

SADRŽAJ PARATIONA U TKIVIMA AKUTNO OTROVANIH PACOVA

S. VITOROVIĆ, S. KAPOR, N. NEŠKOVIĆ i ANA ŽEŽELJ

Zavod za pesticide, INEP, Beograd-Zemun

(Primitljeno 18. XII 1970)

Određivan je paration u mozgu, jetri i mišićnom tkivu pacova nakon jednokratne intraperitonealne aplikacije otrova. Određivanje je vršeno metodom gasno-tečne hromatografije, hromatografom firme Varian, model 2100-20, opremljenim fosforim detektorom. Kolona je punjena smešom dve stacionarne faze (silikonsko ulje DC-200 i QF-1) na Chromosorb W-HMDS, kao nosaču.

U mozgu nisu nađene merljive količine parationa. Takođe, nije nađen paration u jetri i trbušnim mišićima u toku prvih 60 minuta trovanja. U dužim vremenskim intervalima nađene količine parationa iznosile su 0,125-7,158 $\mu\text{g/g}$ tkiva.

U procesu metabolizma organofosforinih insekticida dolazi do stvaranja nepolarnih i polarnih jedinjenja, te je za njihovo dokazivanje i kvantitativno određivanje potreban velik broj operacija. Analitički postupci koji se primenjuju za određivanje mikrokoličina organofosforinih insekticida zasnivaju se na primeni spektrofotometrijskih, hromatografskih i radiometrijskih metoda i tehnika rada. *Mendoza* i sar. (1) primenjuju hromatografiju na tankom sloju s enzimatskom reakcijom za detekciju organofosfata. *Neal* i *DuBois* (2) određuju p-nitrofenol kao degradacioni proizvod parationa spektrofotometrijski, dok *Nakatsugawa* i sar. (3) prate metabolizam parationa kod pacova metodom izotopnog razblaženja.

U poslednje vreme gasna hromatografija sve se više primenjuje za određivanje mikrokoličina organofosforinih insekticida, a njena primena pretežno je vezana za probleme ostataka pesticida u biljnim i životinjskim proizvodima (4, 5, 6). Imajući u vidu već postignute rezultate (7), primenili smo gasno-hromatografsku metodu za određivanje parationa u tkivima akutno otrovanih pacova.

* Rad je saopšten na IV kongresu Evropskog udruženja centara za kontrolu otrovanja s učesćem Američkog udruženja, Baško Polje, septembar, 1970. godine.

MATERIJAL I METODE

Ekperimenti su rađeni sa standardom parationa (0,0-dietil-0-p-nitrofeniltiofosfat) 98,8%, dobivenim od Biologische Institut, Bayer AG, Leverkusen.

Ekstrakcija. Ekstrakcija parationa iz jetre, mozga i mišićnog tkiva pacova vršena je u staklenom homogenizatoru sa teflonskim pistilom sa 10 ml acetonitrila u toku 1–2 minuta. Ekstrakt je proceden kroz sloj anhidrovanog natrijuma sulfata, a zaostali kolač izapran sa 5 ml acetonitrila. Ispirat je proceden kao i u prethodnom slučaju i ujedinjeni filtrat isparen u vakum-evaporatoru do suva. Ostatak se dodavanjem acetonitrila dovede na zapreminu od 1 ml i uzmu alikvoti za prečišćavanje na tankom sloju.

Prečišćavanje. Osetljivost primenjene instrumentalne metode zahteva odgovarajući stepen prečišćenosti ekstrakta iz biološkog materijala. Naša dosadašnja iskustva (7) navela su nas na upotrebu hromatografije na tankom sloju kao pogodne metode za prethodno prečišćavanje uzoraka.

Alikvoti od 0,1 do 0,2 ml nanošeni su na ploče standardnih dimenzija (20 × 20 cm) prevučene slojem MN-kiselogela G, debljine sloja 0,250 mm, aktiviranim na 105° C trideset minuta. Razvijanje je vršeno u komorama zasićenim smesom razvijача acetona i hloroform (1 : 1), pri dužini puta rastvarača od 14 cm. Izazivanje test mrlja vršeno je 0,5% rastvorom paladijum hlorida.

Gasno-tečna hromatografija. Kvantitativno određivanje parationa vršeno je gasnim hromatografom firme Varian, model 2100–20, opremljenim fosfornim detektorom (CsBr – modifikovan FID sistem). U određivanju optimalnih instrumentalnih parametara kvantitativne analize parationa upotrebili smo kolonu gde je na nosaču Chromosorb W-HMDS naneta kombinacija dve stacionarne faze (DC-200 6% i QF-1 4%). Kolona dužine 1,5 m, ϕ 6 mm od Pyrex stakla, pripremljena je na standardan način. Optimalna radna temperatura bila je: kolona 200° C, injektor 232° C, detektor 175° C pri brzini protoka gasa nosača (N₂) od 30 ml/min. Pri ovim radnim uslovima bilo je moguće odrediti 1×10^{-10} g parationa.

REZULTATI I DISKUSIJA

Pri kvantitativnom određivanju količine parationa u tkivu jetre, mozga i mišića akutno otrovanih pacova bilo je potrebno utvrditi vrednost prethodno iznetog postupka analize u odnosu na stvarno prisutnu količinu insekticida u ovim organima. Rezultati eksperimenta dati su u tablici 1.

Na osnovu prikazanih eksperimentalnih rezultata mogu se izračunati srednje vrednosti izražene u procentima za pojedine vrste tkiva. Nađeno je 65,74% parationa u mozgu, 74,15% u mišićima i 76,90% u jetri.

Tablica 1

Urednosti za ponovo dobivanje parationa iz različitih vrsta tkiva izražene u apsolutnim veličinama i procentima

Vrsta tkiva	Težina uzorka (g)	Parationa*			Ponovo dobiveno (%)
		dodato (μg)	nađeno (μg)	\pm SD	
Mozak	1	25	15,75	\pm 1,49	63,00
	1	125	85,62	\pm 0,48	68,49
Mišićno tkivo	2	25	17,91	\pm 1,15	71,64
	2	125	95,83	\pm 0,78	76,66
Jetra	2	25	19,58	\pm 0,78	78,32
	2	125	94,37	\pm 0,37	75,49

* Srednja vrednost od pet merenja

U eksperimentima *in vivo* mužjacima pacova težine 220–280 g intraperitonealno je ubrizgan paration rastvoren u propilenglikolu u dozi od 20 mg/kg. Ovu dozu rastvorili smo u 1 ml rastvarača. Životinje kojima je ubrizgan paration žrtvovane su u razmacima od 60 minuta, s time da su poslednje žrtvovane 240 minuta nakon ubrizgavanja parationa. Rezultati analiza sadržaja parationa u pojedinim tkivima dati su u tablici 2.

Tablica 2

Količina parationa, izražena u $\mu\text{g/g}$ tkiva, u odabranim tkivima posle jednokratnog intraperitonealnog ubrizgavanja pacovima

(min.)	Sadržaj parationa ($\mu\text{g/g}$), (n = 3)		
	mozak	mišićno tkivo	jetra
60	—	—	—
120	—	0,834	0,971
180	—	7,158	0,125
240	—	0,536	0,205

Analizirajući različita tkiva pacova posle intraperitonealnog ubrizgavanja bilo je moguće odrediti 0,5 do 1 ng parationa pri ubrizgavanju 1 do 2 μl prečišćenog ekstrakta u kolonu gasnog hromatografa. Möllhoff (4) je opisao slične mogućnosti u pogledu osetljivosti metode pri određivanju parationa u biljnom materijalu. Određujući paration u punoj krvi i plazmi, Bäumlér i Rippstein (6) i Boelcke (8) radili su u istom opsegu osetljivosti metode. Količina parationa u ispitivanim tkivima životinja žrtvovanim nakon 60 minuta bila je nemerljiva, a u mozgu nije bilo moguće otkriti paration pri datim eksperimentalnim uslovima u toku celog eksperimenta.

Kako su *Nakatsugawa* i sar. (3) pretpostavili, metabolizam parationa kod pacova vrši se pod uticajem mikrozosmskih enzima jetre. Proučavanjem procesa kojim enzimi mikrozosma jetre deluju na paration (2), ustanovljeno je da brzina i put unošenja, kao i pol životinje takode utiču na povećanje ili smanjenje toksičnosti parationa. Ovi eksperimenti ukazuju da se pri intraperitonealnom ubrizgavanju parationa mužjacima pacova nađe najveća količina u jetri posle 120 minuta, a u trbušnim mišićima posle 180 minuta. Na ovom nivou osetljivosti metode nije bila moguća detekcija parationa u mozgu.

Literatura

1. *Mendoza, C. E., Wales, P. J., McLeod, H. A., McKinley, W. P.*: *Analyst*, 93 (1968) 34.
2. *Neal, R. A., DuBois, K. P.*: *Pharmakol. exp. Ther.*, 148 (1965) 185.
3. *Nakatsugawa, T., Tolman, N. M., Dahm, P. A.*: *Biochem. Pharmacol.*, 18 (1969) 1103.
4. *Möllhoff, E.*: *Pflanzenschutz-Nachrichten »Bayer«*, 20 (1967) 557.
5. *Askew, J., Ruzicka, J. H., Wheals, B. B.*: *Analyst*, 94 (1969) 275.
6. *Bäumler, J., Rippstein, S.*: *Arch. Toxicol.*, 25 (1969) 57.
7. *Vitorović, S., Kapor, S., Nešković, N.*: *Određivanje organofosfornih insekticida u tkivima životinjskog porekla metodom gasne hromatografije*, II jugoslovenski kongres o prehrani, Zagreb, 1969.
8. *Boelcke, G.*: *Arch. Toxicol.*, 26 (1970) 161.

Summary

PARATHION CONTENT IN INDIVIDUAL TISSUES OF ACUTELY POISONED RATS

Parathion determinations were carried out in brain liver and muscle tissues of the rats poisoned by a single intraperitoneal injection, using gas-liquid chromatography. »Varian« chromatograph, model 2100-20, was used, equipped with a phosphorus detector. The column was packed with a mixture of two stationary phases (silicone oil DC-200 and OF-1) on Chromosorbe W-HMDS.

No measurable quantities of parathion were found in the brain. During the first 60 minutes after the poison injection there was no parathion in the liver or abdominal muscles either. In longer time intervals, the detected quantities of parathion were in the range from 0.125 to 7.158 mg/g of the tissue.

*Department of Pesticides
INEP, Beograd-Zemun*

*Received for publication
December 18, 1970.*