

Alkilfoszfátok bomlásának vizsgálata vérben és szérumban

Írta:

Gyarmati László dr. gyógyszerész-százados és Dávid Gábor dr. orvos-alezredes

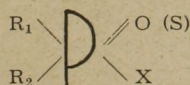
A második világháborút közvetlenül megelőző években és a háború alatt is Németországban új, hatásos inszekticidek után kutattak. A rendszeres kutatás során felfedezték, hogy bizonyos foszforsavészterek kiváló rovarölő hatásúak. Ezeket a vegyületeket már régebben ismerték, azonban nem tulajdonítottak nekik különösebb jelentőséget.

1940-ben Schrader és munkatársai (1) foglalkoztak ezekkel a vegyületekkel és ebből a vegyülettípusból több százat állítottak elő. A vizsgálatok során rájöttek, hogy ezek a vegyületek az emberre is igen toxikusak, mérgező hatásuk a kolineszteráze enzim irreverzibilis bénításán alapszik (2, 3, 4.)

Azóta számos ilyen vegyület van forgalomban: Parathion, Malathion, Systox, TEPP (tetraetilpirofoszfát), HEPT (hexaetiltetrapirofoszfát), Diazinon, Demeton, Wofatox stb. (5, 6) mint növényvédő és rovarirtószerek. Egyes vegyületek pedig mint gyógyszerek kerülnek felhasználásra: DFP (diizopropilfluoroszfát), Neo-Glaucit, Floropyl néven (7). Ezeket a gyógyászatban miotikumként és a myasthenia gravis gyógyítására ajánlják.

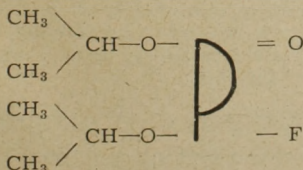
Mint hogy e vegyületek elterjedése — akár gyógyszerként, akár rovarirtó és növényvédőszerként — hazánkban is várható, továbbá tekintettel igen magas toxicitására, szükségesnek láttuk ezen anyagok toxikológiai vizsgálatát.

Ezen csoportba tartozó hatásos vegyületek az alkilfoszforsavészterek és az alkilfluorfoszforsavészterek, melyeknek általános szerkezete a következő:



ahol R_1 , illetve R_2 , alkil-, vagy alkoxi-gyök, X pedig —F, —CN, —Cl lehet.

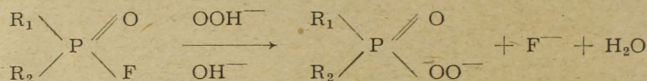
A DFP ezen anyagok modell-vegyületének tekinthető, ahol az R_1 és R_2 , izopropoxi-gyök és X = —F:



Munkánk során megvizsgáltuk a DFP sorsát a szervezetben azért, hogy egyrészt a bomlás mechanizmusát követni, másrészt pedig, hogy az esetleges mérgezést kémiaiailag diagnosztizálni tudjuk.

Az igen kis mennyiségű alkilfoszfátok és fluorofoszfátok kémiai meghatározására legalkalmasabb módszernek *Gehauf* és munkatársai (8, 9, 10, 11) által közölt kolorimetriás eljárás látszott.

Ezen módszer alapja az ún. *Schoenemann*-reakció (12). A reakció mechanizmusa teljes egészében nem tisztázott. Lényege a következő: az alkilfoszfátokból és a fluorofoszfátokból (savhaloidokból is) első lépésben perhidroxil-ionok hatására lúgos közegben (pH 9—11) a megfelelő persav keletkezik.



Az így keletkezett persav oxidál olyan anyagokat, melyek oxidációja egyébként kizárólag peroxidok hatására csak lényegesen lassabban, vagy egyáltalán nem menne végbe. Így persavak hatására:

— a kolorimetriás meghatározás esetében szerves diaminokból (benzidin, o-tolidin, o-dianizidin) színes vegyület képződik (8);

— a fluoreszcenciás meghatározás esetében indolból fluoreszkáló indoxil, majd kék indigó (9) képződik;

— a lumineszcenciás meghatározás esetében luminolból (10) lumineszkáló — sötétben felvillanó — vegyület keletkezik.

Az említett szerzők eljárásaikat az alkilfoszfátok megfelelő oldószerben előállított tiszta oldatára írták le s ezen anyagok gőzeinek levégőből való kimutatására alkalmazták (13).

Az ismertett reakció körülményeinek a hatását a módszer reprodukálhatóságára vonatkozóan részletesen kivizsgáltuk, célszerű módosításokat eszközöltünk az érzékenység növelésére és a módszer alkalmazhatósági területének a kiszélesítésére.

Ezen vizsgálataink eredményeinek alapján dolgoztuk ki a DFP meghatározásának a módját szérumban és teljes vérben.

MÓDSZER.

Reagensek:

1. o-tolidin 0,3%-os acetonos oldata.
2. Nátriumperborát 0,3%-os vizes oldata. (Mindkét oldat naponta frissen készítenedő!)
3. Aceton (aldehidmentes!). [Készítése: kereskedelmi p. a. minőségű acetonhoz kevés szilárd KOH-t és annyi szilárd KMnO₄-t adunk, hogy az elegy lila maradjon. Egy hétig állni hagyjuk, de naponta többször összerázzuk. Ha szükséges, még adunk hozzá KMnO₄-t. Egy hét múlva visszafolyó hűtővel egy órán át forraljuk és ledesztilláljuk. A desztillátum elejét és végét (kb. 1/10-nyi mennyiséget) külön fogjuk fel és elöntjük. A középső fő frakciót sötét, jól záró, becsiszolt üvegdugós palackban jégszekrényben tároljuk.]
4. Xilol p. a.

Kivitelezés:

1 ml vizsgálandó vérhez, vagy szérumhoz azonnal hozzáadunk 4 ml acetont. Összerázzuk, majd centrifugáljuk. A szupernatánsból kiveszünk 1 ml-t és hozzáadunk 0,5 ml o-tolidin-oldatot és 2,5 ml Na-perborát-oldatot. 20 perces állás után 3 ml xilollal kírázzuk, centrifugáljuk. A xiloból oldott színezéket 50 mm-es kis-küvetébe töltjük, S—47-es szűrőn a hasonló módon elkészített összehasonlító oldattal szemben — mely szérumot, vagy vért és a reagensek helyett desztillált vizet tartalmaz —, az extinkciókat olvassuk. Az értékelés ismert mennyiségű DFP bemérésével készült kalibrációs görbe segítségével történik.

EREDMÉNYEINK ÉS MEGBESZÉLÉS

Számunkra természetesen a legfontosabb annak tisztázása volt, hogy mód-szerünk mennyire megbízható. Ezért modell-kísérleteket végeztünk, úgyhogy vérhez, illetve szérumhoz ismert mennyiségű DFP-t adtunk és megvizsgáltuk, hogy az eljárás során mennyi DFP-t tudunk visszamérni. Mint az 1. számú táb-

1. SZ. TÁBLÁZAT

DFP meghatározása vérben, illetve szérumban

Sorszám	1 ml-hez adott DFP γ -ban	Talált DFP γ -ban	Eltérés γ -ban	Eltérés %-ban
TELJES VÉR				
1	5,0	5,0	0,0	0,0
2	10,0	10,0	0,0	0,0
3	10,0	10,0	0,0	0,0
4	10,0	9,5	-0,5	-5,0
5	20,0	19,6	-0,4	-2,0
6	20,0	18,0	-2,0	-10,0
7	20,0	17,5	-2,5	-12,5
8	40,0	35,0	-5,0	-12,5
9	40,0	39,0	-1,0	-2,5
10	50,0	46,0	-4,0	-8,0
SZÉRUM				
1	5,0	4,5	-0,5	-10,0
2	5,0	4,0	-1,0	-20,0
3	10,0	9,5	-0,5	-5,0
4	10,0	9,0	-1,0	-10,0
5	10,0	9,5	-0,5	-5,0
6	20,0	17,5	-2,5	-12,5
7	25,0	22,0	-3,0	-12,5
8	25,0	22,0	-3,0	-12,5
9	30,0	26,0	-4,0	-13,3
10	50,0	42,0	-8,0	-16,0

lázat mutatja, módszerünkkel 20%-nyi pontossággal sikerült a hozzáadott DFP-t meghatározni. Kísérleteinkhez kétszer desztillált DFP-t használtunk, melynek forráspontja 66,8 C° volt 12 Hgmm nyomáson. (Irodalmi: 67,5 C°/12 Hgmm. (20)

A rendelkezésünkre álló DFP-ből 1%-os (súly/térfogat) oldatot készítettünk propilénkollal, oldatunkat hetenként újonnan készítettük és jégén tároltuk. Ebből a törzsoldatból minden kísérlethez a kívánt koncentrációjú DFP-oldatot desztillált vízben való felhígítással készítettük el. Minden kísérletnél ebből az oldatból készítettünk kalibrációs görbét és ennek segítségével olvastuk le a talált értékeket.

Patkányokat és nyulakat mérgeztünk DFP-vel 10 esetben a DL_{100} háromszoros mennyiségével, így a tünetek néhány percen belül kifejlődtek. Az állatokat leöltük és vérükben megkíséreltük a még bomlatlan DFP-molekulát kimutatni. Ez a próbálkozás nem sikerült, felvetődött tehát joggal az a gondolat, hogy a DFP rendkívül gyorsan elbomlik a szervezetben.

A DFP sorsát a szervezetben eddig a P^{32} -vel jelzett DFP segítségével vizsgálták. Kimutatták, hogy a beadás után néhány perc múlva megjelenik és kimutatható a perifériás vérben. Maximális aktivitás 90 perc múlva volt észlelhető, vizelettel 10 napon belül 60–70% ürül ki, mint diizopropilfoszfát (tehát a F' hidrolizált), a faecessel pedig alig 5% (14).

Okinaka (15) kutyákon végzett kísérletei azt mutatták, hogy a vérben 7 mg/kg i. v. beadása után

15 perc múlva 6,8 γ /ml

30 perc múlva 5,4 γ /ml

60 perc múlva 3,4 γ /ml alkilfoszfát található, továbbá kimutatták, hogy a faecessel 2%-nál kevesebb ürül ki. Megfigyelték, hogy a F' lehasadása a májban történik.

Muntier (16), *Augustinson* (17, 18) kimutatták, hogy a szérumban és a májban van egy enzim, mely az alkilfoszfátokat hidrolizálja 1 molekula HF-re és 1 molekula dialkilfoszfátra.

Cohen (14) kimutatta, hogy a DFP erősen és irreverzibilisen kapcsolódik a proteinekhez. *Ashbolt* (19) szerint is a fehérje-molekula végén álló szerin- és tirozin-csoportokat foszforilálja a DFP, ezen mechanizmus alapján bénítja a kolineszterázt, valamint más enzimeket is, többek között pl. elég kifejezetten a tripszint.

Ezek a vizsgálatok nem derítenek fényt arra a kérdésre, hogy a DFP-molekula mennyi idő alatt bomlik el. Ugyanis az említett szerzők a P^{32} -szintet vizsgálták, viszont ez nem ad feleletet arra, hogy a P^{32} még a bomlatlan molekulában van-e jelen, vagy sem.

Ezért szükségesnek láttuk megvizsgálni, hogyan történik a szervezetben a DFP elbomlása. Teljes vérben, szérumban végeztünk ilyen irányú kísérleteket in vitro körülmények között, emberi és kutyavért használva kísérleteinkhez.

Kísérleteinkben 20 γ /ml DFP-koncentrációt használtunk, az eljárás a következő volt:

37 C°-on tartott citrátos, oxalátos, vagy heparinos vér, szérum, illetve plazma 1 ml-éhez Wa-csővekben 0,1 ml 200 γ /ml vizes DFP-oldatot adtunk, azaz 20 γ -t. Az első csőbe azonnal bemértünk 4 ml acetont, a többibe pedig előre meghatározott idők után. A továbbiakban a már leírt módon jártunk el. Minden egyes mérés alkalmával összehasonlító oldatokat is készítettünk, természetesen azonos módon. DFP helyett vizet adtunk ugyanazon vér, szérum, vagy plazma azonos mennyiségéhez. Ezzel szemben olvastuk le az extinkciókat, ki-

2. SZ. TÁBLÁZAT

DFP bomlása kutyavérben (20 γ DFP/ml vér)

Minta sor-száma	DFP-szint %-ban perc múlva					
	0'	2'	5'	10'	15'	20'
1	100,0	—	82,0	36,0	0,0	0,0
2	100,0	—	90,0	38,0	0,0	0,0
3	100,0	—	52,5	0,0	0,0	0,0
4	100,0	58,5	—	54,0	41,5	—
5	100,0	63,0	35,0	25,0	10,0	0,0
6	100,0	69,0	56,5	37,0	22,0	—
7	100,0	—	57,5	25,0	6,2	0,0
8*	100,0	—	93,0	93,0	81,0	81,0

Megjegyzés. A 8* sz. készítmény a 7. sz. kutyavérből nyert mosott vörösvértestek szuszpenziója.

3. SZ. TÁBLÁZAT

DFP bomlása kutya-szérumban (20 γ DFP/ml szérum)

Minta sor-szám	DFP-szint %-ban perc múlva					
	0'	2'	5'	10'	15'	20'
1	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2	100,0	0,0	—	—	—	—
3	100,0	13,0	0,0	—	—	—
4	100,0	—	16,5	0,0	—	—
5	100,0	—	23,0	0,0	—	—

4. SZ. TÁBLÁZAT

DFP bomlása emberi vérben (20 γ DFP/ml vér)

Minta sor-száma	DFP-szint %-ban perc múlva					
	0'	2'	5'	10'	15'	20'
1	100,0	—	66,0	2,5	0,0	0,0
2	100,0	85,6	56,0	—	39,0	0,0
3	100,0	—	75,0	—	51,0	25,0
4	100,0	—	50,0	0,0	—	—

5. SZ. TÁBLÁZAT

DFP bomlása emberi szérumban (20 γ DFP/ml szérum)

Minta sor-száma	DFP-szint %-ban perc múlva				
	0'	5'	10.	15'	20'
1	100,0	32,0	4,0	0,0	—
2	100,0	63,0	13,0	0,0	—
3	100,0	50,0	0,0	—	—
4	100,0	57,0	12,5	0,0	—
5	100,0	41,0	7,8	2,0	0,0
6	100,0	61,0	23,4	6,4	0,0

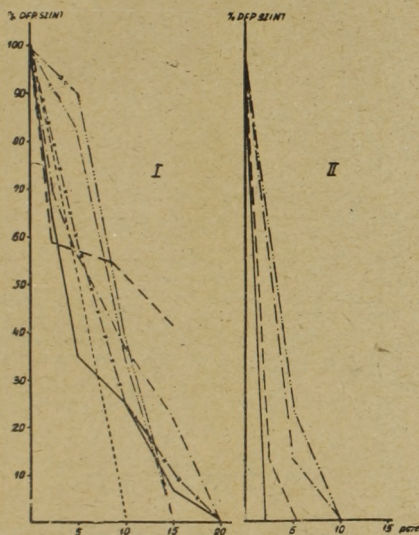
6. SZ. TÁBLÁZAT

A DFP bomlásának sebessége és a DFP koncentrációjának összefüggése ugyanazon szérumban

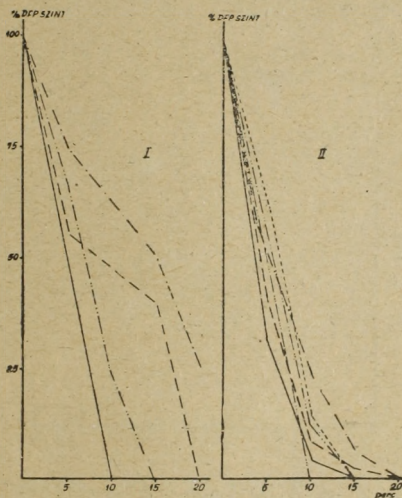
DFP konc. γ /ml szérum	DFP-szint %-ban perc múlva				
	0'	5'	10'	15'	20'
20	100,0	50,0	0,0	—	—
50	100,0	58,0	0,0	—	—
100	100,0	49,0	24,0	14,8	7,4

küszöbölve így a vér-, szérumszint, illetve plazmából esetleg kioldódó színező anyagok zavaró hatását.

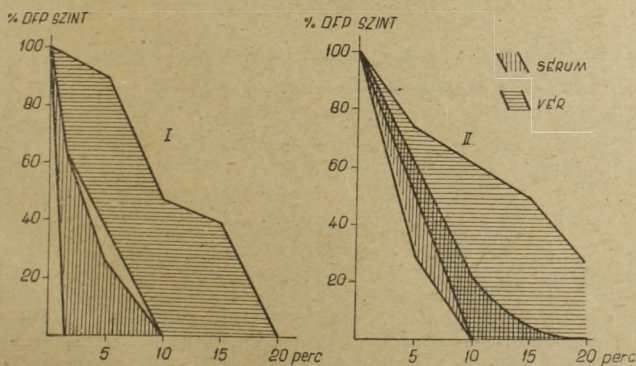
Természetesen megvizsgáltuk a DFP spontán hidrolizisét, mind desztillált vízben, mind a vér-, szérumszint, illetve plazma pH-jának megfelelő puffer-oldatban,



1. sz. ábra. DFP bomlása különböző kutyavérekben (I) és szérumokban (II)



2. sz. ábra. DFP bomlása különböző emberi vérekben (I) és szérumokban (II)

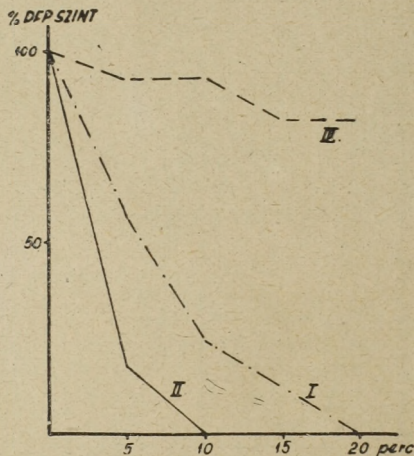


3. sz. ábra

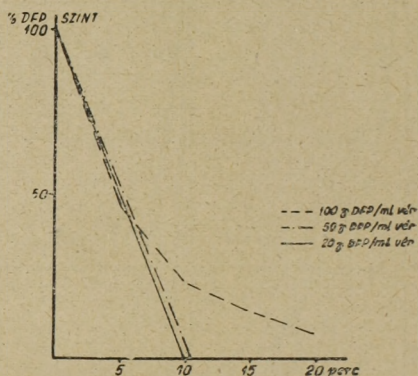
azonos körülmények között. Azt találtuk, hogy a DFP ennyi idő alatt egyáltalán, de még néhány órán belül sem hidrolizál számottevő mennyiségben. Vizsgálataink eredményét a következő 2., 3., 4., 5., 6. számú táblázatok és az 1., 2., 3., 4., 5. számú ábrák dokumentálják.

A táblázatokból és ábrákból látható, hogy a DFP a vérben és a szérumban igen gyorsan elbomlik. A bontásban az alakos elemek alig vesznek részt. Ezek a kísérletek is igazolják a szérumban levő alkilfoszfatáze enzim létezését.

Másrésről a kísérletek bizonyítják, hogy a mérgezett állatok vérében és szérumában a DFP már nem mutatható ki, így diagnosztikus, vagy egyéb célból keresni nem érdemes.



4. sz. ábra. A DFP bomlása ugyanazon egyed vérében (I), szérumában (II) és mosott vörösvértest szuszpenziójában (III)



5. sz. ábra. A DFP bomlásának függése a koncentrációtól, ugyanazon vérben

ÖSSZEFOGLALÁS

1. A szerzők kidolgoztak eljárást DFP-nek vérben és szérumban való meghatározására. A módszer érzékenysége 5 γ /ml.

2. Vizsgálták a DFP elbomlását vérben, szérumban és azt találták, hogy a bomlás rendkívül gyors és ez a gyors bomlás is igazolja az alkilfoszfatáze jelenlétét a szérumban.

IRODALOM

1. Schrader: Monographien zu Angew. Chemie und Chem. Ing. Techn. No. 62, 1951. — 2. Bruns, F. H.: Clin. Chim. Acta. 2, 257, (1957). — 3. Goodmann-Gilmann: The Pharmacol. Basis of Therapeutics. 1955. Macmillan Co. N. Y. 458. — 4. Hauschild: Pharmacologie und Grundlagen der Toxicologie. VEB. G. Thieme Verl. Leipzig, 1956. 11. o. — 5. Perkow: Die Insektizide. Hütingg Verl. 1956. Heidelberg. — 6. Helkins, H. B.: The Chem. of Ind. Tox. 1959. J. Wiley Sons. Inc. N. Y. 179. — 7. Issekutz B.: Gyógyszertan 1954 Eü. kiadó. — 8. Gehauf, B.: Anal. Chem. 29., 278 (1957). — 9. Epstein, J. et all.: Ibid. 29., 276 (1957). — 10. Goldenson J. et all.: Ibid. 29., 877 (1957). — 11. Marsh, B. J.-Neale E.: Chem. and Ind. 494., (1956). — 12. Schoenemann, R. B. R.: New Reaction for Detect. of Metalloid Nonmetall Labile Halogen Linkage, office of Publication Board, U. S. Dept. of Commerce P. B. 119, 887 (1944). — 13. Kjöblin-Epstein: U. S. Armed Forces Journ. 1957. nov.-dec. 24. old. — 14. Cohen, J. A.: J. Clin. Invest 33., 459 (1953). — 15. Okinaka, A. J. et all.: J. of Pharm. and Exp.

Ther. 112., 231. (1954). — 16. *Muntier, L. A.*: J. Biol. Chem. 204., 837. (1953). — 17. *Klas Bertil—Augustinson*: Acta Chem. Scand. 8., 753. (1954). — 18. *Klas Bertil—Augustinson*: Arkiv Kem. 6., 331. (1953). — 19. *Ashbolt R. F.*: J. Am. Chem. Szoc. 74., 1865. (1952). — 20 *Rufener, J.*: Protar 17. (1951).

Капитан фарм. службы д-р Л. Дьярмати и подполковник мед. службы д-р Г. Давид:

ИССЛЕДОВАНИЕ РАСПАДА АЛКИЛФОСФАТОВ В КРОВИ И В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

1. Авторы разработали метод определения DFP (diisopropylfluorophosphat) в крови и сыворотке. Чувствительность метода 5 микрограмм мл.

2. При анализе распада DFP в крови и сыворотке было отмечено, что распад происходит чрезвычайно быстро и это тоже подтверждает присутствие алкилфосфата в сыворотке.

Dr. L. Gyarmati, Hauptm.-Pharmaz. d. San. und *Dr. G. Dávid*, Oberstl. d. San.:

VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG DER ZERSETZUNG VON ALKYLPHOSPHATEN IM BLUTE UND IM SERUM

Verfasser arbeiteten ein neues Verfahren für die Bestimmung des DFP (Diisopropylfluorophosphat) aus dem Blute und Serum aus. Empfindlichkeit der Verfahren erreicht 5 Mikrogramm pro ml. Es wurde der Zerfall des DFP im Blute sowie im Serum studiert und indessen konnte man feststellen, dass der Zerfall sehr rasch verläuft, weiter dass dieser schnelle Ablauf das Anwesen einer Alkylphosphatase im Serum erweist.

Meprobamat (Andaxin) hatása a vékonybélmozgásra

Írta: **Sántha András** dr. orvosalezredes és **Hideg János** dr. orvosfőhadnagy

Az ún. tranquillánsok vagy ataractikumok alkalmazása a gyógyászatban aránylag rövid időre tekint vissza, javallati körük annál rohamosabban szélesedik, a rájuk vonatkozó irodalom pedig napjainkban szinte már áttekinthetetlen. Hazánkban e csoportból főleg a meprobamat terjed, hatásmechanizmusával és klinikai alkalmazásával az utóbbi években számos külföldi és néhány magyar szerző is foglalkozik (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 13, 14, 19, 20, 21, 25). A szakirodalomban a meprobamatot „centrális relaxáns”-ként kezelik, az adatok szerint hatását a thalamus magasságában fejt ki, általános nyugtató, csökkenti a harántcsikolt izomzat tónusát és a görcskészséget. Ellentétben a phenothiazinokkal és a rauwolfia-alkaloidákkal, nem hat az autonóm idegrendszerre, tehát beadása után változatlan a szívműködés, a légzés, a gyomorsav- és a verejtékelválasztás stb. Mindössze egy közlemény utal arra, hogy a centrális hatás mellett a meprobamatnak perifériás ganglion-bénítő effektusa is kimutatható, mely a sympathicus és parasympathicus ganglionokon egyaránt jelentkezik (*Garrett* és munkatársai, 7).

Régebbi vizsgálatainkban tanulmányoztuk a vékonybél nyálkahártyájának farmakológiáját és kimutattuk *Kokas* és *Ludány* (12) nyomán, hogy a bélbolyhok mozgása, az általunk bélmikromotorikának nevezett jelenség, igen érzékenyen reagál a különféle serkentő és gátló hatásokra. Tanulmányoztuk a biogén aminok (22), különféle növényi kivonatok (11), baktériumtoxinek (27), cholin és származékai (15), a phenothiazinok (8), a hypothermia (23) szerepét a vékonybél mikromotorikájának változásában. *Ludány* és mtsai újabban a serotonin (18), a reserpin (16) és más