Urin (postupak s AmPF). U 2 cm^3 pufera doda se urin određenog volumena (od $0,2 \text{ cm}^3$ razrijeđenog urina (1:10) do 1 cm^3 nativnog urina), od $0,05$ do $0,5 \text{ cm}^3$ standardne otopine Toxogonina ($3,6$ — $36 \mu\text{g}$), vode do 4 cm^3 i 1 cm^3 otopine AmPF. Otopine se promućkaju i nakon jednog sata mjeri se apsorbancija kod 610 nm prema vodi.

Urin (postupak s NP). U 1 cm^3 otopine NaOH doda se 1 cm^3 otopine NP i promućka. Nakon 10 minuta doda se urin određenog volumena (od $0,2 \text{ cm}^3$ razrijeđenog urina (1:10) do $0,1 \text{ cm}^3$ nativnog urina), od $0,05$ do $0,5 \text{ cm}^3$ standardne otopine Toxogonina i vode do 5 cm^3 . Otopine se promućkaju i nakon 5 minuta mjeri apsorbancija kod 615 nm prema vodi.

Serum. U 1 cm^3 seruma doda se od $0,25$ do $2,5 \text{ cm}^3$ standardne otopine Toxogonina (18 — $180 \mu\text{g}$), 2 cm^3 otopine barij-hidroksida, 2 cm^3 otopine cink-sulfata, $0,4 \text{ cm}^3$ otopine natrij-klorida i vode do 10 cm^3 . Dobro promućkane smjese se centrifugiraju. U 1 cm^3 otopine NaOH doda se 1

cm³ otopine NP i promućka. Nakon 10 minuta dodaju se 2 cm³ bistrog supernatanta i 1 cm³ vode. Otopine se promućkaju i nakon 5 minuta mjeri se apsorbancija kod 615 nm prema vodi.

Baždarni pravci za rad s AmPF odnosno s NP dobiveni su na temelju 7 ponovljenih pokusa za svaki pravac. Pravci su dobiveni po postupcima predloženim kod analize urina, ali bez dodatka biološkog materijala.

REZULTATI

Metode određivanja Toxogonina razrađene su na osnovi ranijih iskustava (1) kao i ispitivanja izvedenih pri radu s biološkim materijalom. Kod rada s AmPF na visinu apsorbancije ne utječe volumen urina sve do 1 cm³ nativnog urina. Ustanovljeno je naime, da od normalnih sastojaka urina jedino mokraćna kiselina u većim količinama snizuje apsorbanciju. To je slučaj kod reakcijskih smjesa koje sadrže više od 1 mg mokraćne kiseline, tj. više od 1 cm³ urina. Činjenica da je urin bio uziman od različitih osoba nije imala utjecaja na rezultat. Jednadžba pravca i rezultati određivanja Toxogonina dodanog u urin prikazani su na tablici 1.

Tablica 1.
Preciznost određivanja Toxogonina u urinu

dodano (μg)	Postupak s AmPF				Postupak s NP			
	A	nađeno* (μg)	std. devijacija	CV (%)	A	nađeno* (μg)	std. devijacija	CV (%)
3,59					0,025	3,73	0,14	3,75
7,18	0,205	7,34	0,39	5,31				
17,95	0,269	17,66	0,47	2,66	0,110	17,22	0,33	1,92

Tablica 2.
Preciznost određivanja Toxogonina u serumu

dodano (μg)	Postupak s NP			
	A	nađeno* (μg)	std. devijacija	CV (%)
3,59	0,024	3,57	0,08	2,24
17,95	0,113	17,69	0,35	1,98

* Izračunato je iz jednadžbe pravca:

$$y = 0,0062x + 0,1595 \text{ (postupak s AmPF), } r = 1,0002$$

$$y = 0,0063x + 0,0015 \text{ (postupak s NP), } r = 1,0006$$

x je izraženo u μg na 5 cm³ reakcijske smjese

Broj određivanja kod analize urina bio je 7 a kod seruma 6.

Kod rada s NP na rezultate analize ne utječe volumen urina sve do 0,1 cm³ nativnog urina. Uz veći volumen urina dobivaju se viši rezultati zbog utjecaja kreatinina. Ispitivanja su pokazala da se viši rezultati dobivaju ako sadržaj kreatinina u reakcijskoj smjesi premaši 1 mg, što je više od mogućeg sadržaja kreatinina u 0,1 cm³ nativnog urina zdrave osobe. Niti u ovom slučaju nije imalo utjecaja što je urin bio uzet od različitih osoba. Volumen deproteiniziranog seruma ne utječe na visinu apsorbanције sve do 2 cm³. Jednadžba pravca i rezultati određivanja Toxogonina dodanog u biološki materijal prikazani su na tablicama 1. i 2.

DISKUSIJA I ZAKLJUČAK

Iz iznesenih je rezultata vidljivo da se predložene metode mogu uspješno primijeniti na određivanje Toxogonina u urinu. Sam urin ne pokazuje nikakvu apsorbanciju kod valne duljine mjerenja za razliku od klasične metode određivanja oksima (7). Naime, kod klasične metode određivanja koja se osniva na mjerenju apsorbancije lužnatih otopina uzorka u ultraljubičastom području spektra (za Toxogonin kod 355 nm) čisti urin može znatnije apsorbirati a vrijednost apsorbancije varira kod uzoraka različitih osoba. Analizom urina opisanim metodama može se odrediti Toxogonin u koncentracijama od 3,6 do 36 μg na 5 cm³ reakcijske smjese odnosno od 100 do 1 000 μmol na 1 dm³ nativnog urina, ako se za analizu uzme 0,1 cm³ nativnog urina. Ovisno o koncentraciji Toxogonina u reakcijskoj smjesi koeficijent varijacije kreće se od 2,66 do 5,31% kod postupka s AmPF a od 1,92 do 3,75% kod postupka s NP. Brži i reproducibilniji je dakle postupak s NP. Sam reagens može se lako nabaviti a može se upotrijebiti i kod analize seruma.

Kod analize seruma uz AmPF kao reagens ne dobivaju se dovoljno reproducibilni rezultati pa se za analizu može upotrijebiti samo postupak s NP. Zbog male osjetljivosti, metoda se može upotrijebiti samo pri analizi seruma s većim sadržajem Toxogonina. Opisanim postupkom može se odrediti Toxogonin u koncentracijama od 3,6 do 36 μg na 5 cm³ reakcijske smjese odnosno 50 do 500 μmol na 1 dm³ seruma. Ovisno o koncentraciji Toxogonina u reakcijskoj smjesi koeficijent varijacije se kreće od 1,98 do 2,24%.

Prikazane metode ne zahtijevaju složenu aparaturu kao na primjer automatska metoda s dijalizatorom (8).

Literatura

1. Burger, N., Karas-Gašparec, V.: Talanta, 24 (1977) 704.
2. Toma, H. E., Malin, J. M.: Inorg. Chem., 12 (1973) 2080.
3. Toma, H. E., Malin, J. M.: Inorg. Chem., 13 (1974) 1772.
4. Swinehart, J. H., Rock, P. A.: Inorg. Chem., 5 (1966) 573.

5. Hankonyi, V., Burger, N., Karas-Gašparec, V.: Z. Phys. Chemie, Leipzig, 256 (1975) 87.
6. Rauen, H. M.: Biochemisches Taschenbuch, Springer-Verlag, Berlin, 1956, str. 651, 654.
7. May, J. R., Zvirblis, P., Kondritzer, A. A.: J. Pharm. Sci., 54 (1965) 1508.
8. Groff, W. A., Ellin, R. I.: Clin. Chem., 15 (1969) 72.

Summary

SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF TOXOGONIN
IN URINE AND BLOOD SERUM

Water-soluble, coloured complexes formed in the reactions of Toxogonin with either sodium aminopentacyanoferrate(II) (AmPF) or sodium nitrosylpentacyanoferrate (II) (NP) were used for spectrophotometric determinations of Toxogonin in urine and blood serum. Toxogonin in urine can be determined with both reagents in the concentration range from 100 to 1000 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ of urine (if analysis is performed with 0.1 cm^3 of native urine). The coefficient of variation ranges from 2.66 to 5.31% in the determination with AmPF and from 1.92 to 3.75% in the determination with NP. Toxogonin in serum can be determined only by using the NP reagent. In the concentration range from 50 to 500 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ of serum, the coefficient of variation is between 1.98 and 2.24%.

*Department of Chemistry and Biochemistry,
Faculty of Medicine, University of Zagreb,
Zagreb*

*Received for publication
October 18, 1983*