

IZBOR METODE ZA MERENJE SADRŽAJA OKSIMA U BIOLOŠKOM MATERIJALU

M. MAKSIMOVIĆ i V. VOJVODIĆ

Institut za toksikologiju UMA, Beograd

(Primljeno 17. XII 1968)

Opisana su tri postupka modifikacije Creasey-Green metode za određivanje sadržaja oksima u biološkom materijalu.

Ispitivanja su vršena sa pet oksima: TMB-4Cl, LüH6-Cl, MMB-1Cl, PAM-2Cl i MINA. Kod svih pet oksima kao najbolja se pokazala izmena Creasey-Green metode u kojoj je 20% natrijumhidroksid zamenjen 25% amonijumhidroksidom. Kod ovog postupka oksimi su stabilniji (tablica 1), a i osetljivost metode je bolja (tablica 2). Zato se ovaj postupak predlaže za primenu.

Danas se u svetu upotrebljava nekoliko metoda za merenje sadržaja oksima u biološkom materijalu. Najčešće se koristi metoda koju su dali *Creasey i Green* (1), a izvestan broj autora upotrebljava i modifikovanu metodu diazotacije (2, 3, 4). Osim toga *Loomis* (5) je opisao i metodu kojom se koncentracija PAM-2J u biološkom materijalu određuje pomoću markiranog ugljenika (C^{14}). Svako od ovih metoda mogu se staviti izvesne zamerke. Tako, na primer, poslednja (sa markiranim ugljenikom) zahteva posebnu opremu i kadrovc. Kolorimetrijska metoda diazotacije je najmanje osetljiva; osetljivost počinje tek sa 20 mikrograma oksima.

U našim ispitivanjima orijentisali smo se na *Creasey-Green* metodu iako su i za nju već iznete neke zamerke i izvršene neke modifikacije ove metode. Tako neki autori smatraju da su koncentracije barijumhidroksida i cinksulfata koje se upotrebljavaju u metodi nepogodne i predlažu da se smanje na polovinu (6, 7). Drugi nalaze da se manje stabilni oksimi brzo raspadaju u toku postupka (8), a to su nam pokazala i naša iskustva. Čehoslovački su autori takođe pokušali da poboljšaju ovu metodu, pa su umesto cinksulfata upotrebljavali kadmijumsulfat, a umesto natrijumhidroksida amonijumhidroksid (9), čime su postigli veću stabilnost oksima.

U našim ispitivanjima nastojali smo da dobijemo metodu koja će biti osetljiva, tačna, brza i primenjiva u različitim uslovima. Zato smo ispitali sve navedene modifikacije *Creasey-Green* metode, a isprobali i neke naše izmene.

REZULTATI I DISKUSIJA

a) *Ocena metode u odnosu na stabilnost oksima.* Za naša ispitivanja upotrebili smo oksime domaće proizvodnje (10): TMB-4Cl, MMB-1Cl, LüH6-Cl, PAM-2Cl i MINA.

Upotrebom kadmijumsulfata u *Creasey-Green* metodi nismo dobili zadovoljavajući rezultat za neke oksime (TMB-4 i LüH6), odnosno, ni velike koncentracije oksima nisu davale nikakva očitavanja na spektrofotometru. Međutim, primetili smo da zamena natrijumhidroksida amonijumhidroksidom, u istoj metodi, poboljšava stabilnost oksima. Osim toga, pretpostavljali smo da bi taloženje belančevina iz biološkog materijala u kiseloj sredini (sa trihlorsirćetnom kiselinom) također rezultiralo boljom stabilnosti oksima, jer se ovi raspadaju u alkalnoj sredini.

Iz svih tih razloga ispitivali smo osnovnu *Creasey-Green* metodu i tri njene modifikacije: zamenu natrijumhidroksida amonijumhidroksidom (25%), zamenu natrijumhidroksida natrijumbikarbonatom (10%) i taloženje belančevina trihlorsirćetnom kiselinom, pa zatim alkalizaciju smeše amonijumhidroksidom.

Sva su ispitivanja rađena tako što je u celokupnu krv dodavana poznata količina oksima, zatim je materijal obrađen jednim od četiri opisana postupka i meren na spektrofotometru Unicam sa vodonikovom lampom kao izvorom svetlosti. Posle prvog merenja materijal je u zatvorenim kivetama ostavljen na mračnom mestu i ponovo meren u određenim vremenskim intervalima, sve do 1140 minuta. Talasne dužine maksimuma apsorpcije za pojedine oksime bile su iste kod svih opisanih postupaka: TMB-4Cl na 345, MMB-1Cl na 375, LüH6-Cl na 355, PAM-2Cl na 336 i MINA na 276 milimikrona. Rezultati ispitivanja stabilnosti prikazani su u tablici 1.

Tablica 1

Stabilnost oksima u zavisnosti od metode u raznim vremenskim intervalima

T (min)	Creasey-Green			Amonijumhidroks.			Trihlorsirć.		Natrijumbikarb.		
	PAM-2	MMB-1	LüH6	PAM-2	MMB-1	LüH6	PAM-2	MMB1	TMB-4	MMB-1	LüH6
0	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
10	100%	0	62	100%	98	99	95	94	100	0	100
30	100	—	35	100	81	96	89	85	99	—	99
60	97	—	11	100	66	94	89	78	99	—	99
120	89	—	0	100	—	—	—	70	—	—	101
180	83	—	—	100	—	—	—	—	98	—	97
1140	68	—	—	100	18	93	13	51	75	—	72

MMB-1, koji se pokazao kao najnestabilniji ispitivani oksim, potpuno se raspao već posle 10 minuta stajanja u toku postupka po *Creasey-Green* i primenom metode sa natrijumbikarbonatom. LüH6, koji takođe

važi kao manje stabilan, potpuno se raspao posle 120 minuta pri *Creasey-Green* metodi, tako da se ova metoda pokazala kao najslabija u odnosu na stabilnost oksima. Kod svih ispitivanih oksima pokazalo se da je najbolja metoda u kojoj je natrijumhidroksid zamenjen amonijumhidroksidom, sa izuzetkom MMB-1. Ovaj oksim najstabilniji je kada se meri metodom taloženja belančevina trihlorsirćetnom kiselinom i alkalizacijom sa amonijumhidroksidom.

b) *Ocena metode u odnosu na osetljivost.* Da bi ispitali osetljivost opisanih postupaka, merili smo koncentraciju oksima od 1 mikrogram/ml krvi kod sva četiri postupka. Ovde je bilo važno utvrditi koja će od metoda kod svih pet ispitivanih oksima dati najveće ekstinkcije. Rezultati su prikazani u tablici 2.

Tablica 2.

Osetljivost metoda kod koncentracije ispitivanih oksima od 1 mikrograma/ml krvi

Oksim	Ekstinkcija $\times 1000$			
	Creasey-Green	Amonijumhidroks.	Trihlorsirć.	Natrijumbikarb.
LüH6-Cl	7	34	13	6
PAM-2Cl	11	20	17	14
MMB-1Cl	0	5	42	0
TMB-4Cl	20	30	23	2
MINA	0	45	15	8

Sa izuzetkom MMB-1 svi oksimi daju najveće ekstinkcije u metodi sa amonijumhidroksidom. MMB-1 i ovde daje najbolji rezultat u metodi sa trihlorsirćetnom kiselinom. To bi ukazivalo da osetljivost metode zavisi od stabilnosti oksima. Međutim, metoda sa trihlorsirćetnom kiselinom nije pogodna za ispitivanje sadržaja oksima u mozgu, jer je redovno posle dodavanja amonijumhidroksida u završnu smešu dolazilo do zamučivanja.

Iz prikazanih rezultata naših ispitivanja proizlazi da je za sve oksime najbolji sledeći postupak:

na 2 ml krvi doda se 3,8 ml destilate; odn.

na 0,2 ml mokraće (razblažene 1 : 10) doda se 5,6 ml destilate; odn.

na 3 ml centrifugata mozga ili mišića (homogenat 1:3) doda se 2,8 ml destilate;

dalje se kod svih dodaje 1 ml 10⁰/₀-tnog rastvora cinksulfata i 1 ml rastvora barijumhidroksida (2 g barijumhidroksida razmute se u 20 ml destilate i suspenzija profiltrira). Cela smeša se promućka, zatim doda 0,2 ml 20⁰/₀ rastvora natrijumhlorida, ponovo promućka i centrifugira 15 minuta na 3500 obrtaja. Dobijeni centrifugat profiltrira se kroz malo vate, odmeri u kvarcnu kivetu tačno 3 ml, doda 0,2 ml koncentrovanog (25⁰/₀) amonijumhidroksida i meri na određenoj talasnoj dužini zavisno od oksima.

ZAKLJUČAK

Opisani modifikovani postupak *Creasey-Green* metode za ispitivanje sadržaja oksima u biološkom materijalu pokazao se kao pogodan za sve tipove oksima: piridinske (PAM-2Cl), bispiridinske (TMB-4Cl i LÜH6-Cl) i monoksima (MINA). Modifikacijom je metoda, ne gubeći na brzini, dobila na osetljivosti.

Literatura

1. *Creasey, N. H., Green, A. L.*: J. Pharm. Pharmacol., 11 (1959) 485.
2. *Blom, J.*: Ber. dtsh. chem. Ges., 59 (1926) 121.
3. *Askew, B. M., Davies, D. R., Green, A. L., Holmes, R.*: Brit. J. Pharmacol., 11 (1956) 424.
4. *Erdmann, W. D., Engelhard, H.*: Arzneim. Forsch., 14 (1964) 5.
5. *Loomis, T. A.*: Toxicol. Appl. Pharmacol., 5 (1963) 489.
6. *Duke, E. E., DeCandole, C. A.*: Can. J. Biochem. Physiol., 41 (1963) 2473.
7. *Ederý, H., Porath, G., Zuhavý, J.*: Toxicol. Appl. Pharmacol., 9 (1966) 341.
8. *Milošević, M., Vojvodić, U., Terzić, M.*: Biochem. Pharmacol., 16 (1967) 2435.
9. *Ornst P.*: Lično saopštenje.
10. *Milojević M.*: ITMZ, Beograd (1968).

Summary

SELECTION OF THE METHOD FOR DETERMINATION OF OXIME CONTENT IN BIOLOGICAL MATERIAL

Three modifications of *Creasey-Green's* method for determination of oxime content in biological material are described.

The study comprised 5 oximes: TMB-4Cl, LÜH6-Cl, MMB-1Cl, PAM-2Cl and MINA. For all the five oximes the modification of *Creasey-Green's* method in which 20 per cent of sodium hydroxide was substituted for 25 per cent of ammonium hydroxide proved best. In this procedure both the stability of oximes (Table 1) and the sensitivity of the method (Table 2) were higher than in the other two modifications. This modification is therefore recommended for use.

*Institute of Toxicology,
Military Medicine Academy, Beograd*

*Received for publication
December 17, 1968.*