

Katedra i Zakład Chemii Toksykologicznej. Wydział Farmaceutyczny.

Akademia Medyczna w Lublinie

Kierownik: prof. dr hab. Stanisław Szczepaniak

Stanisław SZCZEPANIAK, Henryk NOWIŃSKI

### Oznaczanie chlorfenwinfosu we krwi metodą chromatografii gazowej

Определение хлорфенвинфоса в крови газохроматографическим методом

Gas Chromatographic Determination of Chlorfenvinphos in the Blood

Szerokie stosowanie insektycydów fosforoorganicznych wymaga systematycznego kontrolowania ich pozostałości w środowisku pracy i w płynach ustrojowych człowieka. Dlatego istnieje pilna potrzeba opracowywania czułych, dokładnych, a zarazem możliwie prostych metod ich oznaczania.

Do niedawna najbardziej rozpowszechnioną metodą oznaczania pestycydów fosforoorganicznych była metoda kolorymetryczna, polegająca na pomiarze intensywności barwy kompleksu fosforomolibdenowego (5, 8) po uprzednim zmineralizowaniu oczyszczonego ekstraktu według metody Schönigera (11). Wadą tych metod jest zbyt mała czułość i specyficzność. Z metod chromatograficznych najczęściej stosowane są chromatografia cienkowarstwowa (5, 9) i gazowa (1, 2, 6, 10).

Na temat oznaczania chlorfenwinfosu, aktywnej substancji w preparatach stonkobójczych (jak Karbatox Extra P), metodą chromatografii gazowej istnieje niewiele prac, przy czym w większości rozpatruje się oznaczanie tego związku w środowisku człowieka (3, 12, 13), a nie w płynach ustrojowych. W dostępnym piśmiennictwie jedna tylko publikacja dotyczy oznaczania chlorfenwinfosu we krwi metodą chromatografii gazowej. Zastosowano w niej długotrwałą i uciążliwą procedurę ekstrakcji i oczyszczania tej substancji na kolumnie z kwasem krzemowym przed właściwą analizą chromatograficzną (7).

Zalety metody przedstawionej przez nas polegają na uproszczeniu ekstrakcji i na eliminacji procesu oczyszczania ekstraktu na kolumnie.

#### CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Odczynniki i aparatura:

1) aceton cz.d.a., n-heksan cz.d.a., siarczan sodu cz.d.a.

2) łaźnia wodna z termoregulacją, chromatograf gazowy Varian 2860, strzykawka Hamiltona (10  $\mu$ l), ultradźwięki.

## TOK ANALITYCZNY METODY

Do 1 cm<sup>3</sup> krwi znajdującej się w próbówce o pojemności 5 cm<sup>3</sup> dodawano 2 cm<sup>3</sup> acetonu, szczelnie zamykano korkiem i po intensywnym wymieszaniu zawartości, próbkę wstawiano do łaźni wodnej o temp. 50°C na przeciąg ok. 5 min. Po tym czasie wytrząsano ręcznie zawartość próbki w ciągu 1 min. i odwirowywano osad z szybkością 3000—3500 obr./min. w czasie ok. 5 min. Wyciąg acetonowy zlewano do kolbki miarowej na 100 cm<sup>3</sup> i szczelnie zamykano. Izolowanie chlorfenwinfosu z pozostałego osadu 2 cm porcjami acetonu powtarzano jeszcze 4-krotnie. Po 5-krotnej ekstrakcji połączone wyciągi acetonowe zagęszczano strumieniem azotu w temperaturze pokojowej do objętości ok. 1 cm<sup>3</sup> i kolbkę szczelnie zamykano korkiem. Do zagęszczonego wyciągu dodawano 2 cm<sup>3</sup> n-heksanu, wymieszano ultradźwiękami do uzyskania jednorodnej emulsji (ok. 30 sek.) i zawartość kolby uzupełniano do 100 cm<sup>3</sup> 2% wodnym roztworem siarczanu sodu. Całość wymieszano i pozostawiano do następnego dnia w celu rozdzielania się warstw. Z warstwy heksanowej pobierano 1 cm<sup>3</sup> wyciągu, do którego wprowadzano 4 µg trójfenylofosforanu jako standardu wewnętrznego. Po dokładnym wymieszaniu, 1 µl tak przygotowanej próbki wprowadzano do kolumny chromatografu za pomocą mikrostrzykawki Hamiltona.

## PARAMETRY CHROMATOGRAFICZNE

1. Wypełnienie szklanej kolumny: Varaport 30, faza stacjonarna — 4,5% QF<sub>1</sub>+0,3% OV-17.
2. Detektor AFID — płomieniowo-jonizacyjny z posiewem alkalicznym.
3. Temperatury: komora iniekcyjna — 225°C, kolumna — 185°C, detektor — 220°C.
4. Szybkość przepływu gazów: N<sub>2</sub> — 30 cm<sup>3</sup>/min., H<sub>2</sub> — 47,5 cm<sup>3</sup>/min., powietrze — 228 cm<sup>3</sup>/min.
5. Atenuacja — 32 · 10<sup>-12</sup>.

## WYZNACZANIE WSPÓŁCZYNNIKA K

Współczynnik  $K$  jest ilościowym wskaźnikiem czułości detektora dla substancji oznaczanej w porównaniu do jego czułości dla standardu wewnętrznego. Współczynnik ten wylicza się ze wzoru:

$$K = \frac{h_x \cdot C_s}{h_s \cdot C_x}$$

$h_x$  — wysokość piku chlorfenwinfosu,

$h_s$  — wysokość piku wzorca wewnętrznego,

$C_x$  — stężenie molowe chlorfenwinfosu,

$C_s$  — stężenie molowe standardu wewnętrznego.

Celem wyznaczenia współczynnika  $K$  sporządzono 5 mieszanin wzorcowych, zawierających wzrastające stężenia chlorfenwinfosu (1, 2, 3, 4, 5  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ ) i niezmienną ilość trójfenylofosforanu jako standardu wewnętrznego (4  $\mu\text{g}$ ). Po wprowadzeniu poszczególnych roztworów do kolumny chromatografu, mierzono wysokość pików pestycydu i wzorca wewnętrznego oraz obliczano  $K$ . Otrzymane wyniki zestawiono w tab. 1.

Tab. 1. Wskazania detektora dla różnych stężeń chlorfenwinfosu i stałych stężeń wzorca wewnętrznego

Detector response to the different concentrations of chlorfenwinphos and constant concentrations of the internal standard

Lp.	Chlorfenwinfos ng	Standard wewnętrzny ng	Chlorfenwinfos h/mm/	Standard wewnętrzny h/mm/	K
1	1	4	47,5	135,5	1,55
2	2	4	103,0	126,0	1,30
3	3	4	132,0	114,0	1,70
4	4	4	182,0	130,0	1,55
5	5	4	193,0	122,0	1,40
$\bar{x}$					1,60

#### PRECYZJA METODY

W celu określenia powtarzalności wyników wstrzykiwano 5-krotnie ten sam roztwór standardowy (3 ng chlorfenwinfosu + 4 ng trójfenylofosforanu) i po zmierzeniu wysokości pików obliczano  $K$ . Otrzymane dane zestawiono w tab. 2.

Tab. 2. Powtarzalność wyników analizy  
Recurrence of analytic results

Lp.	h/mm/ pestycydu	h/mm/ wzorca wewnętrznego	K
1	176	149	1,73
2	177	147	1,77
3	153	140	1,60
4	169	148	1,67
5	132	114	1,70
$\bar{x} \pm SD$			1,69 $\pm$ 0,20
Współczynnik zmienności: $V = \frac{SD}{\bar{x}} \cdot 100$			11,8%

## DOKŁADNOŚĆ METODY

Celem oznaczenia dokładności metody zbadano stopień odzysku chlorfenwinfosu dodanego w znanej ilości do krwi. W tym celu do 4 próbek krwi o objętości 1 cm<sup>3</sup> dodano odpowiednio 1, 2, 4 i 6 μg chlorfenwinfosu, co po przeliczeniu na stężenie molowe wynosiło: 2,78; 5,56; 11,12 i 16,68 μM/dcm<sup>3</sup> krwi. Chlorfenwinfos wyekstrahowany z 1 cm<sup>3</sup> próbek krwi znajdował się w 2 cm<sup>3</sup> heksanu, a objętość dodanego wzorca wewnętrznego wynosiła 26,66 μl, zatem teoretyczne stężenia chlorfenwinfosu w próbkach wprowadzanych do kolumny były ponad (dokładnie 2,05) 2-krotnie mniejsze i wynosiły odpowiednio: 1,35; 2,71; 5,40 i 8,10 μM/dcm<sup>3</sup>. Stężenie wzorca wewnętrznego wynosiło 12,26 μM/dcm<sup>3</sup>. Po wprowadzeniu próbek do chromatografu i zmierzeniu wysokości pików pestycydu i standardu wyliczano stężenie chlorfenwinfosu ze wzoru:

$$C_x = \frac{h_x \cdot C_s}{h_s \cdot K}$$

Otrzymane wyniki zestawiono w tab. 3.

Tab. 3. Stopień odzysku chlorfenwinfosu z krwi  
Recovery of chlorfenvinphos from the blood

Lp.	Dodano		h/mm/ pestycydu	h/mm/ standardu	Zaliczono μg/cm <sup>3</sup>	Odzysk %
	μg/cm <sup>3</sup>	μM/dcm <sup>3</sup>				
1	1	2,78	24	189	2,02	72,6
2	2	5,56	73	217	3,34	96,1
3	4	11,12	97	225	6,60	99,3
4	6	16,68	136	188	11,49	68,9
$\bar{x}$						73,4

## OMÓWIENIE WYNIKÓW

Jak wynika z tab. 1, czułość i oznaczalność przedstawionej metody jest bardzo duża. Najmniejsza ilość, jaką w tych warunkach można oznaczyć, wynosi 10<sup>-10</sup> g.

Początkowo wykonywano oznaczenia stosując detektor płomieniowo-jonizujący bez posiewu alkalicznego, ale oznaczalność metody nie przekraczała 40 ng.

Precyzję metody należy również uznać za dobrą. Wprawdzie współczynnik zmienności nieznacznie przekraczał wartość 10%, to jednak, biorąc pod uwagę doskonałą czułość metody i możliwość stosowania jej do

oznaczeń ilości śladowych, należy go uznać jako wskaźnik wystarczająco dokładnej i powtarzalnej metody analitycznej.

Oczywiście, warunkiem dobrej precyzji metody jest utrzymywanie wartości ciśnień i szybkości przepływu gazów na stałym poziomie. Nawet niewielkie odchylenia w wartościach tych parametrów powodują duże zmiany w odpowiedzi detektora. Stałość wartości przepływów gazów zapewniają dobre 2-stopniowe reduktory, manometry i idealna szczelność całego układu.

Jak wynika z tab. 3, stopień odzysku chlorfenwinfosu z krwi wynosi średnio 73%, przy czym dla ilości 1 i 2  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  uzyskuje się wartości wyższe, a dla wyższych stężeń pestycydu w próbce odzysk jest mniejszy i wynosi 60—63%. Nie są to wartości małe, jeśli się weźmie pod uwagę, że chlorfenwinfos ma tendencję do wiązania się z białkami osocza (4), co utrudnia jego ekstrakcję z krwi.

### W n i o s k i

1. Opracowana metoda oznaczania chlorfenwinfosu we krwi daje wyniki dokładne i precyzyjne po spełnieniu następujących warunków:

a) należy zawsze stosować metodę standardu wewnętrznego lub zewnętrznego, aby wykluczyć wpływ ewentualnych zmian parametrów chromatograficznych na sygnał detektora,

b) przed każdą serią pomiarów należy sprawdzić wartości współczynnika  $K$ .

### P I Ś M I E N N I C T W O

1. Abbolt D. C., Crosby N. T., Thomson J.: Use of Thin-layer and Semi-preparative Gas-liquid Chromatography in the Detection, Determination and Identification of Organophosphorus Pesticide Residues. Proc. Soc. Anal. Chem. Conf. Nottingham 1965.
2. Bäumlér J., Rippstein S.: Gaschromatographische Bestimmung von Insecticiden im Blut mit dem Halogen-Phosphor-Detector. Arch. Toxicol. 25, 57, 1969.
3. Beroza M., Bowman M. C.: Gas Chromatographic Determination of Compound 4072 and Shell SD-8447 by Electron-Capture and Flame-Photometric Detection. J. Agr. Food Chem. 14, 625, 1966.
4. Cohen J. A., Warringa M. G. P. J.: The Fate of Phosphorous 32-labeled Diisopropylfluorophosphate (DFP) in the Human Body and Its Use as a Labeling Agent in the Study of the Turnover of Blood Plasma and Red Cells. J. Clin. Invest. 33, 459, 1954.
5. Fischer R., Plunger Chr.: Nachweis und quantitative Bestimmung von Phosphor-Insecticiden im biologischen Material. Arch. Toxicol. 21, 101, 1965.

6. Girienko B. D., Klisenko M. A.: Gazochromatograficzeskij analiz fosfor-organiczeskich piesticydow. *Gig. Sanit.* 5, 77, 1970.
7. Hutson D. H., Hatway D. E.: Toxic Effects of Chlorfenvinphos in Dogs and Rats. *Biochem. Pharmacol.* 16, 549, 1967.
8. Klisienko M. A., Lebediewa T. A.: Opriedielenije małych koliczestw jadochimikatow w wozduchie, produktach pitaniya, biologiczeskich i drugich sriedach. Kijew. Gosmiedzdat. 1964.
9. Pismiennaja M. W., Klisienko M. A.: *Mietody analiza piesticidow.* Moskwa 1972.
10. Ruzicka J. H. A., Thomson J., Wheals B. B.: The Gas-chromatographic Determination of Organo-phosphorus Pesticides. V Studies Under Field Conditions. *J. Chromatogr.* 33, 430, 1968.
11. Schöniger W.: Rapid Microanalytical Determination of Halogen in Organic Compounds. *Mikrochim. Acta* 123, 1955.
12. Szucki B., Maksymiuk H., Nazimek T.: Oznaczanie karbarylu i chlorfenwinfosu w środowisku pracy. *Bromat. Chem. Toksykol.* 7, 43, 1974.
13. Witek S., Mierzwa S.: Oznaczanie pozostałości 1-(2',4'-dwuchlorofenylo)-2-chlorowinylofosforanu dwuetylowego (chlorfenwinfosu) w wodzie metodą chromatografii gazowej z detektorem rekombinacyjnym. *Chem. Anal.* 21, 715, 1976.

Otrzymano 30 VI 1983.

#### РЕЗЮМЕ

Разработан упрощенный метод экстрагирования хлорфенвинфоса из крови и оптимальные параметры количественного определения газохроматографическим методом. Пестицид был экстрагирован из крови ацетоном а из ацетонового экстракта Н-гексаном. Гексанову вытяжку с добавленным трифенилфосфатом как внутренним стандартом вводили в колонку Варян хроматографа. Насадка колонки Варпорт-30; 4,5% QF<sub>1</sub>+0,3% OV-17. АФИД-Детектор. Степень возврата: 59—96%, в среднем — 73%, коэффициент переменения — 11,8%.

#### SUMMARY

The simplified method of the extraction of chlorfenvinphos from the blood and the optimal parameters of its gas chromatographic determination is described. The pesticide was extracted from the blood with acetone and from the acetonic extract with n-hexane. The hexane extract with the addition of triphenylphosphate as an internal standard was introduced into the column of Varian chromatograph. The column packing: Varaport 30; 4.5% QF<sub>1</sub>+0.3% OV-17. AFID Detector. The recovery degree: 59—96%, the average — 73%; method variation coefficient — 11.8%.