

*Prikazi bolesnika/
Case reports*

ANALITIČKA POTVRDA TROVANJA PSA
METOMILOM METODOM GC-ITMS I
HPLC-PDA. *Prikaz slučaja*

ANALYTICAL CONFIRMATION OF
METHOMYL POISONING DOG
BY GC-ITMS AND HPLC-PDA METHOD.
Case reports

Correspondence to:

Dipl. bioh. **Gordana Brajković,**
Specijalista toksikološke hemije
Vojnomedicinska akademija,
Centar za kontrolu trovanja, Beograd
Telefon: +381-11-3609481
E-mail: gocab@panet.rs

Gordana Brajković, Vesna Kilibarda, Dragana Rančić

Vojnomedicinska akademija, Centar za kontrolu trovanja, Beograd

Key words

Methomyl; gas chromatography; liquid chromatography; toxicology-chemical analysis; gastric contents.

Ključne reči

Metomil; tečna hromatografija; gasna hromatografija; toksikološko-hemijska analiza; želudačni sadržaj.

Apstrakt

Rad prikazuje trovanje psa metomilom. Uzorke želudačnog sadržaja i hrane na toksikološko-hemijsku analizu koja uključuje analizu na pesticide je dostavio vlasnik uginulog psa. Metomil je određen tečnom hromatografijom sa PDA detektorom i gasnom hromatografijom sa jon trap masenom spektrometrijom (GC-ITMS) gde su podaci prikupljeni u punom skeniranju. Metomil je izolovan iz želudačnog sadržaja i hrane tečno-tečnom ekstrakcijom u kiselom dihlormetanu. Razdvajanje je postignuto na koloni Symmetry® C8 sa mobilnom fazom acetonitril : natrijum dihidrogen fosfat 50 mM pH 3,6 u gradijentu i na kapilarnoj koloni TG-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) na temperaturi 50-300 °C sa rampom od 10°C; sa temperaturom MS Transfer linije 280 °C; temperaturom jonskog izvora od 220°C. Noseći gas je helijum, a opseg masa: *m/z* 50-600. Rekonstitucija je vršena u heksanu, a injektovano 1,0 µL u GC/MS. Metoda je validirana i linearna u opsegu 0,1-2,0 µg/mL ($r^2=0.989$). Granica detekcije je 0,05 µg/mL, a limit kvantifikacije je 0,1 µg/mL. Prinos ekstrakcije za metomil u serumu je 80 – 95%. Ovo su moderne analitičke tehnike za identifikaciju i kvantifikaciju lekova i pesticida u biološkim tečnostima i tkivima.

UVOD

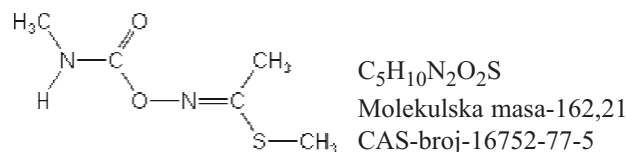
U svakodnevnom životu prisutan je veliki broj materija hemijskog i organskog porekla koje su izuzetno toksične kako po nas tako i po naše kućne ljubimce. Mnogi otrovi su dostupni na našem tržištu i praktično može svako da ih kupi i koristi. Česta su podmetanja i namerna trovanja pasa i mačaka. Najčešće upotrebljavani otrovi, a vrlo smrtonosni, sa kojima se srećemo u kliničkoj praksi su dinitrofenoli i to kreozan-žuti prah (4,6-Dinitro-o-crezol-DNOC). Izazivaju poremećaj telesne temperature usled poremećaja metabolizma, a deluju i na jetru, bubrege i CNS.⁽¹²⁾ Organofosfati i karbamati su nervni otrovi, gde simptomi trovanja nastupaju vrlo brzo: ubrzano disanje, nedostatak koordinacije, povraćanje, grčevi muskulature, hipersalivacija, sužene zenice.^(4,7)

Sledeća grupa su rodenticidi, antikoagulanti namenjeni uništenju glodara. Njihov mehanizam delovanja je sprečavanje koagulacije krvi, što dovodi do nekontrolisanog krvarenja u organizmu i smrti životinje. Simptomi se javljaju nekoliko dana od unošenja otrova. ⁽⁴⁾

Procenat preživljavanja otrovanih životinja zavisi od toga koliko je uneto otrova u organizam i koliko je vremena prošlo od pružanja stručne veterinarske pomoći.

U našem radu je opisano trovanje životinje metomilom, koji prema hemijskoj podeli pripada monometilkarbamatima oksima.⁽¹⁾ Visoko je toksičan pesticid. Koristi se kao insekticid i akaricid, pogotovo protiv štetočina koje su razvile otpornost na organofosfate. ⁽¹⁰⁾ Prvi put je registrovan 1968.

Agencija za zaštitu životne sredine *Environmental Protection Agency* (EPA) svrstala ga je u grupu insekticida čija je upotreba ograničena *Restricted use Pesticide* (RUP).



ime po IUPAC: (E,Z)-metil N-[(metilamino)karbonil]oksi}etanimidatoat

Slika 1. Strukturna formula metomila

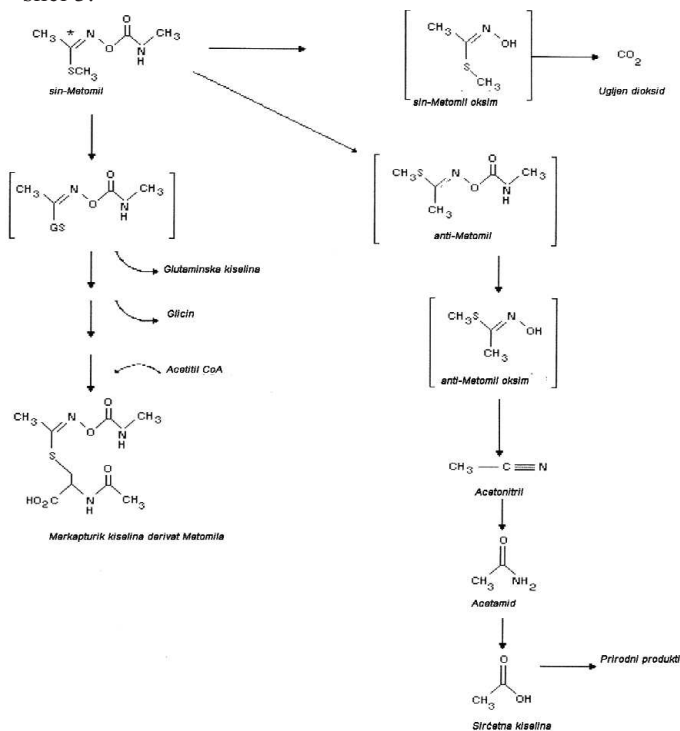


Slika 2.
Metomil- supstanca

Metomil je bela, kristalna supstanca sumporastog mirisa, rastvorljiva u vodi, metanolu, acetonu.^(6,7,12)

Trovanje metomilom je praćeno inhibicijom aktivnosti acetilholinesteraze koje je reverzibilne prirode. Simptomi su povećan bronhijalni sekret, preterano znojenje, salivacija, suzenje očiju, grčevi, povraćanje, proliv i tahikardija, depresija respiratornog sistema i koma.

Metomil se lako apsorbira preko kože, sluzokože, gastrointestinalnog i respiratornog trakta. Brzo se izlučuje i ne akumulira se u tkivu sisara. Metabolizam metomila se odvija u tri pravca. Jednim delom se metaboliše do merkapturik kiselina (acetilcistein) i eliminiše urinom. Drugi metabolički put je stvaranje oksima koji se konjuguju ili metabolišu do ugljen dioksida. Treći put uključuje *vivo*-izomerizaciju metomila i njegov glavni metabolit acetonitril. Prikazano na slici 3.



Slika 3. Metomil i metaboliti metomila*

MATERIJAL I METODE

Uzorak želudačnog sadržaja uginulog psa i uzorak hrane koju je pas prethodno konzumirao u laboratoriju je dostavio vlasnik. Dihlormetan, hlorovodonična kiselina, fosforna

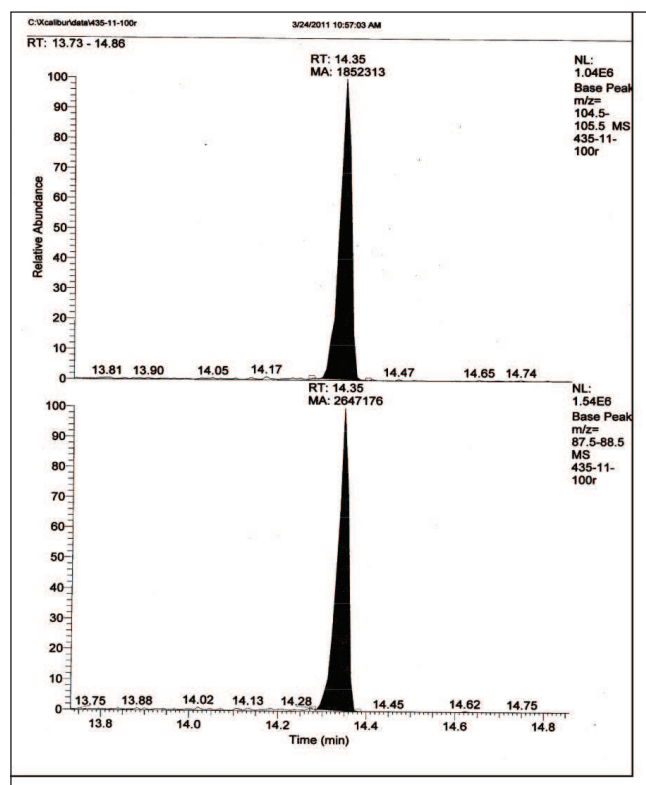
kiselina (PA čistoće), acetonitril i metanol (HPLC čistoće) nabavljeni su od firme Merck, Nemačka. Reagensi mobilne faze natrijum dihidrogen fosfat i standard metomila koji je korišćen za analizu dobijeni su od *Sigma-Aldrich*.

Metomil je dokazan tehnikom gasne hromatografije na instrumentu (GC/MS)-*Thermo Fisher Scientific Jon Trap ITQ 900 Trace GC Ultra*, uz upotrebu biblioteke MS spektara autora Maurer HH, Pflieger K, Weber AA. Hromatografski uslovi za GC-MS: Razdvajanje je radeno na kapilarnoj koloni TG-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm). Temperatura kolone iznosila je od 50-300°C sa rampom od 10°C. Temperatura MS *Transfer* linije je bila 280°C, a jonskog izvora 220°C. Gas nosač je helijum, a protok gasa je 1 mL/min. Maseni detektor je *Jon Trap ITQ 900 Trace GC Ultra, Thermo Fisher Scientific*. Opseg masa 50-600. Dužina analize 32 min. Ekstrakcioni rastvarač je kiseli dihlormetan. Uparavanje je vršeno u struji vazduha, rekonstitucija u 0,5 ml heksana, a injektovano je 1,0 μL u GC/MS. Retenciono vreme za metomil: $R_t \approx 14,33$ min.

Metomil je određen i tehnikom tečne hromatografije u sprezi sa PDA detektorom i bibliotekom UV spektara. Hromatografski uslovi za HPLC-PDA: Mobilna faza: acetonitril: natrijum dihidrogen fosfat 50 mM pH 3,6 doteran sa H_3PO_4 (20%). Mobilna faza je filtrirana i degazirana preko membranskog filtra; kolona *Symmetry® C8 4,6 x 250 mm Waters* sa pretkolonom *Sentry Guard Symmetry® C18*, temperatura kolone: 30°C, brzina protoka mobilne faze: 1-1,5 mL/min. u gradijentu, PDA detektor: $\lambda = 234,0$ nm; retenciono vreme za metomil: $R_t \approx 9,336$ min. Uzorak je rekonstituisan u metanolu i hromatografisan.

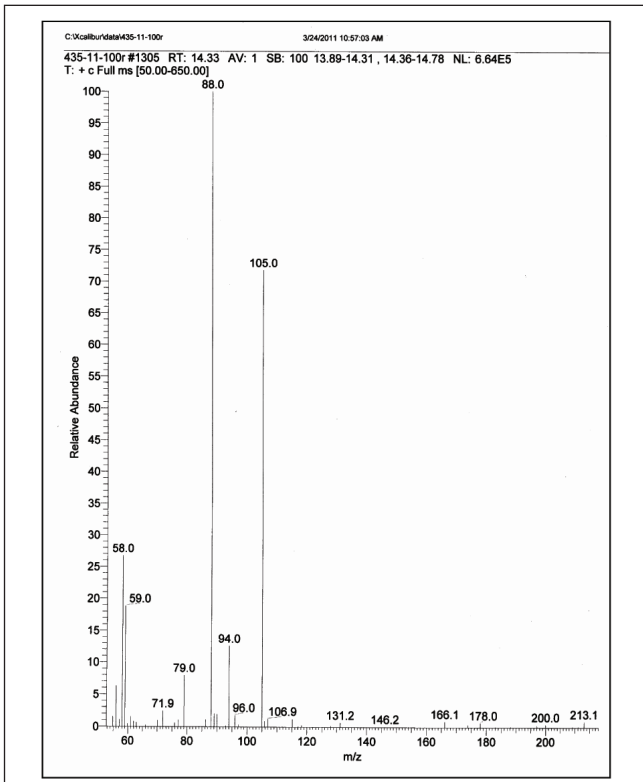
REZULTATI

Dostavljen je uzorak želudačnog sadržaja uginulog psa i uzorak hrane koju je pas prethodno konzumirao sa zahtevom da se izvrši analiza na prisustvo pesticida. Toksikološko-

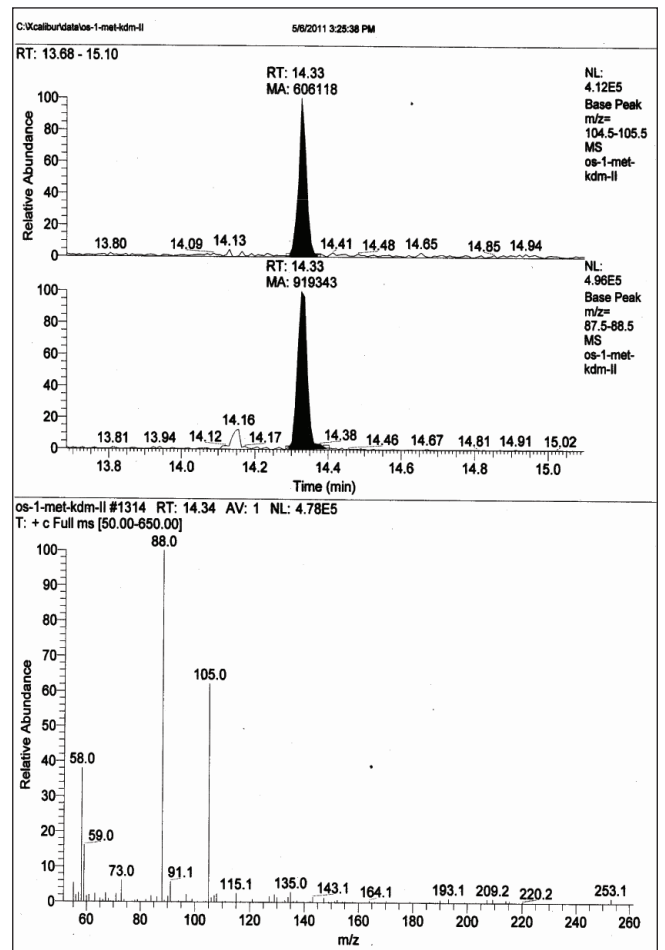


Slika 4. Hromatogrami metomila iz uzorka želudačnog sadržaja.

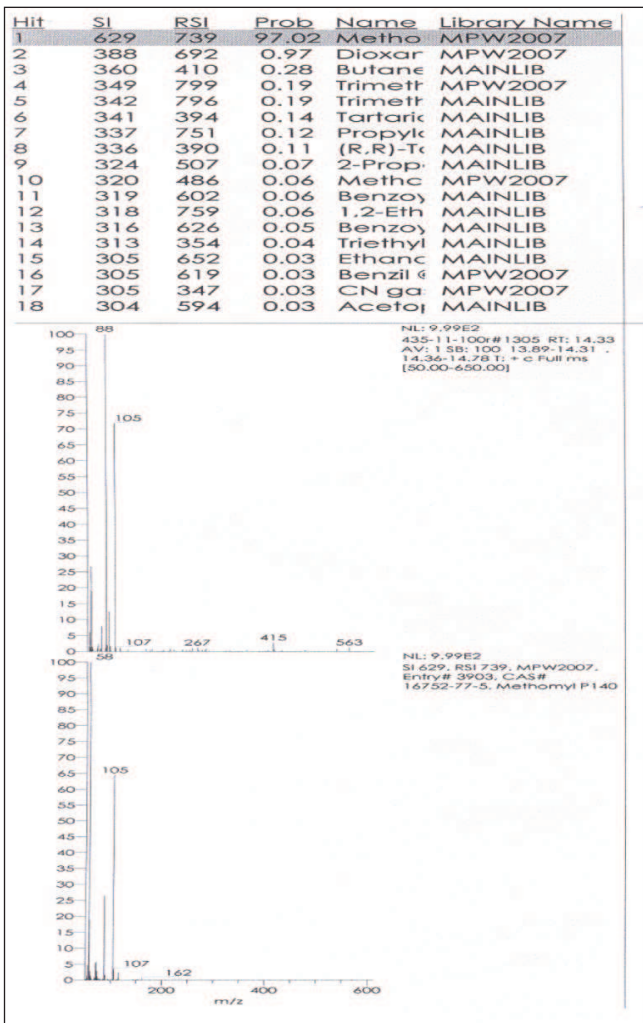
*Published under the joint sponsorship of the United Nations Environment Programme, the International Labour Organisation, and the World Health Organization World Health Organization Geneva, 1996
First draft prepared Dr M.L. Lithchfield, Arundel, United Kingdom



Slika 5. MS spektar metomila iz uzorka želudačnog sadržaja.



Slika 7. Hromatogrami i MS spektar standarda metomila



Slika 6. Poređenje metomila iz uzorka sa bibliotekom

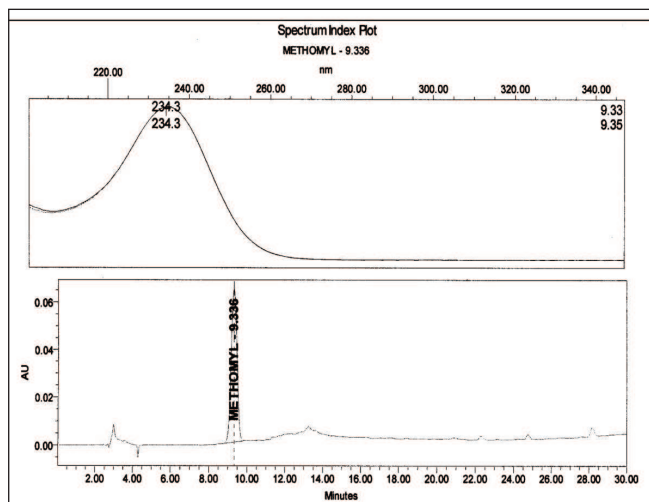
hemijskom analizom primenom gasne hromatografije sa masenom spektrometrijom (GC-MS) i poređenjem retencionih vremena i MS spektara sa MS bibliotekom u uzorcima želudačnog sadržaja i hrane dokazano je prisustvo metomila. Primenom tačne hromatografije (HPLC) sa PDA detektorom i poređenjem retencionih vremena i UV spektara sa UV bibliotekom u dostavljenim uzorcima takođe je dokazano prisustvo pomenutog pesticida. Koncentracija metomila u želudačnom sadržaju uginulog psa iznosila je 36,0 mg/kg.

Uvedena je metoda GC/MS za dokazivanje i određivanje metomila metodom tačno-tečne ekstrakcije u biološkom materijalu.

Na slikama 4 i 5 prikazani su hromatogrami selektovani na jone 88 i 105 i MS spektar metomila u uzorku želudačnog sadržaja koji se poklapa sa MS spektrom iz biblioteke spektara (97,02 % poklapanja), slika 6. Na slici 7. prikazani su hromatogrami i MS spektar u serumu koji je opterećen standardom metomila. Na slici 8. prikazan je hromatogram i UV spektar metomila u uzorku želudačnog sadržaja koji se poklapa sa UV spektrom iz biblioteke spektara.

Metoda na GC-MS je validovana i linearna u rasponu 0,1-2,0 µg/mL ($r^2=0,989$). Granica detekcije je 0,05 µg/mL, a limit kvantifikacije je 0,1 µg/mL sa prinosom metomila od 80 – 95%.

Na slici 9. je prikazana je kalibraciona kriva za metomil u serumu opterećenog različitim koncentracijama standarda na GC-MS-u.



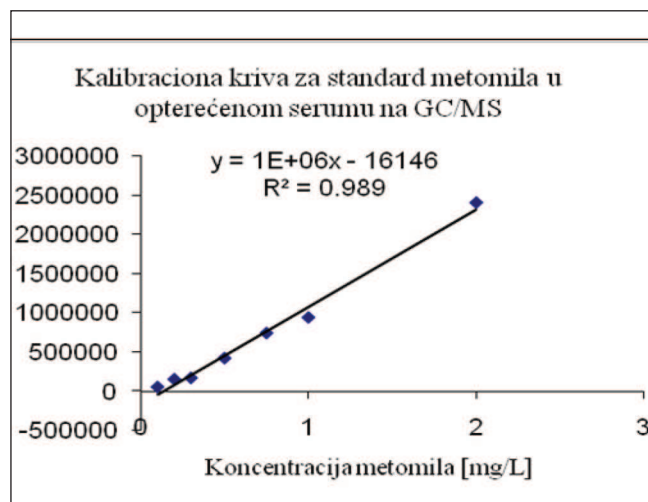
Slika 8. Hromatogram i UV spektar metomila iz uzorka želudačnog sadržaja

DISKUSIJA

U navedenom slučaju trovanja toksikološko-hemijskom analizom u želudačnom sadržaju dokazano je prisustvo metomila u koncentraciji od od 36,0 µg/mL. U uzorku hrane takođe je dokazano prisustvo metomila.

Primena tehnike gasne hromatografije sa masenom spektrometrijom i tečne hromatografije sa PDA detekcijom je od velikog značaja za identifikaciju i kvantifikaciju metomila i drugih pesticida u urgentnim i sudsko-medicinskim analizama.^(2,11) Metoda tečno-tečne ekstrakcije za pripremu uzoraka je efikasna sa visokim prinosom 80-95% i linearna u opsegu 0,1-2,0 µg/mL ($r^2 = 0.989$). Granica detekcije je 0,05 µg/mL, a limit kvantifikacije je 0,10 µg/mL.

U radovima je prikazana i priprema uzoraka na karbamate i metodom čvrsto-fazne ekstrakcije (SPE).⁽¹³⁾ Detekcija i kvantifikacija metomila vršena je primenom tečne hromatografije sa PDA detekcijom.⁽¹⁰⁾ Sadržaj metomila i drugih pesticida u voću i povrću određivan je tehnikom tečne hromatografije sa masenom spektrometri-



Slika 9. Kalibraciona kriva i regresiona jednačina za opterećen serum standardnim rastvorima metomila na GC/MS-u

jom (LC-MS)^(3,10,14), kao i gasnom hromatografijom (GC-MS).⁽⁵⁾ S obzirom na vrstu uzorka radi se o većim koncentracijama i istovremenoj analizi većeg broja pesticida. U ovim radovima posebna pažnja se obraća na njihovom razdvajanju. Prednost GC-MS metode je visoka osetljivost, pa se pesticidi mogu detektovati u veoma niskim koncentracijama. Primena LC-MS metode za određivanje organofosfata i karbamata u serumu pokazuje veliku preciznost, osetljivost i linearnost u opsegu od 5-50 µg/L sa limitom kvantifikacije od 2 µg/L i 5 µg/L.⁽²⁾

ZAKLJUČAK

Određivanje koncentracije metomila u uzorcima je značajno u urgentnoj i forezničkoj toksikologiji zbog slučajnih i namernih trovanja kod ljudi⁽⁸⁾ i životinja. Briga o dobrobiti životinja u civilizovanom društvu, je važno društveno pitanje i zauzima značajno mesto. Kaže se da se stepen civilizovanosti jednog društva ogleda u načinu na koji ono tretira životinje.

Abstract

This article presents the poisoning of a dog by methomyl. Sample of gastric contents and food, for toxicological- chemical analysis, which included the analysis of pesticides, submitted to the owner of a dog poisoned. Methomyl was determined by liquid chromatography coupled with diode-array detection (DAD) and confirmed technique of gas chromatography with ion trap mass spectrometry (GC-ITMS), where data are collected in full-scan mode. Methomyl was isolated gastric contents and food using a liquid-liquid extraction with acid dichloromethane. Separation was achieved on the Symmetry® C8 column with mobile phase acetonitrile: dihydrogen sodium phosphate 50 mM pH 3.6 in the gradient mode, and capillary column TG-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) temperature 50-300°C with ramp of 10 °C; MS Transfer line temperature 280°C; temperature ion source 220°C; carrier gas: He; mass scan range: m/z 50-600. The residue is dissolved in hexane and a 1-µL aliquot of it is injected into GC/MS. The method is validated and linear in the range of 0,1-2,0 µg/mL ($r^2 = 0.989$). Limit of detection was 0,1 µg/mL and limit of quantification was 0,05 µg/mL. Recovery of the extraction of methomyl from serum was 80 – 95%. This is modern analytical instrumentation for identification and quantification of drugs and pesticides in biological fluids and tissues.

LITERATURA

1. Alvito P, Alvares Pharmacology and toxicology of carbamates. In: Clinical and Experimental Toxicology of organophosphates and carbamates 1992; 40-46.
2. Araoud M, Douki W, Najjar MF, Kenani A. Simple analytical method for determination of pesticide residues in human serum by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Environ Sci Health B*. 2010;45(3):242-8.
3. Bogialli S, Curini R, Di Corcia A, Nazzari M, Tamburro D. A simple and rapid assay for analyzing residues of carbamate insecticides in vegetables and fruits: hot water extraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Agric Food Chem*. 2004;52(4):665-71.
4. Drasbach H.R. Trovanje-prevencija, dijagnoza i lečenje, prevod sa engleskog jezika, XIII izdanje, Data status, Beograd 2005.
5. Fialkov AB, Gordin A, Amirav A. Extending the range of compounds amenable for gas chromatography-mass spectrometric analysis. *J Chromatogr A*. 2003;991(2):217-40.
6. Janjić V, Mitrić S. Pesticidi u poljoprivredi i šumarstvu, GrafoMark laktaši; 2004; 557-563.
7. Kiyoshi Ameno, Carbamate pesticides. In: *Drugs and Poisons in Humans A Handbook of Practical Analysis*. 2006; (559-570).
8. Kudo K, Hida Y, Zaitso A, Inoue H, Tsuji A, Ishida T, Ikeda N. A case of poisoning in a man who drank a nutrition supplement containing methomyl, a carbamate pesticide. *Fukuoka Igaku Zasshi*. 2005;96(7):305-10.
9. Krueve A, Herodes K, Leito I. Accounting for matrix effects of pesticide residue liquid chromatography/electrospray ionisation mass spectrometric determination by treatment of background mass spectra with chemometric tools. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2011;25(9):1159-68.
10. Maggio RM, Damiani PC, Olivieri AC. Multivariate curve-resolution analysis of pesticides in water samples from liquid chromatographic-diode array data. *Talanta*. 2011;83(4):1173-80.
11. Santos V, Siqueira H, Silva J, Farias M. Insecticide resistance in populations of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), from the state of Pernambuco, Brazil. *Neotrop Entomol*. 2011;40(2):264-70.
12. Soldatović D, Šovljanski R, Milenković D, Milić S. Toksikologija pesticida sa analitikom, Beograd, 1980;115-128, 263, 413
13. Vichapong J, Burakham R, Srijaranai S, Grudpan K. Sequential injection-bead injection-lab-on-valve coupled to high-performance liquid chromatography for online renewable micro-solid-phase extraction of carbamate residues in food and environmental samples. *J Sep Sci*. 2011; 10.1002.
14. Wang J, Cheung W. Determination of pesticides in soy-based infant formula using liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J AOAC* 2006;89(1):214-24.