

# DETERMINACIÓ DE PLAGUICIDES ORGANOFOSFORATS PER DENSITOMETRIA DE CAPA FINA

per

EDUARD FIGUEROLA (1)

Departament de Química Analítica. Institut Químic de Sarrià.  
Barcelona.

## SUMMARY

An enzymatic inhibition method for determining four organophosphorus pesticides resolved by thin-layer chromatography is described.

Thin-layer chromatograms are evaluated quantitatively by direct densitometric measurements at 412 nm. of the difference in the colour of spots and the layer after making the spots visible by enzyme inhibition with acetylthiocholine iodide as substrate and (5,5')-dithiobis-2-nitrobenzoic acid as chromogenic reagent at a pH of 7.5

Reproducible determinations of micrograms amounts of pesticide are achieved. Sensitivity of the method is: Azinphos-methyl 0.2  $\mu\text{g.}$ , Parathion-methyl 2.0  $\mu\text{g.}$ , Dichlorvos 0.6  $\mu\text{g.}$  and Naled 0.9  $\mu\text{g.}$

The effect of bromination and incubation time is studied.

## 1. RESUM

Hom descriu un mètode d'inhibició enzimàtica per a la determinació de quatre pesticides organofosforats separats per cromatografia de capa fina.

(1) Adreça actual: Departament de Química. E.T.S.E.I.B. Universitat Politècnica de Catalunya. Barcelona.

Els cromatogrames són avaluats quantitativament per densitometria directa a 412 nm tot mesurant la diferència entre el color de les taques i els fons un cop revelat el cromatograma per inhibició enzimàtica emprant iodur d'acetiltiocolina com a substrat, i àcid (5,5')-ditiobis-2-nitrobenzoic com a reactiu cromogènic a pH 7.5.

Hom aconsegueix determinacions reproduïbles de quantitats de pesticida de l'ordre del microgram. La sensibilitat del mètode és: Azinfos-metil 0.2 µg, Metil-paration 2.0 µg, Diclorvos 0.6 µg i Naled 0.9 µg.

Hi és estudiat l'efecte dels temps de bromació i incubació.

## 2. INTRODUCCIÓ

La cromatografia de capa fina ha estat sovint emprada per a la detecció de pesticides organofosforats, bé en el camp de la química ambiental o bé en la forense, i n'han estat publicades algunes revisions. (1-3)

Hom ha fet estudis comparatius de revelat de cromatogrames amb diferents sèries de reactius, i ha obtingut els millors resultats pel que fa a selectivitat i sensibilitat amb tècniques basades en la inhibició per part dels pesticides organofosforats de la reacció d'hidròlisi de l'acetilcolina o derivats catalitzada per l'acetilcolinesterasa (4-6). En aquestes tècniques, l'addició d'un tercer reactiu cromogènic permet de colorar la cromatoplaca en els llocs on hi ha hagut reacció enzimàtica, tot deixant taques blanques als focus d'inhibició.

Moltes de les tècniques de cromatografia de capa fina i inhibició enzimàtica descrites no passen d'ésser mètodes de detecció (7-14); alguns autors proposen mètodes semiquantitatius per comparació amb patrons (15, 16), i finalment gairebé no han estat publicats treballs en els quals hom combini la densitometria amb les tècniques de cromatografia de capa fina i inhibició enzimàtica (17).

L'inconvenient que presenten aquestes tècniques és l'elevat preu dels reactius utilitzats, que d'altra banda en alguns casos ni tan sols són comercials. Ellman proposà un mètode colorimètric per a l'assaig d'activitats enzimàtiques que utilitza reactius comercials de preu relativament baix (18) i que ha estat aplicat a estudis d'inhibició enzimàtica (19, 20). Aquest mètode es basa en la hidròlisi de l'acetiltiocolina catalitzada per acetilcolinesterasa; la tiocolina produïda és feta reaccionar amb l'àcid (5,5')-ditiobis-2-nitrobenzoic per tal de donar àcid 5-tio-2-nitrobenzoic de color groc intens amb una banda d'absorció a 412 nm.

En aquest treball hom optimitza un mètode d'avaluació quantitativa de pesticides organofosforats d'ús general per densitometria, mesurant l'absorbància per reflexió de llum difusa sobre la cromatoplaca prèviament revelada per inhibició enzimàtica emprant els reactius descrits per Ellman.

### 3. EXPERIMENTAL

#### 3.1. *Reactius*

Dissolució tampó: Hom dissol 10.9 g de fosfat disòdic (Merck) en un litre d'aigua bidestil·lada i ajusta el pH a 7.5. La dissolució és estable indefinidament.

Acetilcolinesterasa: Hom dissol 0.05 mg d'acetilcolinesterasa d'anguila elèctrica (Boehringer-Manheim) en 50 ml d'aigua bidestil·lada. La dissolució és estable una setmana a 4 °C.

Substrat: Hom dissol 5.78 g de iodur acetiltiocolina (Boehringer-Manheim) en un litre de dissolució tampó. La dissolució és estable un mes a 4 °C.

Reactiu d'Ellman: Hom dissol 7.92 g d'àcid (5,5')-ditiobis-2-nitrobenzoic en un litre de dissolució tampó. La dissolució és estable indefinidament a 4 °C.

#### 3.2. *Patrons de pesticides*

Preparats a partir de productes comercials cedits per CEQUISA.

Azinfos-metil purificat per recristal·litzacions successives en n-hexà. Metilparation, Diclorvos (DDVP) i Naled (Dibrom) purificats per cromatografia de capa fina preparativa emprant benzè com a eluent.

Hom prepara les dissolucions *stock* per pesada de les substàncies pures i posterior dissolució en n-hexà.

#### 3.3. *Instrumentació*

- pHmetre Crison pH/mV-Meter Digit 501 amb elèctrode combinat.
- Electrobalança Cahn-Gram.
- Espectròmetre de fluorescència Perkin-Elmer MPF-3 amb l'accessori per a C.C.F. Hitachi i registrador Ratio.

#### 3.4. *Procediment*

Els cromatogrames han estat desenvolupats en plaques Merck de sílica-gel 60 F d'un gruix de 0.25 mm en mides de 10×5 i 20×20 cm, activades a 105 °C per espai de dues hores.

A totes les experiències el volum de dissolució de pesticida aplicat a la cromatoplaca ha estat de 5 µl.

Ha estat utilitzada com a eluent una mescla de cloroform i àcid acètic en una proporció de 99:1.

Un cop desenvolupats i secs, els cromatogrames són exposats a vapors de

brom per espai de cinc minuts, i tot seguit polvoritzats amb la dissolució d'acetilcolinesterasa i col·locats en una atmosfera saturada d'humitat per espai de quinze minuts.

Les plaques humides són polvoritzades amb la dissolució de substrat i amb la de reactiu d'Ellman; finalment i per espai de vint-i-cinc minuts hom les col·loca a 37-40 °C en una atmosfera humida, i al cap de pocs minuts hi comencen a aparèixer taques blanques sobre un fons groc intens.

Un cop seca la placa, hom duu a terme la densitometria per mesurament directe d'absorció de llum difusa amb els monocromadors d'excitació i emissió a 412 nm, amb una esclatxa de 2.5 nm.

#### 4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

Dels diversos eluents assajats, només uns pocs aconseguixen de separar d'una manera completa els quatre pesticides (taula 1); malgrat tot, el criteri de no emprar mescles binàries amb baixes proporcions de components volàtils, fa que el cloroform sigui considerat el més adient. L'addició d'1 % d'àcid acètic elimina la cua de les taques, millorant-ne per tant la quantització sense variar-ne els valors de  $R_f$ .

Les rectes de calibratge per als quatre pesticides estudiats obtingudes pel mètode descrit són presentades a la figura 1. Les àrees dels pics han estat calculades a partir del producte de la seva alçada per l'amplària a mitja banda.

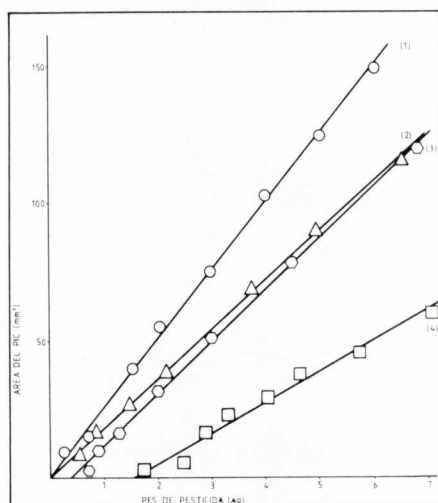


Fig. 1. Corbes de calibratge per a l'anàlisi per cromatografia de capa fina i inhibició enzimàtica de pesticides organofosforats: (1) Azinfos-metil, (2) Diclorvos, (3) Naled, (4) Metil-paration.

TAULA 1

Valors de  $R_f$  dels pesticides organofosforats

	$R_f$			
	I	II	III	IV
Metil-paration	0.79	0.68	0.71	0.84
Azinfos-metil	0.51	0.44	0.31	0.59
Diclorvos	0.36	0.27	0.55	0.19
Naled	0.47	0.37	0.66	0.27

Eluents: I cloroform  
 II benzè-acetona (95:5)  
 III benzè-acetona (99:1)  
 IV cloroform-acetona (99:1)

TAULA 2

Avaluació estadística del mètode

	Pes de pesticida ( $\mu\text{g}$ )	Pesticida trobat ( $\mu\text{g}$ )	Desviació estàndard ( $\mu\text{g}$ )	Desviació estàndard relativa (%)
Azinfos-metil (6 determinacions)	5.95	5.92	0.33	5.57
	3.03	2.96	0.16	5.41
	1.52	1.54	0.03	1.95
	0.76	0.63	0.01	1.59
Metil-paration (6 determinacions)	5.64	5.72	0.37	6.52
	3.36	3.46	0.18	5.20
	2.82	2.96	0.09	3.01
Diclorvos (5 determinacions)	6.53	6.47	0.04	0.31
	4.89	4.95	0.04	0.81
	2.17	2.14	0.07	3.27
	1.45	1.45	0.02	1.36
Naled (7 determinacions)	6.76	6.71	0.04	0.53
	4.50	4.49	0.13	2.83
	3.00	3.06	0.02	0.78
	1.33	1.21	0.08	6.84

TAULA 3

Límits de detecció dels pesticides organofosforats

Compost	L.D. ( $\mu\text{g}$ )
Azinfos-metil	0.2
Metil-paration	2.0
Diclorvos	0.6
Naled	0.9

La relació entre l'àrea del pic i el pes de pesticida és lineal en el marge de 0 a 6  $\mu\text{g}$  d'Azinfos-metil i fins a 7  $\mu\text{g}$  per a la resta de pesticides.

L'avaluació estadística del mètode és presentada per a diferents quantitats de producte a la taula 2.

El límit de detecció (taula 3) és agafat com la quantitat de pesticida que dona lloc a un pic de 10 mm<sup>2</sup> d'àrea; aquest valor ha estat escollit a partir de la relació senyal-soroll dels registres obtinguts.

Ha estat estudiat l'efecte del temps d'interacció de l'enzim amb els pesticides previ a la polvorització dels reactius, i hom ha trobat que és òptim en el marge de 10 a 15 minuts. Un temps més llarg té com a conseqüència una alteració irreversible de l'enzim i per tant uns resultats més pobres a la determinació densitomètrica.

El desenvolupament del color a la temperatura de 37-40 °C i en una atmosfera humida ha estat seguit per espai de 35 minuts, i hom ha observat per als quatre pesticides àrees màximes en els pics obtinguts a l'interval de 15 a 25 minuts (figura 2), i que a continuació s'hi produeix una ràpida pèrdua del color deguda a l'alteració del compost colorat àcid 5-tio-2-nitrobenzoic. Aquest temps d'estabilitat del color, malgrat tot, és suficient per a dur a terme la quantització, que amb l'aparell utilitzat no dura més de cinc minuts.

L'oxidació dels pesticides tiofosforats (Metil-paration i Azinfos-metil) als seus corresponents compostos oxigenats, que en general hom accepta que són inhibidors més potents de les colinesterases, ha estat dut a terme per exposició del cromatograma a vapors de brom, i hom ha observat un augment de l'àrea dels pics de l'ordre del 50 % després d'una bromació de cinc minuts; passat aquest temps, es produeix un enfosquiment irreversible de les cromatoplaques (figura 3). L'exposició de les plaques a llum ultraviolada no ha suposat cap millora en els resultats obtinguts.

La determinació de pesticides pel mètode d'inhibició enzimàtica ha demostrat que és selectiva i útil; el valor de  $R_f$  d'algun dels compostos, però, pot afectar negativament la seva quantització, com ha estat demostrat en el cas del Metil-paration. Això s'explica per la difusió que pateix la taca al llarg de

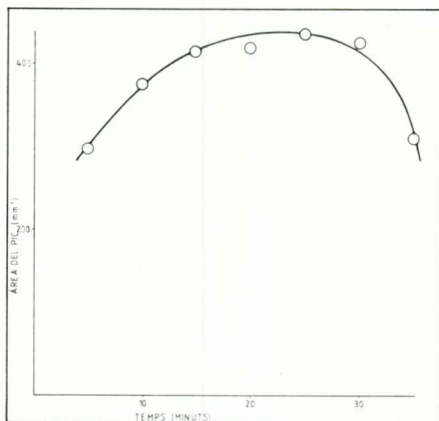


Fig. 2. Dependència de l'absorbància de llum difusa amb el temps a partir de la polvorització dels reactius.

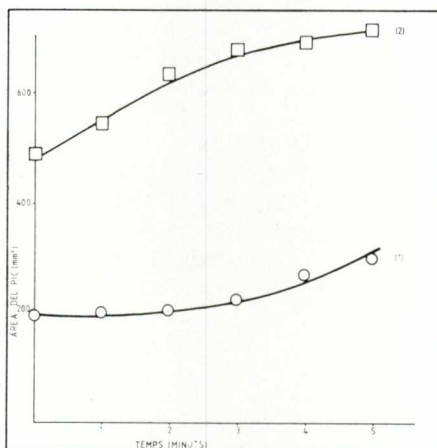


Fig. 3. Dependència de l'absorbància de llum difusa per a Metil-paration (1) i Azinfos-metil (2) amb el temps d'exposició a vapors de brom.

l'elució, que fa que el focus d'inhibició enzimàtica no estigui prou localitzat i que el contrast entre les taques i el fons no sigui òptim.

En els altres casos, la determinació al nivell de microgram presenta una bona reproductibilitat i exactitud, tot això amb uns reactius de preu relativament baix i que no necessiten cap preparació acurada.

## REFERÈNCIES

1. ZAKARIA, M.; GONNORD M.F. i GUIOCHON G.: J. Chromatogr. 271 (2), 127 (1983).
2. SHERMA, J.: J. Liq. Chromatogr. 5 (6), 1013 (1982).
3. GETZ, M. E.: «Paper and Thin-layer Chromatography Analysis of Environmental Toxicants» Heyden (1980).
4. MENDOZA, C. E.: Residue Rev. 50, 43 (1974).
5. AMBRUS, A.; HARGITAI, E.; KAROLY, G.; FULOP, A. i LANTOS J.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. 64 (3), 743 (1981).
6. MENDOZA, C. E.: J. Chromatogr. 78, 29 (1973).
7. MENDOZA, C. E.; WALES, P. J.; MCLEOD, H. A. i MCKINLEY P. W.: Analyst (Londres) 93, 34 (1968).
8. MENDOZA, C. E.; WALES, P. J.; MCLEOD H. A. i MCKINLEY, P. W.: Analyst (Londres) 93, 173 (1968).
9. ORTOFF, R. i FRANZ, P.: Z. Chem 5, 388 (1965).
10. ACKERMANN, H.: Nahrung 16, 273 (1966).
11. ACKERMANN, H.: J. Chromatogr. 36, 309 (1968).
12. ERNTS, C. F. i SHURING, F.: J. Chromatogr. 49, 325 (1970).
13. SCHUTZMANN, R. L.: J. Ass. Off. Anal. Chem. 53, 1056 (1970).
14. GADNER, A. M.: J. Ass. Off. Anal. Chem. 54, 517 (1971).
15. NANDA KUMAR, N. V. i VISWESWARIAH, K.: J. Ass. Off. Anal. Chem. 59, 641 (1975).
16. EBING.: J. Chromatogr. 42, 140 (1969).
17. STEFANAC, Z.; STENGL, B. i VASILIC, Z.: J. Chromatogr. 124, 127 (1976).
18. ELLMAN, G. L.; COURTNEY, D. K.; ANDRES, J. R. V. i FEATHERSTONE, R. M.: Biochem. Pharmacol. 7, 88 (1961).
19. DREVENKAR, V.; VASILIC, Z. i STEFANAC, Z.: Michrochim. Acta 45 (1981) II.
20. CHIN, B. H. i SPRANGLER, N.: J. Agric. Food Chem. 28 (6), 1342 (1980).

*Article acceptat per a publicació el gener de 1987.*