

IRENA GAWĘCKA, ZDZISŁAW SZMAŁ, RYSZARD WÓJCIK

OCENA METOD BIOLOGICZNEGO OZNACZANIA ADRENALINY W ŚRODKACH LECZNICZYCH

Z Zakładu Farmakologii Instytutu Leków w Warszawie

Kierownik: doc. dr *J. Venulet*

Dokładne oznaczenie adrenaliny jest bardzo istotnym zagadnieniem, ze względu na gwałtowność reakcji układu krążenia na ten preparat.

Metody chemiczne pozwalają na dość dokładne oznaczenie ilościowe, lecz wymagają przeciętnie od 5 do 20 mg substancji. Wobec tego w wielu przypadkach oznaczania adrenaliny w środkach leczniczych zawierających małe jej ilości, chemiczne metody stają się nieprzydatne. Badaniem biologicznym przeprowadzonym na zwierzętach można określić nie tylko aktywność czystej substancji, ale również wykazać znikome ilości tego preparatu w złożonych środkach leczniczych, w obecności innych substancji.

W Farmakopei Polskiej III są podane jedynie badania chemiczne, nie uwzględniające zresztą oznaczania ilościowego, co z punktu widzenia analizy leku jest niezadowolające. Celem dobrania metody czulej, dokładniejszej i względnie łatwej, przeprowadziliśmy szereg doświadczeń. Oznaczenia jakościowe w naszym Zakładzie wykonujemy według metody Erhmann'a w modyfikacji Fühnera. Badania ilościowe przeprowadzone były początkowo według metody podanej w Farmakopei ZSRR z 1946 r., następnie metodą I. Natoff'a i wsp., metodą Leitch'a i wsp. oraz metodą oznaczeń „na trzeciej powiece kota”. Tę ostatnią jednak metodę ze względu na bardzo duże zmienności reakcji na tę samą dawkę uznano za nieprzydatną.

METODYKA

W metodzie zamieszczonej w Farmakopei Radzieckiej badanie przeprowadza się na królikach w narkozie uretanowej. Adrenalinę podaje się dożylnie w ilości 20 μ g na zwierzę w stężeniu wzorca 1:50.000. Reakcją jest wzrost ciśnienia krwi. Oznaczeń dokonujemy na nieruchomym walcu. Trzykrotnie podajemy wzorzec na zmianę z preparatem badanym, w stężeniu tak dobranym, aby reakcje na oba pre-

paraty były równe. Zawartość adrenaliny w preparacie badanym obliczamy z porównania dokonanego rozcieńczenia, z wzorcem o znanym stężeniu.

W drugiej metodzie, także opierającej się na ocenie wzrostu ciśnienia, zwierzęciem doświadczalnym jest również królik, jakkolwiek w oryginalnej pracy badania przeprowadzono na drobiu. Doświadczalnie ustalonymi dawkami, dla których była najwyraźniej zaznaczona różnica w reakcji były 1 μg , 2 μg i 4 μg na kilogram wagi ciała zwierzęcia. Kształt krzywej reakcji był w tym przypadku bardzo zbliżony do prostej. Wyżej wymienione dawki wzorca i adrenaliny badanej podawaliśmy w odstępach 4-minutowych. Każdą dawkę wstrzykiwano trzykrotnie, przy czym z uwagi na zmniejszającą się wrażliwość zwierzęcia podawaliśmy je w schemacie zbliżonym do kwadratu łacińskiego. Zastosowanie pełnego kwadratu łacińskiego było niemożliwe, ponieważ wymagałoby 36 wstrzyknięć, a przeciętnie po 20 wstrzyknięciach reakcja jest tak osłabiona, że nie ma wyraźnych różnic pomię-

Tabela 1. Analiza zmienności ciśnienia u królików po podaniu adrenaliny w cm Hg.

Źródło zmienności	Sumy kwadratów	Liczba stopni swobody	Wariancja	F _{emp}	F _{0,95}	
serie (efekt uwikłany)	7,622	2	3,811	1,90	6,94	
podbloki	8,025	2	4,013	2,00	6,94	
nieściskości I	8,024	4	2,006	—	—	
Ogółem króle	23,671	8	—	—	—	
preparaty (efekt uwikłany)	0,191	1	0,191	8,30*	5,99	
preparaty x serie	0,024	2	0,012	—	—	
nieściskości II	0,139	6	0,023	—	—	
Ogółem króle x preparaty	24,025	17	—	—	—	
dawki	{składnik liniowy	24,178	1	24,178	317,3**	3,92
	{składnik paraboliczny	0,017	1	0,017	—	—
preparaty x dawki	{składnik liniowy	0,003	1	0,003	—	—
	{składnik paraboliczny	0,010	1	0,010	—	—
seria x preparaty x dawki	{skład. liniowy dawki	0,833	4	0,208	2,75*	2,45
	{skład. parabol. dawki	0,126	4	0,032	—	—
serie x podbloki x preparaty x dawki (skład. liniowy dawki)	0,572	4	0,142	1,88	2,45	
powtórzenia	0,384	2	0,192	2,52	3,07	
nieściskości III	8,342	126	$\sigma_1^2 = 0,0762$	—	—	
całkowita	58,490	161	—	—	—	

* — zmienność istotna z prawdopodobieństwem większym niż 0,95.

** — zmienność wysoce istotna ($P \approx 1$).

Oceny istotności dokonano testem F-Snedecora.

dzy dawkami. Stężenia roztworów były tak dobrane, żeby objętość podawanego płynu nie przekraczała 1 ml. Uzyskane wzrosty ciśnienia krwi, analizowaliśmy statystycznie i obliczaliśmy potencję względną jak dla tzw. próby na 6 punktów [4, 10].

Metoda trzecia — na izolowanym pęcherzyku nasiennym szczura, pod względem metodycznym jest bardzo zbliżona do metody poprzedniej. Zwierzęta o wadze 250—300 g zabijano uderzeniem w okolice potylicy i po wypreparowaniu obu pęcherzyków nasiennych umieszczano je w roztworze Ringera-Lock'a w aparacie do narządów izolowanych. W doświadczeniu tym ważne jest dokładne usunięcie tkanki łącznej ograniczającej skurcze pęcherzyka. Doświadczalnie stwierdzono, że dawki 0,25 μg , 0,5 μg i 1 μg w 1 ml tak w przypadku wzorca jak i preparatu badanego

Tabela 2. Analiza zmienności skurczów pęcherzyka nasiennego szczurów po podaniu adrenaliny

Źródło zmienności	Sumy kwadratów	Liczba stopni swobody	Warjancja	F_{emp}	$F_{0,95}$	
serie (efekt uwikłany)	7,68	2	3,84	—	—	
podbloki	20,12	2	10,06	1,10	6,99	
nieścistości I	36,43	4	9,11	—	—	
Ogółem pęcherzyki	64,23	8	—	—	—	
preparaty (efekt uwikłany)	0,49	1	0,49	—	—	
preparaty x serie	3,31	2	1,66	3,19	5,14	
nieścistości II	3,10	6	0,52	—	—	
Ogółem pęcherzyki x preparaty	71,13	17	—	—	—	
dawki	{składnik liniowy	1044,08	1	1044,08	2269,7 **	3,92
	{składnik paraboliczny	5,00	1	5,00	10,87 *	3,92
preparaty x dawki	{składnik liniowy	0,01	1	0,01	—	—
	{składnik paraboliczny	0,52	1	0,52	1,12	3,92
serie x preparaty x dawki	{skład. liniowy dawki	27,17	4	6,29	13,67 *	2,44
	{skład. parabol. dawki	41,82	4	10,46	22,74 **	2,45
serie x podbl. x prepar. x dawki (składnik liniowy dawki)	1,16	4	0,29	—	—	
powtórzenia	{składnik liniowy	1,74	1	1,74	3,78	3,92
	{składnik paraboliczny	0,01	1	0,01	—	—
nieścistości III	57,87	126	$\sigma_2^2 = 0,46$	—	—	
całkowita	1250,51	161	—	—	—	

* — zmienność istotna ($P > 0,95$).

** — zmienność wysoce istotna ($P \approx 1$).

przy zastosowaniu przekładni 1:10 spełniały warunki postawione dawkom w metodzie Natoff'a. W czasie podawania preparatu ruch walca jest zatrzymany. Dawki podawano w analogicznej kolejności jak w metodzie Natoff'a z zachowaniem 10-minutowych odstępów między podaniami.

Ocena wyników uzyskanych według metody zamieszczonej w Farmakopei ZSRR nie jest obiektywna, opiera się na jednej tylko dawce i nie uwzględnia zależności pomiędzy dawką a reakcją a znalezienie stężeń o identycznym działaniu jak wzorzec jest kłopotliwe i niezbyt dokładne. Nie mniej metoda ta, podobnie jak wszystkie opierające się na zwyżce ciśnienia jest poprawna z farmakodynamicznego punktu widzenia, ponieważ opiera się na reakcji najwrażliwszego na adrenalinę układu. Z matematycznego punktu widzenia nie budzą zastrzeżeń jedynie metody Natoff'a i wsp. oraz Leitch'a i wsp., ponieważ znajomość reakcji na trzy dawki pozwala na znalezienie linii regresji między reakcją a dawką w skali logarytmicznej w zakresie stosowanych dawek. Z porównania tych linii otrzymuje się potencję względną wraz z granicami ufności dla żądanego prawdopodobieństwa właściwego oszacowania. Ponadto zaletą tych metod jest podawanie roztworów w niedużej i stałej objętości oraz wyeliminowanie błędu wynikającego z różnicy stanów układu krążenia przez zastosowanie zrównoważonych bloków, tj. określonego schematu kolejności wstrzykiwań. Z przyjętego sposobu obliczania potencji względnej przez porównanie linii regresji wynika, że linie te muszą być proste i równoległe oraz współczynnik regresji musi być istotnie większy od zera [10]. Celem sprawdzenia, czy dla przyjętych przez nas dawek powyższe warunki są spełnione oraz dla określenia wielkości błędu losowego, od którego zależy dokładność wiarygodnego oszacowania potencji przeprowadzono dodatkowe doświadczenia na 9 królikach metodą Natoff'a i metodą Leitch'a: Na każdym zwierzęciu (jak również na pęcherzyku) badano jednocześnie wzorzec i jedną z trzech analizowanych serii. Dawki wzorca i adrenaliny badanej podawano według następującej kolejności: $W_1 W_2 N_3 W_3 N_2 N_1 N_1 N_2 W_3 N_3 W_2 W_1 W_3 N_2 N_1 W_1 W_2 N_3$; W — dawki wzorca, N — dawki adrenaliny badanej. Każdą serię analizowano na trzech zwierzętach.

WYNIKI

Wprowadzenie wzorca do badania na każdym zwierzęciu pozwala na całkowite wyeliminowanie zmienności osobniczej w toku porównywania serii i przy obliczaniu potencji. Jednak w syntetycznym opracowaniu doświadczeń powoduje ono uwikłanie (confounding) głównych efektów takich czynników jak „serie” i „preparaty”. W planowaniu doświadczenia zdecydowaliśmy się na to uwikłanie, kierując się ubocznym znaczeniem jakie w aktualnie rozpatrywanym przypadku posiada informacja o tych efektach. W tych okolicznościach, ażeby wyodrębnić efekty uwikłane dla osiągnięcia interesujących informacji zaszła konieczność zastosowania wielostopniowej analizy zmienności. Szczegółowe omówienie syntetycznej analizy doświadczenia, gdzie na skutek syntezy następuje uwikłanie pewnych efektów, można znaleźć u *Snedecora* i *Nawrockiego*. Wyniki analiz zamieszczone są w tabeli 1.

Mimo jednakowego układu doświadczalnego możemy zaobserwować pewne dość ważne różnice w wynikach analiz statystycznych zamieszczo-

nych w tab. 1 i 2. Omówimy kolejno pozycje analizy zmienności. Pierwszy stopień analizy (tab. 1) zawierającej zmienności serii i podbloków (powtórzenia danej serii na 3 zwierzętach), ma charakter formalny i służy do wyeliminowania zmienności osobniczej. Wydzielenie obu zmienności jest konieczne dla lepszego uwidocznienia roli odpowiednich współdziałań wy-

Tabela 3. Wzrost ciśnienia królików po podaniu adrenaliny w cm Hg.

Nr ser. prep.	Prep.	Badany				Wzorzec				Suma
	Dawka	1 μ g/kg	2 μ g/kg	4 μ g/kg	Suma	1 μ g/kg	2 μ g/kg	4 μ g/kg	Suma	
	zwierzę									
1		1,2	2,0	2,3		1,3	1,8	2,5		11,1
		1,3	2,1	2,2		1,0	1,5	2,4		10,5
		1,0	1,4	2,1		1,0	1,6	2,0		9,1
		3,5	5,5	6,6	15,6	3,3	4,9	6,9	15,1	30,7

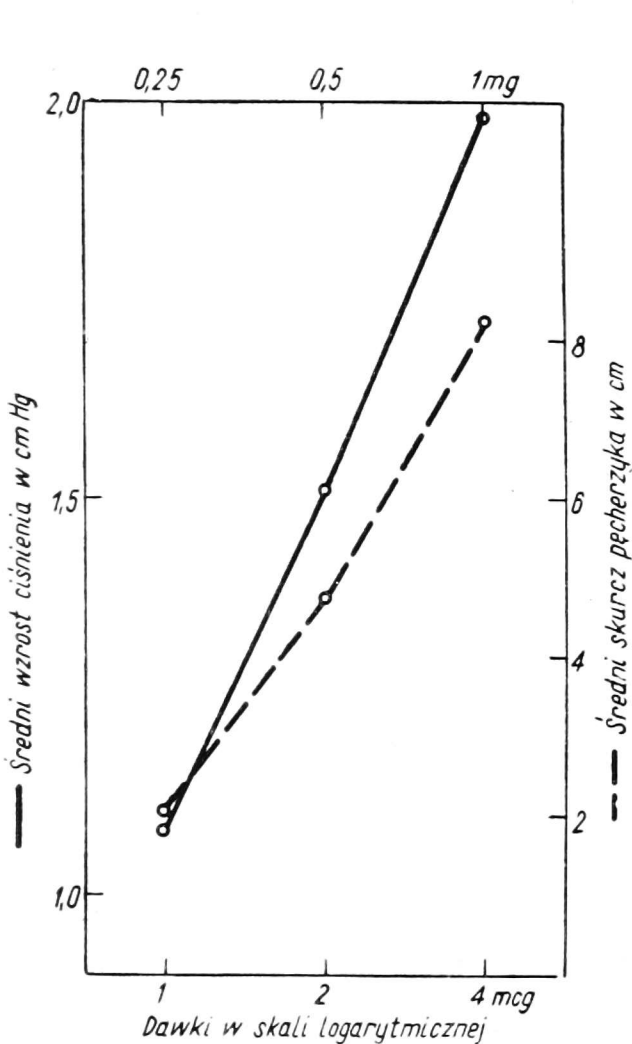
Analiza zmienności doświadczenia metodą Natoff'a na 1 króliku.

Źródło zmienności	Sumy kwadratów	Licz. stop. swob.	Wariancja	F _{emp}	F _{0,95}	
preparaty	0,014	1	0,014	—	—	
dawki —	składnik liniowy (seria)	3,741	1	3,741	149,64 **	4,96
	składnik paraboliczny	0,007	1	0,007	—	—
prepar. skl. liniowy (równoległość)	0,021	1	0,021	—	—	
x dawki skl. parab. (różnice krzywych)	0,047	1	0,047	1,88	4,96	
powtórzenia	0,350	2	0,175	7,00 *	4,10	
nieścistości	0,250	10	s ² =0,025	×	×	
ogólna	3,830	17	×	×	×	

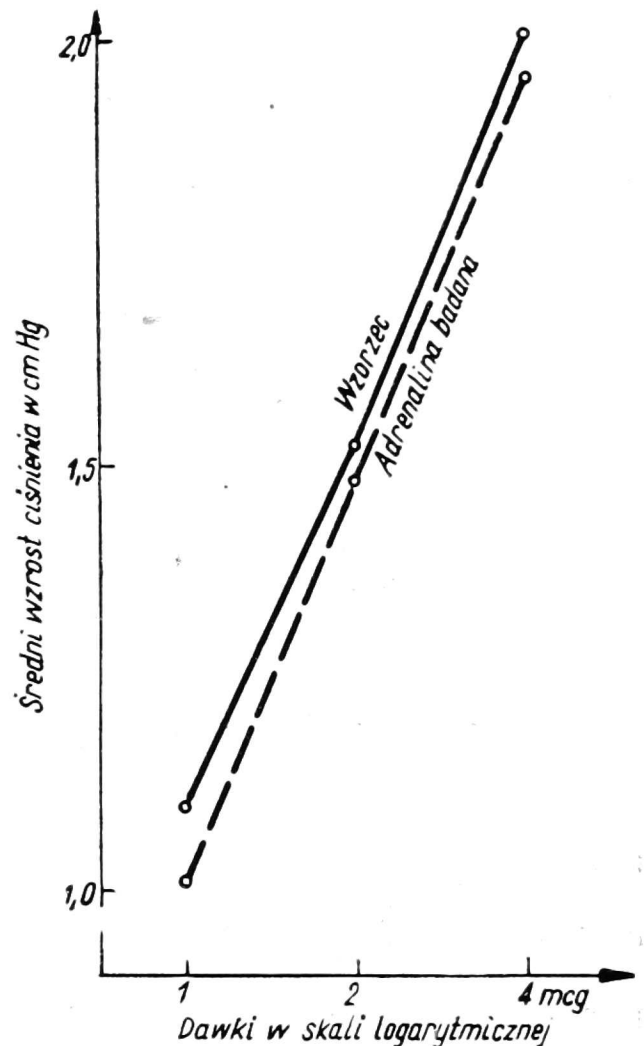
stępujących w dalszej części tabeli. Zmienność „serii” nie może być rozumiana w zwyczajnym znaczeniu, ponieważ zawiera ona również zmienność osobniczą — każda seria na innych zwierzętach).

Zmienność preparatów (badany i wzorzec) jest również uwikłana, ponieważ traktuje łącznie efekt wszystkich 3 serii. Jednak nieistotna zmienność współdziałania: preparaty x serie, wskazuje na zawsze jednakową proporcję badanych serii do wzorca. Stąd, i z istotności zmienności preparatów wnioskujemy ogólnie, że badane serie są istotnie słabsze od wzorca, przy czym różnica ta jest ilościowo niewielka.

Jedno z zasadniczych zagadnień powyższej analizy stanowią wnioski dotyczące zmienności dawek. Rozbicie jej według wielomianów ortogonalnych (dawki w skali logarytmicznej tworzą postęp arytmetyczny) wykazuje wysoką istotność składnika liniowego i nieistotność składnika parabolicznego. Oznacza to, że regresja między reakcją na adrenalinę, a logarytmem dawki jest liniowa w rozpatrywanym przykładzie (ryc. 1).



Ryc. 1.



Ryc. 2.

Ryc. 1. Regresja między wzrostem ciśnienia u króli i skurczu pęcherzyka po podaniu adrenaliny a dawkami.

Ryc. 2. Wykres współdziałania preparatów i dawek.

Potwierdzenie hipotezy o dobrym przybliżeniu do prostych obu linii regresji (badanego preparatu i wzorca) znajdujemy w nieistotności * składnika parabolicznego dawek we współdziałaniu: preparaty x dawki, jak i hipotezy o ich równoległości — nieistotny składnik liniowy (ryc. 2).

Z istotności składnika liniowego współdziałania 2-go stopnia serii x podbloki x dawki wynika, że współczynnik regresji nie jest wielkością stałą i podlega zmienności osobniczej.

* Pojęcie „istotna” i „wysoce istotna” należy rozumieć w sensie określonym w tabeli 1.

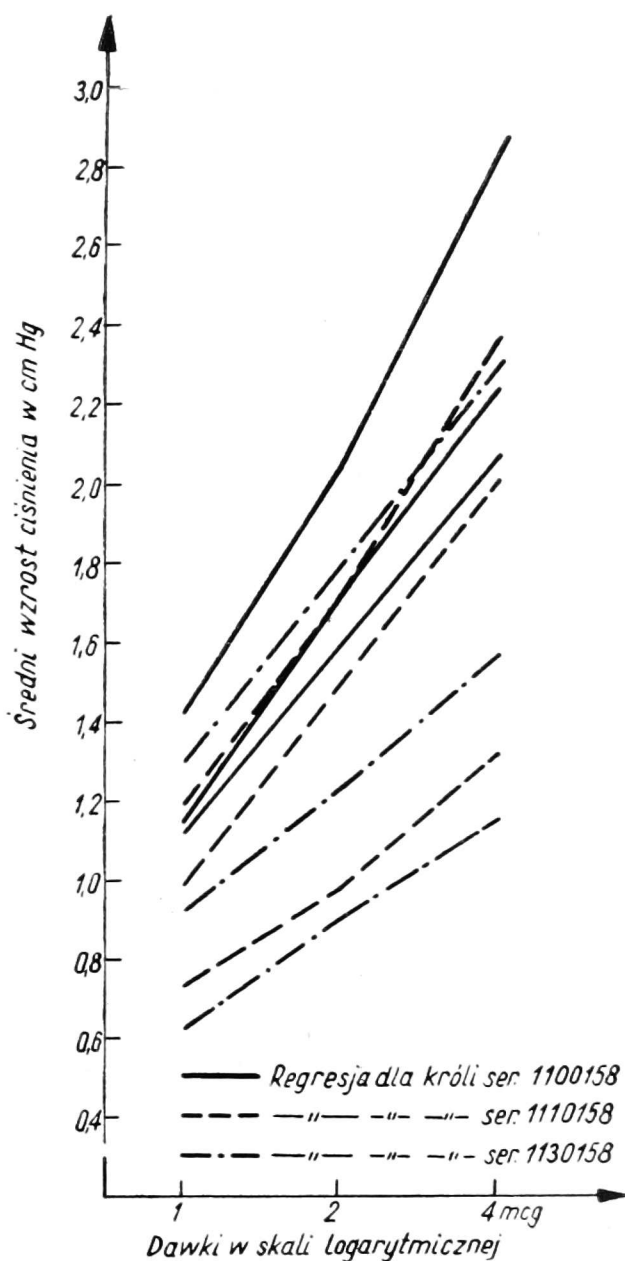
Nie oznacza to oczywiście, że zmienia się potencja oznaczonego preparatu. Udowodniona linia regresji i równoległość powodują odpowiednią zmianę odległości linii regresji wraz ze zmianą współczynnika. Nieistotność składnika parabolicznego wskazuje na dobre przybliżenie ich do prostych w przypadku rozpatrywania pojedynczych zwierząt (ryc. 3).

Ze współdziałania 3 stopnia serie x podbloki x preparaty x dawki wyodrębniono jedynie składnik liniowy dawek. Nieistotność tego składnika potwierdza hipotezę o równoległości linii regresji dla wzorca i preparatu badanego dla pojedynczego doświadczenia na jednym zwierzęciu.

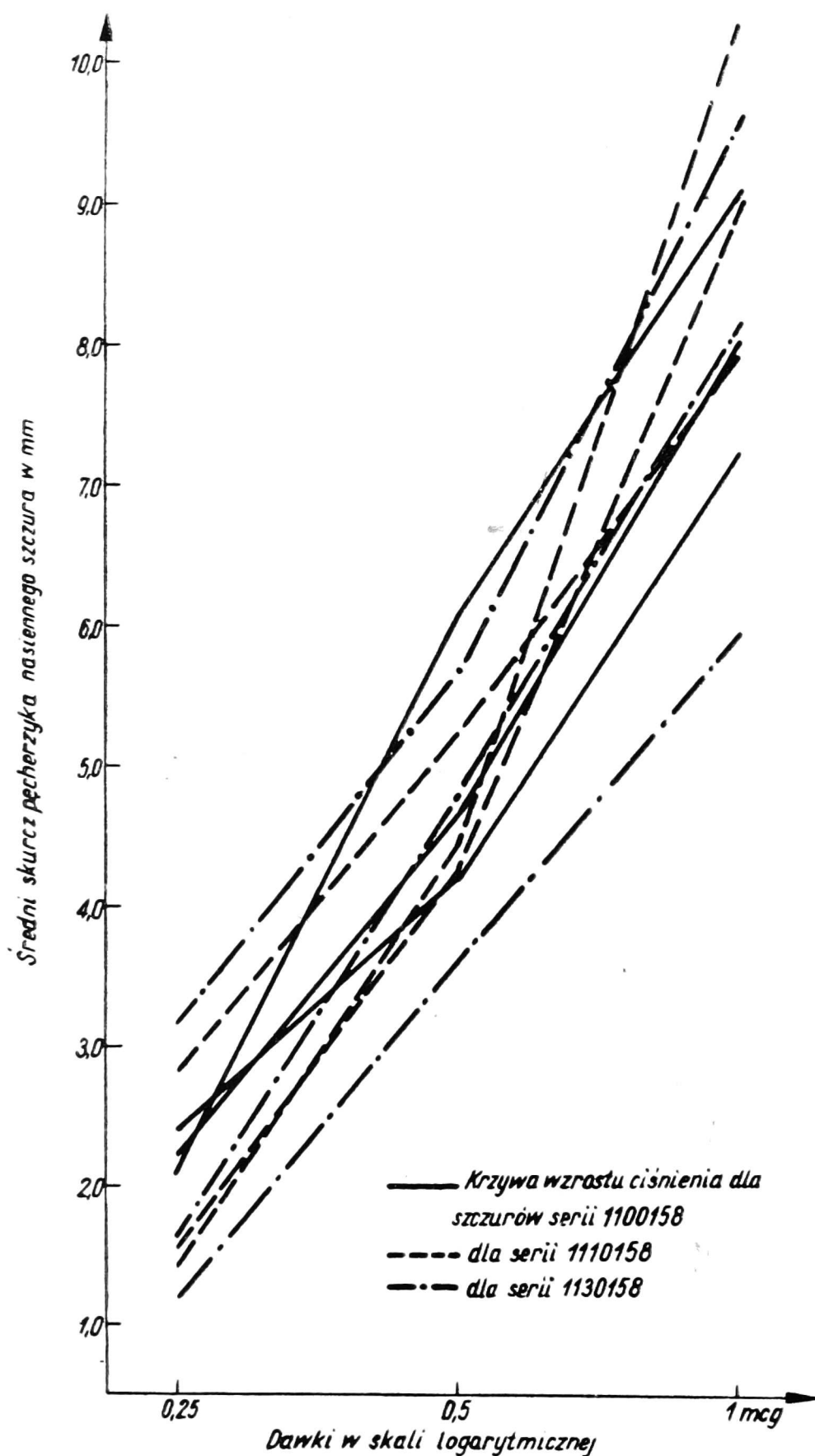
Wbrew oczekiwaniu nieistotna okazała się zmienność powtórzeń. Jednak jest ona duża i znajduje się na granicy istotności, można więc przypuszczać, że na większej grupie zwierząt mogła by się ona okazać istotną, co potwierdzałoby przyjęty przez nas schemat podawania dawek.

Nieco odmiennie przedstawiają się wyniki analizy doświadczeń na pęcherzykach nasiennych szczurów. Poczynione przy omawianiu tab. 1 uwagi natury ogólnej jak i szczegółowej w przypadku zgodnego wniosku statystycznego odnoszą się również i do tej analizy. Wobec tego pominiemy je i omówimy jedynie te pozycje, w których otrzymano inne wnioski. Przede wszystkim w grupie tych doświadczeń składnik paraboliczny zmienności dawek jest istotny. Oznacza to niezupełnie dobre przybliżenie regresji między reakcją a logarytmami dawek do prostej. Jednocześnie bardzo wysoka istotność składnika liniowego wykazuje dominujące znaczenie tego składnika i małe krzywizna linii regresji w praktyce może być pominięta (ryc. 1).

Istotny jest składnik paraboliczny dawek we współdziałaniu: serie x podbloki x dawki. Tę istotność należy interpretować jako znamienne różnice dokładności przybliżenia do prostych linii regresji dla pojedynczych pę-



Ryc. 3. Wykres współdziałania serie x podbloki x dawki (regresja dla poszczególnych króli).



Ryc. 4. Wykres współdziałania serie x dawki x (regresja dla poszczególnych szczurów). Średni skurcz pęcherzyka nasiennego szczura w mm.

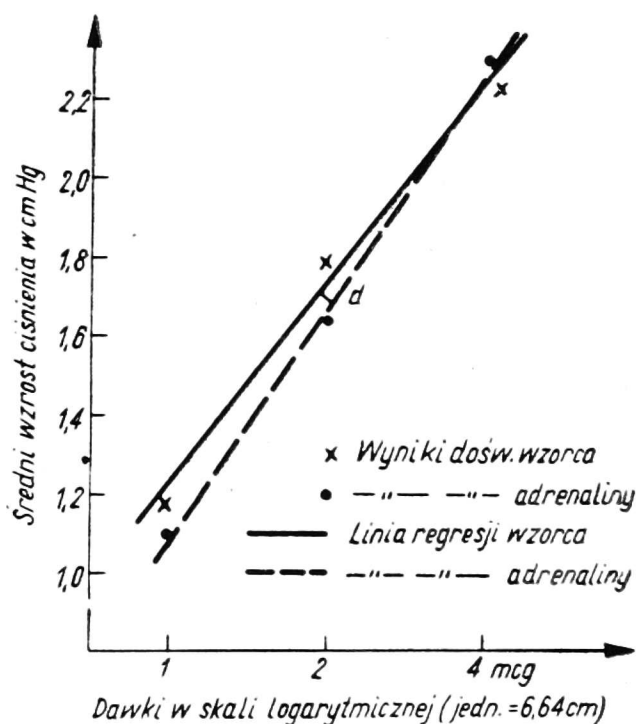
cherzyków (ryc. 4). Jest to wynik dużej zmienności osobniczej w tej metodzie.

Ponadto w metodzie na pęcherzyku nasiennym nie została udowodniona różnica między preparatami badanymi a wzorcem (nieistotne zmienności

preparaty i współdziałanie preparaty x serie). To również jest konsekwencją dużej zmienności (większej niż w metodzie Natoff'a) wyników liczbowych. Dopiero na znacznie większej liczbie zwierząt udałoby się uchwycić tak małe różnice w działaniu tych preparatów, podczas gdy metodą przy użyciu królików w analogicznym doświadczeniu różnice te zostały wykryte.

Wariancje nieściłości III z tabeli 1 i 2 (σ_1^2, σ_2^2) są kwadratami przeciętnego błędu losowego dla obu metod w ramach badania na jednym zwierzęciu. Z porównania tych błędów widzimy, że w metodzie „na królikach” będziemy otrzymywać przeciętnie około 2,4 razy większe granice przedziału ufności dla potencji preparatu niż w metodzie na pęcherzykach nasiennych.

Ostatecznie możemy stwierdzić, że metoda „na królikach” jest bardziej dokładna oraz prostsza w technice przeprowadzenia doświadczenia niż metoda na pęcherzykach. Ponadto do oznaczania potencji względnej wystarczy, jak wynika z przeprowadzonej analizy, badanie na jednym zwierzęciu. W metodzie Leitch'a niejednokrotnie będzie zachodziła konieczność powtarzania doświadczenia dwa lub więcej razy. Szansa, że założenia analizy doświadczeń na 6 punktów, będą spełnione w doświadczeniu na jednym pęcherzyku jest, jak wynika z analizy, niewielka. Nie mniej metoda ta pozwala na ilościowe oznaczenie minimalnych zawartości adrenaliny rzędu 0,25—1,0 μg , co jest jej niewątpliwą zaletą.



Ryc. 5. Wykres linii regresji adrenaliny badanej i wzorca.

Przykład obliczania potencji

Na zakończenie omówimy sposób obliczania potencji względnej dla wyżej omówionych metod. Dla przykładu weźmiemy pierwszą analizę z tabeli 1.

Najpierw dokonujemy analizy zmienności według schematu dla próby na 6 punktów (tabela 3, str. 461).

Analiza wykazuje istotność regresji liniowej oraz dobre przybliżenie do prostej obu linii (badany i wzorzec) i ich równoległość (nieistotne skład-

niki współdziałania preparatu x dawki) (ryc. 5). Spełnienie tych warunków pozwala na obliczenie potencji badanej adrenaliny według wzoru:

$$R = N \log \left(0,301 \cdot \frac{\bar{x}_b - \bar{x}_w}{b} \right)$$

0,301 — logarytm stosunku kolejnych dawek

\bar{x}_w — średni wzrost ciśnienia dla wzorca

\bar{x}_b — średni wzrost ciśnienia dla adrenaliny badanej

b — współczynnik regresji

$$R = N \log \left(0,301 \cdot \frac{\frac{15,6}{9} - \frac{15,1}{9}}{\frac{6,6 + 6,9 - 3,5 - 3,3}{3 [(-1)^2 + 1^2 + (-1)^2 + 1^2]}} \right) = N \log \left(\underbrace{0,301 \cdot 1,33}_{\text{const.}} \cdot \frac{0,5}{6,7} \right) =$$

$$= N \log 0,0299 = 1,071 \sim 107,1\%$$

Granice ufności dla $P = 0,95$ wynoszą:

$$R_1 = N \log (0,0299 - s_m)$$

$$R_2 = N \log (0,0299 + s_m)$$

$$s_m = 2,2 \cdot \sqrt{\left(\frac{0,301^2 \cdot 2}{9} + \frac{0,0299^2}{12} \right) \cdot \frac{s^2}{b^2}} = 0,0283$$

czyli

$$R_1 = N \log 0,0016 = 1,004 \sim 100,4\%$$

$$R_2 = N \log 0,0582 = 1,143 \sim 114,3\%$$

Potencję względną możemy również obliczyć w sposób graficzny. Jest on jednak dość niedokładny i wymaga dużej wprawy. Ponadto brak analizy statystycznej może doprowadzić do nie obiektywnego oszacowania potencji, ponieważ przeprowadzenie linii prostej przez punkty empiryczne, będzie wprowadzało wiele dowolności.

WNIOSKI

1. Obok badań chemicznych konieczne jest biologiczne badanie adrenaliny ze względu na wrażliwość organizmu na ten lek.

2. W pracy różnymi metodami biologicznego oznaczania adrenaliny stwierdziliśmy, że najlepsze wyniki otrzymuje się metodą Mary Lockett i wsp. i metodą Leitch'a i wsp. Metody te uwzględniają charakter krzywej reakcji i pozwalają na dokładne określenie ilościowe adrenaliny.

3. Dla celów rutynowych bardziej przydatna jest metoda M. Lockett jako łatwiejsza technicznie i jak wynika z analiz w przeliczeniach staty-

stycznych, obarczona mniejszym błędem. Ponadto metoda M. Lockett bardziej odpowiada przyjętemu schematowi próby na 6 punktów.

*

*

*

Uprzejmie dziękujemy P. Profesorowi Dr *Zygmuntowi Nawrockiemu* Kierownikowi Katedry Statystyki Matemat. S. G. G. W. za uwagi dotyczące części statystycznej tej pracy.

И. Гавенюка, З. Шмаль, Р. Вуйцик

ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АДРЕНАЛИНА В ЛЕЧЕБНЫХ СРЕДСТВАХ

Содержание

В фармакологическом отделении Института Лекарственных Средств проведено исследования для оценки биологических методов определения адреналина. Применялся метод цитированный в Советской фармакопее, с мигательной перепонкой кошки, метод Лейча — с семенным пузырьком, и метод Лошета — на кролике.

Наиболее ценным в отношении точности и верности отображения кривой реакции являются два последние метода.

Из экспериментов видно, что при дозах 1, 2 и 4 микрограмма у кроликов кривая реакции практически прямая, так что при трехкратном применении отдельных доз потенция определяется с большой вероятностью, в узких пределах. Метод с семенными пузырьками, хотя достаточно чувствительный (дозы 0,5, 1 и 0,25 микрограмма), обладает меньшей точностью, так что нужно применять большее количество животных; кроме того он технически сложен.

Так как многократное применение средства изменяет временные отношения реакции, упомянутые дозы применялись по схеме уравновешенных блоков.

I. Gawęcka, Z. Szmal, R. Wójcik

EVALUATION OF BIOLOGICAL METHODS OF TESTING ADRENALINE IN MEDICINAL PREPARATIONS

Summary

Biological methods of adrenaline testing have been evaluated in the Drug Institute's Pharmacological Department. Soviet Pharmacopeia, Leitch's, and M. Lockett's methods were used on the nictitating membrane of a cat, seminal vesicle, and a rabbit respectively.

Reasons of accuracy and consideration of the reaction curve recommend the last two methods.

Doses of 1, 2 and 4 μg gave from rabbits a virtually rectilinear reaction curve; therefore, by repeating each dosis thrice, potency is determined with great likelihood within narrow limits. The seminal vesicle method, though sensitive (0,5 l and 0,25 μg doses) is less accurate, and requires thus a larger number of animals and is technically more laborious.

Since repeated administration of the drug modifies the reaction with time, doses were given according to the scheme of equilibrated balanced blocks.

PIŚMIENNICTWO

1. *Leitch James L., C. S. Liebig, Haley Thomas J.*: Brit. J. Pharmacol. a. Chemotherapy 1954, 9, 233.
2. *Natoff I. L., Lackett Mary F.*: J. Pharmacy a. Pharmacol. 1957, 9, 464.
3. *Schild*: J. Physiol. 1942, 101, 115.
4. *Snedecor F.*: Statistical Analysis, New York John Willey a. Sons 1957.
5. *Nawrocki Z.*: Zarys metodyki doświadczeń rolniczych PWN, Łódź—Warszawa 1958 r.
6. *Cramer H.*: Metody matematyczne w statystyce PWN Warszawa 1958.
7. Farmakopea Polska III Warszawa PWL 1954.
8. Farmakopea ZSSR Moskwa 1946.
9. *Finney D. J.*: Experimental Design and its biological basis Cambridge University Press London 1955.
10. *Gawęcka I., Wójcik R.*: Acta Physiol. Polon., 1958, 9, 5.

Otrzymano: 19. 11. 1959.