

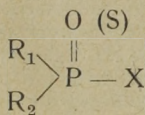
# Inszekticid foszfátészterek kimutatása és meghatározása növényi anyagokban

S Á N D I E M I L

Technikai munkatárs: K Ö V Á R I V E R O N I K A  
Országos Élelmezés- és Táplálkozástudományi Intézet, Budapest

Érkezett: 1961. augusztus 22.

A második világháború alatt Németországban és Nagy-Britanniában új-típusú *szerves foszforvegyületeket* állítottak elő, amelyek a ma ismert legtoxikusabb szintetikus anyagok közé tartoznak. Háborús célokra ezeket a szereket szerencsére nem alkalmazták, hanem a sorozat egyes képviselői gyógyszerként használatosak, elméleti enzimkémiai kutatásokra adtak lehetőséget, legfontosabb felhasználási területük a *növényvédelem* (26, 23). E vegyületek általános képlete a következő:

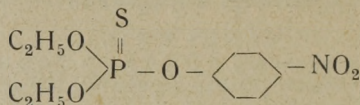


ahol a központi foszforatomhoz az  $R_1$  és  $R_2$  alkoxil-csoportok, esetleg primer vagy szekunder amin-csoportok, az  $X_3$  szerves vagy szervetlen, savas természetű gyök és egy oxigén, ill. kénatom csatlakozik. Az X csoport lehet fluor, cian, *fenil* esetleg egy második alkilfoszforsav, ill. tiofoszforsav-maradék. Mindezeknek a vegyületeknek közös tulajdonsága, hogy izeltlábiákra és gerincesekre egyaránt nagyon toxikusak és mérgező hatásukat oly módon fejtik ki, hogy az idegrendszer működésében fontos szerepet játszó *kolineszteráz-enzimet* bénítják. Bár a növényvédelemben használt típusok sokkal kevésbé toxikusak, mint a háborús célokra szánt ún. ideggázok, mérgező hatásuk mégis meglehetősen nagy — egyeseké eléri a nikotinét, vagyis halálos adagjuk emlősöknel testsúly kg-ként néhány mg-ra tehető. Ennek ellenére növényvédőszerként való felhasználásuk *élelmezésszegészségügyi és ökológiai* szempontból általában előnyösnek tekinthető, mégpedig két okból:

1. *Nem perzisztensek*, vagyis nem halmozódnak fel sem a növény felületén, vagy belsejében, sem az ember vagy haszonállat szervezetében, sem pedig élettelen tárgyain felületén, hanem viszonylag gyorsan bomlanak el hatástalan vegyületekké.
2. *Biológiai hatásmechanizmusuk* nagyon jól ismert és meglehetősen biztonságosan jelenthető ki, hogy a növényvédelemben előforduló mennyiség-határokon belül nem kell azzal számolnunk, hogy e vegyületek alkalmazásával kapcsolatban krónikus toxikus hatás léphet fel.

Az inszekticid hatású foszfátészterek egyre növekvő felhasználásával kapcsolatban az egészségügyi szerveknek és ellenőrző laboratóriumoknak súlyos feladatokat kell megoldaniuk, amelyek kiterjednek a munkaegészségügyi előírásokra, az utolsó permetezés és a betakarítás közötti kötelező várakozási idő és az élelmiszerekben megtűrhető permetmaradékok mennyiségének megszabására. Mindezek a feladatok, nem is szólva a folyamatos ellenőrzésről, a hatóanyagok bomlásának, átalakulásának, anyagcseréjének problémáiról, csak akkor oldhatók meg, ha a célnak megfelelő érzékenyséű analitikai módszerek állnak rendelkezésre.

A növényvédőszerként elsőnek bevezetett és ma is leggyakrabban használt foszforsavészterek *paration-típusúak*:



Paration, E 605

A paration-típusú hatóanyagok analitikai szempontból különösebb nehézséget nem jelentenek, mert a nitrofenil-csoport változatos kémiai módszerek alkalmazására nyújt lehetőséget. A legegyszerűbb ezek közül a lúgos hidrolízis, amely után a keletkezett nitrofenol fotometrálnak (11). Redukcióval e vegyületekből egy amin állítható elő, amely diazotálható, kapcsolható és az így képzett színezék nagy érzékenységgel fotometrálnak (3). Mindkét módszer érzékenysége elegendő ahhoz, hogy a növények felületéről oldószerekkel könnyen lemosható paration permetmaradékokat meghatározhassuk és mennyiségük csökkenését az idő függvényében követhessük (7). Egészen más a helyzet a nitrofenil-gyököt nem tartalmazó hatóanyagok esetében, mint amilyen pl. a *szisztox*, mert ezek kémiai módszerekkel csak igen nehezen mutathatók ki és meghatározásukat az is akadályozza, hogy nem maradnak a növények felületén, hanem behatolnak belsejükbe.

Az ilyen permetmaradékok *kémiai* meghatározása általában oly módon történik, hogy a növények szerves-oldószeres kivonatát hosszadalmas tisztítási eljárásoknak vetik alá, beleértve a kromatográfiás oszlopon való kezelést is, majd foszformeghatározást végeznek. A biológiai anyagokban azonban sokféle foszforvegyület fordul elő és ezért e módszerek általában túlságosan bonyolultak és sorozatosan végezendő ellenőrző vizsgálatok céljaira kevésbé felelnek meg (12, 13, 27).

Az említett nehézségek már régen arra a gondolatra vezettek, hogy az inszekticid foszforvegyületek maradékainak meghatározását *biokémiai* módszerekkel kíséreljék meg, mégpedig a kolineszteráz enzimre gyakorolt gátló hatásuk alapján. Mindezek az eljárások a *kolineszteráz-aktivitás* valamely ismert mérési módszeren alapulnak. Számos részletes összefoglaló jelent meg erről a tárgykőről (1, 8, 25), ezért itt csak vázlatosan ismertetjük az alapvető eljárásokat és az összefoglalókban még nem szereplő legújabb közleményeket.

Az enzimes foszfátészter-meghatározás legelterjedtebb módszerei a *Hestrin*-féle (9) kolineszteráz-aktivitás mérésen alapulnak. Ezek lényege az, hogy a foszfátészter-tartalmú (szükség esetén oxidációval aktivált) vizsgálati oldatot egy enzimpreparátummal, legegyszerűbb esetben emberi vérsavóval inkubálunk, majd *szubsztrátumként* ismert mennyiségű *acetilkolin* adunk hozzá. Újabb inkubáció után a bomlatlan acetilkolinlúgos hidroxilamin-oldattal *hidroxilaminsavvá* alakítjuk, melynek *ferrikomplexe* élénk vörös színű és fotometrálnak. Legújabbban ezt a módszert *Nesheim* és *Cook* (19) alkalmazta, mégpedig hét különböző hatóanyagra, közleményük külön foglalkozik az optimális inkubációs idő meghatározásával. *Jane McCaulley és Cook* (16) megállapította, hogy az egyes hatóanyagok a különböző eredetű kolineszteráz-preparátumokra különbözőképpen hatnak – ezt a jelenséget a szerzők specifikus meghatározási eljárások kidolgozására kívánják kihasználni. *D. F. McCaulley és Cook* (15) szintén *Hestrin* módszerét alkalmazták, enzimmorrásként házilégyfejékből készült homogénizátum szolgált. Jó egyezést állapítottak meg az enzimaktivitás csökkenése és a legyek mortalitása között. E szerzők összesen kilenc különböző hatóanyagra terjesztették ki vizsgálataikat.

A másik igen elterjedt módszer *Michel* (17) eljárásán alapul, amely szerint az enzimaktivitást az acetilkolinból lehasadó ecetsav hatására bekövetkező *pH-eltolódásból* állapítják meg. Ezt a módszert az utóbbi években *Zweig és Archer* (30) alkalmazta foszfátészter-hatóanyagok meghatározására, mégpedig különböző enzimpreparátumok igénybevételével. Hasonlóképpen járt el *Boyd* (5) is, aki a legnagyobb részletességgel írja le a tisztítási és oxidációs műveleteket. Jelentős *Patchell és Batchelder* (20) munkássága is, mert tizenegy különböző foszforvegyületre terjed ki és meghatározza azokat a hatóanyag koncentrációkat, amelyek az enzimaktivitást 50%-kal csökkentik. E szerzők a módszert oly módon kívánják specifikussá tenni, hogy a hatóanyagokat redukáló, oxidáló-redukáló és erélyes oxidáló hatásoknak vetik alá és így módon különböző mértékű aktivitáscsökkenést idéznek elő.

A felsorolt két alapvető módszer közös hátránya, hogy az enzimreakció alatt a körülmények *nem lehetnek optimálisak*, mert vagy a szubsztrátum koncentrációja változik nagymértékben (*Hestrin*-féle módszer), vagy pedig a közeg *pH*-ja tolódik el (*Michel*-féle módszer). Az optimális körülmények állandó fenntartására két út kínálkozik: a keletkező *ecetsav folyamatos semlegesítése, titrálása és bikarbonát-puffer alkalmazása*, amelyből az ecetsav gáz halmazállapotú széndioxidot szabadít fel. Mindkét eljárás állandó *pH*-értékű közeget tud biztosítani, miközben a szubsztrátum, az acetilkolin főlegben alkalmazható, tehát koncentrációja gyakorlatilag állandónak tekinthető.

Az ecetsav folyamatos titrálása manuálisan nehezen hajtható végre, mégis számos esetben alkalmazták eredményesen, legutóbb *Yip és Cook* (29). Az új-típusú automatikus titráló berendezésekkel („*pH*-stat”) igen elegáns módon lehetne ezt a módszert alkalmazni, lásd pl. *Jorgensen* (10) kolineszteráz-aktivitás méréseit, de nincsen tudomásunk róla, hogy foszfátészter-hatóanyagokra már adaptálták volna.

A *Nachmanson* (18) szerint végzett kolineszteráz-aktivitás meghatározás a bikarbonát-pufferből felszabaduló széndioxid volumetriás mérésén alapul, ami *Warburg*-készülékkel történhet. Ezt a módszert legutóbb *Augustinsson és Jonsen* (2), *Schaumann* (24) és *Yip és Cook* (29) alkalmazta foszforsavészter-hatóanyagok meghatározására, mégpedig kiváló eredménnyel. Sajnos, ezek az eljárások sorozatvizsgálatokra kevéssé alkalmasak, mert a *Warburg*-készülék nagyon költséges, kezelése körülményes és rajta egyszerre csak korlátolt számú minta vizsgálható.

Végül meg kell említeni *Cook* (6) *papírkromatográfiás* vizsgálatait, amelyekben a kromatográfiásan elválasztott hatóanyagokat *in situ* aktiválja, enzimpreparátummal, acetilkolinnal és *pH*-indikátorral kezeli és így hívja elő az egyes vegyületeknek megfelelő foltokat. Ennek az eljárásnak nagy az érzékenysége, de csak a hatóanyagok mennyiségének nagyságrendi megbecslésére alkalmas.

A következőkben két új módszerről kívánunk beszámolni, amelyek közül az egyik permetmaradékok hatóanyag-tartalmának gyors megbecslésére alkalmas, a másik pedig kvantitatív meghatározásukra.

#### Szükséges eszközök és anyagok

*Turmix*, vagy más vele egyenértékű homogenizátor,  
*ultratermosztát*, olyan méretű vízfürdővel, hogy 1–2 literes főzőpoharat, ill. kémcső-állványt lehessen beleállítani. Bármilyen típusú  $37 \pm 1$  C° és  $50 \pm 1$  C° hőmérsékletre szabályozható vízfürdő felhasználható,  
*pH-mérő készülék*, üveg- és kalomel-elektrodával,  
*üveglapok* 25 × 30 cm nagyságúak, jó minőségű ablaküvegből,  
*papiros ragasztószalag*, 3–4 cm széles,

*kvarchomok*, bármilyen eredetű, pormentes, vízzel mosott és megszáritott homok használható,

*kolineszteráz preparátum*, valamely kórház vagy közegészségügyi- járványügyi állomás szerológiai laboratóriumából beszerezhető friss emberi verlepényről leöntjük a savót, majd kvarchomokkal és kétszeres mennyiségű vízzel dörzscsészében eldörzsöljük. A folyadékot dekantálással, kevés vízzel a homokot utánöblítve, nagyméretű centrifuga-csővekbe öntjük és 1500/perc fordulatszámmal centrifugálva a homoktól és a durva sejtfal-részektől megszabadítjuk. A kissé zavaros folyadékot az eredeti verlepény súlyának megfelelően vízzel tízszeresen felhígítjuk és hűtőszekrényben legfeljebb két hétig tároljuk,

*agar-agar*, bakteriológiai minőség,

*detergens-oldat*, 1%-os Ultra mosószer, vagy Tween 80,

*brómtimolkék*, p. a.,

*brómtimolkék-oldat*, 0,1%-os, etanolos,

*brómtimolkék-puffer oldat*, 0,04%-os, pH = 7,7,

*nátriumhidroxid-oldat*, kb. 0,1 mol/liter,

*brómvíz*, telített. Célszerű az elemi brómot 2–5 ml-es ampullákba kb. 1 ml-ként szétosztani és leforrasztva tárolni. Egy ampulla tartalmát kb. 50 ml vízhez adjuk és becsiszolt dugós üvegben sötétben legfeljebb két hétig tároljuk,

*nátriumtioszulfát-oldat*, kb. 0,1 mol/liter,

*acetilkolin-klorid-oldat*, 0,4%-os. Legmegbízhatóbb a 0,1 vagy 0,2 g-os „Roche” vagy más gyártmányú száraz ampullákból készült vizes oldat, amely hűtőszekrényben két hétig tárolható. Szükség esetén a kristályos formában beszerezhető acetilkolinbromid is használható, de ez rendszerint szabad ecetsavat is tartalmaz. Ezért belőle 1%-os vizes oldatot készítünk, amit végső térfogatra való kiegészítés előtt brómtimolkék-indikátor jelenlétében nátriumhidroxid oldattal semlegesítünk (zöldeskékre titrálunk). Az ilyen oldatot frissen kell vizsgálat előtt elkészíteni,

*izopropanol*, puriss.,

*kloroform*, puriss.,

*nátriumsulfát*, sicc., puriss.,

*puffer-oldatok*, a pH-mérő beállítására,

*hatóanyag törzsoldatok*. A kvantitatív meghatározásoknál ismert mennyiségű hatóanyagot tartalmazó összehasonlító oldatokra van szükség. Leghelyesebb, ha a törzsoldatokat ugyanabból a növényvédőszer preparátumból készítjük, mint amellyel a permetezés történt. Tapasztalunk szerint az etanolos törzsoldatok, melyeknek töménysége 1 mg/ml, sötétben tárolva hetekig, vagy hónapokig bomlás nélkül tarthatók el. A hígabb összehasonlító oldatokat vízzel történő hígítással frissen készítjük el.

### Figyelmeztetés

Az itt leírt enzimes meghatározási módszerek nagyon érzékenyek. Ezért mindent meg kell tenni, hogy eszközeinket és oldatainkat ne szennyezzük be a hatóanyagokkal. A használt üvegeszközöket, pipettákat híg nátriumhidroxid-oldattal töltött üveghengerekbe tesszük, a többi eszközt, pl. a homogenizátort szintén híg lúg-oldattal, majd vízzel mossuk át minden egyes minta feldolgoása után. Különösen vigyáznunk kell a „tömény” (1 mg/ml) hatóanyag-törzsoldatokkal végzett munka során, mert ezek egyes esetekben egymilliószor

nagyobb koncentrációban tartalmazzák a hatóanyagokat, mint amennyi módszerünkkel kimutatható és így ezekből egy csepp is elegendő összes eszközeink és oldataink olymértékű beszennyezésére, hogy a további munka lehetetlenné válik.

### Gyors módszer a hatóanyag-maradékok megbecslésére

A foszfátészter-típusú növényvédőszerrel dolgozó munkások vérenek kolineszteráz-aktivitását munkaegészségügyi okokból rendszeresen ellenőrizni kell. Erre a célra különböző eljárásokat fejlesztettek ki, amelyek közül az egyik legegyszerűbb az, amelyet *Limperos és Ranta* (14), valamint *Wolfsie* (28) nyomán *Barnes* (4) ajánl és amelyet Magyarországon is bevezettünk (21). Ez a vizuális kolorimetrián alapuló módszer, megfelelő módosításokkal, permetmaradékok megbecslésére a következőképpen alkalmazható:

1. 100 g növényi anyagot késsel feldarabolunk és 100 ml kloroformmal turmixban alaposan elkeverünk. A keletkezett pépet kloroformmal megnedvesített redősszűrőre öntjük és így vízmentes szűredéket kapunk, amelyből kb. 20 ml elegendő a további műveletekhez. Szükséges esetén ezt az oldatot kevés nátriumsulfáttal víztelenítjük.

2. A kloroformos szűrletből 0,1 1, 2, 5 és 10 ml-t kis főzőpoharakba mérünk és az oldószert levegőárammal elűzzük. A poharakban levő maradékokat, amely különböző, vízben nem oldódó anyagokat, pl. viaszokat tartalmaz, 0,5 ml vizes detergens oldattal, kis üvegbot segítségével eldörzsöljük. A szuszpenzióhoz ezután 0,2 ml brómvizet adunk, a keveréket 30 percig állni hagyjuk, majd a fölös brómot 0,2 ml nátriumtiosulfát oldattal megkötjük. A brómos-tiosulfátos kezelés csak a tiosulfát-típusú hatóanyagok esetében szükséges (lásd következő fejezet).

3. A poharakba ezután 1 ml kolineszteráz-preparátumot mérünk és a keveréket szobahőmérsékleten 30 percig állni hagyjuk.

4. A keverékekből 1–1 ml-t kémcsövekbe mérünk, majd hozzáadunk 3 ml brómtimolkék-puffer-oldatot és 1 ml acetilkolinklorid-oldatot. Alapos összekeverés után a kémcsöveket 37 C°-os vízfürdőbe állítjuk.

5. A fenti műveleteket növényi kivonat nélkül, valamint ha lehetséges a vizsgálttal azonos fajtájú és érettségi fokú, de nem permetezett növények kivonattal is elvégezzük. Hasonlóképpen járunk el ismert mennyiségű, hozzáadott, hatóanyag jelenlétében is, tekintetbe véve a 1. táblázat adatait.

6. 30–40 perces várakozás után a kémcsöveket jó világítás mellett, fehér háttér előtt megsejleljük. Az intakt enzimet tartalmazó csövek színe zöldes-sárgától narancssárgáig terjed, a gátolt enzimet tartalmazó kémcsövek színe nem változik. A hatóanyagmennyiségek megbecslése úgy történik, hogy tekintetbe vesszük a hígításokat, vagyis a vizsgálatnál felhasznált kloroformos oldát térfogatát és az ismert hatóanyagmennyiségekkel végzett vizsgálatok eredményét.

### 1. táblázat

A szövegben közölt feltételek mellett enzimgátlást okozó hatóanyagmennyiségek Tájékoztató adatok

Paration, E 605 .....	0,03 $\mu$ g
Metil-paration .....	0,3 $\mu$ g
Chlorthion .....	0,3 $\mu$ g
Systox .....	2,5 $\mu$ g
Metasystox .....	2,5 $\mu$ g
Tinox .....	2,5 $\mu$ g

## A hatóanyagok meghatározása az agar-diffúziós eljárással

Az enzimreakciók rendkívüli érzékenységét előnyösen köthetjük össze az antibiotikum-meghatározásoknál használatos agar-diffúziós eljárások kvantitativ jellegével és így az inszekticid foszfátészterek permetmaradékait sorozatvizsgálatokra igen alkalmas módszerrel határozhatjuk meg (22).

E módszer alapelve az, hogy egy kolineszteráz preparátumot, pH-indikátort és agar-agarot tartalmazó oldat pH-értékét kb. 8-ra állítjuk be és ezután belőle lemezt öntünk. A lemezekbe készített lyukakba mérjük be a vizsgálati oldatot. Kellő ideig történő diffúzió után a lemezre acetilkolin-oldatot öntünk, amely bediffundál az agar lemezbe és belőle az enzim hatására ecetsav szabadul fel. Az intakt enzimet tartalmazó helyeken a lemez színe ekkor megváltozik, míg a vizsgálati oldatban levő enzimgátló anyag mennyiségével arányos átmérőjű gátlási gyűrűk keletkeznek a lyukak körül, ahol az indikátor színe nem változik meg.

1. A vizsgálati anyag előkészítése: A vizsgálandó növényi részek (gyümölcs, zöldség) legalább 1 kg-os gondosan vett átlagmintáját késsel apróra daraboljuk és belőle 100 g-ot a homogenizátorba mérünk. Hozzáadunk 50–100 ml vizet (attól függően, hogy milyen nagy a vizsgálandó anyag víztartalma) és a homogenizátort 3–5 percig működtetjük, mialatt egyenletes pép keletkezik. A pépből 10 g vizsgálati anyagnak megfelelő mennyiséget, vagyis 15–20 g-ot 50 ml-es főzőpohárba mérünk és hozzáadunk 20 ml izopropanolt. Üvegbottal összekeverjük a tömeget, majd apránként állandó kevergetés közben hozzáadunk kb. 15 g száraz nátriumsulfátot. A keverést addig folytatjuk, amíg a tömeg felületén az izopropanolos, növényi festékektől színezett fázis tisztán elválik. Ebből az oldatból 1 ml-t kémcsőbe pipettázunk.

2. A kivonatok és összehasonlító oldatok aktiválása és előkészítése: A növényvédelemben használatos foszfátészterek közül számos csak a szervezetben alakul át kolineszteráz-bénítő hatóanyaggá. Ezeket oxidációval kell *in vitro* aktiválással rendelkező anyagokká átalakítani és csak ezután lehet őket a jelen módszerrel meghatározni. (Lásd: 2. táblázat.)

Ha a vizsgálandó növényi termékeket olyan anyaggal permetezték, amely aktiválásra szorul, akkor a kémcsövekbe mért izopropanolos kivonathoz 0,2 ml brómvizet adunk, majd 30 perces várakozás után a fölös mennyiségben je-

### 2. táblázat

Az összehasonlító hatóanyag-oldatok koncentrációinak szélső értékei. A \*-gal megjelölt anyagok oxidációs aktiválást nem igényelnek.

	Koncentráció mikrogramm/ml
Paration .....	0,01 – 500
Metilparation .....	0,1 – 500
Chlorthion .....	1,0 – 1000
Isochlorthion .....	1,0 – 1000
Phenkapton .....	0,5 – 1000
Melathion .....	0,5 – 1000
Systox* .....	1,0 – 200
Metasystox* .....	1,0 – 200
Tinox* .....	1,0 – 200
Phosdrin* .....	0,5 – 1000

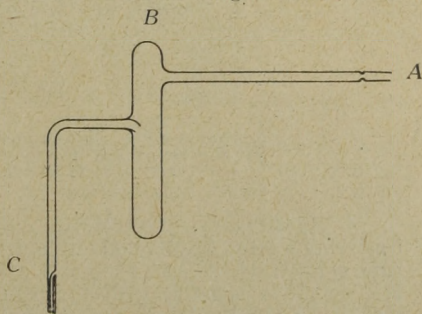
lenlevő bróm megkötésére 0,2 ml nátriumtioszulfát-oldatot. Hasonlóképpen kezeljük a hatóanyag-törzsoldatokból készített összehasonlító oldatok egy-egy ml-nyi mennyiségeit. Az összehasonlítás céljait szolgáló hígítások szélső értékeit a 2. táblázat adja meg. Az összehasonlító oldatokat előnyös olyan sorozatokban készíteni, amelyekben az egyes hígítások egymásnak tízszeresei (pl. 100–10–1–0,1 mikrogramm/ml).

Ezután a vizsgálati oldatokat semlegesítjük, vagyis a növényből származó, valamint esetleg a brómos oxidáció folyamán keletkező savtermészetű anyagokat lúggal megkötjük. Ez úgy történik, hogy egy csepp brómtimolkék indikátor-oldat jelenlétében az oldatot nátriumhidroxid oldattal zöld színárnyalat eléréséig titráljuk. A minták térfogatát ekkor ismert mennyiségre egészítjük ki, ez általában 2 ml lehet. (A kiegészítés előtt a minta térfogata attól függ, hogy volt-e szükség aktiválásra és attól, hogy mennyi lúgot kellett felhasználnunk a semlegesítésre. Sorozatvizsgálatok esetén, amikor általában azonos összetételű növényi anyagot dolgozunk fel, a minták azonos térfogatra való kiegészítése gyorsan végezhető művelet. Előnyös, ha a tioszulfát- és nátriumhidroxid-oldatot, valamint a kiegészítésre való vizet automata bürettából adagoljuk).

3. Az agar lemezek elkészítése és a vizsgálati oldatok bemerése: A  $25 \times 30$  cm-es üveglapokat a papíros-ragasztószalaggal oly módon keretezzük be, hogy szélükön kb. 1,5 cm magas, az üvegre merőleges peremet alkossunk, vigyázva arra, hogy a keret résmentes legyen. Ezután a lemezeket gondosan vízszintezett sík asztallapra helyezük, vagy pedig egyenként vízszintezzük őket.

1200 ml össztérfogatra számítva (három lemezre elegendő mennyiség) a következőképpen készítjük el az agar-oldatot: 960 ml vízben, állandó keverés mellett forralás közben oldunk 20 g agar-agar. Ha az oldat feltisztul, a poharat az ultratermostát vízfürdőjébe állítjuk és a folyadékot  $50 \pm 1$  C°-ra hűtjük. Közben 120 mg brómtimolkéket néhány ml nátriumhidroxid-oldattal eldörzsölünk és kevés vízzel az agar-oldatba öblítjük. Ha az oldat hőmérséklete 50 C°-ra hűlt (amit felkeverés után hőmérővel közvetlenül kell ellenőrizni), hozzáadunk 240 ml kolinszteráz preparátumot. A megfelelő puffer-oldatokkal (pl. pH 7 és 9) 50 C°-on beszabályozott pH-mérő készülék ellenőrzésével az agar-oldathoz állandó keverés mellett nátriumhidroxid-oldatot adagolunk, míg a pH-érték eléri a 7,8–7,9 értéket. Megfelelő gyakorlat után ez a művelet műszeres ellenőrzés nélkül is elvégezhető: a kívánt pH-érték elérését az jelzi, hogy az oldaton levő hab, alapos keverés után kék színárnyalatot mutat. A pH beállítását jól be kell gyakorolni és gyorsan végezni, mert ellenkező esetben az oldat túlságosan lehűlhet és a lemezöntés ilyenkor nem sikerül.

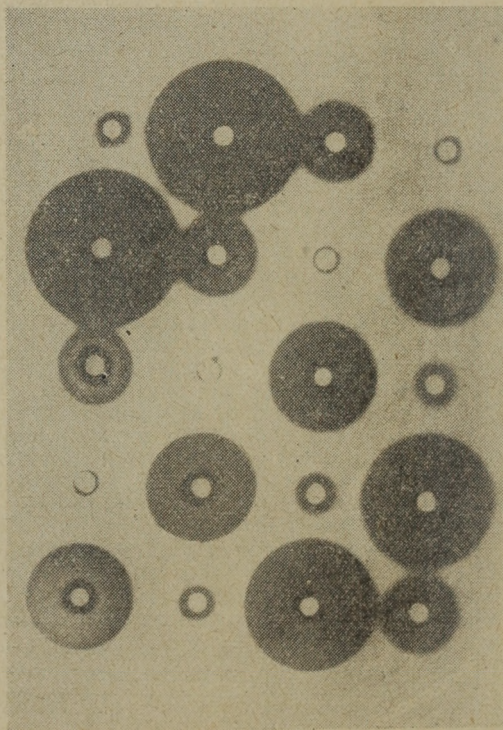
Az üveglemezek mindegyikére 400 ml oldatot öntünk egy melegvízzel előre felmelegített mérőhenger segítségével. Az oldat zavaró habzását néhány csepp etiléterrel szüntetjük meg. Az agar-kocsonya megdermedéséig nem nyúlunk a lemezekhez. Ezután egymástól 5 cm távolságra 8–9 mm átmérőjű lyukakat készítünk a lemezbe, összesen  $4 \times 5$ -öt. Előnyös, ha papírosra egy megfelelő sablont készítünk, amit a lemezek alá helyezhetünk és így megkönnyítjük a lyukak szabályos elhelyezését. A lyukakat bármily alkalmas eszközzel elkészíthetjük, pl. dugófúróval, de legkönnyebben egy, a laboratóriumunkban jól bevált kis üvegeszközzel érünk célt (lásd 1. ábra).



1. ábra. Üvegeszköz lyukak készítésére az agar-agar lemezbe: A) Csatlakozás a vízlégsvattyúhoz; B) Tartály; C) A levegő szabad beáramlását biztosító cső

Mindezeket a műveleteket, valamint a lemezek további tárolását olyan helyiségben végezzük, amelynek levegője sav- és ammóniák-gőzöktől mentes. Előnyös, ha a hőmérséklet  $20 - 22\text{ C}^\circ$  és az atmoszféra vízgőzzel van telítve, egy más célokra nem használt zárt vegyifülke jól megfelel a célnak.

A lyukakba a vizsgálati oldatokból  $0,1\text{ ml}$ -nyi mennyiségeket mérünk, minden beméréshez friss pipettát használva. Ezután a lemezeket  $18\text{ óra}$  hosszat állni hagyjuk, ezalatt a diffúzió eléri a kellő mértéket.



2. ábra. A gátlási gyűrűk kontakt másolata. Hatóanyag: paration. Hatóanyag mennyiségek  $0,1\text{ ml}$  oldatban:  $0; 0,003; 0,03; 0,3; 3; 30$  mikrogramm (kicsinyítve)

4. Az előhívás és az eredmények értékelése: A diffúziós periódus letelte után a lemezekre  $50\text{ ml}$  acetilkolin-klorid-oldatot öntünk oly módon, hogy egyenletesen lepje el őket. Kb.  $30$  perc várakozás után már nagyon jól láthatók a zöldeskéken áttetsző diffúziós gátlási gyűrűk, a lemez többi része narancssárga színű és átlátszatlan (az átlátszatlanság oka egyrészt az, hogy savas közegben a brómtimolkék kevésbé oldódik, másrészt pedig az, hogy a kolineszteráz-preparátum valamely komponense savas pH-értékeknél kicsapódik). A gátlási gyűrűk hosszú ideig láthatók, de az értékelést az előhívás elkezdése után  $45$  percen belül kell elvégezni,



mert a gátlási gyűrűbe a környezetből ecetsav diffundál, ami lassan csökkenti átmérőjüket.

Az értékelést legegyszerűbben úgy végezhetjük, hogy a lemezek alá, fehér háttér előtt, átlátszó, mm beosztású vonalzót csúsztatunk és ennek segítségével leolvassuk a gyűrűk átmérőjét. Tartós képet állíthatunk elő a lemezekről úgy, hogy alájuk  $24 \times 30$  cm-es kemény gradációjú brómezüst nagyító-papírost helyezzünk és kb. 2 m magasságból néhány másodpercre 40 wattos izzó segítségével átvilágítjuk őket, s a felvételt előhívjuk. Az így készült kontakt másolatok igen pontos értékelést tesznek lehetővé. (Lásd 2. ábra.)

A kalibrációs görbék felrajzolása úgy történik, hogy a gátlási gyűrűk átmérőjét a koncentrációk, vagy az abszolút hatóanyag-mennyiségek logaritmusával szemben ábrázoljuk. Példaképpen ilyen görbét közlünk a 3. ábrán. Mivel az eredmények az agarlemez összetételétől, a hatóanyag minőségétől és más tényezőktől is függenek, ajánlatos minden laboratóriumban saját kalibrációs görbéket felvenni. Ilyenek birtokában, tapasztalataink szerint, az eredmények kitűnően reprodukálhatók.

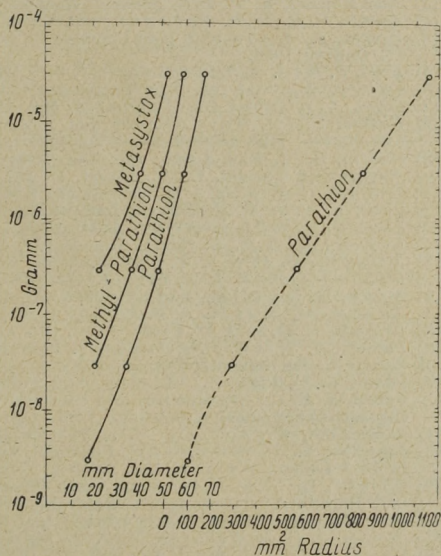
### Megjegyzések

A paration-származékok alkoholos törzssoldatai, sötétben tárolva hónapokig bomlás nélkül eltarthatók.

A gátlási gyűrűk méretét az alkalmazott oldószer (víz, metanol, etanol, izopropanol) érdekes módon nem befolyásolja. Az agar-agar koncentráció változtatásának (1,4–2,2%) szintén alig van hatása. A vérpreparátum mennyiségének változtatása azonban jól mérhető effektussal jár: minél több vér van jelen, annál kisebbek a gátlási gyűrűk.

A kalibrációs görbék első megközelítésben egyeneseknek látszanak, ha azonban a méréseket széles koncentrációs határok között végezzük – ahogyan ezt pl. a parationnal tehetjük – és a legnagyobb gondossággal járunk el, akkor jól látható a görbék parabolikus alakja. Kivételt csak a legkisebb gátlási gyűrűk képeznek (a parationnal kb. 0,01 mikrogrammig), amelyek valamivel nagyobbak a vártnál, ami valószínűleg az oldószer hígító hatásának következménye, valamint annak, hogy a vizsgálati oldatokat az agarlemezre nem valamely dimenzió nélküli mértani helyére visszük fel, hanem a 8 mm átmérőjű lyukba pipettázzuk. A görbék parabolikus alakját bizonyítja, hogy félogaritmusos papíron ábrázolva a sugarak négyzetét egyenest képeznek (3. ábra).

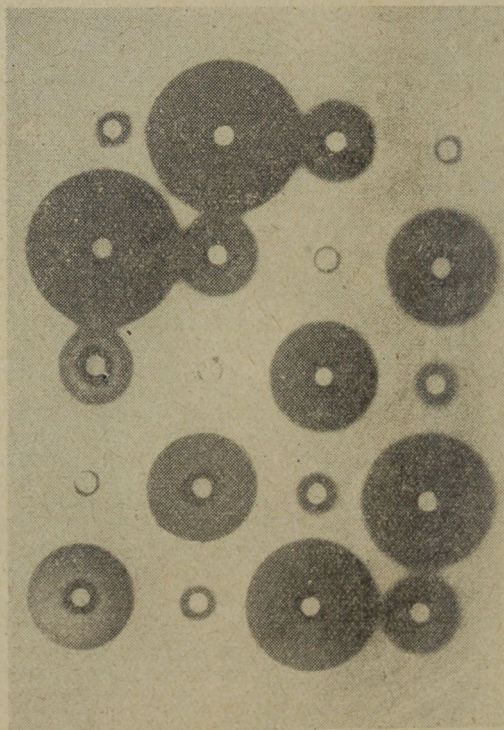
A gyümölcsökből (alma, körte) való extrakciós eljárás jó hozamú, hozzáadott hatóanyag mennyiségek 90–100%-ban nyerhetők vissza.



3. ábra. Paration, metil-paration, metasystox kalibrációs görbéi. A mennyiségek 0,1 ml vizsgálati oldatban értendők. Kihuzott vonalak: gátlási gyűrűk átmérője mm-ben; szaggatott vonal: a sugarak négyzete

Mindezeket a műveleteket, valamint a lemezek további tárolását olyan helyiségben végezzük, amelynek levegője sav- és ammóniák-gőzöktől mentes. Előnyös, ha a hőmérséklet 20 – 22 C° és az atmoszféra vízgőzzel van telítve, egy más célkra nem használt zárt vegyifülke jól megfelel a célnak.

A lyukakba a vizsgálati oldatokból 0,1 ml-nyi mennyiségeket mérünk, minden beméréshez friss pipettát használva. Ezután a lemezeket 18 óra hosszat állni hagyjuk, ezalatt a diffúzió eléri a kellő mértéket.



2. ábra. A gátlási gyűrűk kontakt másolata. Hatóanyag: paration. Hatóanyag mennyiségek 0,1 ml oldatban: 0; 0,003; 0,03; 0,3; 3; 30 mikrogramm (kicsinyítve)

4. Az előhívás és az eredmények értékelése: A diffúziós periódus letelte után a lemezekre a 50ml acetilkolinikloridoldatot öntünk oly módon, hogy egyenletesen lepje el őket. Kb. 30 perc várakozás után már nagyon jól láthatók a zöldeskéken áttetsző diffúziós gátlási gyűrűk, a lemez többi része narancssárga színű és átlátszatlan (az átlátszatlanság oka egyrészt az, hogy savas közegben a brómtimolkék kevésbé oldódik, másrészt pedig az, hogy a kolineszteráz-preparátum valamely komponense savas pH-értékeknél kicsapódik). A gátlási gyűrűk hosszú ideig láthatók, de az értékelést az előhívás elkezdése után 45 percen belül kell elvégezni,

mert a gátlási gyűrűbe a környezetből ecetsav diffundál, ami lassan csökkenti átmérőjüket.

Az értékelést legegyszerűbben úgy végezhetjük, hogy a lemezek alá, fehér háttér előtt, átlátszó, mm beosztású vonalzót csúsztatunk és ennek segítségével leolvassuk a gyűrűk átmérőjét. Tartós képet állíthatunk elő a lemezekről úgy, hogy alájuk  $24 \times 30$  cm-es kemény gradációjú brómeüst nagyító-papírost helyezzünk és kb. 2 m magasságból néhány másodpercre 40 wattos izzó segítségével átvilágítjuk őket, s a felvetelt előhívjuk. Az így készült kontakt másolatok igen pontos értékelést tesznek lehetővé. (Lásd 2. ábra.)

A kalibrációs görbék felrajzolása úgy történik, hogy a gátlási gyűrűk átmérőjét a koncentrációk, vagy az abszolút hatóanyag-mennyiségek logaritmusával szemben ábrázoljuk. Példaképpen ilyen görbéket közlünk a 3. ábrán. Mivel az eredmények az agarlemez összetételétől, a hatóanyag minőségétől és más tényezőktől is függenek, ajánlatos minden laboratóriumban saját kalibrációs görbéket felvenni. Ilyenek birtokában, tapasztalataink szerint, az eredmények kitűnően reprodukálhatók.

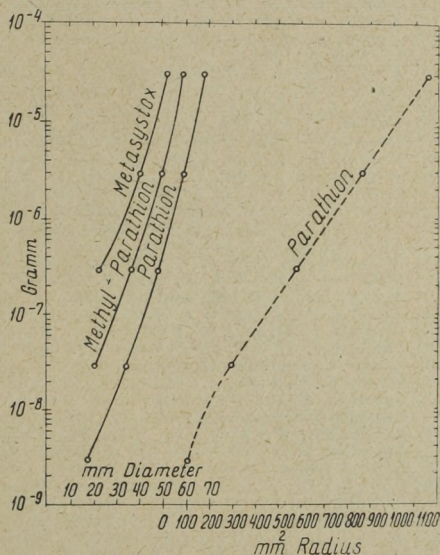
### Megjegyzések

A paration-származékok alkoholos törzsoldatait, sötétben tárolva hónapokig bomlás nélkül eltarthatók.

A gátlási gyűrűk méretét az alkalmazott oldószer (víz, metanol, etanol, izopropanol) érdekes módon nem befolyásolja. Az agar-agar koncentráció változtatásának (1,4–2,2%) szintén alig van hatása. A vérpreparátum mennyiségének változtatása azonban jól mérhető effektussal jár: minél több vér van jelen, annál kisebbek a gátlási gyűrűk.

A kalibrációs görbék első megközelítésben egyeneseknek látszanak, ha azonban a méréseket széles koncentrációs határok között végezzük – ahogyan ezt pl. a parationnal tehetjük – és a legnagyobb gondossággal járunk el, akkor jól látható a görbék parabolikus alakja. Kivételt csak a legkisebb gátlási gyűrűk képeznek (a parationnal kb. 0,01 mikrogrammig), amelyek valamivel nagyobbak a vártnál, ami valószínűleg az oldószer hígító hatásának következménye, valamint annak, hogy a vizsgálati oldatokat az agarlemezre nem valamely dimenzió nélküli mértani helyére visszük fel, hanem a 8 mm átmérőjű lyukba pipettázzuk. A görbék parabolikus alakját bizonyítja, hogy fellogaritmusos papíron ábrázolva a sugarak négyzetei egyenes képeznek (3. ábra).

A gyümölcsökből (alma, körte) való extrakciós eljárás jó hozamú, hozzáadott hatóanyag mennyiségek 90–100%-ban nyerhetők vissza.



3. ábra. Paration, metil-paration, metasystox kalibrációs görbéi. A mennyiségek 0,1 ml vizsgálati oldatban értendők. Kihúzott vonalak: gátlási gyűrűk átmérője mm-ben; szaggatott vonal: a sugarak négyzete

Az inszekticid foszforsav-észterek enzimes meghatározása még bizonyosan sokat fejleszthető, különösen ami a specificitást illeti. E módszerek érzékenysége, reprodukálhatósága, pontossága és végül egyszerűsége viszont már kielégítőnek látszik. A szerző véleménye, hogy a kromatográfia és az agar-diffúziós módszer együttes alkalmazása lehetne a legközelebbi célszerű továbbfejlesztési lépés.

#### I R O D A L O M

- (1) Augustinsson, K. B.: „Assay Methods for Cholinesterases” in D. GLICK: „Methods of Biochemical Analysis” Vol. V. 1–63. New York 1957.
- (2) Augustinsson, K. B. és G. Jonsson: Acta agric. scand. 7, 165, 1957.
- (3) Averell, P. R. és M. V. Norris: Anal. Chem. 20, 753, 1948.
- (4) Barnes, J. M.: Toxicité pour l'homme de certains insecticides” WHO Monograph No. 16. Geneve 1954.
- (5) Boyd, G. R.: J. Agric. Food Chem. 7, 615, 1959.
- (6) Cook, J. W.: Ass. Off. Agr. Chem. 38, 150, 1955.
- (7) Dénes A. és Botond Gy.: Nahrung 2, 493, 1958.
- (8) Fukuto, T. R.: „The Chemistry and Action of Organic Phosphorus Insecticides” in Advances of Pest Control Research, Vol. I. New York 1957.
- (9) Hestrin, S.: J. Biol. Chem. 180, 249, 1949
- (10) Jorgensen, K.: Scand. J. clin. Invest. 11, 282, 1959.
- (11) Ketelaar, J. A. A. és J. E. Hellingman: Anal. Chem. 23, 646, 1951.
- (12) Laws, E. O. és D. J. Webley: Analyst 84, 28., 1959.
- (13) Laws, E. Q. és D. J. Webley: Analyst 86, 249, 1961.
- (14) Limperos, G. és K. E. Ranta: Science 117, 453, 1953.
- (15) McCaulley, D. F. és J. W. Cook: J. Assoc. Off. Agr. Chem. 42, 200, 1959.
- (16) McCaulley, Jane és J. W. Cook: J. Ass. Off. Agr. Chem. 42, 197, 1959.
- (17) Michel, H. O.: J. Lab. and Clin. Med. 31, 1564, 1949.
- (18) Nachmanson, D. és M. A. Rothenberg: J. Biol. Chem. 158, 653, 1945.
- (19) Nesheim, E. D. és J. W. Cook: J. Ass. Off. Agr. Chem. 42, 187, 1959
- (20) Patchett, G. G. és G. H. Batchelder: J. Agric Food. Chem. 8. 54, 1960.
- (21) Sándi E.: Munkavédelem 6, 26, 1960.
- (22) Sándi, E. és Wight, J.: Chemistry and Industry 1961, 1161.
- (23) Saunders, B. C.: „Phosphorus and Fluorine. The Chemistry and Toxic Action of their Organic Compounds” Cambridge 1957.
- (24) Schaumann, W.: Arch. exp. Path. Pharmacol. 239, 81, 1960.
- (25) Schechter, M. S., Hornstein I.: „Chemical Analysis of Pesticide Residues” in Advances in Pest Control Research, Vol. I. New York 1957.
- (26) Schrader, G.: „Die Entwicklung neuer Insektizide auf Grundlage organischer Fluor- und Phosphor-Verbindungen”, Weinheim 1952.
- (27) Tietz, H. és H. Frehse: Höfchen-Briefe 13, 212, 1960.
- (28) Wolfsie, J. H. és Winter G. D.: Arch. Industr. Hyg. 9, 396, 1954.
- (29) Yip, G. és Cook J. W.: J. Ass. Off. Agr. Chem. 42, 194, 1959.
- (30) Zweig, G. Archer T. E.: J. Agric. Food Chem. 6., 910, 1958.

#### КОЛИЧЕСТВЕННОЕ И КАЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ИНСЕКТИЦИДНЫХ ФОСФАТНЫХ ЭФИРОВ В РАСТИТЕЛЬНЫХ МАТЕРИАЛАХ

Э. Щанди

После критического обсуждения методов определения остатков средств защиты растений с содержанием органических эфиров фосфорной кислоты в пищевых продуктах, автор устанавливает, что химический микрометод определения веществ типа „Систокс” в практике не всегда можно производить.

После пересмотра биохимических методов, основанных на торможении действия ферментов, автор подробно сообщает два метода: быстрый колориметрический метод для приблизительного определения веществ и метод основанный на диффузии в агар-агаре, что преимущественно можно принимать для серийных исследований. Каждый метод можно производить простыми средствами и точность методов соответствует требованиям методов

гигиенического характера, даже в некоторых случаях выше таких требований. Нижним пределом определения паратиона является 0,003 мг, „Систокс-а“ 0,2 мг в 0,1 мл исследуемого раствора. Методом диффузии в агар-агаре можно определить количества 1000—10 000 раз больше без разбавления растворов.

## NACHWEIS UND BESTIMMUNG VON INSEKTICIDEN PHOSPHAT-ESTERN IN PFLANZLICHEN STOFFEN

*E. Sándi*

Nach kritischer Besprechung der Bestimmungsmethoden von Pflanzenschutzmittelresten mit organischem Phosphorsäure-Ester-Wirkstoffgehalt stellt der Verfasser fest, dass eine Mikrobestimmung der Substanzen vom Systoxtyp auf chemischen Wege in der Praxis nicht immer anwendbar ist.

Der Verfasser beschreibt — nach Zusammenfassung der bisher erschienenen, auf biochemischer Enzymhemmung beruhenden Methoden — zwei neue Methoden ausführlich: ein rasch ausführbares, kolorimetrisches Schätzungsverfahren und eine auf Agar-Agar-Diffusion beruhende Methode, welche sich für Serienprüfungen besonders eignet. Beide Methoden können mit einfachen Mitteln ausgeführt werden und ihre Empfindlichkeit genügt den Ansprüchen von Verfahren mit hygienischem Gepräge, übertrifft dieselben sogar in einigen Fällen. Die untere Grenze der nachweisbaren Mengen beträgt bei Parathion 0,003, bei Systox 0,2  $\mu\text{g}$ , und zwar in 0,1 ml Untersuchungs-lösung. Mit dem Agar-Diffusionsverfahren können aber auch 1000—10 000-fache Mengen, -ohne Verdünnung der zu untersuchenden Substanz bestimmt werden.

## DETECTION AND DETERMINATION OF PHOSPHATE-ESTER INSECTICIDES IN PLANT MATERIALS

*E. Sándi*

On subjecting the methods for the determination of insecticide residues of organic phosphate-ester basis in foods to a critical examination, the author states that in practice, it is not always possible to carry out the microdetermination of substances of Systox type by chemical methods.

Summarizing the methods based on biochemical enzymatic inhibition suggested thus far, two procedures are described by the author in detail: a rapid colorimetric assay and a method based on agar-agar diffusion particularly suitable for serial determinations. Both methods can be carried out by simple devices, and their sensitivity meets and in certain cases much exceeds the requirements of hygienic investigations. The lower limit of detectable amounts ranges 0,003  $\mu\text{g}$  in the case of parathion and 0,2  $\mu\text{g}$  in the case of Systox, referred to 0,1 ml of test solution. However, on applying the method of agar-agar diffusion, also contents 10000—10 0000-times higher can be determined without diluting the samples.