

ODREĐIVANJE ORGANOFOSFORNIH INSEKTICIDA INDOLSKOM REAKCIJOM

K. WEBER, JELKA MATKOVIĆ i LJERKA PALLA

Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada JAZU, Zagreb

(Primito 3. IX 1969)

Primijenjena je oksidaciona reakcija indola, čiji se tok prati mjerenjima intenziteta fluorescencije međuprodukata oksidacije, za kvantitativno određivanje organofosfornih insekticida. Rad je izveden s preparatima insekticida koji se praktički mnogo upotrebljavaju, kao i s nekim živežnim namirnicama onečišćenima insekticidima. Ustanovljene su konstante baždarnih pravaca za izvedbu takvih analiza, a određene su granice osjetljivosti ove analitičke metode za pojedine insekticide.

Oksidaciona reakcija indola (2, 3-benz(o)pirol), čiji se tok prati mjerenjima intenziteta fluorescencije oksidacionih produkata (indoksila, indigo bijelog), predstavlja određeni oblik *Schönemannove reakcije* (1), te se praktički upotrebljava za analitičko određivanje organofosfornih nervnih otrova (2), a daje dobre rezultate i pri dokazivanju i određivanju organofosfornih insekticida (3). Kinetika ove reakcije istraživana je u prisutnosti nervnih otrova (4), kao i metilparaoksiona (5), odnosno hemina i methemoglobina (6) kao aktivatora reakcije. Ustanovljeno je da se indolska reakcija u kinetičkom pogledu formalno vlada po zakonima kinetike enzima kataliziranih biokemijskih reakcija, i to strogo barem u prvim fazama reakcije. Kada se primijeni takva kinetička obrada na indolsku oksidacionu reakciju, aktivator, tj. organofosforni otrov se formalno smatra »enzimom«, a indol supstratom tog reakcionog zbivanja. Reakciona smjesa osim toga sadrži još i odgovarajući davalac kisika, te supstanciju koja daje potrebnu alkaličnu reakciju. Ustanovljeno je nadalje, da je brzina reakcije redovito linearno ovisna o koncentraciji organofosfornog aktivatora, te da daje razmjerno visoke vrijednosti intenziteta fluorescencije, koji su lako pristupačni pouzdanim mjerenjima. Uzimajući u obzir navedeno, bilo je od interesa ispitivati djelovanje većeg broja različitih organofosfornih insekticida na indolsku reakciju, i to baš onih, koji se kod nas proizvode, odnosno praktički upotrebljavaju. Svrha ovog rada bila je da se izrade analitički postupci za kvantita-

tivno određivanje tih insekticida fluorometrijskim mjerenjima uz primjenu indolske reakcije. Određivanja su se pri tom odnosila na originalne preparate proizvodnje insekticida, kao i na živežne namirnice koje su bile onečišćene dodavanjem organofosfornih insekticida. Dajemo kratak opis metode rada, kao i prikaz dobivenih rezultata.

METODE RADA

Reakcione otopine (indolski reagens) ovog rada sastojale su se od:

35 ml H_2O

5 ml 1% -tne otopine natrijeva perborata

5 ml 0,2% -tne otopine indola u acetonu

5 ml otopine organofosfornog insekticida u izopropilnom alkoholu

Aceton u tim reakcionim smjesama ne igra samo ulogu otapala, nego na specijalan način olakšava prenošenje kisika perborata na indol. U reakcionim smjesama bez acetona znatno se sporije i slabije razvijaju efekti fluorescencije oksidacionih produkata indola. Perborat ($NaBO_2 \cdot H_2O_2 \cdot 3H_2O$) u reakcionim smjesama davalac je kisika (H_2O_2) kao i lužnate reakcije ($NaBO_2$). Otopina ovog spoja mora biti svježja, svakako ne smije biti starija od nekoliko dana, jer se perborat u vodenoj otopini postepeno raspadne uz razvijanje elementarnog kisika. Kao otapalo za insekticide upotrijebljen je izopropilni alkohol jer se esteri fosforne kiseline najmanje hidroliziraju u tom otapalu. Gore navedene koncentracije reakcionih komponenata predstavljaju optimalne uvjete rada s indolskom reakcijom pri aktivaciji s organofosfornim insekticidima.

Upotrijebljena fotoelektrična fluorometrijska aparatura opisana je u prijašnjim radnjama (4, 5, 7), a pokusi su izvedeni pri sobnoj temperaturi bez termostatskog uređaja. Način izvedbe pokusa opisan je također u već navedenim radnjama (4, 5, 6).

Upotrijebljene kemikalije za indolski reagens bile su p. a. preparati, a indol i natrijev perborat nabavljeni su od tvrtke Fluka AG, Buchs. Organofosforne insekticide za ovu radnju stavljale su na raspolaganje naše tvornice: »Pinus« – Rače pri Mariboru, »Chromos« – Zagreb, »Radonja« – Sisak i »Zorka« – Šabac. Rađeno je i s nekim inostranim preparatima. U tablicama ove radnje navedeni su trgovački nazivi insekticida. Njihov kemijski sastav, kemijske i fizikalne osobine, te podaci o otrovnosti mogu se naći u Schraderovoj knjizi (8). Insekticidi su upotrijebljeni za pokuse uvijek kao gotovi produkti proizvodnje, kako se stavljaju u prodaju. Koncentracija insekticida (c) izražena je kao g u 100 ml.

Priređivanje uzoraka živežnih namirnica s insekticidima, kao i rad s takvim kontaminiranim namirnicama, te izolacija otrova iz tih uzoraka opisano je u prijašnjoj publikaciji (9). U ovoj radnji primijenjen je isti postupak.

REZULTATI RADA

Primarni oksidacioni produkt indola je indoksil koji se tokom reakcije dalje oksidira u indigo bijelo, pa nadalje u indigo. Indoksil i indigo bijelo predstavljaju međuprodukte oksidacije i samo njima pripada sposobnost fluoresciranja, dok konačni produkt indigo pod uvjetima izvedbe oksidacione reakcije ne fluorescira. Intenzitetne krivulje fluorescencije reakcionih otopina u ovisnosti o reakcionom vremenu prikazuju prema tome određeni maksimum. Taj maksimum nastaje utjecajem brzine stvaranja fluorescentnih međuprodukata s jedne, te brzine stvaranja nefluorescentnog indiga s druge strane. Pri tom, kako izgleda, organofosforni spojevi aktiviraju samo primarnu reakciju stvaranja fluorescentnih međuprodukata, budući da je poznato da se indigo bijelo lako oksidira u indigo u prisutnosti elementarnog kisika ili nekog donora kisika bez ikakvog aktivatorskog utjecaja.

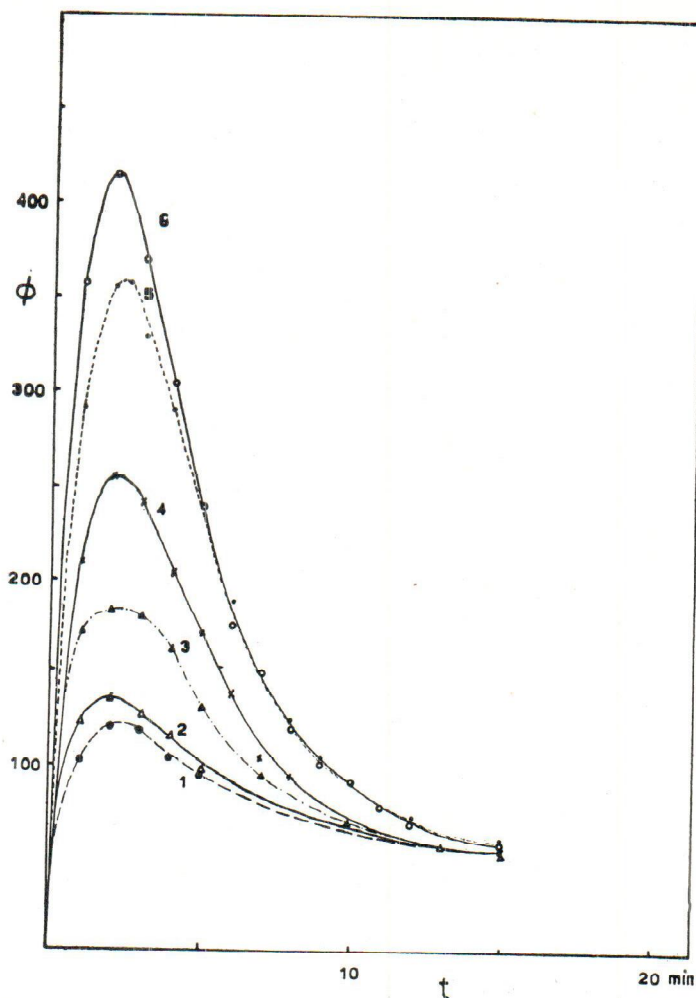
Na slici 1. prikazan je niz krivulja ovisnosti intenziteta fluorescencije (Φ) o reakcionom vremenu (t), tzv. $\Phi - t$ krivulje, indolske reakcije za različite koncentracije (c) aktivatora. Kao aktivator upotrijebljen je u ovom slučaju insekticid »Ortho-Dibrom« s aktivnom komponentom: 0, 0-dimetil-0-(1, 2-dibrom-2, 2-dikloretil)-fosfat. Vidi se da se maksimalna jakost fluorescencije Φ_m (brojčana vrijednost maksimuma krivulje) znatno i pravilno povećava s povećavanjem koncentracije insekticida. Statističkom obradom eksperimentalnih vrijednosti za ovisnost Φ_m o koncentraciji aktivatora (c) dobije se regresioni pravac, koji je prikazan na slici 2. Takav pravac može dobro poslužiti kao *baždarni pravac* za fluorometrijsko određivanje dotičnog insekticida.

Bilo bi zapravo ispravnije za crtanje baždarnog pravca analitičkog postupka upotrebljavati za ordinatu početnu brzinu (V_0) oksidacione reakcije, jer je očito da će upravo ta brzina biti proporcionalna koncentraciji aktivatora. Ta se brzina v_0 može dobiti u relativnim jedinicama polaganjem tangente na ishodište dotične krivulje i očitavanjem vrijednosti tangente za određeno (stalno) reakciono vrijeme. Pokazalo se međutim, da u svim pokusnim nizovima ove radnje Φ_m - vrijednosti također daju linearnu ovisnost o koncentraciji insekticida (aktivatora), pa je zato upotrijebljen taj jednostavniji način prikazivanja baždarnih pravaca: $\Phi_m - c$. Osim toga Φ_m je izravno dobiveni eksperimentalni podatak, što računskoj obradbi daje veću sigurnost.

Opći oblik jednadžbe pravca za određivanje organofosfornih insekticida indolskom reakcijom je

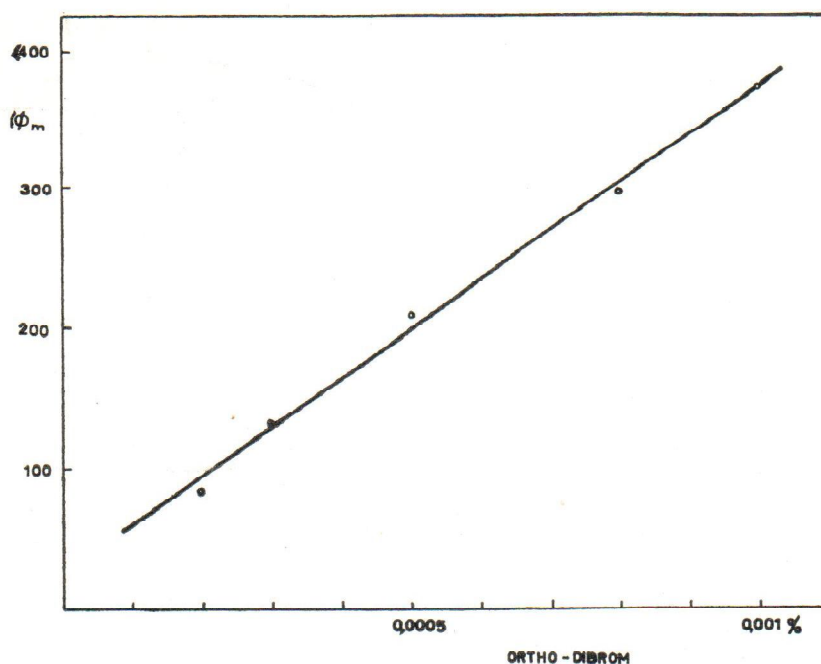
$$\Phi_m = a + b \cdot c \quad (1)$$

Vrijednosti konstanta a i b za ovaj izraz određuju se eksperimentalno s otopinama poznatih koncentracija, te pod strogo standardiziranim pokusnim uvjetima. Dobivene konstante vrijedit će za određeni koncentracioni raspon, koji ne mora biti isti za različite insekticide. U tablici 1. navedene su ustanovljene vrijednosti konstanta a i b baždarnih pravaca



Sl. 1. Ovisnost intenziteta fluorescencije (Φ) o reakcionom vremenu (t)

nekoliko insekticida. Ista tablica daje i koncentracioni raspon u kojem postoji linearni odnos između Φm i c , a navedene su i vrijednosti standardne pogreške regresije τ . Konstante u tablici 1. odgovaraju jednadžbi (1) u kojoj je Φm maksimalna vrijednost intenziteta fluorescencije, a korigirana je s obzirom na jakost fluorescencije bez prisutnosti insekticida (slijepa vrijednost fluorescencije). Reakciona smjesa bez otrova, te posuda za otopine, pokazuju naime određenu minimalnu vrijednost intenziteta fluorescencije (pozadina fluorescencije, background) koju treba odbiti od maksimalne vrijednosti intenziteta, pa se tako korigira eksperimentalna vrijednost za Φm .



Sl. 2. Baždarni pravac za određivanje insekticida »Ortho-Dibrom«

Tablica 1

Konstante baždarnih pravaca za određivanje insekticida indolskom reakcijom

Insekticid	Koncentracijski raspon otrova (g/100 ml).10 ⁵	Konstante		τ
		a	b	
Diptereks	5 do 100	10,98	418480	5,76
Ortho Dibrom	20 do 100	24,4	350700	7,95
Nankor	50 do 1000	28,4	13795	5,31
Dimckron	200 do 1000	10,0	14606	5,41
Izoompa	200 do 1000	0,78	5335	0,72

Iz navedenog se koncentracionog raspona vidi da postoji prilična razlika u pogledu osjetljivosti metode fluorescencije indolske reakcije za pojedine insekticide. Osjetljivost se manifestira u dobivenim vrijednostima intenziteta fluorescencije. Što je veća vrijednost za Φ_m za određenu koncentraciju, to je i veća osjetljivost određivanja otrova. Zato

su za prosuđivanje osjetljivosti određivanja pojedinih insekticida navedene u tablici 2. vrijednosti za maksimalnu jakost fluorescencije za pojedine insekticide u koncentraciji od 0,001 g u 100 ml reakcione smjese. Ako se sada smatra, da se na skali upotrijebljenog fluorometra može još sasvim sigurno ustanoviti razlika od 5 jedinica u intenzitetu (u otklonu

Tablica 2

Φm - vrijednosti za 0,001 g insekticida u 100 ml reakcione otopine; donja granica u mikrogramima (μg) za određivanje insekticida

Insekticid	Φm	μg
Diptereks	430	5
Ortho Dibrom	375	7
Nankor	47	50
Dimekron	25	100
Izoompa	7	350

galvanometra), mogu se izračunati približne granične koncentracije, odnosno količine insekticida u reakcionim smjesama koje se mogu sigurno ustanoviti. U tablici 2. navedene su tako ustanovljene granične količine insekticida u mikrogramima (μg) u 50 ml reakcione smjese koje daju gore navedeni otklon galvanometra od 5 jedinica na skali.

U tablicama 1 i 2 navedeni organofosforni insekticidi mogu se uspješno određivati fluorometrijski primjenom indolske reakcije. Međutim u pogledu osjetljivosti takvih metoda određivanja postoji prilična razlika, već prema upotrijebljenom insekticidu. U drugim nizovima pokusa ustanovljeno je, da postoji veći broj praktički upotrijebljenih organofosforinih insekticida koji se ne mogu kvantitativno određivati primjenom indolske reakcije, jer daju suviše slabe i u kvantitativnom pogledu nesigurne efekte fluorescencije. Ovamo spadaju insekticidi koji se stavljaju u prodaju pod nazivima: Rogor (Fosfamid), Metasistoks, Paration, Lebacid i Fenkapton. Neki od ovih insekticida mogu se određivati apsorpciometrijskom modifikacijom Schönemannove reakcije (9), a drugi metodom kemiluminescencije luminola (10).

Pri radu sa živežnim namirnicama koje su bile onečišćene insekticidima, upotrijebljene su krute namirnice (brašno, šećer, riža) s različitim količinama dodanih insekticida: Diazinon 20 WP i Diptereks. Ustanovljeno je, da se insekticidi dobro ekstrahiraju s izopropanolom iz navedenih živežnih namirnica. Dobiveni ekstrakti s različitim koncentracijama otrova daju također linearni odnos između koncentracije i maksimalne jakosti fluorescencije, međutim konstante jednadžbe 1 imaju druge vrijednosti nego li kod rada uz izravne primjene insekticida. To znači, da

je prilikom analize živežnih namirnica na organofosforne insekticide potrebno izraditi posebne odgovarajuće baždarne pravce. U tablicama 3 i 4 navedene su konstante baždarnih pravaca za analizu živežnih namirnica za navedene insekticide. Vidi se da se pri radu s insekticidom

Tablica 3

Konstante a i b baždarnih pravaca indolske reakcije za Diazinon 20WP

Namirnica	Koncentracioni raspon (g/100 ml).10 ³	a	b	τ
Brašno	1,0-5,0	50,0	16000,0	3,63
Pšenična krupica	1,0-5,0	49,2	17000,0	2,30
Kukuruzna krupica	1,0-5,0	52,7	21000,0	10,51
Šećer	1,0-5,0	52,8	19400,0	4,21
Riža	1,0-5,0	45,3	24300,0	4,43

Tablica 4

Konstante a i b baždarnih pravaca indolske reakcije za Diptereks

Namirnica	Koncentracioni raspon (g/100 ml).10 ³	a	b	τ
Brašno	1,0-5,0	81,7	47900	8,75
Brašno (nakon 9 dana)	2,0-5,0	96,1	40900	13,33
Šećer	1,0-5,0	83,0	26600	14,33

Diazinon 20 WP dobivene konstante razmjerno samo malo razlikuju kada se mijenja namirnica, dok su te razlike pri radu s Diptereksom znatno veće. Očito se radi o tome da se Diazinon 20 WP pasivno vlada prema upotrijebljenim namirnicama, dok se za Diptereks to ne može kazati. Konstante za Diptereks mijenjaju se i u ovisnosti o vremenu u kojem se otrov nalazio u namirnici.

ZAKLJUČAK

Iz navedenih eksperimentalnih činjenica vidi se da je kvantitativna analiza živežnih namirnica na organofosforne insekticide indolskom reakcijom načelno moguća. Međutim, prije izvedbe serijskih analiza bit će potrebno pobliže proučiti dotičnu kombinaciju namirnica i insekticida u

pogledu njihovog specifičnog utjecaja na indolsku reakciju. Naročito vla-
ga u namirnicama može znatno utjecati na rezultate analize. Budući da
živežne namirnice ne smiju sadržavati ni tragove organofosforinih insekti-
cida, neće biti uvijek potrebno vršiti kvantitativnu analizu već će biti
dovoljno dokazati ove otrove u dotičnom materijalu. U tu svrhu može
također dobro poslužiti indolska reakcija. Ako izopropanolski ekstrakt
živežne namirnice s navedenim indolskim reagensom daje u reakcionom
vremenu od nekoliko minuta vidljivu žuto-zelenu fluorescenciju, koja se
postepeno gasi, može se sigurno zaključiti da objekt analize sadrži barem
u malim količinama neki organofosforini insekticid. Ova reakcija bit će
prilično specifična i zbog toga, jer se eventualni drugi aktivatori indol-
ske reakcije npr. hemoproteidi, ne otapaju u izopropanolu, odnosno utje-
cajem tog alkohola brzo se denaturiraju i inaktiviraju.

Kvantitativna analiza insekticida indolskom reakcijom može se veoma
uspješno primijeniti u ispitivanju aktivnosti odgovarajućih komercijal-
nih preparata, nadalje u određivanju njihove koncentracije u produk-
tima proizvodnje, u ispitivanju njihove stabilnosti pod različitim uvje-
tima i sl. U tom pogledu metoda s indolskom reakcijom može dobro na-
dopuniti apsorpciometrijske metode (9) i luminolsku metodu (10) određi-
vanja organofosforinih insekticida.

Literatura

1. Vidi Marsh, D. J., Neale, E.: Chemistry and Industry, 1956, 494; Kramer, D. N., Gamson, R. M.: Anal. Chem., 30 (1958) 251.
2. Cherry, R. H. i suradnici: Analyt. Chem., 30 (1958) 1239; J. Goldenson: Anal. Chem., 29 (1957) 877.
3. Skurić, Z.: Arh. hig. rada, 16 (1965) 3.
4. Uhlík, B., Weber, K.: Arh. hig. rada, 16 (1965) 329.
5. Skurić, Z., Weber, K.: Croat. Chem. Acta, 38 (1966) 23.
6. Skurić, Z., Weber, K.: Croat. Chem. Acta, 40 (1968) 29.
7. Weber, K.: Z. physikal. Chem. (B), 30 (1935) 69; Weber, K. i Ualić, F.: Arh. hig. rada, 8 (1957) 39.
8. Schrader, G.: Die Entwicklung neuer insektizider Phosphorsäure - Ester, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. 1963.
9. Weber, K., Matković, J. i Palla, Lj.: Arh. hig. rada, 19 (1968) 477.
10. Weber, K., Matković, J. i Bušljeta, M.: Acta Pharm. Jugosl., 19 (1969) 47.

Summary

DETERMINATION OF ORGANOPHOSPHORUS INSECTICIDES BY INDOLE REACTION

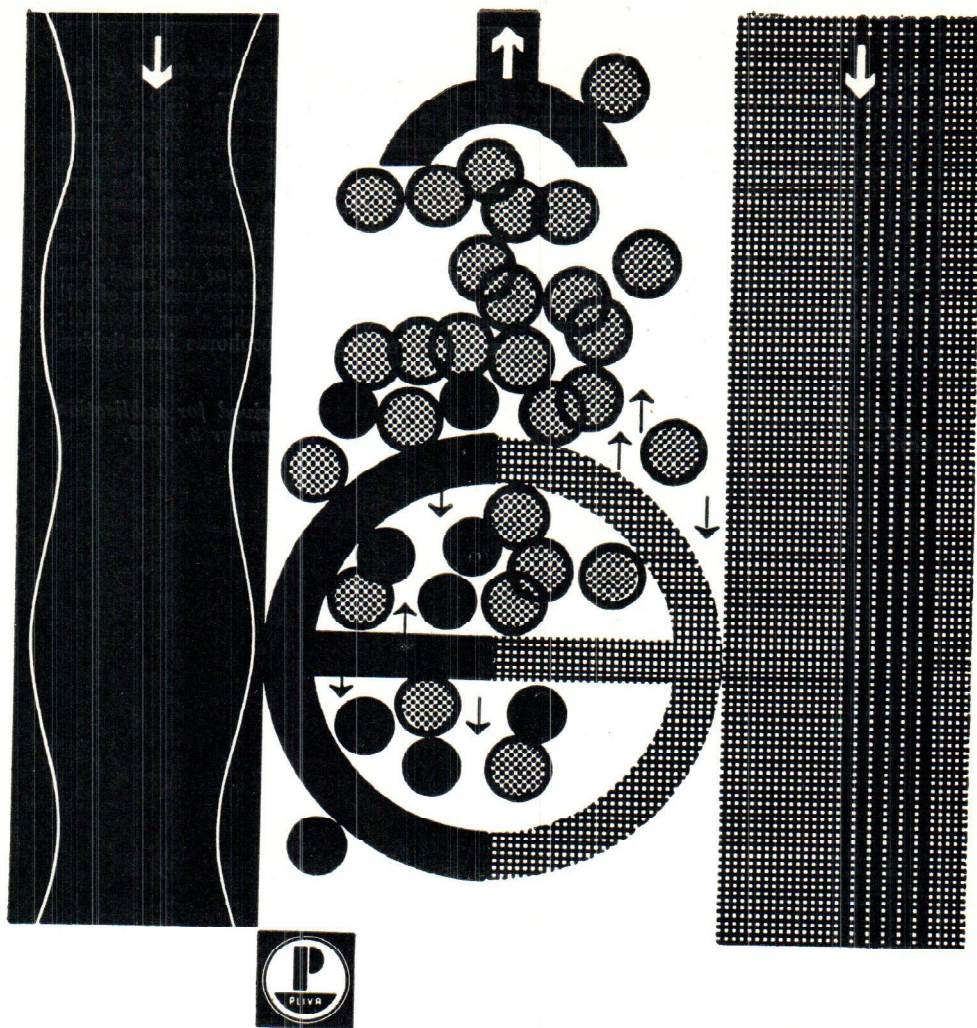
A method for the quantitative determination of organophosphorus insecticides was devised which is based on the oxidation reaction of indole, 2, 3 benz(o)pyrrole, whose course is easily followed by photoelectric measurements of the intensity of fluorescence of oxidation products (indoxyl and indigo white). The preparations of insecticides

which are widely applied in practice were used. Insecticides act as activators of the oxidation reaction, the time curves of the fluorescence intensity ($\Phi - t$ curve) being dependent upon the nature and concentration of the particular insecticide. These curves always show a maximum (Fig. 1.) the maximal intensity of fluorescence (Φ_m) being in linear relationship with the concentration (c) of insecticide (Fig. 2). The calibration lines ($\Phi_m - c$) were obtained with the constants which are characteristic of the particular insecticide. For some insecticides were found the values of these constants (a and b in Table 1), the concentration range (g/100 ml) in which a particular calibration line is valid, as well as the standard error of regression τ . The sensitivity of the method varies from 5 to 350 μg of the lowest determinable quantity of the particular insecticide - Table 2. The method is not applicable for the determination of all organophosphorus insecticides but can be well supplemented with the absorptiometric (9) and luminol (10) method for the determination of organophosphorus insecticides.

*Institute for Medical Research,
and Occupational Health, Yugoslav
Academy of Sciences and Arts, Zagreb*

*Received for publication
September 3, 1969.*

NOVO U LIJEČENJU SMETNJA VENOZNE CIRKULACIJE



Glivenol[®] kapsule

1 kapsula sadržava 400 mg etil-3,5,6-tri-O-benzil-D-glukofuranozid

GLIVENOL djeluje na patološke procese u području kapilara, vena i u paravenoznom tkivu. Naime, on na više mjesta prekida kauzalni lanac kompliciranih patoloških procesa koji se odvijaju u žilama, ali i u paravenoznom tkivu.

Indikacije za GLIVENOL su smetnje venozne cirkulacije: prevarikozni sindrom, varikozni sindrom, flebitis, periflebitis, tromboflebitis, ulcus cruris, hemoroidi.

GLIVENOL je opremljen po 20 i 100 kapsula

P L I V A I C I B A u suradnji