

ENZYMATICKÉ URČOVANIE MALÝCH MNOŽSTIEV INSEKTICÍDNYCH ZLÚČENÍN FOSFORU

J. JANOK, R. KEMKA

Oblastný ústav hygieny práce a chorôb z povolania v Bratislave

Organické fosforové insekticídne látky (OFI) [1—2], ktoré sa používajú na ochranu rastlín pred škodlivým hmyzom, sú veľmi jedovaté aj pre cicavce. Väčšinu príznakov otravy týmito látkami možno vysvetliť inhibíciou enzýmu cholinesterázy (ChE) [3]. Keďže OFI sa môžu dostať do tela nielen zhltnutím a kožou, ale aj dýchacími cestami, z dôvodov prevencie sa často sleduje ich koncentrácia vo vzduchu pri ich výrobe a použití.

Koncentrácia OFI vo vzduchu sa stanovuje kolorimetrickou metódou na základe zistenia množstva fosforu. Táto metóda je málo citlivá pre potrebu hygienickej kontroly pracovného prostredia. OFI s *p*-nitrofenylovou skupinou možno stanoviť kolorimetrickou metódou Averell-Norrisovou [4] alebo Gageovou [5], prípadne polarograficky. Metódy však zlyhávajú pri určovaní paratiónového preparátu *Ekatox 20*, keď sa tento pred analýzou dostane do styku s vodou, ako sa to deje pri postrekovaní vodnou brečkou tohto preparátu. Dobrá, avšak málo dostupná metóda určovania OFI je na základe absorpcie UF svetla [6].

Spoločnou nevýhodou všetkých spomenutých metód je, že sa nimi množstvá OFI stanovujú bez ohľadu na ich toxicitu. Preto autori použili na určovanie *Ekatoxu 20* vo vzduchu po postrekoch modifikovanú Giangovu [7] metódu, ktorou autor stanovoval koncentráciu jednotlivých OFI, potrebnú na spôsobenie 50 % inhibície ChE in vitro, a sledoval rezíduá OFI v rastlinách.

Enzymatickou metódou možno stanoviť všetky látky a zmesi, ktoré inhibujú enzým ChE; paratión sa určuje ako by značkovaný malými množstvami izomérov, ktoré sú mocnými inhibítormi. Platí to najmä o obchodných preparátoch paratiónu.

Autori namiesto zložitého Giangovho prístroja na temperovanie a miešanie roztoku v jednotlivých reakčných nádobkách (pomocou elektromagnetických miešačok) použili trepačku s temperovaným vodným kúpeľom pre 60 vzoriek. Ďalej nahradili vysoko čistený preparát ChE, ktorý používal Giang, konským sérom čisteným do prvého stupňa podľa Strelitza [8], pretože tento preparát, ktorého príprava je veľmi nákladná, je u nás nedostupný. Pre úsporu chemikálií volili Michelov tlmivý roztok, ktorý sa používa na stanovenie aktivity ChE v krvi pracujúcich s OFI, a koncentráciu substrátu obvyklú pri určovaní hladiny ChE v plazme alebo sére. Napokon koncentráciu ChE volili tak, aby zmena pH reakčného prostredia priebehom jednej hodiny sa pohybovala v rozmedzí 1—1,5 pH, čo vyplynulo zo štúdia reakčných podmienok pre inhibíciu ChE malými množstvami paratiónu.

Reakčné podmienky metodiky sa skúšali na chemicky čistom preparáte paratiónu, ktorý nám dodal Výskumný ústav agrochemickej technológie v Bratislave a ktorý asi rok stál v reagenčnej fľaši. Chromatograficky čistený paratión nemá takmer nijakú inhibičnú silu *in vitro*. Prekryštalovaný vykazuje inhibičnú schopnosť 10—100krát menšiu ako technický. Státím vzrastá inhibičná schopnosť čisteného paratiónu až do určitého rovnovážneho stavu, čo je pravdepodobne spôsobené jeho izomeráciou.

Experimentálna časť

Prístroje

pH-meter vlastnej konštrukcie (Poggendorfovo kompenzačné zapojenie), na ktorom sa dá odčítať 0,5 mV;

ultratermostat s vložkou pre nádoby na meranie pH [10];

trepacie zariadenie s temperovaným vodným kúpelom;

antimónová elektróda a ponorná nasýtená kalomelová elektróda „Jena“.

Roztoky

1. Giangov tlmivý roztok [7]: Do 900 ml destilovanej vody dáme 6,647 g kyseliny dietylbarbiturovej, 36 ml 0,1 N-NaOH, aby sa kyselina rozpustila, ďalej 89,46 g KCl a 1,089 g KH_2PO_4 . 0,1 N kyselinou solnou sa pH roztoku upraví na 8,1 a roztok sa doplní destilovanou vodou na jeden liter.

2. Michelov tlmivý roztok I [9]: Asi v 900 ml destilovanej vody rozpustíme 4,1236 g barbiturátu sodného, 0,5446 g KH_2PO_4 , 44,730 g KCl, za stáleho miešania pridáme po kvapkách toľko 0,1 N-HCl, aby roztok pri 25 °C mal pH 8,10 (spotreba asi 28 ml 0,1 N-HCl), a roztok doplníme destilovanou vodou na 1000 ml.

3. Michelov tlmivý roztok II [9]: Asi v 900 ml destilovanej vody rozpustíme 1,2371 g barbiturátu sodného, 0,1361 g KH_2PO_4 a 17,535 g NaCl; 0,1 N kyselinou solnou upravíme pH roztoku na 8,0 pri teplote 25 °C a roztok doplníme destilovanou vodou na 1000 ml.

4. 2 %, 3 % a 4 % vodný roztok chloridu acetylocholínu (ACh).

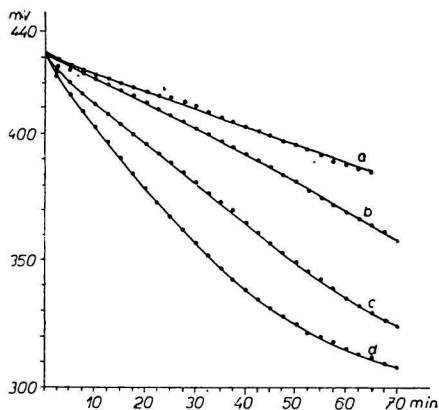
5. Roztok inhibítora: Asi 30 mg paratiónu sa zmieša so 4—5 násobným množstvom vhodného emulgátora (napr eryforu EL); homogénna zmes, zahriata prípadne na 40 až 50 °C, riedi sa malými dávkami H_2O a potom sa roztok doplní na 100 ml. Z tohto základného roztoku sa pripraví zriedený roztok o obsahu 0,003 mg paratiónu v jednom ml.

Pracovný postup

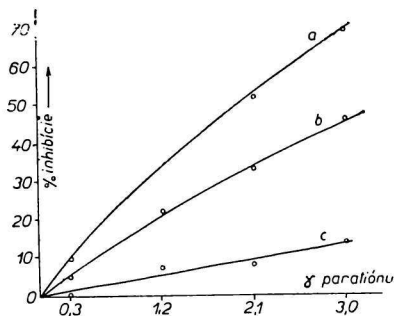
Najprv sa zistila kapacita všetkých troch tlmivých roztokov vzhľadom na kyselinu octovú: ak kapacitu Michelovho tlmivého roztoku II považujeme za rovnú 1, Michelov tlmivý roztok I má kapacitu približne 3 a Giangov tlmivý roztok 4,8. Ďalej sa sledoval časový priebeh enzymatickej hydrolýzy ACh vo všetkých troch tlmivých roztokoch pri rozličnej koncentrácii ChE čisteného konského séra (obr. 1): Do nádobiek na meranie pH sa dá 1,50 ml roztoku ChE a 1,50 ml tlmivého roztoku; po vyhriatí nádobiek na 25 °C sa stanoví potenciál antimónovej elektródy, ponorenej do reakčnej zmesi, proti nasýtenej kalomelovej elektróde, pridá sa 0,3 ml 3 % roztoku ACh a zisťuje sa potenciál antimónovej elektródy v 2 ½ minútových intervaloch v priebehu 70 minút.

Na meranie inhibície ChE paratiónovými preparátmi súběžne sa analyzujú tri druhy vzoriek: 1. vzorky bez roztoku ChE a bez paratiónu — vzorky bez enzýmu, 2. vzorky s roztokom ChE bez paratiónu — vzorky s enzýmom, 3. vzorky s roztokom ChE a s roztokom paratiónu — vzorky s paratiónom.

Do série nádobiek na meranie pH sa napipetuje po 1,50 ml tlmivého roztoku; potom sa do vzoriek bez enzýmu napipetuje po 1,50 ml destilovanej vody, do vzoriek s enzýmom po 1,00 ml destilovanej vody a do vzoriek s paratiónom po 1,00 ml roztoku paratiónu. Po vyhriatí vzoriek na 25 °C sa postupne v dvojminútových intervaloch pridáva do vzoriek s enzýmom a s paratiónom po 0,50 ml roztoku ChE konského séra o takej koncentrácii, aby sa enzymatickou hydrolýzou pridaného ACh vyvolala na antimónovej elektróde zmena potenciálu maximálne 75 mV/hod. Do vzoriek bez enzýmu sa nepridáva teraz nič. Po



Obr. 1. Časový priebeh enzymatickej hydrolýzy chloridu acetylcholínu v Giangovom tlmivom roztoku. a) 0,03 ml, b) 0,05 ml, c) 0,10 ml, d) 0,15 ml roztoku cholinesterázy čisteného konského séra.



Obr. 2. Inhibícia cholinesterázy a) ľudskej plazmy, b) čisteného konského séra, c) nečisteného konského séra paratiónom (nečisteným chromatograficky).

30 minútovej inkubácii za stáleho trepania pri 25 °C sa postupne v dvojminútových intervaloch zistí potenciál antimónovej elektródy (mV_1) vo všetkých vzorkách. Po jeho zmeraní sa do jednotlivých vzoriek pridá 0,3 ml 3 % ACh, vzorka sa premieša, vloží späť do trepačky a presne na sekundy sa poznačí doba pridania ACh do jednotlivých vzoriek. Presne 60 minút po pridaní substrátu sa znova postupne zistí potenciál antimónovej elektródy (mV_2) v jednotlivých vzorkách. Percento inhibície ChE sa vypočíta podľa vzorca:

$$\% \text{ inhibície} = \frac{(\Delta mV_{\text{enz.}}/\text{hod.} - \Delta mV_{\text{p}}/\text{hod.})}{\Delta mV_{\text{enz.}}/\text{hod.} - \Delta mV_{\text{neenz.}}/\text{hod.}} \cdot 100,$$

pričom

$\Delta mV_{\text{enz.}}/\text{hod.} = mV_1 - mV_2$ vzorky s enzýmom,

$\Delta mV_{\text{p}}/\text{hod.} = mV_1 - mV_2$ vzorky s paratiónom,

$\Delta mV_{\text{neenz.}}/\text{hod.} = mV_1 - mV_2$ vzorky bez enzýmu.

Na grafe sa vynáša percento inhibície v porovnaní s množstvom preparátu vo vzorke.

Výsledky a diskusia

Ak sa vzorky paratiónu (nečisteného chromatograficky) inkubujú s roztokom ChE 30 minút pri 25 °C, čo úplne stačí na utvorenie komplexu enzým — para-

tión, a ak enzymatická hydrolyza ACh prebieha za optimálneho pH (8—6) v tlmivom roztoku, možno meniť ešte tieto reakčné podmienky: kapacitu tlmivého roztoku, koncentráciu substrátu, kvalitu a koncentráciu ChE.

V rozsahu veľkosti zmeny pH reakčného prostredia 1—1,5 pH/hod. percento inhibície ChE paratiómom nezávisí od koncentrácie toho istého prípravku ChE. To však nemožno bezpečne tvrdiť v prípade, ak veľkosť zmeny pH/hod., vyvolanej enzymatickým štiepením ACh v tlmivom roztoku, dosahuje 2 pH/hod.

V rozsahu zmeny 1—1,5 pH/hod. reakčného prostredia enzymatickej hydrolyzy ACh percento inhibície prakticky nezávisí od koncentrácie ACh v rozmedzí 2,5—3,5 % koncentrácie, ak sa použije 0,1 ml spomenutých roztokov ACh na 1,0 ml reakčného prostredia.

Percento inhibície toho istého prípravku ChE plazmy alebo séra rovnakým množstvom paratiómu pri zachovaní spomenutého rozsahu zmeny pH/hod. reakčného prostredia (8—6,5) rastie len veľmi málo s úbytkom kapacity tlmivého roztoku.

Pri zachovaní všetkých reakčných podmienok: rozsahu zmeny pH/hod., reakčného prostredia, kapacity tlmivého roztoku, koncentrácie substrátu, dĺžky inkubačnej doby, reakčnej teploty a množstva paratiómu percento inhibície veľmi závisí od druhu a čistoty prípravku ChE, ktorý sa inkubuje s paratiómom (obr. 2). Okrem rozličnej čistoty použitého inhibítora vidíme v používaní prípravkov ChE rozličných druhov a rozdielnej čistoty hlavný dôvod, prečo sa tak rôznia literárne údaje o inhibičnej schopnosti jednotlivých OFI.

Percento inhibície toho istého prípravku ChE paratiómom za uvedených reakčných podmienok je úmerné koncentrácii paratiómu: v rozsahu 0—40 % inhibície táto závislosť je takmer lineárna.

Opísanú enzymatickú metódu na meranie zvyškov paratiómu vo vzduchu použili autori na hygienickú kontrolu pri postrekoch repy semenačky paratiónovým preparátom *Ekatox 20*. Analyzovaný vzduch presávali cez 2,5 ml destilovanej vody v malých prebublávačkách dvojitou membránovou presávačkou [11] rýchlosťou 0,5—1 liter vzduchu za jednu minútu. Účinnosť absorpcie vody pre zvyšky *Ekatoxu 20* vo vzduchu je asi 90—95 %.

Kalibračnú krivku pre *Ekatox 20* (0—15 γ) porovnali autori s kalibračnou krivkou pre paratión (0—3 γ), ktorý dodal Výskumný ústav agrochemickej technológie v Bratislave, a zistili, že 1 γ paratiómu odpovedá 5 γ *Ekatoxu 20*. V tab. 1 je niekoľko výsledkov z terénnych meraní.

Postrekovalo sa 0,2 % *Ekatoxom 20*; dovoľená koncentrácia 0,05 γ paratiómu na jeden liter vzduchu (udávaná sovietskymi autormi).

Enzymatickou metódou pri zachovaní uvedených reakčných podmienok možno stanoviť 0—3 γ technického paratiómu s presnosťou $\pm 0,1 \gamma$, ak máme poruke dobrý pH-meter a sklenú elektródu alebo antimónovú elektródu

Tabuľka 1

číslo vzorky	miesto odberu vzorky vzduchu	koncentrácia <i>Ekatoxu 20</i> , prepočítaná na paratión gama/l vzduchu
1	na postrekovacom prístroji 1,2 m od zeme	0,38
2	tesne za postrekovacím prístrojom	2,2
3	2 m za postrekovacím prístrojom 0,5 m od zeme	0,31
4	medzi repou	0,06
5	medzi repou	0,04

a pH-meter, na ktorom sa dá odčítať 0,5 mV, a ak meriame súbežne 3 vzorky, ktorých aritmetický priemer považujeme za správnu hodnotu.

Keďže paraoxon (kyslíkový analóg paratiónu) má asi 1000-krát väčšiu inhibičnú schopnosť ako paratión, ktorý použili autori, enzymatickou metódou by sa dala sledovať premena paratiónu na paraoxon vplyvom slnečného žiarenia, ak táto premena nastáva po postrekoch v letných mesiacoch. Na to však treba mať poruke aj spoľahlivú a dostatočne citlivú chemickú metódu, ktorou by sa súbežne stanovovalo množstvo samej látky ako chemikálie.

Súhrn

Autori preskúšali podmienky metódy na určovanie malých množstiev paratiónových prípravkov vo vzduchu na podklade inhibície cholinesterázy týmito látkami. Ukázali, že inhibícia paratiónom (nečisteným chromatograficky) veľmi závisí od druhu a čistoty prípravku cholinesterázy.

Metódu preskúšali v teréne na meranie zvyškov paratiónu vo vzduchu po postrekoch repy semenačky *Ekatoxom 20*. Metódu odporúčajú na sledovanie zmeny toxicity organických zlúčenín fosforu, ak sa použije spolu s niektorou spoľahlivou a citlivou chemickou metódou na stanovenie týchto látok. Enzymatická metóda je nateraz jedinou metódou na určovanie malých množstiev insekticídnych organických zlúčenín fosforu, mocne inhibujúcich cholinesterázu, na stanovenie ktorých sa dosiaľ nepodarilo vypracovať chemickú metódu.

ЭНЗИМАТИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ МАЛЫХ КОЛИЧЕСТВ ИНСЕКТИЦИДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ФОСФОРА

И. ЯНОК, Р. КЕМКА

Областной институт гигиены труда и болезней по профессии в Братислав.

Выводы

Авторы исследовали условия метода для определения малых количеств паратионовых препаратов в воздухе на основании ингибции холинэстеразы этими веществами. Указа-

ли, что ингибция паратномом (неочищенного хроматографически) мало зависит от сорта и чистоты препарата холинэстеразы.

Метод был испытан в районе, где находились следы паратиона в воздухе после обрызгивания свеклы, культивируемой на семяно, препаратом *Экатоксом 20*.

Метод рекомендуется для исследования токсичности органических соединений фосфора, при применении совместно с каким-нибудь усовершенствованным и чувствительным химическим методом для определения этих веществ. Энзиматический метод в настоящее время является единственным методом для определения малых количеств инсектицидных органических соединений фосфора, значительно ингибирующих холинэстеразу, для определения которых до сих пор не удалось найти метод химический.

Поступило в редакцию 14. VI. 1955 г.

ENZYMATISCHE BESTIMMUNG KLEINER MENGEN INSEKTIZIDER PHOSPHORVERBINDUNGEN

J. JANOK, R. KEMKA

Gebietsinstitut für Arbeitshygiene und Berufskrankheiten in Bratislava

Zusammenfassung

Die Autoren prüften die Bedingungen der Methode zur Bestimmung kleiner Mengen von Parathionpräparaten in der Luft unter Zugrundelegung der durch diese Stoffe bewirkten Inhibition der Cholinesterase. Sie wiesen nach, dass diese Inhibition durch Parathion (chromatographisch unrein) sehr von der Art und Reinheit des Cholinesterasepräparates abhängig ist.

Diese Methode wurde zum Messen von Parathionresten in der Luft nach der Bespritzung der Samenröbe mit *Ekatox 20* geprüft. Die Autoren empfehlen diese Methode zur Erkennung der Toxizität organischer Phosphorverbindungen, sofern man sie zugleich mit irgendeiner verlässlichen und empfindlichen chemischen Methode zur Bestimmung dieser Stoffe anwendet. Die enzymatische Methode ist zur Zeit die einzige Methode zur Bestimmung kleiner Mengen insektizider organischer Phosphorverbindungen, welche Cholinesterase inhibieren, zu deren Bestimmung es bislang nicht gelungen ist, eine chemische Methode auszuarbeiten.

In die Redaktion eingelangt den 14. VI. 1955

LITERATÚRA

1. Schrader G., *Uspechi Chim.* 22, 712 (1953).
2. Tichý V., *Chem. Zvesti* 5, 163 (1951).
3. Grob D. a spol., *John Hopkins Hospit. Bullet* 87, 106 (1950).
4. Averell P. R., Norris M. V., *Anal. Chem.* 20, 753 (1948).
5. Gage J. C., *Analyst* 75, 189 (1950).
6. Hirt R. C., Gischard J. B., *Anal. Chem.* 23, 185 (1951).
7. Giang P. A., Hall S. A., *Anal. Chem.* 23, 1830 (1951).
8. Strelitz F., *Biochem. J.* 38, 86 (1944).
9. Michel H. O., *J. Lab. clin. Med.* 34, 1564 (1948).
10. Janok J., Líška Š., *Pracovní lékařství* 273 (1955).
11. Kemka R., Janok J., Ďurkovič F., *Technická Práca* 6, 757 (1954).

Došlo do redakcie 14. VI. 1955