

## CONTRIBUȚII LA DOZAREA POLAROGRAFICĂ A OCITOCINEI

Iulia Kovács, Aurelia Hintya Cremene

Deoarece metodele biologice de dozare a ocitocinei necesită aplicarea tehnicilor de o durată mai lungă și unele dintre ele nici nu se caracterizează prin precizie corespunzătoare, au fost folosite în acest scop și alte metode mai exacte și rapide, de exemplu cea polarografică. Cu studiul polarografic al unor peptide din ser, pentru prima oară s-a ocupat Bridička (1, 2), care a constatat că în soluții amoniacale de Co(III) HS-proteinele și peptidele prezintă unde duble catalitice caracteristice.

Ocitocina și alți hormoni peptidici au fost studiați polarografic de mai mulți autori (3, 4, 5). În ultimii ani s-a elaborat o metodă polarografică de urmărire a activității ocitocinazei serice (6, 7, 8, 9), la care micșorarea unei catalitice a ocitocinei sau vasopresinei ca substrat după incubare cu ser, a oferit posibilitatea determinării activității acestei enzime.

În lucrarea de față ne-am propus descrierea unei metode noi de dozare a ocitocinei — experimentată de autori — care se bazează pe măsurarea unei catalitice produse de acest hormon în prezența ionilor de Cd(II), în soluție tampon amoniacal, la pH=8,5 pe cale polarografică.

### Material și metodă

În cursul cercetărilor noastre am folosit ca substanță etalon preparatul Ocitocina S fiole injectabile, conținând 2 UI/fiolă, preparat BIOFARM. Undele polarografice au fost înregistrate în soluție de bază  $\text{NH}_4\text{Cl-NH}_4\text{OH}$  (0,2—0,2 M) și Cd ( $\text{NO}_3$ )<sub>2</sub> 1 mM, cu pH=8,5, cu un polarograf Radelkis Type OH—102, la sensibilitate de  $2 \cdot 10^{-7}$  A/div, cu o înălțime a coloanei de mercur = 79,5 cm. Dependența de temperatură s-a urmărit în intervalul de 288—318°K. Termostatarea s-a realizat cu o precizie de  $\pm 0,05^\circ\text{C}$ , cu un ultratermostat U 10. Îndepărtarea oxigenului din electrolit s-a asigurat prin barbotare de gaz metan purificat, timp de 15 min. înaintea începerii înregistrărilor.

### Rezultate și discuții

Figura nr. 1 reprezintă curba polarografică înregistrată într-o soluție de bază conținând 30  $\mu\text{g/ml}$  ocitocină. Unda dublă se caracterizează prin  $E_1 = -0,94$  V;  $E_2 = -1,66$  V și  $E'_2 = -1,725$  V, iar  $E_{1/2\text{glob}} = -1,425$  V, în timp ce unda Cd(II) are  $E_{1/2} = 0,74$  V.

În privința originii acestor unde se presupune că prima se datorește prezenței asparaginei, iar cea de a doua prezenței legăturii disulfidice din molecula hormonului. În scopul dozării ocitocinei am folosit înălțimea globală a celor două unde, care a prezentat variații proporționale cu concentrația acesteia.

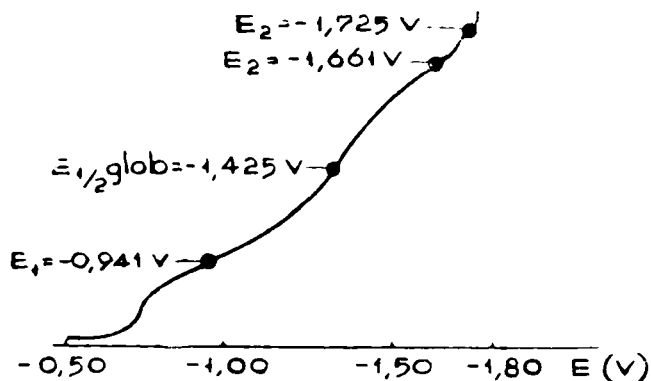


Fig. nr. 1: Curba polarografică a soluției de ocitocină, conținând 30  $\mu\text{g/ml}$  de hormon în soluție tampon amoniacal cu  $\text{pH}=8,5$

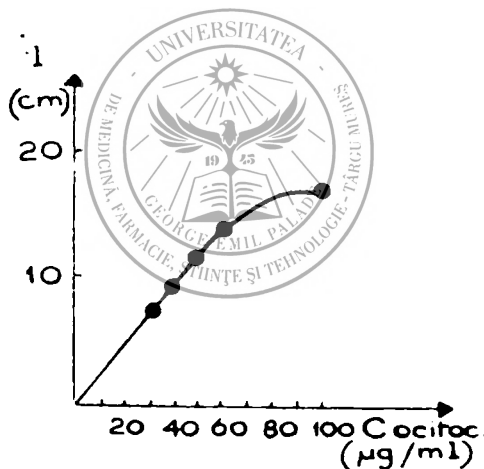


Fig. nr. 2: Variația curentului limită în funcția concentrației de ocitocină.

În domeniul de concentrații: 30—100  $\mu\text{g/ml}$  curba de etalonare prezintă o deviere de la linearitate, datorită fenomenelor de absorbție, fapt verificat prin concordanța sa cu izoterma de absorbție de tip Langmuir, conform figurii nr. 2.

Pe baza figurii nr. 3 s-a constatat că dependența raportului concen-

trație înălțimea unei polarografice (C H) în funcție de (C) concentrație este liniară, în conformitate cu ecuația lui Langmuir transformată:

$$C/H = 1/WZ + C/Z$$

în care s-a presupus că numărului de molecule adsorbite — N — din ecuație îi corespunde înălțimea H a unei duble, cu care este proporțională.

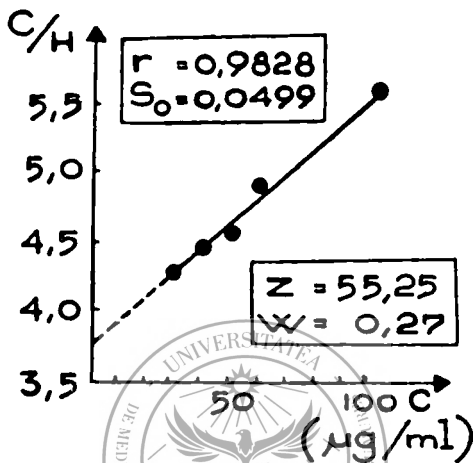


Fig. nr. 3: Variația C/H în funcție de C. C=concentrația ocitocinei, H=înălțimea globală a unei polarografice.

Din panta dreptei s-a obținut valoarea 55,25 pentru Z, care este o constantă proporțională cu suprafața ocupată de moleculele adsorbite, iar valoarea lui W = 0,27, care este coeficientul de adsorbție obținut prin intersecția dreptei cu axa C.H. Concentrațiile au fost exprimate în μg ml. Linearitatea corelației C H a fost verificată prin calcul de corelație, obținându-se :

$$r = -0,983, \text{ iar } S_0 = \pm 0,049$$

Studiind dependența de temperatură a curbei catalitice de ocitocină în intervalul de 288—318°K, s-a obținut următoarea ecuație de corelație, verificând o relație liniară:

$$\lg i_1 = (4,958 \pm 0,647) - (1,083 \pm 0,196) \cdot 1/T \cdot 10^3$$

cu  $r = -0,969$  și  $S_0 = \pm 0,048$

și un coeficient de temperatură:

$$\bar{\alpha}_T = +3,01^\circ \text{K}$$

Din datele acestei dependențe de temperatură s-a calculat valoarea energiei de activare a procesului de transport :

$$E^* = 9,152(1,083 \pm 0,196) = 11,71 \pm 1,79 \text{ kcal mol}$$

Studiul dependenței curentului limită de înălțimea coloanei de mercur a arătat că în domeniul de 40—90 cm, are loc la început, o creș-

tere a curentului limită cu înălțimea coloanei de mercuri, iar după aceea o scădere, fapt semnalat și de alți autori, aceasta fiind o urmare a adsorbției mărite pe suprafața electrodului picător de mercur, conform aspectului curbei din figura nr. 4.

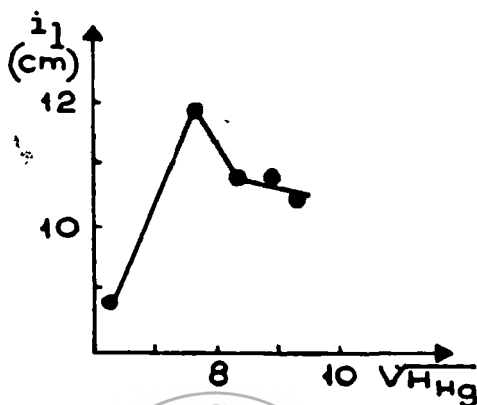


Fig. nr. 4: Dependenta înălțimii unei duble catalitice de înălțimea coloanei de mercur a electrodului picător.

Urmărind variația potențialului de semiundă a Cd(II)-ului în funcția concentrației oцитocinei, am observat devierea acesteia în direcție negativă, cu mărirea concentrației peptidice, fapt care indică formarea unui complex stabil Cd(II)-ocitocină.

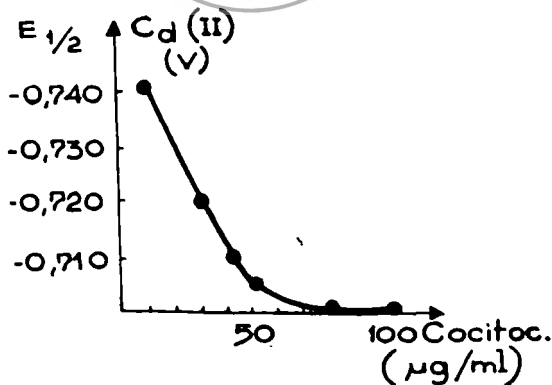


Fig. nr. 5: Dependenta potențialului de semiundă a Cd (II)-ului în funcție de concentrația oцитocinei.

În concluzie, pe baza celor prezentate, putem constata că metoda polarografică prelucrată de noi poate fi propusă la dozarea rapidă și exactă a ocitocinei din diferite preparate medicamentoase.

### *Bibliografie*

1. *Bridička R.*: Collection Czechoslov. Chem. Commun. (1937), 5, 112 și (1937), 5, 148; 2. *Bridička R.*: Nature (1937), 139, 1070; 3. *Hiroshi Sunahara et. al.*: J. Amer. Chem. Soc. (1960), 82, 6017; 4. *Hiroshi Sunahara et. al.*: J. Amer. Chem. Soc. (1960), 82, 6023; 5. *Bota Virgîl, Kovács Iulia*: St. Cerc. Biochimie (1976), 19, 131; 6. *Bartik M., Simko J.*: Cs. Gynekol. (1967), 32, 64; 7. *Bartik M., Tehela M., Cunderliková V., Zwick K.*: Endocrinol. Exp. (1971), 5, 143; 8. *Bartik M., Tehela M., Cunderliková V., Zwick K.*: Cas. Lék. Čes. (1970), 109, 200; 9. *Chavco M., Bartik M., Kasafirek E.*: Collection Czechoslov. Chem. Commun. (1980), 45, 1099.

*Sosit la redacție: 6 iunie 1982*

*Iulia Kovács, Aurelia Hintya Cremene*

### **CONTRIBUTION TO THE POLAROGRAPHIC DETERMINATION OF OXYTOCIN**

The polarographic behaviour of oxytocin in cadmium (II) nitrate-ammonia-ammonium chloride solution has been studied. The calibration curve was constructed with a pharmaceutical product of synthetic oxytocin, by the dependence of global height of the double polarographic wave on oxytocin concentration. Studies were carried out to determine the dependence of the double catalytic wave on temperature. We have calculated the temperature coefficient and the activation energy of the transport process. The relationship of the wave height to mercury pressure on the DME and the effect of oxytocin concentration on the Cd (II) half wave potential were experimented.