

ANALITIČKE METODE U TOKSIKOLOGIJI ORGANOFOSFORNIH SPOJEVA*

K. WEBER

Zavod za sudsku medicinu i kriminalistiku Medicinskog fakulteta u Zagrebu

(Primljeno 27. XII 1961)

Navedene su najvažnije analitičke metode za kvantitativno određivanje organofosfornih otrova. Fizikalno-kemijske metode rada (luminolska reakcija, oksidacija indola) ilustrirane su rezultatima takvih određivanja. Dane su približne vrijednosti letalnih doza raznih otrova u svrhu međusobnog uspoređivanja.

Organofosforni spojevi određene kemijske konstitucije predstavljaju zasebnu skupinu sintetskih organskih otrova, koji se u posljednjem deceniju sve više upotrebljavaju za uništavanje biljnih i drugih štetčinja, dakle kao pesticidi. Broj sintetiziranih, kao i praktički upotrebljavanih organofosfornih otrova veoma je velik, a možemo ih svrstati u dvije grupe. U prvu spadaju otrovi s razmjerno slabim djelovanjem na sisavce, ali s izrazitim pesticidnim svojstvima. Otrovi ove grupe se skoro isključivo upotrebljavaju kao *pesticidi*, a poželjno je da djeluju što slabije otrovno na sisavce i što jače na biljne i druge štetčinje. Organofosforni otrovi se danas mnogo upotrebljavaju praktički u poljoprivredi i šumarstvu, razmjerno su lako pristupačni, jer se prodavaju svakome bez ograničenja. Pri radu s takvim pesticidima razmjerno lako može doći do profesionalnih otrovanja, budući da organofosforni spojevi djeluju kao kontaktni otrovi, inhalacioni otrovi i pri uzimanju per os. Poznati su još i slučajevi samoubistva i kriminalnog ubistva primjenom organofosfornih otrova. U drugu grupu organofosfornih otrova spadaju veoma toksični *nervni otrovi*, koji se danas praktički ne upotrebljavaju. Otrovi ove grupe, koji su sada pristupačni samo malobrojnim stručnjacima u svrhu istraživanja, dolaze međutim u obzir kao potencijalni bojni otrovi u eventualnom budućem sukobu. U miru nervni otrovi vjerojatno neće igrati sudsko-medicinsku ulogu, ali za vrijeme rata postoji mogućnost njihove upotrebe za sabotazu i za druga sudski kažnjiva djela.

* Ovaj članak je jedan dio referata koji je održan na IV stručnom sastanku Udruženja za sudsku medicinu u Portorožu 25-28. aprila 1961.

Kemijska konstitucija i drugi podaci o svojstvima i toksičnosti raznih organofosforinih otrova navedeni su već u ranijim publikacijama ovog časopisa (1) i u odgovarajućoj drugoj literaturi (2). Kao pesticidi i insekticidi dolaze u trgovinu razni više-manje čisti ili tehnički produkti, od kojih su najpoznatiji paration (E 605, tiofos), paraokson (E 600, mintakol), sistoks (E 1059) i dr. (3). Poznati nervni otrovi su »DFP«, tabun, sarin i soman.

Budući da se organofosforini pesticidi i nervni otrovi često smatraju »najopasnijim« otrovima, poučno je međusobno uspoređivati njihove približne letalne doze s odgovarajućim vrijednostima drugih otrova. U tablici 1 navedene su letalne doze raznih otrova, koje su uzete kao približne srednje vrijednosti iz više toksikoloških priručnika. Može se kazati da pesticidi imaju razmjerno visoke letalne doze za sisavce, nervni otrovi veoma niske, ali postoje još i drugi otrovi s još nižim letalnim dozama.

Tablica 1
Letalne doze otrova

Otrov	LD ₅₀ (g/kg) za štakore	letalna doza za čovjeka u g (75 kg)
DDT	0,2 - 0,7	—
Paration	0,018 - 0,030	2,1
Bladan	0,0014	0,300
KCN	—	0,150
As ₂ O ₃	—	0,100
HCN	—	0,050
Nikotin	—	0,040
Tabun	0,0001	0,0075
Akonitin	—	0,0010
Botulinus toksin	—	0,0000003

Analitičke metode koje se praktički primjenjuju na području toksikologije organofosforinih spojeva veoma su različite, a spadaju u područje biokemijske, kemijske i fizikalno-kemijske analize. Od biokemijskih metoda rada upotrebljava se naročito postupak određivanja *aktivnosti kolinesteraze* u krvi otrovanih, pomoću *Warburgovog respirometra*. Princip ove metode se sastoji u tome, da se u tikvici respirometra hidrolizira određena količina acetilkolina utjecajem onog enzimskog preparata (kolinesteraza krvi) kojemu se određuje aktivnost. Supstrat

(acetilkolin) se nalazi u bikarbonatnom puferu, a hidrolizom se oslobađa kiselina. Ta kiselina razvija iz bikarbonata plinoviti ugljični dioksid, kojega se volumen odredi manometrijski na skali respirometra. Količina ugljičnog dioksida u mikrolitrima, koja se razvija u minuti, računajući s količinom enzimskog preparata od 1 g ili 1 ml, predstavlja mjeru za aktivnost kolinesteraze u tom preparatu (4).

Pored ove veoma pouzdane, ali u izvedbi nešto zamršenije metode, postoje još i drugi postupci za određivanje aktivnosti kolinesteraze u biološkom materijalu. Razrađeni su postupci koji se osnivaju na *spektrofotometrijskim* mjerenjima, odnosno na mjerenjima koncentracije vodikovih iona uz primjene odgovarajućih indikatora, električnih pH-metara i metode pH-metrijske titracije. Zajednička crta svih tih metoda je ta, da se služe hidrolizom acetilkolina utjecajem kolinesteraze, a fizičkim mjerenjima određuju koncentracije direktnih ili indirektnih produkata te hidrolize.

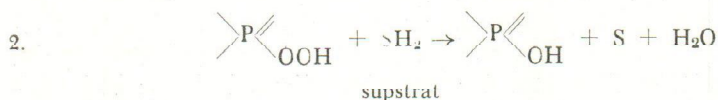
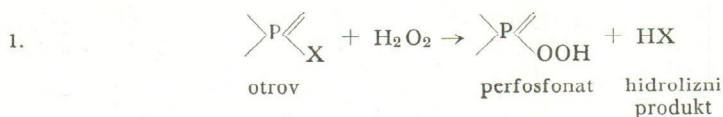
Sudsko-medicinski značajnije su analitičke metode izravnog određivanja organofosfornih otrova u biološkom ili drugom materijalu. Kemijske metode koje se zato upotrebljavaju mogu se služiti određivanjima *ukupne količine* fosfora u određenom uzorku. Organske tvari uzorka se razaraju i organski vezani fosfor se prevede u anorganske fosfate. Nakon toga se s molibdatom stvara plava boja, koja se fotometrira. Ova metoda nije specifična za organofosforne spojeve nego daje ukupnu količinu fosfora u uzorku. Zato može samo indirektno poslužiti za određivanje koncentracije otrova (5).

Druge kemijske metode određuju koncentraciju *hidroliznog produkta* određenog organofosfornog otrova. Otrov se kemijski popuno hidrolizira u analiznom uzorku, a koncentracija produkta hidrolize, tj. kiselina koja nastaje iz kiselinskog ostatka (acil) u organofosfornom spoju, određuje se optičkim ili nekim drugim mjerenjima. Tako se kod analize parationa, paraoksona i armina fotometrira žuta boja alkalične otopine p-nitrofenola, koja nastaje totalnom hidrolizom tih otrova. Drugi postupak se sastoji u tome da se nitrogrupa acila na parationu reducira kemijski u aminogrupu. Ta se aminogrupa diazotira, a nastalo diazobojilo se fotometrira. Diazobojilo daje veoma intenzivnu obojenost otopini, i zbog toga je ta metoda veoma osjetljiva. Pored toga se redukcijom i diazotiranjem postizava i veća specifičnost negoli izravnim fotometriranjem žute boje p-nitrofenola. Koncentracije nekih organofosfornih spojeva mogu se u čistim uzorcima, u kojima nema bioloških ili drugih organskih komponenata, određivati i izravnom spektralnom fotometrijom u ultraljubičastom spektralnom području (6).

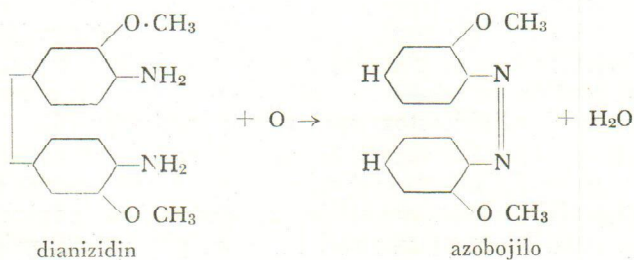
Zasebnu grupu analitičkih metoda zauzimaju kod određivanja organofosfornih otrova *fizikalno-kemijski* postupci. U ovu grupu postupaka spada polarografija i kromatografija (na stupcu i na papiru) organofosfornih spojeva. Može se smatrati da ovim postupcima pripada više

teoretsko negoli praktičko značenje. Drugi fizikalno-kemijski postupci osnivaju se na katalitičkim sposobnostima organofosfornih otrova. Ta grupa postupaka obuhvaća metodu *kemiluminescencije* luminola, *fluorometriju* oksidacionih produkata indola i fotometriju produkata oksidacije *o*-dianizidina. Sve ove metode upotrebljavaju zapravo Schönemannovu katalitičku oksidacionu reakciju, a razlikuje se zapravo samo u pogledu upotrebljenog »supstrata« ove reakcije i time u vezi u pogledu metode mjerenja.

Schönemannova reakcija je modelna enzimatska reakcija za peroksidativno djelovanje, pri čemu ulogu »enzima« igra organofosforni otrov. Taj otrov prenosi kisik vodikova peroksida u slabo lužnatoj otopini na neki supstrat, koji se oksidira, a time daje boju ili luminescenciju. Kao supstrati naročito dolaze u obzir *o*-dianizidin, koji oksidacijom prelazi u intenzivno smeđi produkt, zatim luminol, koji za vrijeme oksidacije emitira intenzivno plavo svijetlo kemiluminescencije, i indol, kojega oksidacioni produkti imaju izrazitu sposobnost fluoresciranja. Peroksidativno djelovanje organofosfornih otrova povezano je s njihovom hidrolizom, jer se za vrijeme toga djelovanja stvara hidrolizni produkt otrova. Princip tih reakcija možemo prikazati ovim kemijskim jednadžbama:



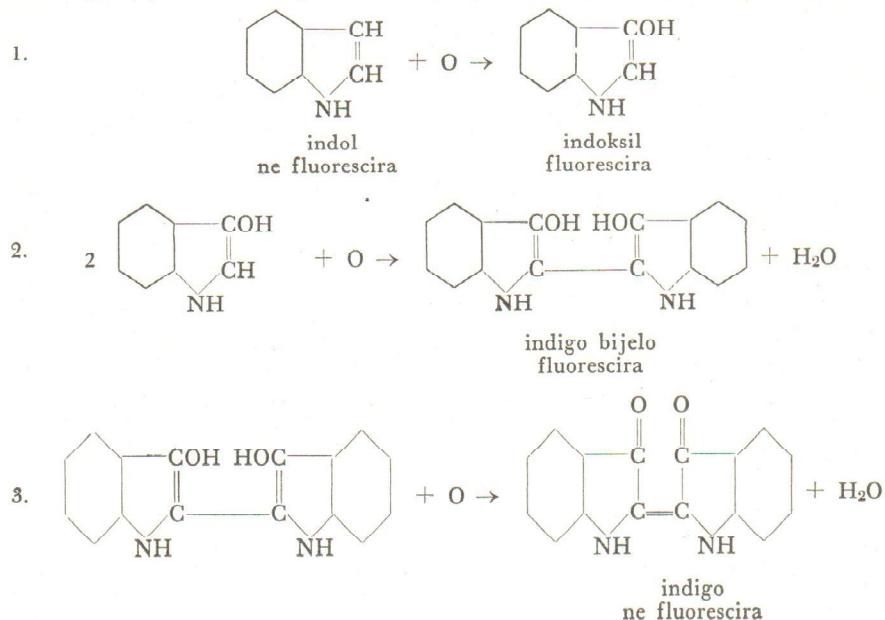
Prvom reakcijom se utjecajem vodikova peroksida na organofosforni otrov stvara perfosfonat s jakim oksidativnim sposobnostima. Taj perfosfonat oksidira (dehidrira) supstrat (*dianizidin*, luminol, indol i sl.) po reakciji 2., pri čemu se stvara diester fosforne kiseline bez acila. Kad je supstrat *o*-*dianizidin*, stvara se kao produkt dehidracije azobojilo:



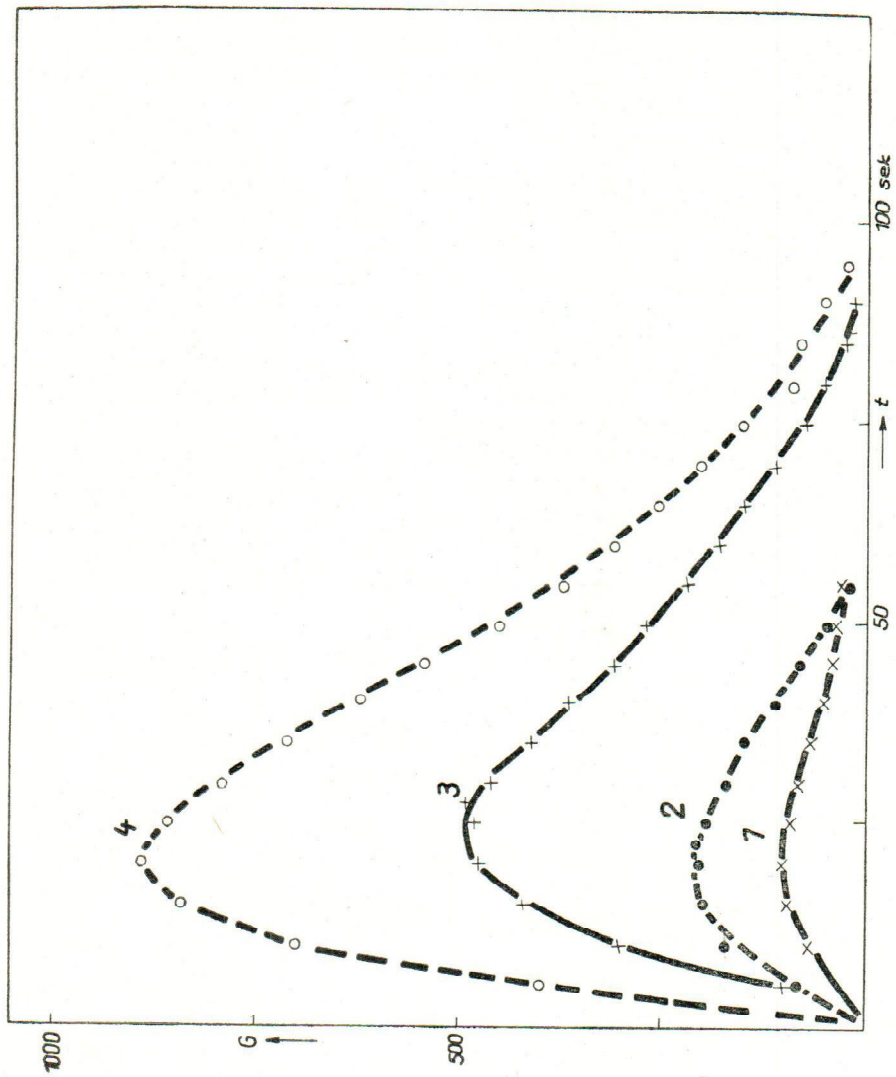
Pod određenim pokusnim uvjetima koncentracija toga bojila predstavlja mjeru za količinu katalizatora (organofosfornog otrova). Koncentracija azo-bojila se određuje spektrofotometrijski, a između dobivenih vrijednosti ekstinkcije i koncentracije organofosfornog otrova redovno postoji linearni odnos (6).

Sličan je princip kvantitativnog određivanja organofosfornih spojeva *luminolskom reakcijom* (7). U ovom slučaju perfosfonat dehidrira luminol, a za vrijeme ove reakcije se stvaraju u zamršenom reakcionom mehanizmu, podražene molekule luminola, koje emitiraju intenzivno plavo svijetlo kemiluminescencije. Intenzitet ove luminescencije se mijenja za vrijeme reakcije; najprije raste pa se nakon toga opet smanjuje. Krivulje koje prikazuju ovisnost intenziteta luminescencije o reakcionom vremenu imaju oblik koji je prikazan na slici 1. za različite koncentracije organofosfornog otrova. Maksimum intenziteta luminescencije (Gm) predstavlja mjeru za koncentraciju otrova, a obično postoji linearni odnos između tog intenziteta i koncentracije.

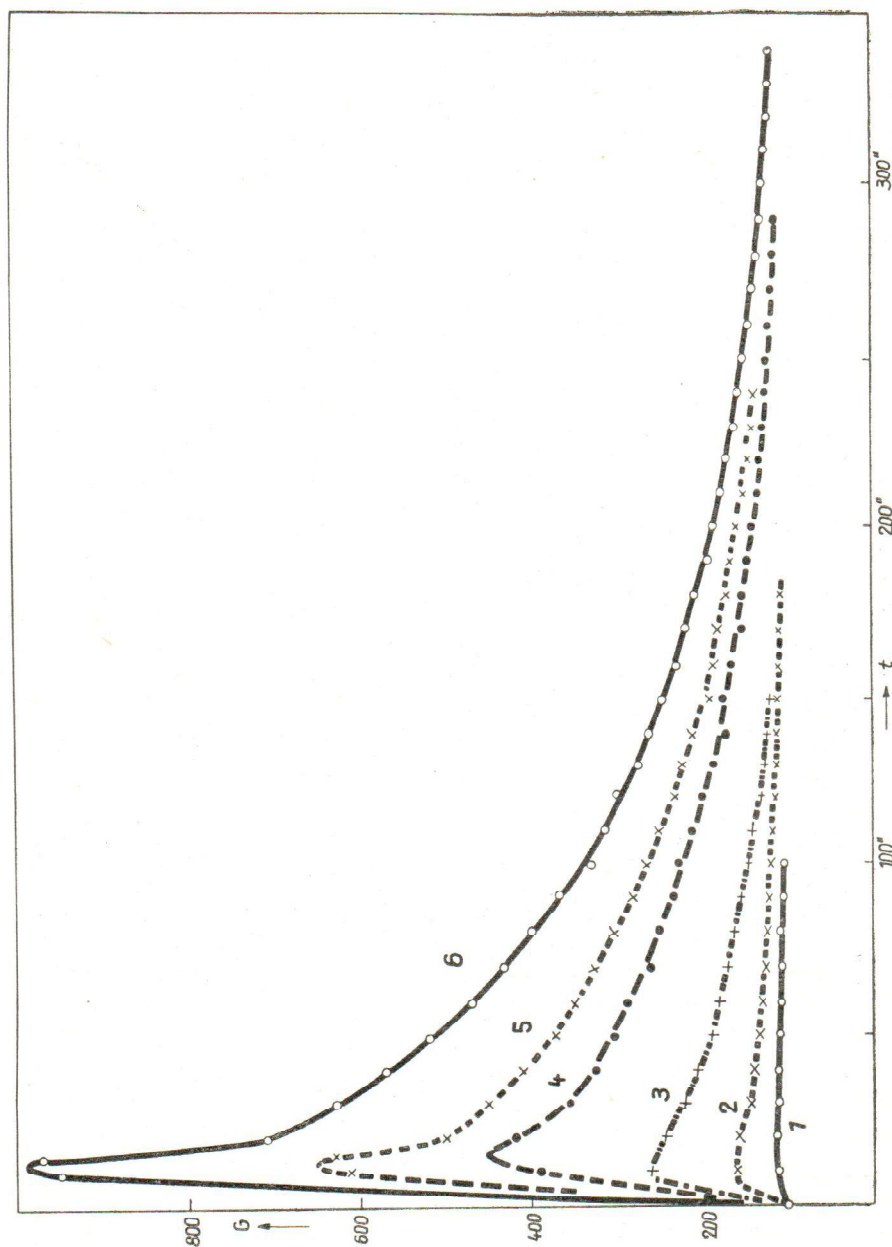
Kad se kao supstrat pri izvedbi Schönemannove reakcije upotrebljava *indol*, perfosfonat djeluje oksidativno na indol, stvara se najprije indoksil, koji se daljom oksidacijom pretvori u indigo bijelo i konačno u indigo (8). Te reakcije se zbivaju po ovim kemijskim jednadžbama:



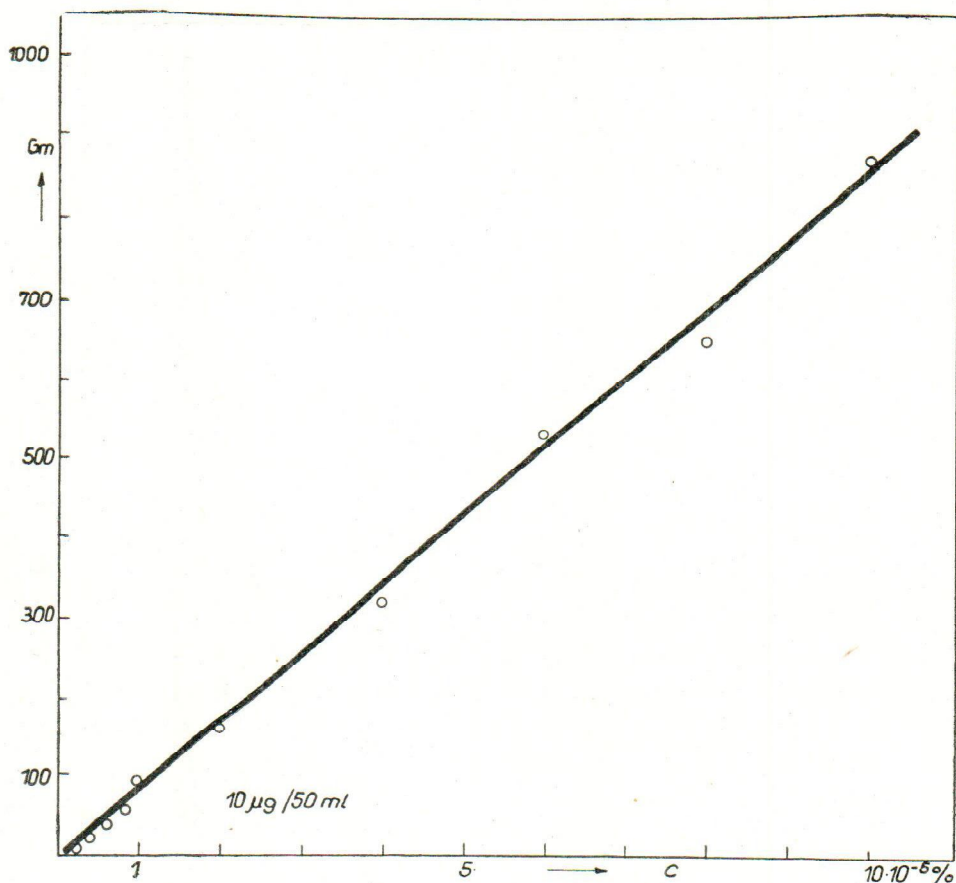
Indoksil i indigo bijelo predstavljaju međuprodukte totalne oksidacije indola, a ti međuprodukti intenzivno fluoresciraju. Intenzitet fluorescencije se mjeri za vrijeme oksidacione reakcije, a maksimum inten-



Sl. 1. - Ovisnost jakosti kemiluminescencije luminola (G) o reakcionom vremenu (t) za različite koncentracije organofosfornog otrova: 2 $\mu\text{g}/100$ ml (1), 4 $\mu\text{g}/100$ ml (2), 6 $\mu\text{g}/100$ ml (3) i 8 $\mu\text{g}/100$ ml (4)



Sl. 2. – Ovisnost jakosti fluorescencije (G) oksidacionih produkata indola o reakcionom vremenu (t) za različite koncentracije organofosfornog otrova: 4 $\mu\text{g}/100$ ml (1), 8 $\mu\text{g}/100$ ml (2), 20 $\mu\text{g}/100$ ml (3), 40 $\mu\text{g}/100$ ml (4), 60 $\mu\text{g}/100$ ml (5) i 100 $\mu\text{g}/100$ ml (6)



Sl. 3. - Ovisnost maksimalne jakosti fluorescencije (Gm) o koncentraciji otrova (c)

zитета predstavlja - kao kod luminolske reakcije - mjeru za koncentraciju organofosforinog spoja. Redovno postoji linearni odnos između tih veličina.

Intenzitetne krivulje fluorescencije oksidacionih produkata indola prikazuje za različite koncentracije otrova slika 2. Ovisnost maksimuma intenziteta fluorescencije o koncentraciji otrova daje grafički prikaz na slici 3.

Potrebno je još istaknuti da zasad još nije uspjelo postaviti vezu između kemijske konstitucije i katalitičkog djelovanja otrova u naprijed navedenim sistemima. Ima organofosforinog spojeva koji vrlo jako kataliziraju luminolsku reakciju, odnosno oksidaciju indola ili o-dianizidina, a neznatnom promjenom kemijske konstitucije može se

ta katalitička sposobnost skoro potpuno ukinuti. Neki otrovi izazivaju luminolsku reakciju, a ne kataliziraju oksidaciju indola i obratno. Općenito se može smatrati da je indolska oksidacija reakcija na koju djeluje veći broj organofosfornih otrova. Luminolska reakcija više je specifična za veoma jake otrove.

Pored ovdje navedenih supstrata Schönemannove reakcije, mogu se za identične postupke upotrebljavati i drugi organski spojevi, lako pristupačni oksidativnim utjecajima.

Literatura

1. Vandekar, M.: Arh. hig. rada 9 (1958) 35; B. Svetličić i M. Vandekar, Arh. hig. rada 9 (1958) 11.
2. Schrader, G.: Medizin und Chemie 5 (1956) 496; Pharmazie 4 (1949) 291; Die Entwicklung neuer Insektizide, Verl. Chemie, Weinheim/Bergstr. 1952; Holmstedt, B. Pharmacol. Rev. 11 (1959) 567; O'Brien, R. D.: Toxic Phosphorus Esters, Acad. Press, New York 1960.
3. Suvremena poljopriv. proizvod., Sredstva i aparati za zaštitu bilja u FNRJ, Zadruga štampa, Zagreb 1960. Ova publikacija daje i popis novijih organofosfornih pesticida za praktičku primjenu.
4. Reiner, E.: Arh. hig. rada 9 (1958) 25.
5. Pribilla, O.: Arch. Toxik. 15 (1955) 210; Kaiser, H. i Haag, K., Arch. Pharmaz. 289/61 (1956) 542.
6. Analysis of Toxic Phosphorus Compounds, Analyt. Chem. 29 (1957) 21 A.
7. Goldenson, J., Analyt. Chem. 29 (1957) 877; Weber, K., Lj. Huić i M. Mrzović, Arh. hig. rada 9 (1958) 325.
8. Gehauf, B. i Goldenson, J., Analyt. Chem. 29 (1957) 276.

Zusammenfassung

ANALITISCHE METHODEN IN DER TOXIKOLOGIE DER ORGANOPHOSPHORGIFTE

Es werden die wichtigsten analytischen Methoden zur quantitativen Bestimmung der Organophosphorgifte angeführt. Die physikalisch-chemischen Methoden (Chemiluminescenz des Luminols, Fluorescenz der Oxydationsprodukte des Indols) werden an Hand von Messergebnissen solcher Bestimmungen besprochen. Zum gegenseitigen Vergleich werden die ungefähren Werte der letalen Dosen verschiedener Gifte mitgeteilt.

Institut für gerichtliche Medizin
und Kriminalistik der medizinischen
Fakultät, Zagreb

Eingegangen am 27. XII. 1961.