

FLUOROMETRIJSKO ODREĐIVANJE METIL-PARAOKSONA

ZDENKA SKURIĆ

*Skola narodnog zdravlja »Andrija Štampar«,
Medicinski fakultet Sveučilišta, Zagreb*

(Primljeno 27. II 1965)

Opisana je fluorimetrijska metoda na bazi indolske reakcije za određivanje metil-paraoksona u otopini. Osjetljivost metode je 1.1 μg metil-paraoksona u 50 ml reakcione smjese.

Hidrolizom nekih organofosforanih spojeva (paraokson, paration, metil-paraokson, metil-paration) nastaje žuti p-nitrofenol, koji u otopini kao unutarnji filtar smanjuje intenzitet fluorescencije. Zbog toga treba analizu metodom fluorescencije takvih organofosforanih spojeva izvoditi uz određivanje p-nitrofenola u alikvotnom dijelu uzorka, a koncentraciju organofosforanog spoja ocijeniti iz baždarnog pravca dobivenog s odgovarajućim sadržajem p-nitrofenola.

Metil-paraokson kao metilni ester fosforne kiseline pripada grupi organofosforanih spojeva. Najtoksičniji organofosforani spojevi smatraju se potencijalnim bojnim otrovima. Manje toksični primjenjuju se u modernoj agrikulturi za zaštitu bilja, u stočarstvu, te općenito kao pesticidi (1, 2).

Njihova primjena u svakodnevnom životu moderne civilizacije stvorila je brojne probleme, među kojima treba naročito istaknuti ove: način detoksikacije, pitanje zaštite pri radu, problem dokazivanja i određivanja tih otrova u atmosferi i u biološkom i drugom materijalu.

Najstarija metoda za dokazivanje i određivanje organofosforanih spojeva sastoji se u prevođenju tih spojeva u anorganske fosfate (3, 4, 5, 6). Vrlo je poznata biokemijska metoda koja se zasniva na određivanju aktivnosti kolinesteraze inhibirane djelovanjem organofosforanih spojeva (7).

Jedna od najnovijih metoda je brza i osjetljiva elektrokemijska metoda razrađena u prvom redu za određivanje kolinesteraze i tiokolin estera (8, 9). Opisana je i metoda određivanja organofosforanih spojeva na bazi inhibicije enzima lipaze (10). Vrijedno je spomenuti i kromatografske postupke za separiranje i određivanje estera fosforne i tiofosforne kiseline (11, 12, 8), te metode plinske kromatografije (13)

Baza za neke kolorimetrijske metode za određivanje organofosfornih spojeva je Schönemannova aminoperoksidna reakcija (3). Otopina alkalnog peroksida, koja sadržava oksidabilni primarni amin (npr. o-dianizidin) reagira s organofosfornim spojem dajući perfosfonat, koji s primarnim aminom daje azo-bojilo.

O-dianizidin se može zamijeniti indolom (14, 15) odnosno luminolom (16, 17). Ako se umjesto o-dianizidina upotrijebi indol, tada se umjesto bojila određuju fluorescentni međuprodukti. Oksidacijom indola u prisustvu donatora kisika (vodikov peroksid, natrijev perborat), stvaraju se fluorescentni međuprodukti oksidacije: indoksil i indigo-bijelo. U prisustvu nekih organofosfornih spojeva zbiva se oksidacija indola povećanom brzinom. Mjereni intenzitet fluorescencije produkata oksidacije indola proporcionalan je koncentraciji prisutnog organofosfornog spoja. Gehauf i Goldenson navode da je osjetljivost metode fluorescencije za određivanje organofosfornih spojeva oko 50 puta veća od najbolje kolorimetrijske metode (14). Zbog toga je metoda fluorescencije primijenjena i pri dokazivanju i određivanju organofosfornih nervnih (bojnih) otrova, kojih prisustvo treba zbog jake toksičnosti i velike opasnosti po zdravlje dokazati u vrlo malim koncentracijama.

APARATURA I REAGENCIJE

Fluorescencija reakcionih međuprodukata mjerena je na fotoelektričnoj aparaturi sastavljenoj od visokotlačne živine svjetiljke (TEŽ, Zagreb, oznaka UTF 250), selenova fotoelementa (B. Lange, Berlin, oznaka S 60) i zrcalnog galvanometra s osjetljivošću 1×10^{-9} A po crtici skale (Carl Zeiss, Jena). Visokotlačna živina svjetiljka daje grupu jakih emisijskih linija žive kod 365 m μ i jednu slabiju liniju kod 404 m μ , te nekoliko linija u crvenom dijelu spektra. Upotrebljavan je primarni filter sastavljen od staklenog filtra od niklovog oksida i planparalelne kivete napunjene 10%-vodenom otopinom CuSO₄ i sekundarni filter od želatinske lamelle s pikrinskom kiselinom na staklenoj ploči.

Natrijev perborat – 1%-vodena otopina. Nakon otapanja otopina je čuvana u hladioniku. Svi pokusi izvedeni su s otopinom koja nije bila starija od 24 sata. Stabilitet 1%-vodene otopine određivan je titracijom s otopinom kalijeva permanganata u sumporno kiselom mediju.

Otopina indola – 0.2% u izopropilnom alkoholu. Otopine indola čuvane su u tamnim bocama pri sobnoj temperaturi. Stabilitet otopine ispitivan je mjerenjem fluorescencije otopine indola prema krutom fluorescentnom filteru. Stabilitet otopine zadovoljava u ispitivanom vremenskom intervalu od 3 dana.

Otopina metil-paraoksiona – 0.8% u izopropilnom alkoholu. Otopina je čuvana u hladioniku.

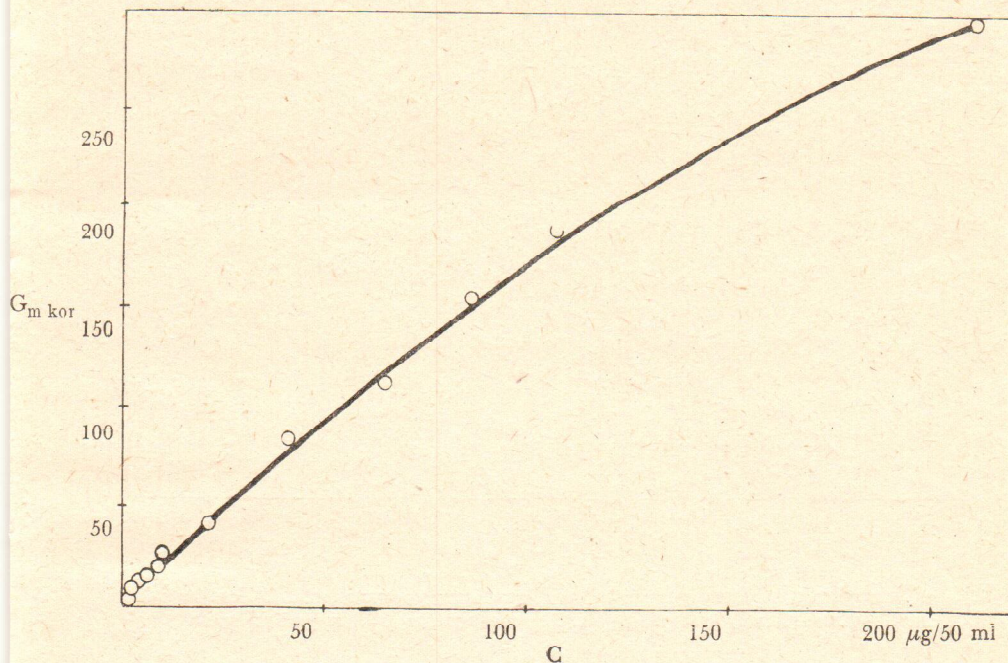
METODE MJERENJA

Kao reakciona posudica služila je Pyrex-čša od 100 ml. Volumen reakcione smjese iznosio je 50 ml. Reakcione komponente dodavane su ovim redom: 28 ml vode, 2 ml acetona, 10 ml 1%-vodne otopine natrijeva perborata, 1 ml 0.2%-otopine indola u izopropilnom alkoholu i $(9 - x)$ ml izopropilnog alkohola. Otopina je promiješana, određen je početni otklon galvanometra G_0 . Pošto je dodano x ml otopine metil-pa-
raoksona u izopropilnom alkoholu, očitana je maksimalni otklon galva-
nometra. Maksimalni otklon galvanometra (G_m) korigiran je za otklon
uslijed vlastite fluorescencije reakcione smjese (G_0).

REZULTATI I DISKUSIJA

Baždarna krivulja prikazana je na sl. 1.

Dobivena baždarna krivulja pretvorena je u pravac logaritmiranjem vrijednosti nezavisne varijable (koncentracija metil-pa-
raoksona) i vri-
jednosti zavisne varijable (maksimalni otklon galvanometra). Funkcija
je linearna do 215 μg metil-pa-
raoksona u 50 ml reakcione smjese.



Sl. 1. — Baždarna krivulja. Ovisnost maksimalnog otklona galvanometra ($G_m \text{ kor}$) o koncentraciji metil-pa-
raoksona (C) izraženoj u $\mu\text{g}/50 \text{ ml}$.

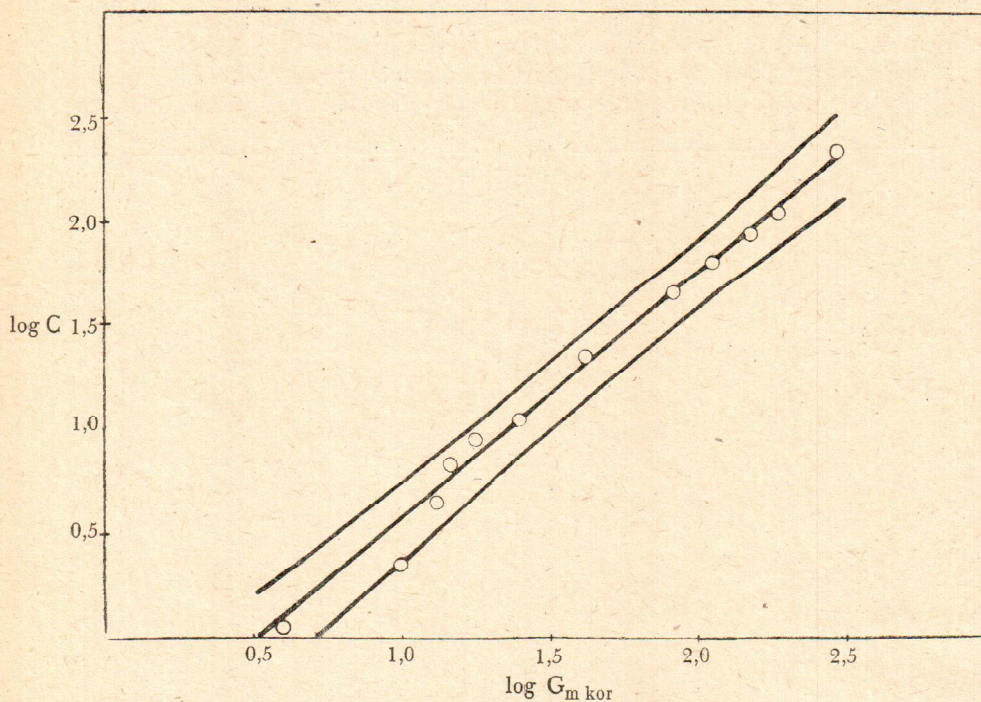
Jednadžba najboljeg pravca kroz eksperimentalne tačke izračunana je regresionom analizom prema metodi najmanjih kvadrata (18, 19). Tako dobivena regresiona jednadžba za metilparaokson glasi:

$$Y = 0,5904 + 0,8079 X$$

Analiza varijance i odgovarajući F-test pokazali su da linearna regresija uspješno tumači eksperimentalne rezultate. Izraz za invertiranu jednadžbu pravca za ocjenu metil-paraoksona iz očitavanja maksimalnog otklona galvanometra je ovaj:

$$X = -0,73083 + 1,2378 Y.$$

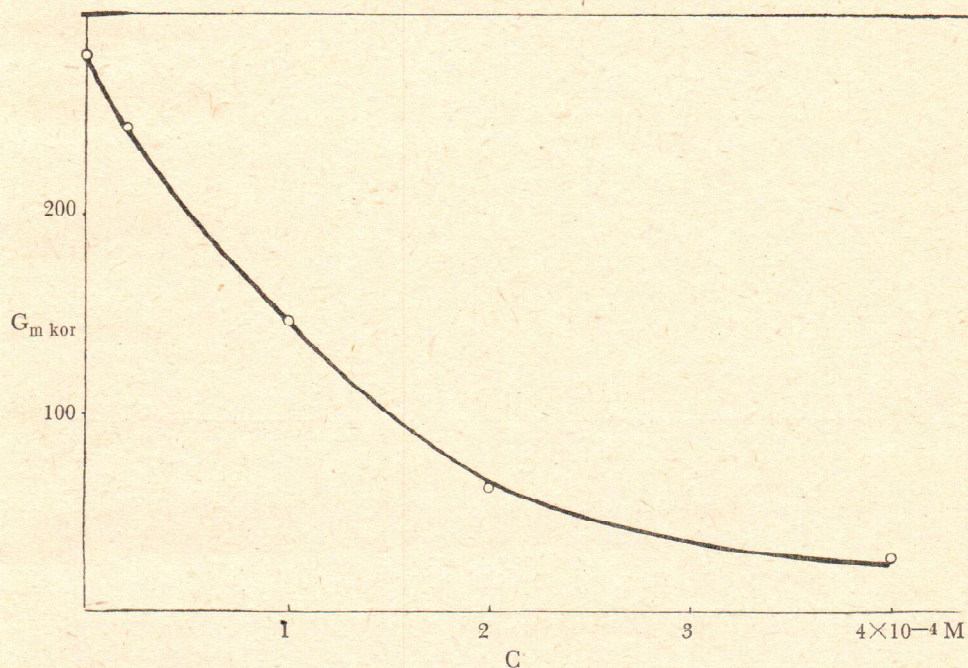
U toj je jednadžbi X logaritam koncentracije metil-paraoksona izražen u $\mu\text{g}/50$ ml reakcione smjese a Y je logaritam maksimalnog otklona galvanometra. Taj pravac sa 95%-granicama pouzdanosti određivanja prikazan je na sl. 2.



Sl. 2. - Inventirani baždarni pravac sa 95%-granicama pouzdanosti. (c) koncentracija metil-paraoksona ($\mu\text{g}/50$ ml), ($G_{m \text{ kor}}$) maksimalni otklon galvanometra.

Osjetljivost metode iznosi $1,1 \mu\text{g}$ metil-paraoksona u 50 ml reakcione smjese.

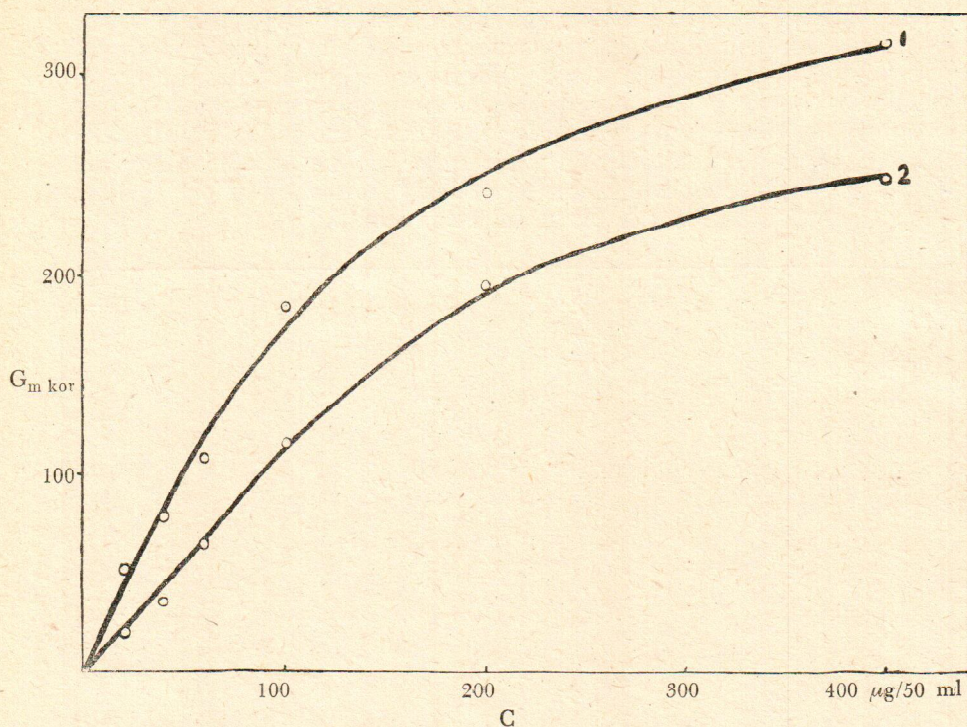
Metil-paraokson, kao i neki drugi organofosforni spojevi, daje hidrolizom p-nitrofenol. Kako je p-nitrofenol u alkalnom mediju izrazito žuto obojen, djeluje kao unutarnji filter i smanjuje intenzitet fluorescencije na osnovu koje se određuje koncentracija metil-paraoksona. Da bi se ispitao utjecaj toga unutrašnjeg filtra, izvršeno je ispitivanje utjecaja različitih koncentracija p-nitrofenola na maksimalni intenzitet fluorescencije fluorescentnih međuprodukata koji nastaju oksidacijom indola. Rezultati ispitivanja prikazani su na slici 3.



Sl. 3. - Ovisnost maksimalnog otklona galvanometra ($G_{m \text{ kor}}$) o molarnoj koncentraciji p-nitrofenola (c).

Na slici 3. prikazana je krivulja smanjenja maksimalnog intenziteta fluorescencije ($G_{m \text{ kor}}$) u ovisnosti o koncentraciji p-nitrofenola u reakcionoj smjesi, uz konstantnu koncentraciju metil-paraoksona ($0,17 \cdot 10^{-4}$ M). Krivulja jasno pokazuje, da će ista koncentracija metil-paraoksona dati pri analizi različite maksimalne otklone galvanometra, ovisno o koncentraciji prisutnog p-nitrofenola.

Na slici 4. prikazane su dvije baždarne krivulje za metil-paraokson, uz dvije različite koncentracije p-nitrofenola. Na osnovu tih krivulja može se zaključiti da metodu fluorescencije pri analizi organofosfornih spojeva, koji hidrolizom daju p-nitrofenol, treba izvesti uz određivanje



Sl. 4. Ovisnost maksimalnog otklona galvanometra ($G_{m \text{ kor}}$) o koncentraciji metil-paraoksona (c) izraženoj u $\mu\text{g}/50 \text{ ml}$ uz dvije različite koncentracije p-nitrofenola: krivulja br. 1. $2.5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ p-nitrofenol
krivulja br. 2. $1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ p-nitrofenol

p-nitrofenola u alikvotnom dijelu uzorka, a koncentraciju organofosfor-nog spoja ocijeniti iz baždarnog pravca dobivenog uz odgovarajući sadržaj p-nitrofenola.

Literatura

1. Vandekar, M.: Arh. hig. rada, 9 (1958) 85.
2. Khan-Magometova, I. D.: Biofizika, 3 (1958) 558.
3. Kramer, D. N., Gamson, R. M.: Anal. Chem., 29 (1957) 21 A.
4. Fleischer, K. D., Southworth, B. C.: Anal. Chem., 30 (1958) 152.
5. Welch, C. M., West, P. N.: Anal. Chem., 29 (1957) 874.
6. Eggertssen, F. T., Weiss, F. T.: Anal. Chem., 29 (1957) 453.
7. Giang, P. A., Hall, S. A.: Anal. Chem., 23 (1951) 1830.
8. Hanes, C. S., Isherwood, F. A.: Nature, 164 (1949) 1107.
9. Guilbault, G. G., Kramer, D. N., Cannon, P. L. jr.: Anal. Chem., 34 (1962) 1437.
10. Guilbault, G. G., Kramer, D. N.: Anal. Chem., 36 (1964) 409.
11. Plapp, F. W., Casida, E. J.: Anal. Chem., 30 (1958) 1622.
12. Erne, K.: Nord. Vet. Med., 9 (1957) 450.
13. Egan, H., Hammond, E. W., Thomson, J.: Analyst, 89 (1964) 1056.

14. *Gehauf, B., Goldenson J.*: Anal. Chem., 29 (1957) 276.
15. *Cherry, R. H., Foley, G. M., Badgett, C. O., Eanes, R. D., Smith, H. R.*: Anal. Chem., 30 (1958) 1939.
16. *Goldenson, J.*: Anal. Chem., 29 (1957) 877.
17. *Weber, K., Huić, Lj., Mrazović, M.*: Arh. hig. rada, 9 (1958) 325.
18. *Youden, W.*: Statistical Methods for Chemists, John Wiley & Sons Inc., New York, Chapman & Hall, London, 1957.
19. *Davies, O. E.*: Statistical Methods in Research and Production, Oliver and Boyd, London, 1949.

Summary

FLUORIMETRIC DETERMINATION OF METHYL PARAOXON

A fluorimetric method for the determination of methyl paraoxon is proposed. The method is based on the oxidation of indole with hydrogen peroxide. Some products of this reaction are fluorescent. The reaction is influenced by methyl paraoxon, the reaction rate being a function of the methyl paraoxon concentration in the solution. The sensitivity of the method is 1.1 micrograms methyl paraoxon in 50 cc of the final solution.

Some organophosphorous compounds (paraoxon, parathion, methyl paraoxon, methyl parathion) yield p-nitrophenol as the product of their hydrolysis. It is experimentally shown that p-nitrophenol as a yellow compound decreases the fluorescence intensity of the fluorescent products of indole oxidation acting as an internal filter in the solution in which the organophosphorous compound is to be determined. Therefore it is suggested that, prior to the fluorimetric analysis of methyl paraoxon, the concentration of p-nitrophenol in the sample should be determined and the concentration of the organophosphorous compound estimated from a calibration curve prepared with solutions of methyl paraoxon containing the same concentration of p-nitrophenol.

»Andrija Štampar«,
School of Public Health,
Medical Faculty, Zagreb University

Received for publication
February 27, 1965