

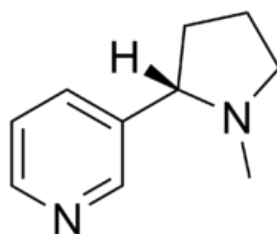
## Izolace a identifikace nikotinu v droze *Nicotiana folium*, *Nicotiana tabacum*, Solanaceae

**Úvod:** Nikotin je olejovitá prchavá látka, v přírodní formě levotočivá, postupně žloutne a hnědne. NIKOTIN JE POTENTNÍM JEDEM PRO VĚTŠINU ŽIVOČICHŮ. Akutní toxický efekt je podmíněn interakcí s nikotinovými cholinergními receptory v periferním i centrálním nervovém systému, přičemž periferní efekt je dominantní. V organismu se velmi rychle vstřebává a rychle metabolizuje v játrech a vylučován ledvinami, významná presystémová eliminace, částečně je vylučován i mateřským mlékem.

1 mg/kg, tj. cca 40 - 60 mg koncentrovaného extraktu je smrtelné pro průměrného dospělého člověka, pro dítě 10 mg. Tato dávka je zapsaná ve všech dostupných databázích, je však možné, že se jedná o omyl tradovaný z 19. století věhlasnou vědeckou kapacitou. Dle kazuistických sdělení u intoxikací, se předpokládá dávka asi 10x vyšší, cca 12 mg/kg. Nicméně akceptujeme hodnotu původně publikovanou v odborné literatuře.

Dávky kolem 1-4 mg u dospělého způsobí záněty sliznice dutiny ústní, pálení v hrdle, slinění, pocity horka začínající v žaludku a šířící se do hrudi a hlavy, nevolnost, bolest hlavy a závratě. Zorničky mohou být zúžené i dilatované. Vyšší dávky způsobují nejasné vidění, poruchy sluchu, ztuhlost, bledost tváře, nervozitu, suchost v ústech, výrazné pocity slabosti končetin., průjmy, zvracení, svalový třes, rychlý nepravidelný a namáhavý dech. Letální dávky (40-60 mg) způsobí během několika minut vytvoření nahnědlé pěny v nose a ústech, poleptání sliznic, cirkulační kolaps, tonicko-klonické křeče. Frekvence dechu je zpočátku zvýšená, později slabá s příznaky dušení. Smrt nastává respirační paralýzou a zástavou srdce. Avšak tato dávka rozložená do celého dne je u chronických kuřáků běžná. 1 cigareta obsahuje 10-15 mg. Nikotin způsobuje skeletární malformace a rozštěpy patra podobně jako anagryrin.

LD<sub>50</sub> 50 mg/kg potkan *p.o.*, někde dávky vyšší až 190 mg/kg, 3mg/kg *i.v.*



nikotin

Nikotin se používá jako insekticid, proti savým a žravým škůdcům na rostlinách.

### Postup extrakce:

0,5 g nikotinových listů zalijeme 10 ml methanolu, necháme 15 minut na ultrazvukové lázni extrahovat. Poté zfiltrujeme přes 1 g bezvodého síranu sodného a na vakuové odparce při teplotě lázně do 30 °C zahustíme přibližně na 2,0 ml.

### Chromatografický důkaz přítomnosti nikotinu na TLC:

Na tenký proužek silufolu s indikátorem pro UV<sub>254</sub> (10 cm x 4 cm) nanese odděleně čirý roztok izolovaného nikotinu rozpuštěného v methanolu a roztok standardu nikotinu, vysušíme a vložíme do mobilní fázi vysycené chromatografické kyvety a necháme vyvíjet po dráze 8 cm. Poté vysušíme fénem, provedeme detekci pod UV lampou při vlnové délce 254 nm.

Dále použijeme detekční činidlo č. 1, zaznamenáme změnu zbarvení a detekujeme detekčním činidlem č. 2. Zahřejeme (nejlépe na vařiči) a vyčkáme do objevení se barevných změn.

**Mobilní fáze:** toluen-ethylacetát-diethylamin, 70:20:10

**Detekční činidlo č. 1:** zředěné Dragendorfovo činidlo (2 ml Dragendorfova činidla + 2 ml konc. kyseliny octové+ 10 ml voda), (už připravené zředěné)

**Detekční činidlo č. 2:** 5% vodný roztok dusitanu sodného

**Vyhodnocení:** Vypočítáme R<sub>f</sub> hodnotu barevných skvrn na dráze vzorku a standardu. Srovnáme s Atlasem TLC, str. 86

### Biologický test:

#### 1) Test akutní toxicity na žábřonožkách *Artemia salina*, Artemiidae

*Artemia salina* je slanovodní korýš, který se používá k testování akutní toxicity. Zkouškou se hodnotí počet uhynulých nauplií v různých testovacích roztocích.

**Provedení:** Do čtyř Petriho misek rozdělíme žábřonožky cca po 5 jedincích a přidáme 0,5 ml roztoku s testovanou koncentrací nikotinu, 4,5 ml mořské vody. Čtvrtá miska je referenční bez nikotinu jen s 5 ml mořské vody. Odečet po 30 minutách, a pak 24-48 hodinách.

Testované koncentrace nikotinu:	roztok č. 1	1 % vodný roztok nikotinu
	roztok č. 2	0,2% vodný roztok nikotinu
	roztok č. 3	0,1% vodný roztok nikotinu

**Vypočítáme** procentuální mortalitu: %mortalita = počet uhynulých/celkový počet nauplií x 100

#### 2) Test na octomilkách, *Drosophila melanogaster*, Drosophilidae

Připravíme roztok nikotinu s vodou a pomocí rozprašovače aplikujeme přes gázu cca 0,5 ml emulze do láhve s octomilkami, do referenční nádoby aplikujeme vodu. Sledujeme změny životaschopnosti octomilek.

Případně emulzi aplikujeme na rostlinu napadenou savým hmyzem, referenční rostlina je postříkaná roztokem bez nikotinu. Sledování efektu v delším časovém horizontu

#### 3) Kontaktní test na rostlinných parazitech – červci (Pseudococcidae)

Na infikovaný list (nejlépe k živému organismu) necháme skápnout cca 10 µl 1% roztoku nikotinu. Sledujeme efekt nikotinu na hmyz (pod mikroskopem).

4)**Kotininový test:** jednorázový test pro kvalitativní detekci kotininu v lidských slinách. Jedná se o jednorázový průtokový chromatografický imunologický test, který slouží ke zjištění přítomnosti kotininu v lidských slinách.

**Otázky:**

1. Co je to nikotin?
2. Jakým způsobem se z drogy izoluje a jaké jsou jeho organoleptické vlastnosti?
3. Jaká je biologická aktivita nikotinu, mechanismus účinku, toxicita?
4. *Artemia salina* – žábřonážka slanisková
5. Kotininový test – princip

