

## APSORPCIOMETRIJSKO ODREĐIVANJE ORGANOFOSFORNIH INSEKTICIDA

K. WEBER, JELKA MATKOVIĆ i LJERKA PALLA

*Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada JAZU, Zagreb*

*(Primljeno 10. VI 1968)*

Primijenjena je oksidaciona reakcija o-dianizidina, odnosno benzidina za kvantitativno određivanje organofosfornih insekticida. Kao mjera za koncentraciju insekticida uzeta je ekstinkcija reakcionih otopina pri dužini vala od 450 nm i debljini sloja od 1 cm, te nakon određenog reakcionog vremena. Ekstinkcije su ustanovljene apsorpciometrijski, fotoelektričnim mjerenjima. Ustanovljeni su optimalni uvjeti za rad po toj metodi. Pokusi su izvedeni s nizom organofosfornih insekticida koji se i kod nas u praksi mnogo upotrebljavaju.

Navedene su konstante baždarnih pravaca za vršenje takvih analitičkih određivanja. Rezultati mjerenja obrađeni su statistički i navedene su vrijednosti srednjeg odstupanja. U nekim slučajevima ustanovljene su 95%-tne granice pouzdanosti određivanja.

Analogni pokusi izvedeni su i s insekticidima u nekim živežnim namirnicama, pri čem je ustanovljena stabilnost otrova u tim namirnicama.

Broj analitičkih metoda koje su izradene i praktički uvedene za kvantitativno određivanje organofosfornih otrova (insekticida, nervnih otrova) prilično je velik (1, 2, 3). Principi tih metoda rada su dijelom veoma različiti, te neke metode spadaju u područje čisto kemijskih analiza, ali i u područje fizikalnih mjernih postupaka (4), odnosno enzimatskih i bioloških testova (5). Kod praktičkog rada s organofosfornim pesticidima (insekticidima, herbicidima) uspješno će se upotrebljavati analitičke metode koje su razmjerno jednostavne u izvedbi a brzo daju pouzdane rezultate dovoljne tačnosti. Izgleda da ovim uvjetima vrlo dobro odgovaraju metode koje se osnivaju na mjerenjima apsorpcije svjetla, tzv. apsorpciometrijski analitički postupci.

Budući da organofosforni otrovi gotovo bez iznimke apsorbiraju samo ultraljubičasto svjetlo, a takva apsorpcija je redovito nespecifična, jer je broj tvari koje apsorbiraju u ultraljubičastom području prilično velik, izravna mjerenja apsorpcije svjetla u organofosfornim spojevima za analitičke svrhe jedva dolazi u obzir. Iznimno se ipak za određivanje parationa upotrebljava spektrofotometrija u ultraljubičastom području (6). Kod analize većine organofosfornih insekticida primjenom spektro-

fotometrije bit će redovito potrebna prethodna kemijska obrada uzorka, i to takva obrada koja daje stabilan obojeni produkt sa specifičnom apsorpcijom svjetla u vidljivom spektralnom području. Poželjno je, dakako, da ta kemijska obrada uzorka bude još i jednostavna.

Poznat je niz jednostavnih kemijskih reakcija koje se osnivaju na oksidaciji nekog »supstrata« djelovanjem odgovarajućeg donatora kisika (vodikova peroksida, perborata) u slabo lužnatim otopinama, a posredovanjem organofosfornih spojeva kao prenosilaca vezanog kisika. Ova grupa reakcija naziva se po prvom autoru *Schönemannova reakcija* (7), a izvediva je praktički s različitim supstratima. Kod toga oksidacioni produkti tih supstrata moraju imati naročite fizikalne osobine koje su prikladne za praćenje brzine oksidacione reakcije. Tako se radi sa supstratima koji oksidacijom daju intenzivno obojene tvari (benzidin, o-dianizidin), koji daju fluorescentne tvari (indol), odnosno koji za vrijeme oksidacije pokazuju kemilumescencije (luminol, lucigenin). Pokazalo se da između koncentracije organofosfornog spoja i koncentracije oksidacionog produkta supstrata redovito postoji jednostavan, često linearan odnos. To omogućuje da se mjerenjima ekstinkcije (E) reakcione smjese u određenom reakcionom vremenu, kao i mjerenjima intenziteta fluorescencije, odnosno intenziteta kemilumescencije za vrijeme oksidacije, vrše kvantitativna određivanja organofosfornog otrova. Organofosforni spojevi djeluju za vrijeme reakcije formalno kao katalizatori (prenosioci kisika, modelni biokatalizatori, modeli peroksidaze), mada se zapravo za vrijeme reakcije hidrolitički rastvaraju.

Apsorpciometrijsku modifikaciju Schönemannove reakcije prvi su upotrebljavali za određivanje organofosfornih otrova *Gehauf* i suradnici (8). Kao supstrat koji oksidacijom stvara obojene otopine služio im je benzidin u slabo lužnatim acetonsko-vodenim otopinama. Donator kisika bio je natrijev perborat, a obojenost otopina mjerili su fotoelektričnim kolorimetrom uz primjenu plavog filtra. Radili su s ovim nervnim otrovima i insekticidima: sarin, tabun, DFP, TEPP, HETP, paraokson i paration. Ustanovljeno je da navedeni otrovi u količinama od 1 do 10 mikrograma u 4,5 ml reakcione smjese daju za 20 do 40 minuta žuto obojene otopine, prikladne za određivanje ekstinkcije. Na temelju baždarnih krivulja mogu se na taj način vršiti kvantitativna određivanja navedenih otrova. Ta metoda služila je kasnije (9) kao temelj za konstrukciju automatskog aparata za detekciju nervnih otrova, pri čemu je pored benzidina upotrijebljen kao supstrat još i o-dianizidin.

Mi smo primijenili spektrofotometrijsku varijantu Schönemannove reakcije na kvantitativno određivanje pesticida, i to onih koji se u praksi kod nas najviše upotrebljavaju. Ustanovili smo optimalne uvjete rada i odredili konstante baždarnih pravaca za analitičko određivanje pojedinih insekticida. Radili smo na određivanju tih otrova u nekim živim namirnicama. Nastojali smo se služiti razmjerno jednostavnim mjernim spravama koje su prikladne za rutinsku upotrebu a ipak daju pouzdane i dovoljno tačne rezultate.



## METODE RADA

Upotrijebljena reakciona smjesa za određivanje pesticida imala je ove komponente: 1) o-dianizidin, odnosno benzidin, 2) aceton, 3) natrijev perborat, 4) organofosforni pesticid, 5) izopropilni alkohol i 6) voda. Dianizidin ili benzidin i natrijev perborat su u tim smjesama komponente same reakcije. To vrijedi i za organofosforne spojeve, koji se međutim formalno kinetički mogu smatrati i katalizatorima reakcije (prenosiocima kisika). Aceton je otapalo za dianizidin, odnosno benzidin. Međutim sigurno je da ovo otapalo utječe i na brzinu oksidacione reakcije u tom smislu što povećava tu brzinu po nekom specijalnom mehanizmu (10). Izopropilni alkohol i voda samo su otapala komponenata.

Najprije je priređena otopina natrijeva perborata ( $\text{NaBO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), i to 1% -tna otopina u vodi. Perborat se nešto teže otapa u vodi, pa se postupa tako da se odvagne 1 g praškastog perborata, prenese u odmjerenu tikvicu od 100 ml, zatim se dodaje oko 80 ml vode i mučka se dok se potpuno ne otopi, što će trajati, već prema veličini kristala u prahu, i do jedan sat, pa se na koncu nadopuni s vodom do marke tikvice. Pokuse treba izvesti po mogućnosti sa svježim otopinama perborata, tj. s otopinama koje su sasvim svježije, odnosno nisu starije od nekoliko dana. Što je viša sobna temperatura, to se perborat u otopini lakše raspadne gubitkom kisika. Raspadanje perborata često kataliziraju nečistoće (prašina i sl.), pa se u otopini stalno razvija elementarni kisik. Takva otopina nije prikladna za pokus. o-dianizidin ( $\text{NH}_2 \cdot \text{CH}_3\text{O} \cdot \text{C}_6\text{H}_3 \cdot \text{C}_6\text{H}_3 \cdot \text{CH}_3\text{O} \cdot \text{NH}_2$ ), odnosno benzidin ( $\text{NH}_2 \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{NH}_2$ ), otopljen je u acetonu, i to 0,2%. Kao otapalo za organofosforne spojeve služio je izopropilni alkohol. U tom alkoholu se hidrolize estera fosforne i tiofosforne kiseline zbivaju najmanjom brzinom, zbog toga su otopine pesticida (insekticida) u izopropilnom alkoholu stabilne.

Upotrijebljene reakcione smjese su uvijek imale ukupan reakcioni volumen od 10 ml; npr. 7 ml  $\text{H}_2\text{O}$ , 1 ml 1% -tni perborat u vodi, 1 ml 0,2% -tni o-dianizidin (ili benzidin) u acetonu i 1 ml organofosforni pesticid 0,01% (ili druga koncentracija) u izopropanolu. Varirana je samo koncentracija perborata i koncentracija pesticida. Koncentracije drugih komponenata bile su uvijek iste. U prvom nizu pokusa ustanovljena je uvijek optimalna koncentracija perborata za oksidacionu reakciju s dotičnim pesticidom. Nakon toga su u drugim nizovima pokusa određene krivulje (pravci) ovisnosti ekstinkcije o koncentraciji pesticida (baždarni pravci) za dotičnu optimalnu koncentraciju perborata.

Radilo se kod sobne temperature, a standardno reakciono vrijeme je bilo jedan sat. To znači da se nakon stajanja od jednog sata na sobnoj temperaturi vršilo mjerenje ekstinkcije. U nekim slučajevima – prema potrebi – radilo se i s drugim reakcionim vremenima. Redosljed miješanja reakcionih komponenata bio je ovaj: voda + otopina perborata + otopina o-dianizidina (benzidina) + otopina pesticida. Uvijek je izveden, u svakom nizu, i jedan pokus bez prisutnosti pesticida (slijepa proba).

Upotrijebljene kemikalije bile su p. a. preparati, osim perborata, koji je imao 10% aktivnog kisika. Veoma važnu ulogu ima kod ovih pokusa čistoća vode. Mi smo uspješno radili s destiliranom vodom, koja je destilirana u aparatu sastavljenom samo od staklenih dijelova s električnim grijačima u staklenim cijevima. Voda iz destilacionog aparata s bakrenim kotlićem ne daje dobre rezultate kod izvedbe oksidacionih reakcija ovoga tipa.

Organofosforni pesticidi otopljeni su uvijek izravno u onom obliku u kojem se nalaze u trgovini, bez ikakve prethodne kemijske obrade.

Kada se radilo o praškastim preparatima, tj. o adsorbatima otrova na nekom krutom nedjelotvornom praškastom adsorbensu, preparat je tretiran s izopropanolom, a dobivena otopina filtrirana je prije primjene. Otopine i emulzije nekih otrova, koje se prodaju u trgovini, dale su mutne reakcione smjese, zbog slabe topljivosti upotrijebljenog ulja u vodenim otopinama. Mutnoća reakcione smjese, dakako, smeta pri određivanju ekstinkcije. U nekim takvim slučajevima uspjelo je odstraniti zamućenje povećavanjem koncentracije izopropanola u reakcionoj smjesi. U drugim je slučajevima zamućenje smanjeno smanjenjem koncentracije otopine otrova. U nekim pak slučajevima, pokazalo se, zbog takvih zamućenja nije moguće uspješno primijeniti ove metode određivanja otrova. Radili smo s preparatima naših poduzeća: 1) »Pinus« Tovarna kemičkih izdelkov, Rače pri Mariboru, 2) Kemijski kombinat »Chromos-Katran-Kutrilin«, Tvornica sredstava za zaštitu bilja, Zagreb-Žitnjak, 3) Hemijska industrija »Zorka«, Šabac, Samostalni pogon zaštite bilja. Osim toga smo upotrebljavali i neke inozemne preparate, pa i preparate nepoznatog porijekla.

Od živežnih namirnica upotrijebljeno je brašno, riža, pšenična krupica, kukuruzna krupica i šećer. Radi se o namirnicama, koje se mogu dulje vremena držati na skladištu, pa se tom prilikom, kao i kod transporta, mogu onečistiti insekticidima. Organofosforni spojevi u tim namirnicama mogu biti stabilni, a mogu se i kemijski promijeniti uslijed duljeg međusobnog utjecaja. Postoji mogućnost da uslijed toga i gube na aktivnosti (otrovnosti), što se također može ustanoviti odgovarajućim kvantitativnim analizama.

Za dobivanje uzoraka navedenih praškastih, odnosno kristaličnih živežnih namirnica s organofosforinim insekticidima (otrovima), odvajuta je određena količina (redovito 50 g ili 100 g) namirnice u staklenu kemijsku (Erlenmeyerovu) bocu, volumena od 300 ml, s ubrušenim čepom. Dodana je strogo određena količina otrova u prahu ili tekućini, npr. 0,25 g ili 0,5 g, te je intenzivnim duljim miješanjem, mućkanjem začepljene boce, izvršena homogenizacija uzorka. Iz tako dobivenih temeljnih uzoraka otrovanih namirnica uzete su probe za analizu, redovito u količini od 5 g. Prvi je uzorak uzet odmah nakon homogenizacije, a drugi uzorci u raznim vremenskim razmacima, svakih nekoliko dana, sve do ukupnog pokusnog vremena od 3 mjeseca u nekim slučajevima. Temeljni uzorci su stajali za vrijeme izvedbe pokusnog niza kod sobne (laborato-



rijske) temperature. Analiziranjem pojedinih proba istog temeljnog uzorka s istom ishodnom količinom otrova u istoj namirnici, koje su uzete u različitim vremenima stajanja temeljnog uzorka, ustanovljena je stabilnost otrova u toj namirnici pod takvim uslovima.

Uzete probe otrovanih živežnih namirnica ekstrahirane su s izopropilnim alkoholom, i to redovito 5 g probe sa 50 ml izopropanola. Pošto je dobro promućkana proba s otapalom, vršeno je centrifugiranje s po prilici 2000 okretaja u minuti. Bistra centrifugirana otopina ekstrahiranog otrova u izopropanolu uzeta je za analizu izravno i u određenim razrjeđenjima s istim alkoholom. Pokušaj filtriranja ekstrakta, namjesto centrifugiranja, nije dao dobre rezultate, jer su često dobiveni mutni filtri, koji nisu prikladni za rad, naročito kod izvedbe spektrofotometrijskih mjerenja. Postepenim razrjeđivanjem dobivenog ekstrakta u određenom omjeru, dobije se niz otopina ekstrahiranog otrova za određivanje ovisnosti intenziteta luminescencije, odnosno ekstinkcije o koncentraciji ekstrahiranog otrova.

Kod radova s brašnom ustanovljeno je da vlaga u brašnu igra prilično veliku ulogu u pogledu stabilnosti otrova u brašnu. U vlažnom brašnu stabilnost otrova znatno je manja negoli u suhom. Zbog toga je izveden još i niz pokusa s prethodno sušenim brašnom.

Za spektrofotometrijsko određivanje ekstinkcije reakcionih otopina upotrebljavali smo dva aparata: 1) Univerzalni spektrofotometar tvrtke C. Zeiss-Jena sa staklenom optikom za vidljivi dio spektra i 2) Spekol-fotometar iste tvrtke s adapterom za epruvete. Ekstinkcije su mjerene za dužinu vala od 450 nm, s obzirom na činjenicu da se u reakcionim smjesama uvijek razvija žuta do smeđa boja. Debljina sloja bila je kod rada s kivetama (Univerzalni fotometar) 1 cm, a kod rada sa Spekol-aparatom uzete su normalne staklene epruvete s promjerom od 15 mm. Pokazalo se da i jedan i drugi aparat mogu jednako dobro poslužiti kod rada takve vrsti. Baždarni pravci dakako nisu isti, ali rezultati određivanja se dobro slažu. Za istu svrhu može, načelno, poslužiti i koji drugi spektrofotometar.

## REZULTATI

Pri ispitivanju utjecaja koncentracije na razvijanje boje (ekstinkcije,  $E = \log [J_0/J]$ ) oksidacionih produkata benzidina i o-dianizidina ustanovili smo da ima takvih sistema kod kojih E kontinuirano raste s porastom koncentracije perborata. U drugim slučajevima E raste do stanovite granične vrijednosti, pa se dalje ne mijenja s povećavanjem koncentracije perborata. Konačno, u nekim slučajevima kod većih koncentracija perborata vrijednost za E se veoma smanjuje s porastom koncentracije perborata. U tablici 1 navedeni su neki karakteristični slučajevi utjecaja koncentracije perborata na benzidinsku i dianizidinsku reakciju. Vidi se

da treba ustanoviti za svaki sistem (ciklički amin + insekticid) koncentraciju natrijeva perborata kod koje će se najbolje izvesti analiza.

Tablica 1.

*Utjecaj koncentracije perborata na stvaranje boje oksidacijom*

Na-perborat % u reakcionoj smjesi	E nakon 1 sata			
	Bendizin + paration 20	o-dianizidin + paration 20	o-dianizidin + dimekron	o-dianizidin + diptereks, bez acetona
0,01	—	—	—	0,020
0,02	—	—	0,098	0,178
0,04	—	—	0,198	0,250
0,06	—	—	0,260	0,260
0,08	—	—	0,340	0,240
0,10	0,138	0,224	0,355	0,220
0,20	0,234	0,376	0,570	0,122
0,30	0,265	0,444	0,625	0,072
0,40	0,318	0,552	0,678	0,060
0,50	0,320	0,520	0,720	0,060
0,60	0,359	0,589	0,720	0,062
0,70	0,355	0,592	0,695	0,062
0,80	0,388	0,655	0,698	—

Druga potrebna eksperimentalna predradnja se sastoji u određivanju povoljnog reakcionog vremena. Mi smo našli da intenzitet obojenosti reakcionih otopina redovito na početku prilično naglo raste, postije određeni maksimum, pa nakon toga postepeno ali prilično sporo opet pada.

Ustanovili smo da je reakciono vrijeme od jednog sata prikladno za rad sa svim insekticidima koje obuhvaća ova radnja.

Za konstrukciju baždarnog pravca analitičkog postupka ovom metodom izmjere se ekstinkcije reakcionih otopina za niz koncentracija otrova, vrši se statistička obrada rezultata radi dobivanja jednadžbe regresionog pravca, te se konačno nacrtava baždarni pravac. Kao primjer prikazuje slika 1. takav pravac za sistem: o-dianizidin + paration 20 i koncentraciju perborata od 0,8%. Jednadžba ovog pravca ima oblik:

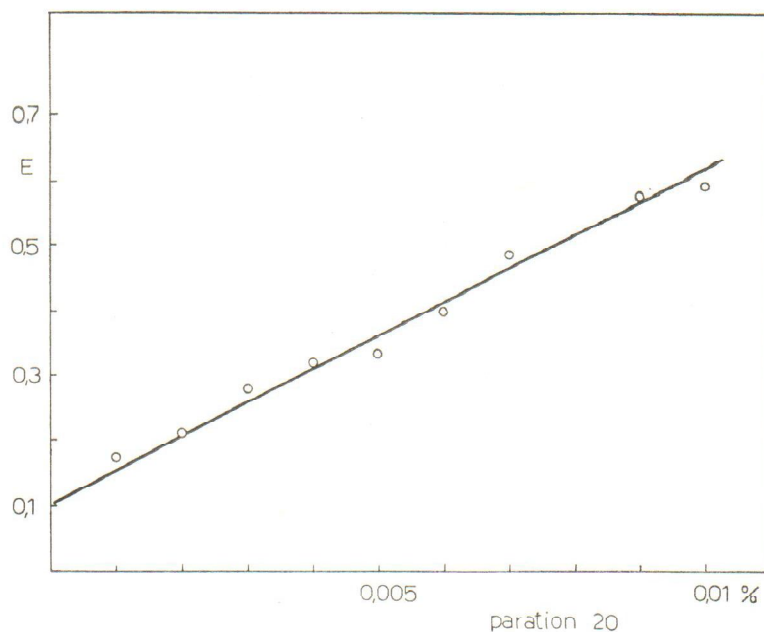
$$E = a + b \cdot c \quad (1)$$

Koncentracija otrova u toj jednadžbi izražena je za tekuće otrove u ml po 100 ml reakcione otopine (vol. %), a za krute otrove u g/100 ml. U tablicama 2 i 3 navedene su konstante *a* i *b* baždarnih pravca niza organofosfornih insekticida za benzidinsku i o-dianizidinsku reakciju.

U tim tablicama navedene su i koncentracije perborata na koje se odnose izvedeni pokusi.



Pomoću konstanta  $a$  i  $b$ , a primjenom jednadžbe (1), može se iz mjerenja ekstinkcije ( $E$ ) izračunati koncentracija insekticida ( $c$ ). Kod analitičkog se postupka, naravno, upotrebljava inverzni oblik jednadžbe. Iz podataka analize može se konstruirati i pravac inverzne jednadžbe, pa



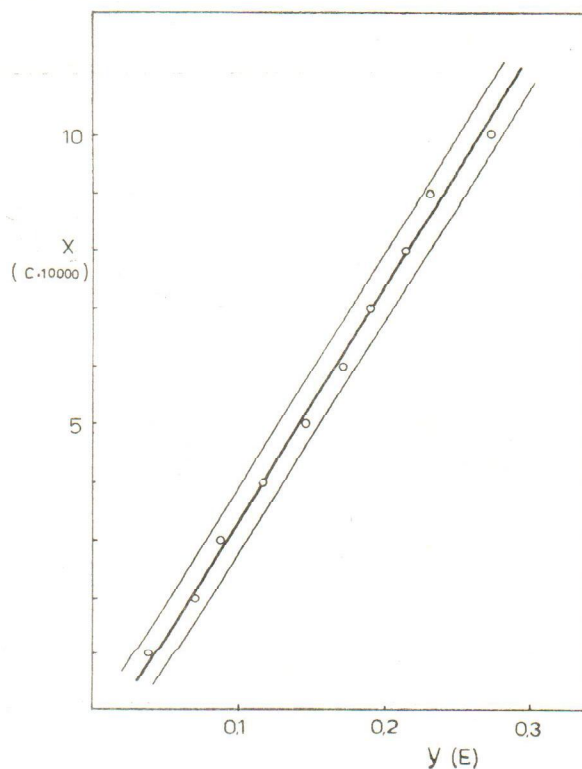
Sl. 1. Baždarni pravac za određivanje parationa *o*-dianizidinskom reakcijom

Tablica 2.

Konstante  $a$  i  $b$  baždarnih pravaca benzidinske reakcije

Naziv insekticida	Koncentracioni raspon insekticida % · 10 <sup>4</sup>	Koncentracija perborata %	$a$	$b$	$\sigma$
Ortho Dibrom	10 do 100	0,04	0,0218	51,0	0,015
Dimekron	10 do 100	0,40	0,0189	27,0	0,007
Diptereks	1 do 10	0,04	0,0167	318,0	0,011
Diptereks	1 do 10	0,10	0,0263	406,2	
Paration 20	10 do 100	0,80	0,723	34,7	0,009

izračunati 95%-tne granice pouzdanosti. Za sistem: o-dianizidin + diptereks prikazuje ove podatke grafički slika 2. Vidi se da regresioni pravac dobro opisuje dobivene rezultate mjerenja.



Sl. 2. Pravac inverzne baždarne jednadžbe s ucrtanim granicama 95%-tne pouzdanosti za određivanje diptereksa o-dianizidinskom reakcijom

U tablicama 2 i 3 navedene su još i vrijednosti *standardne pogreške regresije*  $\sigma$ , koje se u raznim sistemima ne mogu izravno međusobno uspoređivati jer su dobivene vrijednosti ekstinkcije prilično različite. Značenje veličine  $\sigma$  može se međutim vrlo dobro predočiti kada se s pomoću podataka iz tablica konstruiraju baždarni pravci u navedenom rasponu koncentracije insekticida. Načelno treba ove koncentracije izabrati s pomoću odgovarajućeg razrjeđenja tako da se dobiju ekstinkcije u granicama od 0,1 do 0,8. Samo u tim granicama za ekstinkciju daju fotometrijska mjerenja pouzdane rezultate. Kod fluorometrijskih (10) i luminoetrijskih (11) određivanja organofosfornih otrova (insekticida) nema takvih ograničenja u pogledu koncentracionog raspona, jer se osjetljivost mjerne aparature tih postupaka može lako mijenjati u širokim granicama (12). Time se osjetljivost aparata prilagođuje koncentraciji otro-



va. Takav postupak nije lako moguć u primjeni spektrofotometrijskih mjerenja, pa se koncentracija otrova prilagođuje razrjeđenjem navedenom optimalnom području ekstinkcije.

Tablica 3.  
Konstante *a* i *b* baždarnih pravaca *o*-dianizidinske reakcije

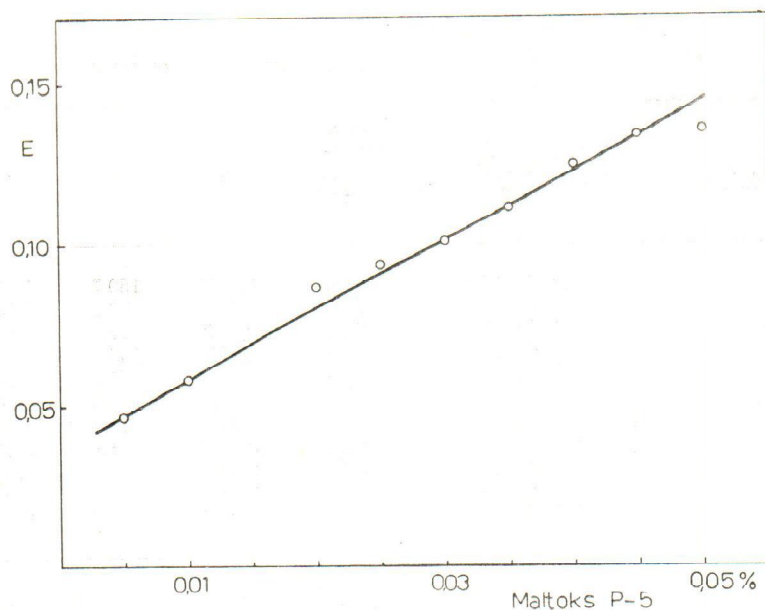
Naziv insekticida	Koncentracijski raspon insekticida % · 10 <sup>4</sup>	Koncentracija perborata %	<i>a</i>	<i>b</i>	$\sigma$
Ortho Dibrom	20 do 100	0,10	0,00052	<b>160,7</b>	0,014
Dimekron	10 do 100	0,55	0,0470	23,3	0,009
Diptereks	1 do 10	0,10	0,02263	406,2	0,011
Diptereks	10 do 100	0,80	0,0722	263,1	0,016
Paration 20	10 do 100	0,80	0,1033	51,5	0,025
Paration 20	10 do 100	0,10	0,0306	19,6	0,004
Diazinon 20 EC	10 do 100	0,40	0,0578	16,7	0,009
Neocid	100 do 700	0,50	0,0704	8,8	0,011
Neocid	10 do 100	0,50	0,0290	7,2	0,003
Nankor	10 do 100	0,60	0,1360	55,8	0,035
Fenkapton	100 do 800	0,20	0,0168	9,3	0,039

Velika je prednost ove metode da se može primijeniti i na određivanje organofosfornih spojeva čiji produkti hidrolize gase fluorescenciju i kemiluminescenciju. Tako se paration može veoma dobro određivati benzidinskom ili *o*-dianizidinskom reakcijom, dok metoda kemiluminescencije luminola u tu svrhu ne dolazi u obzir, jer *p*-nitrofenol – hidrolizni produkt parationa – vrlo intenzivno gasi kemiluminescenciju. Metoda fluorescencije oksidacionih produkata indola može se primijeniti na takve organofosforne insekticide samo tako da se utjecaj gašenja fluorescencije eksperimentalno uzima u obzir (14).

Kod rada sa živčnim namirnicama ustanovljeno je općenito da se baždarni pravci koji su dobiveni sa čistim otrovima, mogu samo uvjetno i samo u određenim slučajevima prenijeti na određivanje organofosfornih otrova u gore navedenim živčnim namirnicama. Očito se radi o tome da ekstrakcijom, pored otrova, ulaze u otapalo još i druge tvari iz namirnica, koje mogu utjecati na reakciju na kojoj se temelji metoda određivanja otrova. Ovi utjecaji međutim nisu presudni, pa se zato ipak dobiju načelno uvijek isti efekti kao i sa čistim otrovima. Jedino se u kvantitativnom pogledu mogu pojaviti određene razlike, koje se međutim pokusima mogu lako ustanoviti.

Kao primjer za upotrebljivost oksidacione reakcije *o*-dianizidina za određivanje insekticida maltoks P-5 u brašnu prikazuje slika 3 dobiveni baždarni pravac. Vidi se da se ucrtani regresioni pravac prilično lijepo

slaže s pojedinim eksperimentalnim vrijednostima. To znači da metoda odgovara načelno veoma dobro. U tablicama 4, 5 i 6 navedeni su rezultati koji su dobiveni o-dianizidinskom reakcijom. U prvoj od navedenih



Sl. 3. Baždarni pravac za određivanje insekticida maltoks P-5 u brašnu o-dianizidinskom reakcijom

tablica kombiniran je organofosforni insekticid diazinon 20WP s raznim živežnim namirnicama. Kako se vidi, dobivene vrijednosti za  $a$ ,  $b$  i  $\sigma$  se međusobno s obzirom na upotrijebljenu namirnicu ne razlikuje bitno. Iz ovog se rezultata vidi da se insekticid ne mijenja pod utjecajem navede-

Tablica 4.

Konstante  $a$  i  $b$  baždarnih pravaca o-dianizidinske reakcije za diazinon 20WP

Namirnica	Koncentracioni raspon insekticida % · 10 <sup>3</sup>	$a$	$b$	$\sigma$
Brašno	5,0 – 30	0,046	8,210	0,00604
Pšenična krupica	5,0 – 25	0,055	6,582	0,0103
Kukuruzna krupica	5,0 – 25	0,059	6,724	0,01001
Šećer	5,0 – 25	0,059	7,660	0,0124
Riža	5,0 – 25	0,075	7,250	0,01188



nih namirnica, a pored toga se očito bar približno u jednakoj mjeri ekstrahira iz njih. To je insekticid koji se s o-dianizidinskom reakcijom može veoma dobro određivati u navedenim živežnim namirnicama.

Tablica 5.

*Konstante a i b baždarnih pravaca o-dianizidinske reakcije za diptereks*

Namirnica	Koncentracioni raspon insekticida $\% \cdot 10^4$	a	b	$\sigma$
Šećer	5,0 – 50	0,0122	7,475	0,00255
Riža	5,0 – 50	0,0096	89,413	0,00671

Iz podataka u tablicama 5 i 6 se naprotiv vidi da se insekticid diptereks u tom pogledu vlada drugačije, da daje sasvim različite vrijednosti za konstante *a* i *b* s obzirom na upotrijebljenu namirnicu (šećer, riža, brašno). Maksimalne razlike za konstantu *b* za diazinon 20WP se odnose kao 1 : 1,25, a za konstantu *a* kao 1 : 1,63. Za diptereks ovi odnosi imaju međutim vrijednosti za konstantu *a* 1 : 7,08. Postoji doduše još i mogućnost da je ta razlika uvjetovana različitim rasponima koncentracije otrova. Pri ispitivanju živežnih namirnica s obzirom na ovaj otrov bit će stoga potrebno uvijek ustanoviti baždarni pravac posebno za svaku namirnicu.

Tablica 6.

*Konstante a i b baždarnih pravaca o-dianizidinske reakcije, otrov je ekstrahiran s brašna*

Insekticid	Koncentracioni raspon $\% \cdot 10^3$	a	b	$\sigma$
Diazinon EC	1,0 – 10	0,016	16,618	0,00126
Diazinon 20 WP	5,0 – 30	0,046	8,21	0,00604
Paration	4,0 – 20	0,018	8,53	0,00113
Nankor 44S	1,0 – 60	0,0394	21,457	0,00102
*Diptereks (Pinus)	0,2 – 2,0	0,016	181,21	0,00228
Diptereks (Bayer)	0,5 – 5,0	0,068	161,19	0,0350

\* brašno sušeno kod 80° C.

Kada se ispituju razni otrovi u istoj namirnici (tabl. 6), dobiju se veoma različite vrijednosti za konstante baždarnih pravaca. Koncentracioni raspon, kao i vrijednost srednjeg odstupanja, također prilično variraju.

Ali linearna ovisnost izmjerene ekstinkcije o koncentraciji u navedenom rasponu (1 : 10) uvijek je realizirana. To znači da je metoda analize prikladna, a odgovarajući se koncentracioni raspon uvijek može postići odgovarajućim razrjeđenjem.

Kao daljnja metoda za određivanje organofosfornih insekticida u živežnim namirnicama upotrijebljena je oksidaciona reakcija benzidina. Rađeno je na isti način kao i kod oksidacione reakcije o-dianizidina, a dobivene rezultate prikazuju tablice 7 i 8. Usporedba s tablicom 4 pokazuje da su vrijednosti za konstantu  $b$  kod rada s benzidinom znatno manje. Time je uvjetovana i manja tačnost u radu. Inače diptereks i u ovom slučaju daje različite vrijednosti za  $b$ , ovisno o upotrijebljenoj namirnici. Ta pojava dakle nije povezana s primijenjenim stvaraočem obojenosti.

Tablica 7.

*Konstante a i b baždarnih pravaca benzidinske reakcije za diazinon 20 WP*

Namirnica	Koncentracioni raspon insekticida ‰ · 10 <sup>2</sup>	a	b	σ
Pšenična krupica	1,0 – 3,0	0,0328	3,00	0,00205
Kukuruzna krupica	1,0 – 3,0	0,0306	3,92	0,00089
Šećer	0,5 – 3,0	0,0406	3,48	0,00289
Riža	1,0 – 3,0	0,0588	2,68	0,00214

zujе da su vrijednosti za konstantu  $b$  kod rada s benzidinom znatno manje. Time je uvjetovana i manja tačnost u radu. Inače diptereks i u ovom slučaju daje različite vrijednosti za  $b$ , ovisno o upotrijebljenoj namirnici. Ta pojava dakle nije povezana s primijenjenim stvaraočem obojenosti.

Tablica 8.

*Konstante a i b baždarnih pravaca benzidinske reakcije za diptereks*

Namirnica	Koncentracioni raspon insekticida ‰ · 10 <sup>4</sup>	a	b	σ
Šećer	5 – 50	0,0073	42,977	0,00298
Riža	5 – 50	0,0110	107,78	0,00662

Naročito su važni rezultati koji su dobiveni pri ispitivanju stabilnosti insekticida u živežnim namirnicama. Ako je stabilnost malena, jasno je da nakon stanovitog vremena neće biti više moguće dokazati prisutnost otrova u namirnici. Međutim takav nestabilan otrov će redovito brzo izgubiti i sposobnost da djeluje kao insekticid, tj. da djeluje kao otrov na sisavce. Od svih kemijskih reakcija, koje lako mogu promijeniti molekule estera fosforne kiseline (organofosforne otrove), najvažnije su hidrolize (13), naročito zbog toga što se hidrolitičkim pretvorbama stvaraju ne-



otrovni produkti insekticida. Pored toga, takve se hidrolize zbivaju u lužnatim, kao i kiselim otopinama, a njihova brzina se lako povećava raznim katalitičkim utjecajima.

Hidrolizi organofosfornih insekticida u živežnim namirnicama naročito pogoduje vlažnost namirnica. Pored toga može se još i pretpostaviti da u nekim namirnicama ima, barem u tragovima, i takvih tvari koje su u stanju katalitički utjecati na brzinu hidrolize. To bi mogli biti npr. tragovi kovina, enzima i sl.

Uzimajući u obzir sve ovo bilo je od interesa vršiti paralelne pokuse s vlažnim i suhim namirnicama, i to pokuse određivanja insekticida u tim namirnicama u raznim vremenskim razmacima, sve do vremena od 120 dana. Kao insekticid upotrijebljen je za ove pokuse diptereks, jer je poznato da je taj organofosforni otrov veoma stabilan u čistom praškastom stanju, a i njegove vodene otopine se praktički veoma sporo mijenjaju.

Ovim pokusima ustanovljeno je najprije da je diptereks u namirnicama kao što su šećer i riža veoma stabilan. Njegova aktivnost se u tim namirnicama praktički ne mijenja niti u gore navedenom roku. Kod izvedbe tih pokusa namirnice nisu posebno sušene, nego su uzete u stanju kako se nalaze u trgovini.

Pokusi s brašnom, pšeničnom i kukuruznom krupicom dali su međutim druge rezultate. Ove namirnice su, kako se praktički upotrebljavaju, uvijek nešto vlažne. Kada se njima u tom stanju dodaje diptereks i na-

Tablica 9.  
Promjena aktivnosti diptereksa (0,002%) u brašnu

t dani	nesušeno brašno		sušeno brašno	
	E	E %	E	E %
0	0,322	100	0,378	100
1	0,330	102,4		
3			0,355	93,9
7			0,354	93,6
13	0,220	68,3		
21			0,361	95,5
35			0,357	94,4
51	0,139	43,1		
61			0,294	77,7
66	0,110	34,1		
84	0,087	27,0		
100	0,087	27,0		
119	0,083	25,7		

t = vrijeme stajanja smjese kod sobne temperature u danima. E = dobivena ekstinkcija o-dianizidijskom reakcijom.

kon toga se smjesa analizira u raznim vremenskim razmacima, lako se može ustanoviti da se aktivnost diptereksa razmjerno brzo i znatno gubi. Tako je npr. u jednom uzorku pšeničnog brašna aktivnost diptereksa pala na polovinu u vremenu od 33 dana, a za 120 dana aktivnost je pala na 25% prvobitne vrijednosti (vidi tablicu 9). U nekim drugim slučajevima opadanje aktivnosti diptereksa bilo je još znatno izrazitije. Za jedan uzorak pšenične krupice ustanovljeno je da u njoj aktivnost diptereksa opada na polovinu već za 4 dana, a na 25% za 20 dana. U svim slučajevima krivulja vremenskog opadanja aktivnosti ima oblik koji očito odgovara eksponencijalnoj funkciji. Ta činjenica vrlo lijepo potvrđuje pretpostavku da se zaista radi o kemijskoj reakciji (hidrolizi). Kada se navedene namirnice prethodno osuše i poslije toga izmiješaju s diptereksom, aktivnost toga insekticida ostaje u namirnicama i nakon stajanja od 60 dana praktički nepromijenjena. To znači da se u suhim namirnicama taj otrov kemijski ne mijenja.

Pored praktičkog značenja ovi pokusi imaju i teoretsko značenje. Budući da je diptereks stabilan i u vodenim otopinama, a nestabilan u vlažnim namirnicama, može se zaključiti da ove namirnice sadržavaju neke tvari, možda enzime ili neke druge djelatne organske supstancije, koje pospješuju hidrolizu otrova.

#### ZAKLJUČAK

Oksidaciona reakcija o-dianizidina, odnosno benzidina, u kombinaciji s fotoclektričnim apsorpciometrijskim određivanjima ekstinkcije reakcionih otopina, može dobro poslužiti za kvantitativno određivanje organofosfornih insekticida. U određenom koncentracionom području, koje može biti različito za pojedine insekticide, postoji linearni odnos između ekstinkcije reakcionih otopina i koncentracije insekticida. Ekstinkciju treba izmjeriti u pravilu nakon jednog sata reakcionog vremena. U sastavu reakcionih otopina koncentracija perborata ima važnu ulogu, a optimalna koncentracija ove komponente ovisna je o upotrijebljenom insekticidu.

Konstante baždarnih pravaca (a i b) treba ustanoviti statističkom obradom rezultata mjerenja. Poželjno je ustanoviti i granice 95%-tne pouzdanosti. Insekticid diptereks se može ovom metodom sigurno određivati još i u najnižoj graničnoj koncentraciji od  $1 \cdot 10^{-4}$  %, što odgovara količini od 0,01 mg u reakcionoj smjesi od 10 ml. Kod niza drugih insekticida (orto-dibrom, dimekron, paration, neocid i nankor) ta je granična koncentracija po prilici 10 puta veća, a u pojedinim slučajevima (fenkapton) čak 100 puta veća. Prednost je ove apsorpciometrijske metode da se može primijeniti i na organofosforne otrove (paration) čija kvantitativna analiza nije moguća metodom kemiluminescencije i fluorescencije.



Apsorpciometrijska metoda određivanja organofosfornih insekticida daje dobre rezultate i pri određivanju tih otrova u živežnim namirnicama. Kada su namirnice vlažne, hidroliza organofosfornih spojeva znatno smanjuje njihovu stabilnost. Ta hidroliza očito je katalizirana nekim sastavnim komponentama takvih namirnica. Za određivanje insekticida u namirnicama treba izraditi posebne baždarne pravce.

#### Literatura

1. *Gunther, F. A., Blinn, R. C.*: Analysis of Insecticides and Acaricides, Chemical Analysis Vol. 6, Interscience Publishers, New York, 1955.
2. Analysis of Toxic Phosphorous Compounds, *Anal. Chem.*, 29 (1957) 21 A.
3. *Schrader, G.* daje u svojoj knjizi: Die Entwicklung neuer insektizider Phosphorsäure-Ester, Verlag Chemie-Weinheim/Bergstr. 1963, popis literature za veći broj organofosfornih insekticida.
4. Vidi npr.: *Averell, P. R. i Norris, M. U.*: *Anal. Chem.*, 20 (1948) 75; *O'Keeffe, K., Averell, P. R.*: *Anal. Chem.*, 23 (1951) 1167; *Edwards, F. J.*: *Anal. Chem.*, 22 (1950) 706; *Weber, K.*: *Arh. hig. rada*, 12 (1961) 169; *Giång, P. A., Caswell, R. L.*: *J. Agric. Food Chem.*, 5 (1957) 753; *Guilbault, G. G., Kramer, D. N., Cannon, P. L., Jr.*: *Anal. Chem.*, 34 (1962) 1437.
5. *Giång, P. A., Hall, S. A.*: *Anal. Chem.*, 23 (1951) 1830; *Cook, J. W.*: *J. Assoc. off. agric. Chem.*, 37 (1954) 561; *Pietri-Tonelli, P.*: *Laboratorio Sperimentale Agrario, Signa, Firenze*, 1956 (Montecatini publikacija).
6. *Hirt, R. C., Gisclard, J. B.*: *Anal. Chem.*, 23 (1951) 185.
7. Vidi *Marsh, D. J., Neale, E.*: *Chemistry and Industry* 1956, 494; *Kramer, D. N., Gamson, R. M.*: *Anal. Chem.*, 30 (1958) 251.
8. *Gehauf, B., Epstein, J.* et all.: *Anal. Chem.*, 29 (1957) 278; *Epstein, J., Rosenblatt, D. H., Demek, M. M.*: *J. Amer. chem. Soc.*, 78 (1956) 341.
9. *Young, J. S., Parsons, J. R., Reeber, H. E.*: *Anal. Chem.*, 30 (1958) 1236.
10. *Gehauf, B., Goldenson, J.*: *Anal. Chem.*, 29 (1957) 276; *Skurić, Z., Weber, K.*: *Croat. Chem. Acta*, 38 (1966) 23; *Weber, K.*: *Arh. hig. rada*, 12 (1961) 169.
11. *Goldenson, J.*: *Anal. Chem.*, 29 (1957) 877.
12. *Weber, K.*: *Arh. hig. rada*, 17 (1966) 1.
13. *Uhlik, B., Weber, K.*: *Arh. hig. rada*, 16 (1965) 329.
14. *Skurić, Z.*: *Arh. hig. rada*, 16 (1965) 3.

#### Summary

#### ABSORPTIOMETRIC DETERMINATION OF ORGANOPHOSPHORUS INSECTICIDES

The oxidation reaction of o-dianisidine and benzidine has been applied for quantitative determination of organophosphorus insecticides. Extinction of reaction solutions determined at 450 nm in a 1 cm cell was taken as a measure of insecticide concentration. Extinctions were determined by absorptiometric photoelectric measurements. Optimum conditions for the method have been found. In experiments were used various organophosphorus insecticides which are widely applied in practice.

Constants of calibration lines for such analytical measurements are given. Results of measurements have been statistically treated and standard errors calculated.

The insecticide Dipterex can be determined by this method at as low concentrations as  $1 \cdot 10^{-4}$  %, what corresponds to 0.01 mg in the reaction mixture of 10 ml. For a number of other insecticides (ortho-dibromo, Dimecron, Parathion, Neocide and Nancor) this limit concentration is approximately 10 times higher, while in some cases (Phencapton) it is even 100-fold. Advantage of this absorptiometric method lies in its applicability to organophosphorus poisons (Parathion) whose quantitative analysis is not possible by the methods of chemiluminescence and fluorescence.

The absorptiometric method for determination of organophosphorus insecticides yields good results also in determination of these poisons in (dry) foods. In wet foods the stability of organophosphorus compounds is considerably reduced due to hydrolysis catalyzed by some food components. For determination of insecticides in food construction of special calibration lines is required.

*Received for publication*  
*June 10, 1968*

*Institute for Medical Research*  
*incorporating the Institute of*  
*Industrial Hygiene, Zagreb*