

## Kwantitatieve bepaling en stofwisseling van hexachloorcyclohexaan \*)

547.592.13 : 545 : 591.149

door K. van Asperen en F. J. Oppenoorth.

(Uit het Laboratorium voor Biocidenonderzoek T.N.O. te Utrecht).

Een methode wordt beschreven voor de kwantitatieve bepaling van hexachloorcyclohexaan in dierlijk materiaal.

Onderzocht werden o.a. de nauwkeurigheid en de specificiteit van de methode, terwijl de bruikbaarheid werd bewezen in een onderzoek van de stofwisseling van hexachloorcyclohexaan bij muizen en bij huisvliegen.

Onderzoek, gedurende de laatste wereldoorlog verricht in Frankrijk en Engeland, toonde aan dat het hexachloorcyclohexaan, reeds in 1825 door *Faraday* bereid en beschreven, een stof is met opvallend sterke en zeer goed bruikbare insectendodende eigenschappen.

De insecticide werkzaamheid wordt speciaal uitgeoefend door het gamma-isomeer, dat ongeveer 10 % van het ruwe product uitmaakt en ook wel in vrijwel zuivere toestand wordt gebruikt. Het toepassingsgebied van het hexachloorcyclohexaan (HCH) in landbouw en veeteelt is thans zeer belangrijk.

In het kader van een min of meer fundamenteel onderzoek naar het werkingsmechanisme van het HCH en meer speciaal het gamma-isomeer daarvan, deed zich sterk de behoefte voelen aan een betrouwbare methode voor de kwantitatieve bepaling in dierlijk materiaal. Deze zou ons immers in staat stellen enige kennis te verwerven omtrent het lot, dat een aan een dier toegevoegde hoeveelheid HCH ondergaat. Bovendien zouden we zo wellicht enig inzicht kunnen krijgen in de middelen, die aan het dierlijk organisme individueel en aan de diersoort

als geheel ter beschikking staan om zich tegen de werking van het HCH te beschermen. In dit verband zij er op gewezen, dat verschillende insectensoorten een voortdurende bestrijding met een insecticide beantwoorden met de ontwikkeling van een soms grote mate van resistentie tegen het gebruikte middel. Een voor ons onderwerp zeer belangrijk voorbeeld is de resistentie, die de huisvlieg (*Musca domestica*) verworft na langdurig voortgezette bestrijding met HCH of DDT. Hier doet zich uiteraard onmiddellijk de vraag voor welke fysiologische verschillen er bestaan tussen de gevoelige en de resistente dieren van dezelfde diersoort. Zeer in het algemeen zouden we dit alles terug kunnen voeren tot de vraag, welke reactie er plaats vindt tussen het toegediende gif enerzijds en het dierlijk organisme anderzijds.

Het onderzoek geschiedde zowel bij insecten als bij zoogdieren. Het onderzoek bij zoogdieren vindt o.i. zijn rechtvaardiging in de overweging, dat een bij het aanzienlijk gemakkelijker onderzoek van zoog-

\*) Voordracht gehouden op de vergadering van de Nederlandse Vereniging voor Biochemie op 14 November 1953 te Leiden.

dieren verkregen inzicht belangrijke aanknopingspunten zal kunnen opleveren voor het technisch zoveel moeilijker onderzoek van insecten. Bovendien is het onderzoek bij zoogdieren toxicologisch uiteraard van grote betekenis.

### Bepalingsmethode.

Deze is gebaseerd op de methode welke in 1952 door *Schechter* en *Hornstein*<sup>1)</sup> werd gepubliceerd, waarbij wij echter gebruik maakten van het toestel, dat onlangs door *Reith*<sup>2)</sup> werd beschreven en aanbevolen voor de aantoning van HCH in groenten. De methode berust op de reductie van het in het te onderzoeken materiaal of het daaruit verkregen extract aanwezige HCH, met behulp van zink in zuur milieu, tot benzeen. De gevormde benzeen wordt door een uit malonzuur ontwikkelde koolzuurstroom meegevoerd naar een nitreervat, dat gevuld is met een mengsel van gelijke delen rokend salpeterzuur en geconc. zwavelzuur. Hier vindt nitrering plaats, waarbij als belangrijkste reactieproduct m-dinitrobenzeen ontstaat. Dit wordt met diaethylaether geëxtraheerd. Na verdamping van de aether wordt de hoeveelheid m-dinitrobenzeen bepaald met behulp van de kleurreactie volgens *Janovsky*, eveneens door *Reith* beschreven.

Bij de hieronder volgende beschrijvingen bediende men zich van de afbeelding, welke door *Reith* in zijn publicatie (*Chem. Weekblad* 49, 691 (1953)) van het gebruikte toestel wordt gegeven.

#### Bepaling in hersenen, lever en nieren van muizen en in huisvliegen.

Circa 1 gram materiaal wordt in mechanisch fijngemaakte toestand gebracht in het kookkolffje A. Daaraan worden toegevoegd 5 ml ijsazijn, 0.5 g zinkstof (zeer fijn) en 1 g malonzuur. Het nitreervat wordt gevuld met glasparels (diam. ca. 3 mm) en voorzien van 5 ml nitreerzuur (gelijke delen rokend HNO<sub>3</sub> en geconc. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). De slijpstukken worden voorzien van 85% phosphorzuur; kolffje, koeler en nitreervat verbonden en de koeler gevoed met water, dat een temperatuur heeft van 85–95° C. Daarna wordt de inhoud van kolffje A voorzichtig aan de kook gebracht. De azijnzuurdampen worden in de koeler gecondenseerd, de ontwikkelde koolzuurstroom verlaat via het nitreervat het toestel. Na 45 min koken wordt het nitreervat losgemaakt en de inhoud daarvan kwantitatief overgespoeld in een scheitrechter. De verdere behandeling is nauwkeurig gelijk aan die, beschreven door *Schechter* en *Hornstein*<sup>1)</sup>, pag. 545. De extinctie van de verkregen violette oplossing wordt gemeten met een Spekter-absorptiometer.

#### Bepalingen in grotere hoeveelheden materiaal.

Indien de hoeveelheid materiaal te groot is om rechtstreeks in het kookkolffje te worden gebracht wordt het met zand en waterdamp Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (enige uren drogen bij 110° C) in een mortier verwreven tot een fijn droog poeder en daarna geëxtraheerd met een ruime hoeveelheid methyleenchloride (gewone handelskwaliteit). De methyleenchloride wordt door een wattenprop gefiltreerd en het filtraat of een bekend gedeelte daarvan, eventueel na toevoeging van een of meer druppels vloeibare paraffine, afgedestilleerd tot circa 5 ml over is. Deze rest wordt daarna kwantitatief overgebracht in het kookkolffje, de nog resterende methyleenchloride in warm water en tenslotte met behulp van een zachte luchtstroom weggedampt en het residu verder behandeld als hierboven reeds werd beschreven. Aangezien HCH tamelijk vluchtig is, dient men steeds, bijv. bij het afdestilleren, of afdampen van methyleenchloride, te waken voor verdamping van het HCH; dit vereist, wanneer niet voldoende vet in het filtraat aanwezig is, de toevoeging van paraffine.

#### Betrouwbaarheid en specificiteit van de methode.

Om de nauwkeurigheid van de methode te toetsen werden aan hoeveelheden hersenweefsel, leverweefsel en huisvliegen van ongeveer 1 gram geringe hoeveelheden gamma-HCH toegevoegd, variërend van 0 tot

100 microgram. De relatie tussen de bij de kleurreactie gemeten extinctie en de toegevoegde kwantiteit gamma-HCH bleek grafisch zeer goed te worden weergegeven door een rechte lijn. De afstanden der afzonderlijke punten tot de getrokken lijn komen overeen met niet meer dan enkele microgrammen. Fig. 1 geeft hiervan een duidelijke illustratie.

Gemeten werd met Ilford filter no. 605, maximale transmissie bij 548 m $\mu$  en met Ilford filter no. 606, maximale transmissie bij 580 m $\mu$ .

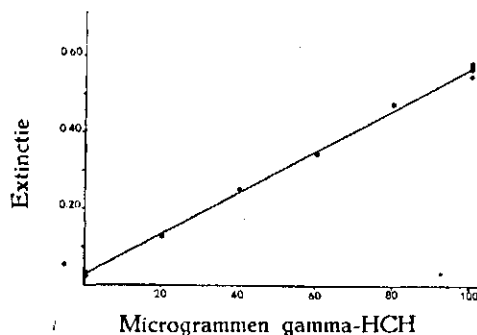


Fig. 1. Relatie tussen extinctie en hoeveelheid gamma-HCH, bepaald in hersenweefsel. Gebruikt werd filter 605 (max. transm. 548 m $\mu$ ).

Zoals uit fig. 1 blijkt wordt ook zonder toevoeging van HCH door ons een geringe extinctie gevonden, welke gedeeltelijk moet worden geweten aan de gebruikte reagentia, gedeeltelijk aan in het dierlijke materiaal aanwezige stoffen. Bij verwerking van geringe hoeveelheden materiaal is deze „blanco-extinctie” klein en zeer constant. Worden bepalingen verricht na extractie van grotere hoeveelheden weefsel dan worden de „blanco-extincties” groter en variëren ook sterker. Het verdient daarom aanbeveling, speciaal in het laatste geval, de waarde ervan regelmatig tussen de bepalingen door vast te stellen. Uiteraard wordt de bepaling bij hoge blanco-extincties nochtans aanzienlijk onnauwkeuriger, zodat in sommige gevallen door ons zelfs rekening moest worden gehouden met afwijkingen tot 10 microgram. Voor ons fysiologisch onderzoek bleek de methode echter steeds ruimschoots voldoende nauwkeurig, te meer daar andere factoren dan de nauwkeurigheid der chemische bepaling dan een zeer belangrijke rol gingen spelen.

Door onopgehelderde oorzaken trad bij onze metingen verschillende malen een storende oranje kleur op, die echter in tegenstelling tot de door ons te meten kleur vrij instabiel bleek. Deze moeilijkheid kon dan ook grotendeels worden overwonnen door de meting niet 20 min na het begin der kleurreactie te verrichten, zoals door *Schechter* en *Hornstein* wordt aanbevolen, doch na 50 min en dan tevens te meten bij een iets grotere golflengte dan gewoonlijk (filter 606 i.p.v. 605).

De opbrengst bij toevoeging van bekende hoeveelheden gamma-HCH was 86% van die, welke theoretisch zou mogen worden verwacht, wanneer een volledige omzetting tot m-dinitrobenzeen zou plaats vinden. Met betrekking tot de specificiteit der methode kan nu allereerst worden opgemerkt, dat ook de andere aan ons ter beschikking staande isomeren van HCH bij gebruik van zeer fijn zinkstof als reducerend agens ongeveer een dergelijke opbrengst leverden. Werd echter gegranuleerd zink gebruikt, zoals oorspronkelijk door *Schechter* en *Hornstein* aanbevolen, dan bleven het beta- en het delta-isomeer ver achter, zoals duidelijk blijkt uit Tabel I.

Tabel I.  
Opbrengst verkregen met de verschillende isomeren van HCH.

	Zinkstof	Gegranuleerd zink
Alpha-isomeer	100	100
Beta-isomeer	98	60
Gamma-isomeer	100 *)	84
Delta-isomeer	95	19

\*) De opbrengst, verkregen met het gamma-isomeer bij gebruik van zinkstof werd op 100 gesteld.

Een drietal andere door ons in de bepaling opgenomen min of meer verwante verbindingen, trichlorbenzeen, meso-inositol (= hexahydroxycyclohexaan) en phenol, gaven een vrijwel volkomen negatieve reactie.

### Stofwisseling van gamma-HCH.

Hieronder willen wij een aantal resultaten van het door ons verrichte stofwisselingsonderzoek vermelden, die de bruikbaarheid van de hierboven beschreven bepalingmethode verder illustreren. Onze vraagstelling bij dit onderzoek was: 1e. Indien een bekende hoeveelheid gamma-HCH aan een dier wordt toegediend, welke zijn dan de concentraties, die in verschillende organen worden aangetroffen? 2e. Wordt gamma-HCH in het lichaam afgebroken? Met afbraak bedoelen wij hier een omzetting in verbindingen, die de beschreven tot de kleurreactie aanleiding gevende reacties niet vertonen. 3e. Vindt er excretie van gamma-HCH plaats?

Het onderzoek werd uitgevoerd bij muizen en bij tegen HCH resistente huisvliegen (*Musca domestica*).

Gebruikt werden albino en champagne kleurige muizen, gewoonlijk 6—10 weken oud.

#### De concentraties in enige organen.

Onmiddellijk, dat wil zeggen 1 tot 3 min na intraveneuze injectie van 400 microgram gamma-HCH (een snel dodende dosis) bij muizen van gemiddeld 17 gram, werden in de hersenen concentraties gevonden van 40  $\mu\text{g}/\text{gram}$  en van 21  $\mu\text{g}/\text{gram}$ , in de lever van 14  $\mu\text{g}/\text{gram}$ .

Na subcutane toediening van 5 mg bij muizen van gemiddeld 17 gram, werd 2½ uur na de injectie in de hersenen van juist gesuccombeerde dieren 7  $\mu\text{g}/\text{gram}$  aangetroffen, terwijl de concentratie in de lever 16  $\mu\text{g}/\text{gram}$  bedroeg. Bij de overlevenden werden na 24 uur concentraties van 15  $\mu\text{g}/\text{gram}$  hersenen en 19  $\mu\text{g}/\text{gram}$  lever gevonden. Van de totale hoeveelheid gamma-HCH, die op deze tijdstippen in het lichaam aanwezig was en die zeker verscheidene milligrammen bedroeg, was dus steeds slechts een zeer kleine fractie in de onderzochte organen aanwezig.

Werd aan ongeveer 25 gram zware muizen gedurende 5 tot 6 dagen met het voer ca. 2 mg gamma-HCH per dag toegediend, dan werden in hersenen, lever en nieren concentraties gevonden van 5—15  $\mu\text{g}/\text{gram}$ . Bij dieren, die op overeenkomstige wijze waren behandeld, werden in het totale lichaam (zonder de darm) hoeveelheden van 600  $\mu\text{g}$  en 1000  $\mu\text{g}$  gevonden. Ook hier waren de concentraties

in de onderzochte organen dus uitzonderlijk laag. Het onderzoek over de verdeling van gamma-HCH in het lichaam wordt nog voortgezet.

#### De afbraak van gamma-HCH in muizen en huisvliegen.

Deze werd nagegaan door aan de proefdieren een bekende hoeveelheid gamma-HCH toe te dienen en daarna op verschillende tijdstippen het „HCH-gehalte” in het totale dier en de excreta tezamen te bepalen. Bij de proeven met huisvliegen werden de excreta niet in de bepaling opgenomen; hieronder zullen wij echter aantonen, dat de excreta zowel bij muizen als bij vliegen slechts verwaarloosbare hoeveelheden HCH bevatten.

Na intraveneuze injectie van 100 of 200 microgram gamma-HCH bij muizen van 13 gram werd na 24 uur circa 20 % teruggevonden, terwijl de overige getallen een ongeveer exponentieel verloop van de afbraak zeer waarschijnlijk maken.

Voor de intraveneuze injectie van muizen en de injectie van huisvliegen (tussen de vliegspielen in de thorax) werden emulsies bereid van HCH bevattende oleum arachidis (1 deel) en fysiologische zoutopl. (24 delen).

Na subcutane injectie van 1 mg gamma-HCH in oleum arachidis werd een nagenoeg rechtlijnige afneming van de hoeveelheid HCH gevonden, waarbij ongeveer 230 microgram HCH per dag werd omgezet (zie fig. 2). Hierbij dient nog aangetekend te worden, dat na 24 uur en na 48 uur ongeveer 75 % van de totaal gevonden hoeveelheden HCH zich bevindt in of vlak onder de huid van het proefdier, die slechts circa 15 % van het totale gewicht uitmaakt.

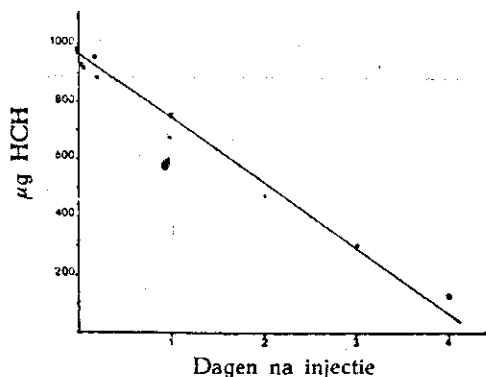


Fig. 2. De hoeveelheid HCH, gevonden na subcutane injectie van 1 mg bij muizen.

Na injectie van 0.31 microgram per dier bij 70 tegen HCH resistente huisvliegen, totaal dus 21.5 microgram, werd een ongeveer exponentiële afneming van de hoeveelheid HCH gevonden. Na 5 uur bleek steeds meer dan de helft van de toegediende dosis te zijn verdwenen, terwijl na een dag nog slechts verwaarloosbare hoeveelheden werden gevonden. Fig. 3 geeft het verloop van de afbraak, zoals dat in een bepaald geval werd gevonden; grafisch weer. Aangezien het onderzoek bij niet-resistente vliegen grote technische moeilijkheden oplevert, kon het verloop van de afbraak hier nog niet met de vereiste nauwkeurigheid worden vastgesteld. Wij zouden daarom willen waarschuwen voor de conclusie, dat de HCH-resistentie berust op het vermogen tot snelle afbraak.

#### De excretie van gamma-HCH.

De excretie na subcutane injectie bij muizen en na

injectie bij resistente huisvliegen bleek in alle door ons

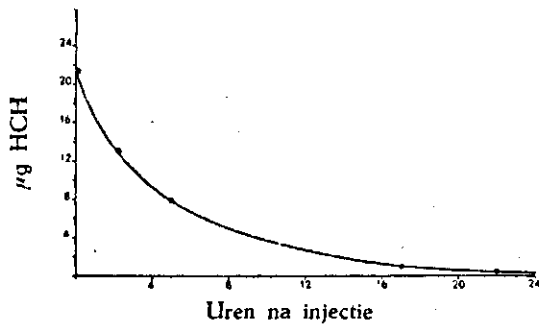


Fig. 3. De hoeveelheid HCH, gevonden na injectie van 21.5 microgram bij resistente huisvliegen.

onderzochte gevallen verwaarloosbaar gering. Na subcutane injectie van 1 mg gamma-HCH werd gedurende 3 dagen ten hoogste 20 microgram uitgescheiden, na subcutane toediening van 2 mg gedurende 1 dag minder dan 10 microgram. De bepalingen werden hierbij steeds verricht in urine en faeces tezamen. Na injectie van 21.5 microgram en 50 microgram bij huisvliegen werd in de excreta niets teruggevonden.

#### Discussie.

Het is nuttig bij de interpretatie der verkregen resultaten voortdurend in het oog te houden, dat alle verbindingen, die onder de beschreven omstandigheden tot benzeen worden gereduceerd, in de door ons gebruikte bepalingmethode een positieve kleurreactie zullen geven en wellicht ook nog andere dit zullen kunnen doen. Wanneer wij in het bovenstaande dus korthedshalve spreken van de bepaling van een hoeveelheid HCH, dan dient men te beseffen, dat misschien ook afbraakproducten van HCH dezelfde

reactie kunnen geven en dat we dus eigenlijk de som van het onveranderde HCH en deze afbraakproducten bepalen. Omgekeerd is het mogelijk, dat zich onder die afbraakproducten, welke geen kleurreactie meer geven, zeer giftige verbindingen bevinden, zodat „ontkleuring” en „ontgiftiging” geenszins parallel behoeven te gaan. Over de aard van de afbraakproducten tasten wij nog in het duister.

#### Samenvatting.

1. Gebleken is, dat de colorimetrische HCH-bepaling volgens *Schechter* en *Hornstein*, uitgevoerd met de apparatuur, beschreven door *Reith* voor het aantonen van HCH in groenten, zeer bruikbaar is voor de kwantitatieve bepaling van gamma-HCH in dierlijk materiaal.

2. Na toediening van gamma-HCH aan muizen worden in het algemeen in hersenen, lever en nieren slechts lage concentraties gevonden, ook wanneer de concentraties in het totale dier zeer hoog zijn.

3. Zowel bij muizen als bij tegen HCH resistente huisvliegen vindt een snelle afbraak van het toegediende HCH plaats (fig. 2 en 3).

4. De hoeveelheden HCH, die worden uitgescheiden, zijn verwaarloosbaar klein.

Een belangrijk deel van de HCH-bepalingen en van het overige experimentele werk werd verricht door *Mej. C. M. A. Vendrig* en *Mej. M. Visser*. Hun aandeel in de verkregen resultaten wordt door ons zeer hoog gewaardeerd. Ook willen wij hier onze dank betuigen aan *Prof. Dr. J. F. Reith* voor zijn waardevolle adviezen.

<sup>1)</sup> *Schechter, M. S. & Hornstein, I., Anal. Chem.* 24, 544 (1952).  
<sup>2)</sup> *Reith, J. F., Chem. Weekblad* 49, 691 (1953).