

Z Instytutu Medycyny Pracy i Higieny Wsi w Lublinie
Dyrektor: prof. dr Józef Parnas
Zakład Szkodliwości Chemicznych w Rolnictwie i Leśnictwie
Kierownik: doc. dr Jan Brzozowski

Bohdan SZUCKI, Zofia SOCZEWIŃSKA

Oznaczanie aldehydu octowego we krwi zwierząt doświadczalnych

Обозначение уксусного альдегида в крови экспериментальных животных

Determination of Acetaldehyde in the Blood of Experimental Animals

Zawartość aldehydu octowego we krwi ludzi zdrowych waha się od 0,04 do 0,11 mg‰ (3). Po wprowadzeniu jednak do organizmu alkoholu etylowego, a szczególnie przy jednoczesnym działaniu takich związków jak dwusiarczku czteroetylotiuramu (2,3) i irgapyryny (4) występuje zwykle kilkukrotne zwiększenie stężenia aldehydu octowego we krwi. Hald, Jacobsen i inni (5) podają, że stężenie aldehydu we krwi może dochodzić do 2,5 mg‰.

Niewielkie ilości aldehydu, jego własności fizyko-chemiczne oraz zazwyczaj niewielka ilość próbki będąca do rozporządzenia (szczególnie przy doświadczeniach na zwierzętach) wymagają stosowania specjalnych metod analitycznych.

Większość opisanych w literaturze metod (6—10) dotyczy przeważnie oznaczeń aldehydu w produktach spożywczych. Ze względu na czułość, jak i technikę przeprowadzania oznaczeń, metody te nie mogą mieć zastosowania do oznaczeń aldehydu octowego we krwi. Z istniejących nielicznych sposobów oznaczania aldehydu we krwi najczęściej używane są metody Maurice i Rekkera (11), Stotz'a (12) oraz Burbiridge'a (1,13). Metody te jednak są skomplikowane, a technika ich wykonania stwarza możliwości strat lotnego aldehydu. Wyniki oznaczeń aldehydu octowego we krwi w zależności od stosowanej metody mogą się różnić o kilkaset procent (5,15). Jedynie metoda Burbiridge'a ze względu na stosowanie techniki Conway'a daje bardziej pewne wyniki. Jest to metoda kolorymetryczna wymagająca stosowania światła monochromatycznego o długości fali 224 mμ.

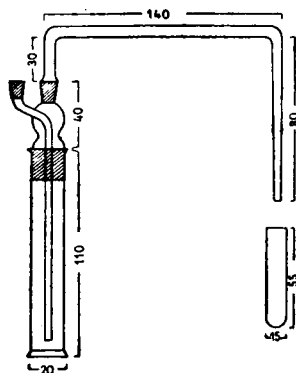
Celem naszej pracy było opracowanie dokładnej i dostępnej metody oznaczania aldehydu octowego we krwi zwierząt doświadczalnych. Szucki i Holeszowski (14) opracowali sposób ilościowego oznaczania aldehydu octowego w powietrzu, wykorzystując barwną reakcję

z kodeiną w środowisku stężonego kwasu siarkowego. Ta ostatnia reakcja posłużyła za podstawę do opracowania niniejszej metody.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Używane aparaty:

1. Fotometr Pulfricha
2. Aparat do destylacji aldehydu octowego z urządzeniem umożliwiającym przepuszczanie powietrza przez destylowany roztwór. Budowę aparatu ilustruje ryc. 1.



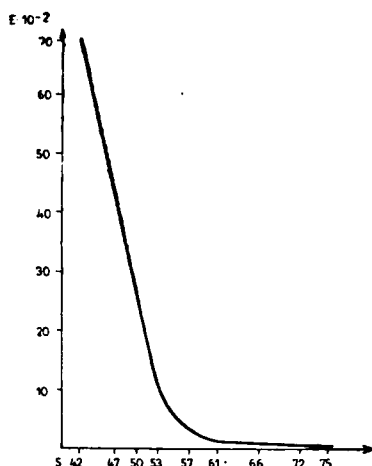
Ryc. 1. Aparat do destylacji aldehydu octowego

Jako źródło sprężonego powietrza stosowano butlę pięciolitrową, której dolny tubus połączono z siecią wodociągową. Górny otwór butli zamknięty był szczelnie korkiem gumowym zaopatrzonym w rurkę szklaną. Ta ostatnia połączona była przy pomocy węża gumowego zaopatrzonego ściskaczem śrubowym z płuczką, zawierającą stężony kwas siarkowy, a następnie z aparatem destylacyjnym. Ilość przepuszczanych baniek powietrza na jednostkę czasu reguluje się dowolnie ściskaczem.

Odczynniki:

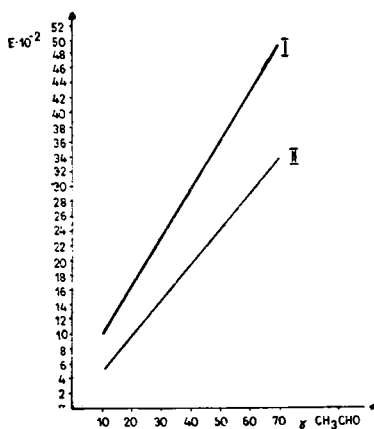
1. kwas siarkowy chem. cz. $d = 1,84$
2. kodeina ch. cz.
3. wolframan sodu ch. cz.
4. aldehyd octowy ch. cz.

Wzorcowy roztwór aldehydu octowego sporządzano w następujący sposób: kolbę miarową z doszlifowanym korkiem pojemności 50 ml napełnioną wodą destylowaną do około 3/4 objętości odważano na wadze analitycznej z dokładnością do 0.2 mg. Następnie dodano około 0,5 ml świeżo przedestylowanego aldehydu octowego, dokładnie zmieszano i powtórnie zważono. Po dopełnieniu wodą destylowaną do 50 ml i dokładnym wymieszaniu odpipetowywano z tak otrzymanego roztworu taką objętość, aby po rozcieńczeniu do 1000 ml, 1 ml zawierał 20 γ aldehydu octowego. Roztwory przechowywano w lodówce nie dopuszczając do zamarzania. W tych warunkach pozostają one trwałe przez 24 godziny.



Ryc. 2. Absorpcja światła przy różnych filtrach

Aldehyd octowy w stężeniu od 10—70 γ daje z kodeiną w środowisku stężonego kwasu siarkowego zabarwienie żółte (14). Zależność absorpcji światła wywołanej przez to połączenie dla różnych filtrów fotometru Pulfricha przedstawia ryc. 2. Zmiany ekstynkcji w zależności od ilości aldehydu octowego (10—70 γ) przy użyciu filtrów S 42 i S 47 ilustruje ryc. 3.

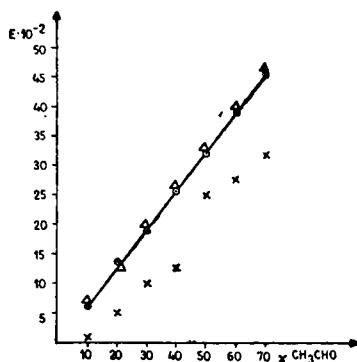


Ryc. 3. Zmiany E w zależności od ilości aldehydu octowego: I przy filtrze S 42, II przy filtrze S 47

Warunki destylacji:

Wykorzystując lotność aldehydu octowego ogrzewano na łaźni wodnej w naczynku destylacyjnym określoną ilość roztworu wodnego aldehydu,

zakwaszonego kwasem siarkowym. Okazało się, że nawet w temperaturze wrzenia łaźni aldehyd nie całkowicie destyluje z roztworu. Średnie wyniki z 10 pomiarów dla każdego stężenia przedstawiono na ryc. 4. Po zastosowaniu przepuszczania powietrza przez roztwór destylowany z szybkością około 30 baniek na minutę przy równoczesnym ogrzewaniu w ciągu pół godziny w temperaturze 80—85°C, uzyskano maksymalne wydobywanie aldehydu z roztworu wodnego (ryc. 4). Koniec rurki destylacyjnej sięgał prawie dna odbieralnika, w którym znajdowało się 3 ml stężonego kwasu siarkowego.



Ryc. 4. Δ — wartość ekstynkcji roztworów wzorcowych (bez destylacji)
 \circ — wartość ekstynkcji przy destylacji roztworów wodnych z przepuszczaniem powietrza
 x — wartość ekstynkcji przy destylacji bez przepuszczania powietrza.

Roztwór porównawczy:

Roztwór porównawczy do oznaczeń fotometrycznych sporządzano przez półgodzinne destylowanie w temperaturze 80—85°C 10 ml kwasu siarkowego rozcieńczonego wodą w stosunku 1:9, do 3 ml stężonego kwasu siarkowego. Równocześnie przepuszczano przez roztwór powietrze. Następnie do odbieralnika dodawano 1 ml 2% roztworu kodeiny w 50% kwasie siarkowym. Tak sporządzony roztwór posiadał przy długości fali światła odpowiadającej filtrowi S 47 takie same własności optyczne, jak roztwory przygotowane przez destylację krwi pełnej, czy też surowicy nie zawierającej aldehydu octowego. Roztwór porównawczy okazał się dość trwałym gdyż w ciągu ośmiu godzin nie obserwowano większych zmian w ilości absorbowanego światła.

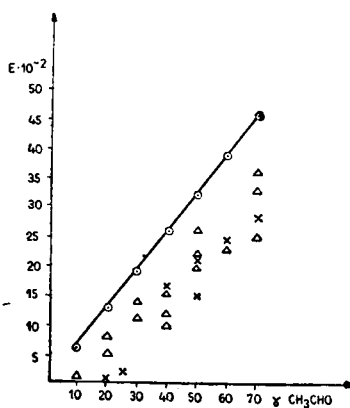
Destylacja aldehydu z krwi pełnej:

Pierwsze próby wykonywano na krwi barana, następnie na świeżej krwi królika. Destylację aldehydu usiłowano przeprowadzić z krwi pełnej,

aby możliwie jak najbardziej skrócić czas analizy i wyeliminować dodatkowe czynności mogące prowadzić do strat w zawartości aldehydu. Pienieniu się krwi zapobiegano przez dodanie dwóch kropli alkoholu decylowego.

Wykonywano próby w następujący sposób: do naczynka destylacyjnego odmierzano około 5 ml krwi, odpowiednią ilość wzorcowego roztworu aldehydu octowego, 5 ml kwasu siarkowego rozcieńczonego wodą w stosunku 1 : 9 i 2 krople alkoholu decylowego. Dalszy tok postępowania był identyczny jak przy destylacji z roztworów wodnych.

Drugą serię pomiarów przeprowadzono z krwią z dodatkiem fluoru sodu aby zapobiec krzepnięciu krwi w czasie destylacji. Uzyskane wyniki średnie z 10 pomiarów dla każdego stężenia przedstawiono na ryc. 5.



Ryc. 5. ○ — wartość ekstynkcji przy destylacji aldehydu octowego z roztworu wodnego przez 30 minut w temp. 80—85° C.
 △ — wartość ekstynkcji przy destylacji aldehydu octowego z krwi nieodbiąlczonej w temp. 80—85° przez 30 minut.
 x — wartość ekstynkcji przy destylacji aldehydu octowego z krwi nieodbiąlczonej w temp. 80—85° przez 30 minut z dodatkiem roztworu fluoru sodu.

Destylacja z surowicy odbiąlczonej.

Do próbki wirówkowej odmierzano 4 ml 10% wolframianu sodu, 4 ml 0,67 n kwasu siarkowego, odpowiednią ilość roztworu wzorcowego aldehydu i 4 ml świeżej krwi królika. Probówkę szczelnie zamykano korkiem gumowym, ochładzano w lodówce a następnie wirowano przez 20 min. z szybkością 2000—3000 obr./min. Po zakończeniu wirowania ochładzano powtórnie i przenoszono surowicę do naczynka destylacyjnego. Dodawano 5 ml rozcieńczonego kwasu siarkowego w stosunku 1 : 9 i destylowano przez pół godziny w temperaturze 80—85°C z równoczesnym przepuszczaniem przez roztwór powietrza. Średnie wyniki 10 pomiarów dla poszczególnych stężeń aldehydu przedstawia tabela I.

Tabela I

Dodano aldehydu	Odzyskano aldehydu	Błąd %
10	9,3	- 7
20	19,0	- 5
30	29,2	- 2,5
40	40,4	+ 1,0
50	50,0	-
60	60,4	+ 0,6
70	69,6	- 0,5

BADANIA WŁASNE

Jak wynika z ryc. 2 maksimum absorpcji światła występuje przy filtrze S 42. Mała jednak przepuszczalność tego filtra utrudnia dokładne odczyty ekstynkcji, co praktycznie uniemożliwia pomiary przy małych różnicach stężeń aldehydu. W zakresie od 10 do 70 γ stwierdzono zależność ekstynkcji od stężenia zgodną z prawem Lamberta-Beera, również przy filtrze S 47, oraz dostateczną jasność obrazu układu porównawczego fotometru (ryc. 3 krzywa II). Z powyższych powodów pomiary przeprowadzono przy filtrze S 47.

Warunki destylacji. Na ryc. 4 przedstawiono wyniki oznaczeń aldehydu przy niektórych warunkach destylacji z roztworów wodnych. W celu porównania tych danych sporządzono bez destylacji, krzywą zależności ekstynkcji od zawartości aldehydu posługując się świeżymi roztworami aldehydu w stężonym kwasie siarkowym (Δ). Punkty x oznaczają średnie dane z 10 pomiarów dla każdego stężenia przy destylacji bez przepuszczania powietrza przez roztwór badany. Wyniki są za niskie, niepowtarzalne i na ich podstawie nie można wyprowadzić liniowej, zależności zawartości aldehydu od czasu ani temperatury destylacji. Punkty \circ ilustrują wyniki półgodzinnej destylacji w temperaturze 80—85°C przy równoczesnym przepuszczaniu powietrza przez roztwór badany z szybkością 30 baniek na minutę. Różnice między równoległymi oznaczeniami wahają się w granicach $\pm 3\%$. Przy prowadzeniu destylacji w powyższych warunkach nie stwierdzono uchwytanych zmian w ciężarze właściwym kwasu siarkowego znajdującego się w odbieralniku co wskazuje na niepowstawanie zmian w objętości roztworu absorpcyjnego.

Oznaczenia w krwi pełnej. Wyniki pomiarów tej grupy oznaczeń zebrano na ryc. 5. Na podstawie średnich danych 10 pomiarów

dla poszczególnych stężeń nie można wyprowadzić zależności liniowej ekstynkcji od zawartości aldehydu. Otrzymane wyniki są za niskie i niepowtarzalne. W krańcowych wypadkach różnice przy poszczególnych oznaczeniach wynosiły około 50% (punkty Δ). W celu sprawdzenia czy powstające w czasie oznaczania skrzepy krwi nie utrudniają destylacji aldehydu przeprowadzono serię pomiarów z dodatkiem fluorku sodu. Jak widać z uzyskanych danych (ryc. 5 punkty x) wyniki nie różnią się od otrzymanych przy destylacji z krwi pełnej bez dodatku fluorku sodu. Pomiary te świadczą, że w wyżej podanych warunkach destylacji nie można oznaczyć aldehydu octowego z krwi pełnej.

Oznaczenia w surowicy odbiałczonej. Z analizy danych przedstawionych w tabeli I wynika, że oznaczenia aldehydu przy stężeniach 10—30 γ obarczone są błędem od 2%—7%. Błąd ten jest spowodowany w znacznej mierze trudnością dokładnego pomiaru roztworów słabo zabarwionych za pomocą fotometru Pulfricha. Przy stężeniach od 40 γ aldehydu błąd nie przekracza 1%. Wyniki zebrane w tabeli I uzyskano przez porównanie z krzywą wzorcową sporządzoną z pominięciem destylacji. Różnice między równoległymi oznaczeniami dla poszczególnych stężeń wahają się w granicach do 3%.

Proponowana metoda oznaczania.

Sporządzanie krzywej wzorcowej. W naczynku destylacyjnym umieszcza się 10 ml kwasu siarkowego rozcieńczonego wodą w stosunku 1 : 9 i dodaje odpowiednią ilość wzorcowego roztworu aldehydu octowego. Naczynko wstawia się do łaźni wodnej o temperaturze 80—85°C na pół godziny i równocześnie przepuszcza się przez badany roztwór powietrze z częstością 30 baniek na minutę. Koniec rurki destylacyjnej winien sięgać prawie dna odbieralnika, zawierającego 3 ml stężonego kwasu siarkowego. Po skończonej destylacji do odbieralnika dodaje się 1 ml świeżo przyrządzonego 2% roztworu kodeiny w 50% kwasie siarkowym i dokładnie miesza bagietką. Po 15 minutach przenosi się zawartość do naczynka kolorymetrycznego i odczytuje wartość absorpcji w stosunku do roztworu porównawczego, który sporządzono przez destylację w tych samych warunkach 10 ml kwasu siarkowego rozcieńczonego wodą w stosunku 1 : 9.

Oznaczanie we krwi. Pobraną próbkę krwi w ilości około 4 ml natychmiast przenosi się ze strzykawki do uprzednio zważonej próbki wirówkowej zawierającej po 4 ml 10% roztworu wolframianu sodu i 0,67 n kwasu siarkowego. Próbki zamyka się korkiem gumowym i powtórnie waży z dokładnością do 0,2 mg, a następnie wstawia do

lodówki na 10 minut, po czym odwirowuje przez 20 minut z szybkością 2000—3000 obr. na minutę. Po skończonym wirowaniu probówkę wstawia się na 10 minut ponownie do lodówki, a następnie przenosi surowicę do naczynka destylacyjnego. W dalszym ciągu postępuje się jak przy sporządzaniu krzywej wzorcowej.

Sprawdzenie metody. W celu sprawdzenia opracowanej metody powtórzono we fragmentach doświadczenia Czyżyk a (15) i H a l d a (5), z których wynika, że po podaniu królikowi alkoholu etylowego i dwusiarczku czteroetylotiuramu („Antabus”) zwiększa się we krwi poziom aldehydu octowego.

Prowokację alkoholową wykonywano w sposób następujący: królikowi podawano sondą bezpośrednio do żołądka około 0,8 g na kg wagi dwusiarczku czteroetylotiuramu w zawiesinie wodnej (preparat produkcji krajowej pod nazwą „Anticol”). Po 20 godzinach po podaniu preparatu wprowadzano sondą do żołądka 20% alkohol etylowy w dawce około 2 g alkoholu bezwodnego na 1 kg wagi. Następnie oznaczano poziom aldehydu octowego we krwi po jednej i po trzech godzinach licząc od chwili podania alkoholu. Krew pobierano z serca w ilości około 4 ml na jedno oznaczenie. Otrzymane wyniki obrazuje tabela II. Jednocześnie przeprowadzono oznaczenia kontrolne krwi królików, którym nie podawano alkoholu i dwusiarczku czteroetylotiuramu. W krwi tej grupy zwierząt nie wykrywano aldehydu octowego. Oznaczenia aldehydu w krwi pełnej po dokonaniu prowokacji alkoholowej nie dały zadawalających wyników.

Tabela II

Zawartość aldehydu octowego we krwi królika.

Anticol wprowadzono dożołądkowo na 20 godz. przed podaniem alkoholu.

Nr hodowlany królika	Waga w g	Ilość Anticolu w g	Ilość ml 20% alkoholu	mg % aldehydu octowego we krwi po podaniu alkoholu		Uwagi
				po 1 godz.	po 3 godz.	
6 ♀	2550	1,75	25	1,0	0,6	
12 ♀	3000	2,4	30	0,4 *)	—	*) krew pobrano po 1,5 godz.
14 ♂	2400	1,8	25	1,2	0,8	
16 ♂	3000	2,4	30	1,5	0,9	

OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ I WNIOSKI

W opracowanej metodzie są wykorzystane własności polimeryzacyjne aldehydu octowego i niska temperatura wrzenia tego związku. Zakwaszenie próbki w czasie destylacji zapobiega polimeryzacji pod wpływem podwyższonej temperatury względnie powoduje depolimeryzację już wytworzonego paraldehydu. Absorpcja wydzielonego aldehydu w stężonym kwasie siarkowym posiada następujące zalety: 1) Zabezpiecza przed stratami mogącymi powstać z powodu dużej lotności aldehydu dzięki polimeryzacji w odbieralniku na nielotny paraldehyd, oraz 2) stężony kwas siarkowy jest gotowym środowiskiem, w którym przebiega reakcja aldehydu z kodeiną.

Intensywność barwy połączenia powstającego przy reakcji kodeiny z aldehydem zależy w znacznej mierze od stężenia kwasu siarkowego, dlatego należy używać tego samego kwasu do sporządzania krzywej wzorcowej i dalszych oznaczeń.

Opracowana metoda oznaczania aldehydu octowego we krwi może służyć również do oznaczeń małych ilości aldehydu w roztworach wodnych (ryc. 4).

Wyniki oznaczeń we krwi królików po podaniu alkoholu i dwusiarczku czteroetylotiuramu potwierdzają słuszność proponowanej metody. Z pracy Hald a i współpracowników (5) oraz C z y ż y k a (15) wynika, że poziom aldehydu octowego przy różnych dawkach dwusiarczku czteroetylotiuramu podanego na 18—24 godzin przed prowokacją alkoholową waha się w granicach od 0,2—2,5 mg^{0/0} i zależy od stężenia alkoholu etylowego we krwi. Najwyższy poziom alkoholu we krwi królików występuje w pierwszej godzinie po podaniu tego związku. Stąd wniosek, że najwyższe stężenie aldehydu we krwi powinno przypadać w pierwszej godzinie po dokonaniu prowokacji alkoholowej. Biorąc pod uwagę fakt, że poziom aldehydu octowego i alkoholu we krwi zwierząt doświadczalnych, mimo zachowania możliwie stałych warunków doświadczalnych, waha się w dość szerokich granicach dla różnych zwierząt z tej samej hodowli, uzyskane wyniki należy uważać za zadawalające i znajdujące się w granicach wartości otrzymanych przez wymienionych autorów (tabela II).

Błąd opracowanej metody przy porównywaniu wyników z krzywą wzorcową sporządzoną przez destylację aldehydu nie przekracza 3^{0/0}.

PIŚMIENNICTWO

1. Burbridge T. N., Hine C. H., Schick A. F.: J. Lab. Clin. Med. 35, 983, 1950.
2. Hald J., Jacobsen E.: Acta Pharmacol. 4, 305, 1956.
3. Hine C. H. i współ.: Jour. of Pharmacol. and Exp. Therap. 98 (1) 13. 1950.
4. Lampi E.: Schweiz. Med. Wochenschrift. Vol. 84, Nr 46, 1954.
5. Hald J.,

Jacobsen E., Larsen V.: Acta Pharmacol. of Toxicol. 8, 329. 1952. 6. Lafon J., Conilland P.: Ann. Falsif. 47, 252 i 357, 1954. 7. Nautow A. J.: Zur. Anal. Chim. Tom VI, Nr 6. 353. 1951. 8. Bohme H., Winkler O.: Fresenius Zeitschr. f. Anal. Chem., Vol. 142, Nr 1, 1954. 9. Dal Nogare S., Norris T. O., Mitchel J.: Jour. Anal. Chem., Vol. 23, Nr 10, 1951. 10. Zellner H.: Fresenius Zeitschr. f. Anal. Chem. Vol. 136. Nr 1, 59. 11. Maurice M. J., Reker R. F.: Rec. trav. chim. 73, Nr 11. 959. 1954. 12. Stotz E.: Jour. Biol. Chem. 148, 583, 1943. 13. Burbridge T. N. i współ.: Jour. of. Pharmac. Exp. Therapy. Vol 98. Nr 1, 4, 1950. 14. Szucki B., Holesszowski B.: Medycyna Pracy Nr 2, 115, 1956. 15. Czyżyk A.: Rozprawy Wydziału Lekarskiego. Polska Akademia Umiejętności Tom. XII, seria I, 1952.

Р Е З Ю М Е

В связи с производимыми исследованиями над влиянием цианмида кальция и этилового спирта на живые организмы было разработано колориметрическим методом обозначение уксусного альдегида в крови экспериментальных животных.

Метод заключается в цветной реакции уксусного альдегида с кодеином в среде концентрированной серной кислоты.

Альдегид был дистиллирован из пробы крови (3—4 мл), после предварительного добавления раствора вольфрамвокислого натрия и центрифугирования, до 3 мл концентрированной серной кислоты.

Дистилляция производилась в температуре 80—85°C в течении 30 минут при одновременном пропускании воздуха через пробу.

По законченной дистилляции в приёмник вливают 1 мл 2% раствора кодеина в 50% серной кислоте.

Для колориметрических обозначений применялся фотометр Пульфрика и фильтр S 47.

Границы обозначений уксусного альдегида в пробе крови колебались от 10 до 70. Ошибка между отдельными обозначениями не превышает $\pm 3\%$.

Метод был проверен определением количества уксусного альдегида в крови кроликов, которым вводился внутрижелудочно этиловый алкоголь и тетраэтилтиурамдисульфид.

S U M M A R Y

In connection with investigations on the influence of calcium cyanamide and ethyl alcohol on living organisms, a colorimetric method of determination of acetaldehyde in the blood of experimental animals has been evolved. This method consists in a colour reaction of acetaldehyde with codeine in the medium of condensed sulphuric acid.

Aldehyde was distilled from a sample of blood (3 to 4 ml), after addition of a solution of sodium wolframian and centrifuging, into 3 ml of condensed sulphuric acid.

Distillation was continued for 30 minutes in the temperature of 80 to 85°C, air being blown through the sample.

When distillation was finished, 1 ml of 2 per cent solution of codeine in 50 per cent sulphuric acid was added into the receptacle.

Colorimetric measurements were carried out by means of the Pulfrich photometre and the S 47 philtre. The estimation range was from 10 to 70 gamma of acetaldehyde in the sample. The error between the separate determinations did not exceed ± 3 per cent.

The exactness of the method was checked by determining acetaldehyde in the blood of rabbits which had received ethyl alcohol and tetraethylthiourame bisulphite introgastrically.

