

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN—POLONIA

VOL. XXXVI, 35

SECTIO D

1981

Zakład Chemii Toksykologicznej, Instytut Analizy i Technologii Farmaceutycznej, Akademia
Medyczna w Lublinie

Kierownik: doc. dr hab. Stanisław Szczepaniak

Ewa SIENKIEWICZ, Stanisław SZCZEPANIAK

**Zmiany stężeń aminokwasów w surowicy krwi szczurów w ostrym
zatruciu Chlorfenwinfosom, oznaczone metodą chromatografii
cienkowarstwowej**

Изменения концентрации аминокислот в сыворотке крови крыс в остром
отравлении Хлорфенвинфосом, определенные методом тонкослойной
хроматографии

Changes in the Concentration of Serum Amino Acids in Rats after Acute Poisoning
with Chlorfenvinphos Determined with the Thin Layer Chromatography Method

W poprzednich pracach (3, 4, 5) wykazaliśmy, że ostre zatrucie szczurów Chlorfenwinfosom wywołuje zaburzenia w gospodarce aminokwasowej ustroju. Objawami tych zaburzeń są istotne spadki stężeń aminokwasów osocza i erytrocytów w pierwszych godzinach po zatruciu. W tych badaniach jako podstawową metodę stosowaliśmy jednokierunkową chromatografię bibułową.

Celem niniejszej pracy było sprawdzenie przydatności chromatografii cienkowarstwowej do ilościowego oznaczania, jako pojedynczych związków, tych aminokwasów, które na chromatogramach bibułowych wędrowały razem. Dodatkowym aspektem pracy było zweryfikowanie wyników otrzymanych poprzednio (3), tj. sprawdzenie, czy metoda chromatografii cienkowarstwowej potwierdzi rezultaty badań uzyskane przy pomocy chromatografii bibułowej.

MATERIAŁ I METODYKA

Do badań użyto szczury białe, rasy Wistar, samce o ciężarze 270 ± 15 g, karmione paszą granulowaną LSM. Łącznie przebadano 24 szczury, dzieląc je na 4 grupy: 1 kontrolna i 3 badane, u których oznaczenia wykonywano po 2, 4 i 24 godz.

od zatrucia. W każdej grupie było po 6 szczurów. Przed zatruciem zwierzęta głodzono 18 godz., a następnie podawano *per os*, sondą metalową, olejowy roztwór Chlorfenwifosy w dawce 6,5 mg/kg (1/2 LD₅₀). Szczurom kontrolnym podawano 0,5 cm³ oliwy.

Po odpowiednim czasie zwierzęta usypiano eterem i skrwawiano przez dekapitację. Po 1 godz. stania odwirowywano elementy morfotyczne i włóknik, a surowicę ściągało suchą mikropipetą i odsalano na kationicie Dowex 50×8. Pobierano 2 cm³ surowicy, dodawano 2 cm³ 0,02 N HCl w celu przeprowadzenia aminokwasów w formę kationów i nanoszono na kolumnę. Szybkość przepuszczania przez kolumnę wynosiła 1 cm³/min. W celu wymycia nie zatrzymanych na żywicy anionów, kolumnę przemywano wodą redestylowaną w ilości ok. 60 cm³, a eluat odrzucano. Zatrzymane na kolumnie aminokwasy eluowano 20 cm³ 6 N amoniaku. Po przejściu amoniaku, kolumnę przemywano 20 cm³ wody redestylowanej. Eluat zbierano od chwili pojawienia się odczynu zasadowego. Połączone eluaty odparowywano promiennikiem podczerwieni. Suchą pozostałość rozpuszczano w 0,2 cm³ 0,1 N HCl, uzyskując roztwór 10-krotnie zatężony w porównaniu z surowicą. Ewentualne zanieczyszczenia stałe odwirowywano, a klarowny roztwór poddawano analizie chromatograficznej. Roztwory standardowe aminokwasów tak przygotowywano, aby stężenia poszczególnych aminokwasów były zbliżone do surowicy 10-krotnie zatężonej. Na płytki chromatograficzne nanoszono strzykawką Hamiltona po 10 μl badanej próbki i tyleż samo roztworów wzorcowych aminokwasów. Jako adsorbentu użyto żelu krzemionkowego typu G firmy Merck, nałożonego na płytki szklane o wymiarach 20×20 cm w warstwie o grubości 0,25 mm. Płytki przechowywano w eksykatorze z bezwodnym chlorem wapnia (6). Do rozdzielania aminokwasów zastosowano dwukierunkową chromatografię wstępującą.

Po wielu próbach wstępnych stwierdzono, że najlepsze efekty uzyskuje się przy zastosowaniu następujących układów rozwijających: układ I — butanol : kwas octowy : woda w stosunku 4:1:1; układ II — fenol : woda w stosunku 75:25 z dodatkiem 20 mg NaCN na 100 g mieszaniny (2). W stosowanej metodycy niektóre aminokwasy migrowały razem i aby uzyskać lepszy rozdział chromatogram rozwijano 1 raz w układzie z butanolem, a 2 razy w układzie fenolowym. Czas rozwijania chromatogramów wynosił w układzie I ok. 1,5 godz., w układzie II — do 4 godz. Aminokwasy wywoływano roztworem ninhydrynowym wg Brennera (1): 0,3 g ninhydryny + 3 cm³ kwasu octowego + 100 cm³ butanolu, zmodyfikowanym przez dodanie soli kadmu (27,6 mg CdCl₂ · H₂O). Ilościowej oceny poszczególnych aminokwasów dokonywano spektrofotometrycznie po elucji barwnych plam z chromatogramów cienkowarstwowych. Elucję prowadzono metanolem 70°, roztwory pozostawiono na 1 godz., a następnie eluat badano spektrofotometrycznie. Absorbancję odczytywano na spektrofotometrze typu Spekol przy długości fali 510 nm.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

W metodycy stosowanej w niniejszej pracy niektóre aminokwasy migrowały razem (leucyna z izoleucyną, fenyloalanina z tryptofanem, arginina z histydyną, kwas asparaginowy z cystyną i lizyną), a niektóre rozdzielały się częściowo: glicyna z seryną i treoniną oraz metionina z waliną.

Otrzymane wartości R_f dla układu fenol:woda były następujące: tryptofan — 0,58, fenyloalanina — 0,45, metionina — 0,45, izoleucyna — 0,45,

tyrozyna — 0,43, leucyna — 0,38, walina — 0,38, alanina — 0,31, glicyna 0,20, treonina — 0,19, histydyna — 0,19, arginina — 0,18, seryna — 0,17, lizyna — 0,09, cystyna — 0,09, kwas glutaminowy — 0,07, kwas asparaginowy — 0,07.

Natomiast wartości R_f w układzie: butanol:kwas octowy:woda kształtowały się następująco: tryptofan — 0,65, leucyna — 0,58, fenyloalanina — 0,56, metionina — 0,56, tyrozyna — 0,54, walina — 0,49, kwas glutaminowy — 0,41, alanina — 0,37, seryna — 0,33, treonina — 0,31, glicyna — 0,30, arginina — 0,11, histydyna — 0,09, kwas asparaginowy — 0,09, lizyna — 0,08, cystyna — 0,08.

Wyniki średnich stężeń aminokwasów w surowicy krwi szczurów kontrolnych i badanych zestawiono w tab. 1. Jak wynika z podanych wartości R_f , niektóre aminokwasy (glicyna+seryna+treonina, oraz metionina z walina) w stosowanych warunkach rozdzielały się prawie całkowicie, jednak ilościową ocenę tych aminokwasów dokonywaliśmy łącznie, gdyż oznaczanie pojedynczych plamek mogłoby prowadzić do błędów.

Wyniki otrzymane w niniejszej pracy potwierdziły rezultaty naszych poprzednich badań wykonanych w oparciu o chromatografię bibułową jednokierunkową (3). Jak widać z tab. 1, największy spadek obserwowano po 4 godz. działania trucizny dla aminokwasów, które organizm potrafi sam syntetyzować, to jest dla alaniny, glicyny+seryny i treoniny, kwasu glutaminowego, asparaginowego oraz aminokwasów zasadowych.

Tab. 1. Stężenia aminokwasów w surowicy szczurów w ostrym zatruciu Chlorfenwinfossem w $\mu\text{g}/\text{cm}^3$.

Amino acid concentrations in rat serum ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$) in acute poisoning with Chlorfenvinsphos

L.p.	Aminokwas	Grupa kontrolna	Czas po zatruciu		
			2 godz.	4 godz.	24 godz.
1.	Kwas asparaginowy + cystyna + lizyna	33,7	29,1	17,8**	31,6
2.	Arginina + histydyna	16,2	12,7*	10,4**	13,6
3.	Kwas glutaminowy	9,6	6,0*	ilość*** śladowa	5,9
4.	Glicyna + seryna + treonina	64,4	50,2*	48,1*	52,7
5.	Alanina	45,3	33,3*	27,6**	47,9
6.	Walina + metionina	25,7	23,4	27,0	23,4
7.	Tyrozyna	23,9	20,9	21,4	20,5
8.	Leucyna + izoleucyna	50,4	47,5	47,9	43,3
9.	Fenyloalanina + tryptofan	43,9	43,7	43,2	44,1

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Na tej podstawie można przypuszczać, że jedną z przyczyn obniżonego stężenia aminokwasów może być zmiana aktywności aminotransferaz w zatruciu insektycydem fosforoorganicznym. Natomiast aminokwasy egzogenne nie zmieniają swego stężenia, to jest leucyna z izoleucyną, fenylalanina z tryptofanem, tyrozyna oraz walina z metioniną.

Zaletą metody chromatografii cienkowarstwowej w porównaniu z bibułową było uzyskanie oddzielenia kwasu glutaminowego od treoniny i tyrozyny od tryptofanu, co było niemożliwe w metodzie chromatografii bibułowej. Dalsze zalety — to krótszy okres rozwijania chromatogramów oraz możliwość nanoszenia mniejszej ilości badanego materiału. Ujemną stroną chromatografii cienkowarstwowej jest niemożliwość jednoczesnego nanoszenia wzorców i próbki badanej na ten sam chromatogram, co jest możliwe przy stosowaniu chromatografii bibułowej.

Wnioski

1. W ostrym zatruciu szczurów Chlorfenwinfossem stwierdzono istotne spadki stężeń tych samych aminokwasów, co i w badaniach wcześniej-szych, opartych na chromatografii bibułowej.

2. Zastosowanie techniki chromatografii cienkowarstwowej umożliwiło dokładne określenie zachowania się kwasu glutaminowego i tyrozyny w stanie zatrucia badanym insektycydem.

PIŚMIENNICTWO

1. Brenner M., Niederwieser A.: Chromatography of Amino Acids on Thin Layers of Adsorbents, *Experientia* **16**, 378, 1960.
2. Opieńska-Blauth J., Kraczkowski H., Brzuszkiewicz H. [w:] Marini Bettolo G. B.: *Thin Layer Chromatography*, Elsevier Publishing Company, Amsterdam 1960.
3. Szczepaniak S. i wsp.: Wpływ Karbarylu i Chlorfenwinfosu na poziom wolnych aminokwasów w surowicy krwi szczura. Cz. I. Zatrucie jednorazowe 1/2 LD₅₀. *Bromat. Chem. Toksykol.* **9**, 419, 1976.
4. Szczepaniak S. i wsp.: Białko całkowite, współczynnik A/G i azot α -aminowy w surowicy krwi szczurów po jednorazowym zatruciu Chlorfenwinfossem i Karbarylem w dawce 1/2 LD₅₀. *Roczn. PZH* **28**, 79, 1977.
5. Szczepaniak S., Sienkiewicz E.: Wpływ ostrego zatrucia Chlorfenwinfossem na poziom azotu aminowego i stężenia wolnych aminokwasów w erytrocytach krwi szczura. *Bromat. Chem. Toksykol.* **12**, 267, 1979.
6. Waldi D., Schnackerz K., Munter F.: Eine systematische Analyse von Alkaloiden auf Dünnschichtplatten. *J. Chromatogr.* **6**, 61, 1961.

Otrzymano 20 VI 1980.

РЕЗЮМЕ

Крысы Вистар, самцы, отравлено п.о. Хлорфенвинфосом в дозе 6,5 мг/кг и определено концентрацию аминокислот в сыворотке крови после 2, 4, и 24 часа от отравления.

Аминокислоты распределено методом двусторонней тонкослойной хроматографии при использовании сольвентов: (I) бутанол — уксусная кислота — вода 4:1:1 и (II) фенол — вода 75:25. Хроматограммы проявлено нингидрином, а количественную оценку проведено при помощи спектрофотометрии метаноловых элюатов цветных пятен.

У крыс отравленных Хлорфенвинфосом обнаружено заметное снижение концентрации эндогенных аминокислот в 2 и 4 часа после интоксикации, а у ароматических и разветвлённых аминокислот не обнаружено отклонения от нормы. Эти исследования подтверждают результаты наших последних определений проведенных методом бумажной хроматографии.

SUMMARY

The effect of a single oral dose (6,5 mg/kg) of chlorfenvinphos on the serum amino acid levels in male rats was examined. The amino acid concentrations were determined after 2,4 and 24 hours following intoxication.

The separation of amino acids was performed by the thin layer chromatography method with the use of solvents: (I) butanol-acetic acid-water (4:1:1) and (II) phenol-water (75:25). Chromatogramms were developed with the ninhydrin reagent and quantitative evaluation was performed by absorbancy determining of the methanolic coloured spots eluates.

The obtained results indicate a significant decrease in the level of endogenous amino acids after 2 and 4 hours from the administration of the poison, whereby the aromatic and branched-chain amino acid concentrations were found to be normal. This study confirms the results of our previous determinations using the paper chromatography method.

