

IMPORTANCE OF DETERMINATION OF ALKYL AND ARYL HALIDES BY MEANS OF ELECTROCHEMICAL TECHNIQUES AT ANIMALS

VÝZNAM STANOVENÍ HALOGENOVANÝCH UHLOVODÍKŮ POMOCÍ ELEKTROCHEMICKÝCH TECHNIK U ŽIVOČICHŮ

Hradecký J.¹⁾, Křížková S.¹⁾, Mikelová R.²⁾, Adam V.¹⁾, Beklová M.³⁾, Pikula J.³⁾, Havel L.⁴⁾, Trnková L.²⁾, Zeman L.⁵⁾, Kizek R.¹⁾

¹⁾Ústav chemie a biochemie, ⁴⁾Ústav biologie rostlin, a ⁵⁾Ústav výživy zvířat, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno; ²⁾Katedra teoretické a fyzikální chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova Univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno; ³⁾Ústav veterinární ekologie a ochrany životního prostředí, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita, Palackého 1-3, 612 42 Brno

E-mail: JanHradecky@seznam.cz, kizek@sci.muni.cz

ABSTRACT

The interest on the determination of alkyl and aryl halides (e.g. pesticides) lies in the serious toxic effects of these compounds on an organism. A higher concentration of these compounds could be responsible for infertility and for tumour disease. Therefore a development of simple and accurate tool for detection of them is need. The aim of this work was to suggest a biosensor for detection of alkyl and aryl halides. Suggested biosensor is based on a determination of halides relaxed from alkyl and/or aryl derivatives by means of various enzymes. The relaxed halides were consequently determined on carbon electrodes both in steady state and flow system. We were able to determine chlorides in units of 10^{-9} M, whereas the biosensor was utilized to determine Bromadiolone.

Keywords: alkyl and aryl halides, enzyme, bromadiolone, biosensor.

ABSTRAKT

Důležitost stanovení alkyl a aryl halogenů (např. pesticidy) spočívá v jejich toxických vlastnostech. Navíc ve větších koncentracích pak mohou způsobovat nádorová onemocnění či neplodnost. Proto je potřebné vyvíjet jednoduché a přesné nástroje k detekci takových látek. Cílem této práce bylo navrhnout biosenzor pro detekci alkyl a aryl halogenů. Navržený biosenzor byl založen na stanovení halogenů uvolněných ze studovaných látek pomocí různých enzymů. Uvolněné halogenidy byly stanoveny na uhlíkové elektrodě jak v stacionárním, tak v průtokovém systému. Tímto postupem jsme dosáhli detekčního limitu pro chloridy 10^{-9} M. Na závěr byl biosenzor aplikován pro detekci bromadiolonu.

Klíčová slova: alkyl a aryl halogenidy, bromadiolon, biosenzor.

ÚVOD

V řadě prací je věnována značná pozornost ekologii a etologii u řady druhů organismů [1-5]. Avšak velmi významnou roli v těchto pozorováních mohou hrát toxické látky, které jsou do životního prostředí uvolňovány z průmyslové výroby [6,7]. Nezanedbatelným vstupem však jsou i sloučeniny využívané v zemědělství jako pesticidy [8]. Významnou skupinu pesticidních látek zastupují rodenticidy [9-11]. Rodenticidy nové generace většinou působí jako antikoagulanty. Smrt zvířete je tak vyvolána vykrvácením do tělních dutin, což většinou nepůsobí žádnou bolest a simuluje přirozenou smrt. Jednou z takových látek je bromadiolon (3-(3-(4'-brom-1,1'-bifenyl-4-yl)-3-hydroxy-1-fenylpropyl)-4-hydroxy-kumarin) je běžně užívaný rodenticid komerčně dostupný jako Hubex, Lanirat, Tarin, Ratibrom, Ramus, Prorat, atd.[12]. Díky velmi nízké LD₅₀ pro hlodavce (kolem 1.1 mg/kg v případě potkana), může být smrtelná dávka těchto přípravků požitá již při jednorázové konzumaci. Je absorbován pomocí trávicí a dýchací soustavy, případně i přes kůži. Hlavním orgánem podílejícím se na jeho metabolizaci a skladování jsou játra. Z organismu je vylučován převážně stolicí. Je známo, že působí jako antagonist vitamínu K₁ (fytomenadion), čímž ovlivňuje kaskádu vedoucí ke srážení krve [13]. Z tohoto důvodu působí jako antikoagulant již ve velmi nízkých koncentracích, jeho účinky jsou kumulativní a mohou vyvolat chronickou otravu [14]. V důsledku jeho požití byla zaznamenána úmrtí jak domácích [15], tak volně žijících živočichů, a to nejen přímých, ale i následných konzumentů, např. káňat, lišek, norků, ale i kanců nebo jelenů [9,16-18]. Kromě toho je bromadiolon nalézán v subletálních množstvích v játrech zvířat, která se běžně těmito hlodavci živí, např. kuny, fretky, lišky, atd. [19-21].

Sledování reziduí pesticidů v životním prostředí, ale i potravinách je věnována velmi značná pozornost [22-24]. Tak i pro stanovení bromadiolonu je používána řada analytických technik, například plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS), chromatografie na tenké vrstvě (TLC) [25] nebo imunochemické metody. Vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC) je nejčastěji používanou metodou pro stanovení bromadiolonu [26-28]. V literatuře bylo popsáno použití HPLC ve spojení s fluorescenčním detektorem [26] nebo hmotnostním spektrometrem [29].

V naší práci jsme se především zaměřili na navržení biosenzoru pro stanovení alkyl a aryl halogenidů. Navržený senzor jsme následně použili pro detekci bromadiolonu, kde jsme jako srovnávací techniku použili vysoce účinnou kapalinou chromatografií s elektrochemickou detekcí.

MATERIÁL A METODIKA

Chemikálie

Bromadiolon a všechny další použité chemikálie ACS čistoty byly zakoupeny od Sigma Aldrich. Pracovní roztoky standardu bromadiolonu byly denně připravovány ze zásobního roztoku o koncentraci 1 mg/ml ředěním methanolem. Všechny roztoky byly

filtrány přes 0.45 µm teflonový membránový filtr (MetaChem, Torrance, CA, USA). pH bylo měřeno za použití WTW inoLab Level 3 instrument (Weilheim, Německo), řízený pomocí osobního počítače a programu (MultiLab Pilot; Weilheim, Německo). pH-elektroda (SenTix H) pro kalibraci byl použit set WTW pufrů (Weilheim, Německo).

Biologický experiment

Studovali jsme příjem a distribuci bromadiolonu o hrabošů (*Microtus arvalis*) podle následujícího experimentálního schématu. Hraboši byly krmeni po dobu tří anebo čtyř dnů a) jednou granulí Lanirat G; b) mraženou žížalou intoxikovanou Laniratem G; c) živou žížalou intoxikovanou Laniratem G. Kontrolní hraboši byli krmeni buď běžným krmivem pro hlodavce nebo žížalami bez obsahu bromadiolonu. Po ukončení experimentu byly hraboši usmrceni a provedena běžná patologicko-anatomická pitva. Z každého hraboše byly získány vzorky jater, které byly zamrazeny.

Příprava biologických vzorků pro analýzu bromadiolonu

Vzorky tkáně o hmotnosti cca 0,5 g v 0,5 ml methanolu byly homogenizovány pomocí homogenizéru (Ultraturax) po dobu 15 min. Po té byly 10 min, sonikovány ultrazvukem (40 W) při teplotě 0 °C a dalších 15 min třepány na vortexu (Genie, USA). Výsledný homogenát byl centrifugován po dobu 20 min při 14 000 g při 4 °C. Následně byl odebrán supernatant, který byl do další analýzy uchováván při teplotě -20 °C. Před analýzou byly vzorky 2 × naředěny methanolem.

Elektrochemické stanovení ve stacionárním systému – návržení biosenzoru

Elektrochemické měření bylo prováděno na AUTOLABu (EcoChemie, Holandsko) ve spojení s VA-Stand 663 (Metrohm, Švýcarsko). Jako pracovní elektroda byla použita elektroda ze skelného uhlíku a pastová uhlíková, pomocná elektroda byla uhlíková tyčka a referenční elektrodou byla Ag/AgCl 3 M KCl. Všechny experimenty probíhaly za pokojové teploty. DPV parametry pro analýzu chloridů: počáteční potenciál -0,8 V, konečný potenciál 0,6 V, amplituda 25 mV, rychlost polarizace 50 mV.s⁻¹.

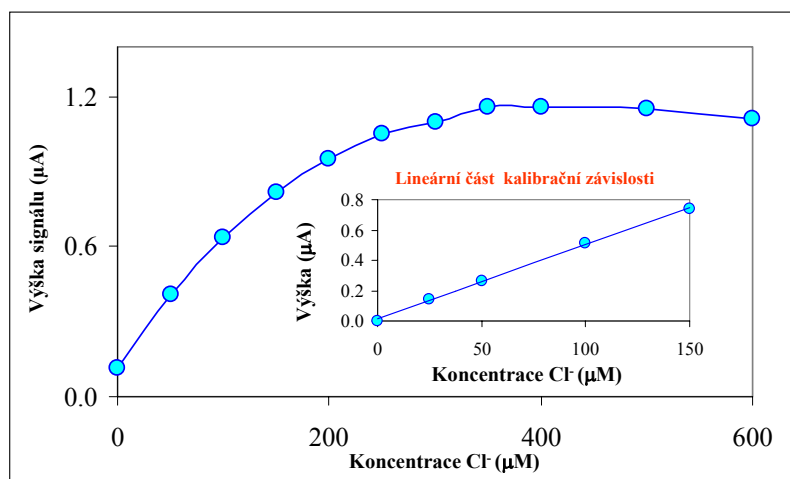
Elektrochemické stanovení v průtokovém systému

Analýza pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí (HPLC-ED) byla provedena na přístroji CoulochemIII (ESA, Inc.). V elektrochemické cele o objemu 50 µl byly umístěna referenční hydrogenpaladiová elektroda, pomocná uhlíková elektroda a pracovní elektroda ze skelného uhlíku. Separace v reálných vzorcích byla uskutečněna na koloně Polaris C18-A, 150 × 4,6 mm, průměr částic 3 µm (Varian, Inc.) s použitím předkolony. Dávkovací smyčkou byl aplikován vzorek o objemu 5 µl. Isokratická mobilní fáze se skládala z 0,2 M acetátového pufru (pH 4,0)/acetonitrilu (40:60, v/v). Jako detekční potenciál bylo použito 836 mV.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Studiu reziduí v životním prostředí je věnována poměrně značná pozornost a mezi významnou skupinu takových látek náleží pesticidní sloučeniny [30]. Pro běžnou analýzu těchto sloučenin je využíváno chromatografických technik většinou s UV, méně s fluorimetrickou a hmotnostní detekcí [31-33]. Avšak elektrochemických technik pro studium těchto látek nebylo doposud využíváno. V naší práci jsme navrhli enzymový biosenzor pro detekci halogenovaných látek. Námi navržený biosenzor se skládal z uhlíkové elektrody, kterou se detekuje uvolněný halogen pomocí enzymu bakterie *Pseudomonas paucimobilis*, který je schopen uvolnit z detekované látky halogen. Kalibrační přímka je zobrazena na Obr. 1. V úseku koncentrací chloridů od 1 do 150 μM jsme získali striktně lineární kalibrační závislost ($y = 0.0049x + 0.0149$; $R^2 = 0.9984$). Tímto postupem jsme dosáhli detekčního limitu pro chloridy 10^{-9} M.

Obr. 1 Závislost výšky elektrochemického signálu na koncentraci chloridů.



V následném biologickém experimentu byl studován efekt bromadiolonu na hraboše (*Microtus arvalis*). Byly navrženy tři skupiny hrabošů. První skupina byla krmena běžnou stravou, druhá skupina byla krmena přípravkem obsahujícím bromadiolon a třetí skupina byla krmena žížalami obsahující bromadiolon. Na počátku experimentu byla průměrná hmotnost hrabošů 16.6 g u kontrol a 13.7 g u skupiny vystavené lanirátu. Po pětidenním experimentu byla hmotnost zvířat 17.3 u kontrol a 15.2 g u skupiny vystavené lanirátu. Po zvážení byla usmrcena a provedena patologicko-anatomická pitva. Z každého zvířete byla odebrána játra jejichž hmotnost byla u kontrol 0.95 g a u skupiny vystavené lanirátu 0.94 g. Ve vzorcích jaterní tkáň byl dále analyzován obsah bromadiolonu pomocí námi navrženého biosenzoru a ověřen pomocí techniky HPLC-ED. Hladina bromadiolonu u hrabošů vystavených lanirátu byla 2.34 ± 0.14 $\mu\text{g/g}$. V případě hrabošů, kteří byli krmeni žížalami kontaminovanými bromadiolonem byla průměrná hladina 1.70 ± 0.39 $\mu\text{g/g}$. Obsah bromadiolonu se ve všech vzorcích jater pohybuje nad hranicí 0.2 mg/kg, což je považováno za hranici otravy bromadiolonem [20,34]. V případě přijetí bromadiolonu prostřednictvím žížal je poměr mezi

zjištěnými hodnotami a množstvím maximálně přijatého bromadiolonu 0.51, v případě granulí lanirat je tento poměr 0,14. Rozdílné hodnoty těchto poměrů mohou naznačovat, že bromadiolon je lépe vstřebáván následným konzumentem (v organické hmotě), než je tomu v podobě granulí. Z těchto příčin je možné očekávat nálezy bromadiolonu v tkáních řady predátorů, avšak zjištěná koncentrace nemusí být vždy toxická. Na tento fakt ukazují výsledky provedené ve Velké Británii kdy byly v játrech padesáti analyzovaných frettek (*Mustela putorius*) nalezeny stopové koncentrace těchto látek, ale příčiny jejich smrti byly jiné než otrava antikoagulantem. Navíc koncentrace bromadiolonu se měnila v závislosti na ročním období tak, že fretky nalezené v první polovině roku měly vyšší koncentrace rodenticidů v játrech, než fretky nalezené v druhé polovině roku [20].

ZÁVĚR

Halogenované organické látky jsou v dnešní době velmi intenzivně studovány nejen z důvodu jejich širokého pole možnosti použití, ale především z důvodu jejich schopnosti akumulovat se v prostředí. Proto jsme navrhli nový postup pro sledování halogenovaných uhlovodíků za pomoci elektrochemie v kombinaci s bakteriálním enzymem, který jsme aplikovali pro detekci bromadiolonu.

LITERATURA

- [1] I. Kolarova, M. Beklova and M. Vavrova Determination of ecotoxicity in river sediments, *Fresenius Environ. Bull.* 12 (2003) 848-851.
- [2] M. Beklova and J. Pikula The Time-Course of Egg-Laying, Numbers of Eggs Laid, Fertilization and Hatchability of Eggs in Reeves Pheasant (*Syrnaticus-Reevesii*), *Folia Zool.* 43 (1994) 153-162.
- [3] M. Beklova and J. Pikula Oology of the Free-Living Population of Phasianus-Colchicus in the Czech Republic, *Folia Zool.* 42 (1993) 127-138.
- [4] J. Pikula, M. Beklova and V. Hanak Losses, Fertility and Hatchability of Phasianus-Colchicus Eggs During the Circadian Time Course of Egg-Laying in Cage Stock, *Folia Zool.* 39 (1990) 307-324.
- [5] M. Beklova and J. Pikula The Ecological, Quantitative Distribution of Buteo-Buteo in Czechoslovakia, *Folia Zool.* 37 (1988) 241-254.
- [6] R. Ulrich and J. Raszyk Variations in environmental contamination by polychlorinated biphenyls (PCB) and chlorinated pesticides (Lindane, DDT) on pig farms in Hodonin district in 1994 to 1999, *Vet. Med.* 47 (2002) 159-168.
- [7] R. Kizek, J. Vacek, L. Trnkova, B. Klejdus and V. Kuban Electrochemical biosensors in agricultural and environmental analysis, *Chem. Listy* 97 (2003) 1003-1006.
- [8] S.Z. Cohen, S.M. Creeger, R.F. Carsel and C.G. Enfield Potential Pesticide Contamination of Groundwater from Agricultural Uses, *ACS Symposium Series* 259 (1984) 297-325.

- [9] R.B. Cope Small animal anticoagulant rodenticide poisoning, *Aust. Vet. Pract.* 34 (2004) 50-+.
- [10] N.J. Snyder, J.M. Cartron, I. van Wesenbeeck, L.S. Carver and A.M. Ritter Electronic soil moisture measurements in federal insecticide, fungicide, and rodenticide act field dissipation and prospective groundwater studies, in: *Terrestrial Field Dissipation Studies: Purpose, Design and Interpretation*, AMER CHEMICAL SOC, Washington, 2003, pp. 137-155.
- [11] R.L. Jones and G. Mangels Review of the validation of models used in federal insecticide, fungicide, and rodenticide act environmental exposure assessments, *Environ. Toxicol. Chem.* 21 (2002) 1535-1544.
- [12] WHO/FAO DATA SHEETS ON PESTICIDES, WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1996.
- [13] K. Revathi and M. Yogananda Effect of bromadiolone on haematology, liver and kidney in *Mus musculus*, *J. Environ. Biol.* 27 (2006) 135-140.
- [14] R.W. Kirk *Current veterinary therapy X: Small animal practice.*, W. B. Saunders Co., Philadelphia., 1989.
- [15] P.J. Berny, L.A. de Oliveira, B. Videmann and S. Rossi Assessment of ruminal degradation, oral bioavailability, and toxic effects of anticoagulant rodenticides in sheep, *Am. J. Vet. Res.* 67 (2006) 363-371.
- [16] M.F. Brito, J.N. Seixas, F.F. Jabour, G.B. Andrade, B.R.M. Cunha, T.N. Franca and P.V. Peixoto About an outbreak of coumatetralyl poisoning in cattle, *Pesqui. Vet. Bras.* 25 (2005) 143-149.
- [17] M.D.K. Markussen, A.C. Heiberg, R. Nielsen and H. Leirs Vitamin K requirement in Danish anticoagulant-resistant Norway rats (*Rattus norvegicus*), *Pest Manag. Sci.* 59 (2003) 913-920.
- [18] W.B. Stone, J.C. Okoniewski and J.R. Stedelin Poisoning of wildlife with anticoagulant rodenticides in New York, *J. Wildl. Dis.* 35 (1999) 187-193.
- [19] C. Fournier-Chambrillon, P.J. Berny, O. Coiffier, P. Barbedienne, B. Dasse, G. Delas, H. Galineau, A. Mazet, P. Pouzenc, R. Rosoux and P. Fournier Evidence of secondary poisoning of free-ranging riparian mustelids by anticoagulant rodenticides in France: Implications for conservation of European mink (*Mustela lutreola*), *J. Wildl. Dis.* 40 (2004) 688-695.
- [20] P.J. Berny, T. Buronfosse, F. Buronfosse, F. Lamarque and G. Lorgue Field evidence of secondary poisoning of foxes (*Vulpes vulpes*) and buzzards (*Buteo buteo*) by bromadiolone, a 4-year survey, *Chemosphere* 35 (1997) 1817-1829.
- [21] R.F. Shore, J.D.S. Birks, A. Afsar, C.L. Wienburg and A.C. Kitchener Spatial and temporal analysis of second-generation anticoagulant rodenticide residues in polecats

(*Mustela putorius*) from throughout their range in Britain, 1992-1999, *Environ. Pollut.* 122 (2003) 183-193.

[22] C. Aprea, C. Colosio, T. Mammone, C. Minoia and M. Maroni Biological monitoring of pesticide exposure: a review of analytical methods, *J. Chromatogr. B* 769 (2002) 191-219.

[23] C.M. Torres, Y. Pico and J. Manes Determination of pesticide residues in fruit and vegetables, *J. Chromatogr. A* 754 (1996) 301-331.

[24] D. Barcelo A Review of Liquid-Chromatography in Environmental Pesticide Analysis, *Chromatographia* 25 (1988) 928-936.

[25] P.J. Berny, T. Buronfosse and G. Lorgue Anticoagulant Poisoning in Animals - a Simple New High-Performance Thin-Layer Chromatographic (Hptlc) Method for the Simultaneous Determination of 8 Anticoagulant Rodenticides in Liver Samples, *J. Anal. Toxicol.* 19 (1995) 576-580.

[26] V. Fauconnet, H. Pouliquen and L. Pinault Reversed-phase HPLC determination of eight anticoagulant rodenticides in animal liver., *J. Anal. Toxicol.* 21 (1997) 548-553.

[27] K. Hunter High-performance liquid chromatographic strategies for the determination and confirmation of anticoagulant rodenticide in animal tissues, *J. Chromatogr. A* 321 (1985) 255-272.

[28] L.J. Marek and W.C. Koskinen Multiresidue analysis of seven anticoagulant rodenticides by LC/ES/MS/MS., *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.* 229 (2005) U79-U79.

[29] M. Kollroser and C. Schober Determination of coumarin-type anticoagulants in human plasma by HPLC-electrospray ionization tandem mass spectrometry with an ion trap detector, *Clin. Chem.* 48 (2002) 84-91.

[30] H. Atterby, G.M. Kerins and A.D. MacNicol Whole-carcass residues of the rodenticide difenacoum in anticoagulant-resistant and -susceptible rat strains (*Rattus norvegicus*), *Environ. Toxicol. Chem.* 24 (2005) 318-323.

[31] F. Guan, A. Ishii, H. Seno, K. Watanabe, T. Kumazawa and O. Suzuki A method for simultaneous determination of five anticoagulant rodenticides in whole blood by high-performance liquid chromatography, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 21 (1999) 179-185.

[32] S.W. Park, B.S. Seo, E.H. Kim, D.H. Kim and K.J. Paeng Purification and determination procedure of coumarin derivatives, *J. Forensic Sci.* 41 (1996) 685-688.

[33] S.M. Obryan and D.J.C. Constable Quantification of Brodifacoum in Plasma and Liver-Tissue by HPLC, *J. Anal. Toxicol.* 15 (1991) 144-147.

[34] P. Brown, A. Charlton, M. Cuthbert, L. Barnett, L. Ross, M. Green, L. Gillies, K. Shaw and M. Fletcher Identification of pesticide poisoning in wildlife, *J. Chromatogr. A* 754 (1996) 463-478.

Poděkování: Práce na tomto projektu byla podporována granty: MSM 6215712402 a INCHEMBIOL 0021622412.