

**Die bepaling van sekere
plaagdoderreste in die bloed van
plaaswerkers op appelplase in die
Elgin-distrik.**

deur

Carel-Jan Hendrikus Morren

Proefskrif ingelewer ter voldoening aan die vereistes
vir die Meestersdiploma in Tegnologie in die Skool vir
Fisiese Wetenskap aan die Kaapse Technikon.

Datum van indiening: Februarie 1994.

Verklaring: Ek, die ondergetekende, verklaar hiermee dat die inhoud van hierdie proefskrif my eie werk verteenwoordig en dat die menings wat hierin uitgespreek word, my eie is en nie noodwendig dié van die Technikon nie.

Handtekening:

Studie leiers: **Mnr CJ van Zyl**

Senior Lektor

Skool vir Fisiese Wetenskap

Kaapse Technikon

Mnr JM Stokol

Beheer Forensiese Analis

Forensiese Chemie Laboratorium

Departement van Nasionale Gesondheid

Kaapstad

INHOUDSOPGAWE

		Bladsy no.....
1.	Inleiding.	1
1.1.	Doelstellings	3
1.2.	Agtergrond	3
1.2.1.	Chroniese blootstelling aan plaagdoders	8
1.2.2.	Plaagdoders en die omgewing	10
1.2.3.	Die noodsaaklikheid van biologiese monitering	12
1.2.4.	Vereistes van biologiese monitering	14
1.2.5.	Waarom is plaagdoders nodig?	16
2.	Metabolisme.	18
2.1.	Agtergrond	18
2.2.	Primêre metabolisme	20
2.2.1.	Hidrolases	21
2.2.1.1.	Esterases	22
2.2.1.2.	Amidases	24
2.2.1.3.	Epoksiedhidrolases	26
2.2.2.	Mikrosomale mono-oksigenases	28
2.2.3.	Mikrosomale FAD-bevattende mono-oksigenases	31
2.3.	Sekondêre metabolisme	32
2.3.1.	Glukuronidasie	33
2.3.2.	Glutatioon-S-transferases	35
2.3.2.1.	Glutatioon-S-epoksiedtransferases	36
2.3.2.2.	Glutatioon-S-aromatiese transferases	37
2.3.2.3.	Glutatioon-S-alkieltransferases	37

2.3.3.	Metilering	38
2.3.4.	Algemeen	39
3.	Plaagdoderdata.	40
3.1.	Asinfos-metiel	40
3.2.	Chloorpirifos	43
3.3.	Endosulfaan	46
3.4.	Metidation	48
3.5.	Protiofos	50
4.	Die bepaling van Asinfosmetiel, Chloor- pirifos, Endosulfaan, Metidation en Protiofos.	53
4.1.	Algemene oorwegings vir die bepaling van 'n geskikte metode	53
4.2.	Analitiese prosedures beskikbaar vir die bepaling van plaagdoders	54
4.3.	Oorwegings vir hierdie metode	59
4.4.	Metode ontwikkeling	61
4.5	Metode	68
5.	Resultate.	69
5.1.	Die ontledingsproses	69
5.2.	Uitslag en bespreking van die plaagdoder- ontledings	74
5.2.1.	Belemmerende stowwe	75
5.2.2.	Organofosfate	78
5.2.3.	Organochloriede	81

5.3.	Algemene opmerkings	86
6.	Gevolgtrekkings en Aanbevelings.	87
6.1.	Gevolgtrekkings	87
6.2.	Aanbevelings	88
7.	Anneks 1. 'n Uiteensetting van die plaagdoders betrokke by sterfgevallen	93
8.	Anneks 2. Apparaat en reagense	94
9.	Anneks 3. Chromatogramme en massaspektrometrie data	97
9.1.1.	Chromatogram van bloedmonster gedoseer met plaagdoders op 'n DB-5 kapillêre kolom: Vlam-fotometriese detektor	97
9.1.2.	Chromatogram van bloedmonster gedoseer met plaagdoders op 'n DB-5 kapillêre kolom: Elektron-ontvangsdetektor	98
9.2.1.	Chromatogram van bloedmonster gedoseer met plaagdoders op 'n DB-210 kapillêre kolom: Stikstof/fosfordetektor	99
9.2.2.	Chromatogram van bloedmonster gedoseer met plaagdoders op 'n DB-210 kapillêre kolom: Elektron-ontvangsdetektor	100
9.3.1.	Die bevestiging van Endosulfaan-B in die positiewe monster op die massa-selektiewe detektor mbv selektiewe ione	101

9.3.2.	Die Endosulfaan- β standaard met selektiewe ione bepaal op die massa-selektiewe detektor	102
9.4.	'n Voorbeeld van 'n monster waarvan die teenwoordigheid van die plaagdoder nie met absolute sekerheid met selektiewe ione bevestig kon word nie	103
9.5.	Die belemmerende stowwe merkbaar wanneer monsterekstrakte gekonsentreer word vir selektiewe ionmonitering	104
9.6.	Voorbeelde van chromatogramme om aan te toon hoe die belemmerende stowwe die plaagdoderstandaarde oorskadu	105
9.7.	Massaspektrometrie data van die belemmerende stof, (2-butoksi-etanol) ₃ -fosfaat (CAS no: 000078-51-3) wat in "Vacutainer" buise voorkom	106
10.	Bronnelys.	107

TABELLE

1-1	Plaagdodervergiftigings by onnatuurlike sterftes .7	.7
1-2	Blootstelling van werkers aan DETF	8
2-1	Sommige van die hidrolases wat bestaan	21
3-1	Vlakke van Chloorpirifos in weefsel	44
3-2	Vlakke van Endosulfaan- α en - β in weefsel	47
4-1	Die invloed van etanol en metanol op die herwins van die plaagdoders	63
4-2	Die effektiwiteit van die elueermiddels	64
4-3	Die invloed van elueervolume op die herwins van die interne standaard	64
5-1	McReynolds retensie-indekse van vloeistoffases in gaschromatografie	72
5-2	Die invloed van belemmerende middels uit proppe op die detektors	77
5-3	Die isotooppatrone van chloor in massa- spektrometrie	84

LYS VAN FIGURE

2-1	Die reaksie van Malation	22
2-2	Die hidrolise van Dimetoaat	24
2-3	Die hidrolise van Propaniel	25
2-4	Die hidrolise van Dieldrin	26
2-5	Die hidrolise van Karbariel	27
2-6	Die struktuur van Piperonielbutoksied	29
2-7	Die oksidasie van Paration	30
2-8	Die konjugasie van Meprobaamat mbv UDPGA	34
2-9	Glutatioon-S-epoksiedtransferases en Karbariel ..	37
2-10	Die reaksie van Metielparation	38
4-1	Lineariteit van plaagdoderekstraksie uit bloed ..	67
5-1	Afbreekkurve van die plaagdoders in bloed	79
5-2	Fragmentasieroetes van Endosulfaan	83
5-3	Die massaspektrum van Endosulfaan- α en - β soos deur Safe en Hutzinger bepaal	85

OPSOMMING

Plaaagdoders word algemeen in Suid-Afrika gebruik vir die beheer van allerlei plae; van die beheer van insekte en swamme tot onkruid. Die grootste gebruiker van plaaagdoders is waarskynlik die landbousektor en daarom is werkers in hierdie deel van die arbeidsmark potensieel die mense wat die meeste blootgestel word aan die gevare van hierdie onontbeerlike produkte.

In die 1988/89 sagtevrugteseisoen is ongeveer R1000 miljoen aan buitelandse valuta deur die sagtevrugtebedryf verdien. Dit is dus vir hierdie bedryf belangrik om vrugte van hoogstaande gehalte te produseer in 'n baie mededingende bedryf. Appels het ongeveer 62,5% van die totale sagtevrugte-uitvoere bedra waarvan die Elgin-Grabouwstreek die belangrikste produksiegebied is.

Hierdie bedryf is dus baie afhanklik van plaaagdoders om die oes te beskerm teen allerlei plae. Plaaswerkers word aan plaaagdoders blootgestel en dit is dus nodig om die vlak van blootstelling by hierdie plaaswerkers vas te stel.

'n Omvattende biologiese moniteringsprogram is uitgevoer in die Elgindistrik waarin bloed- en urinemonsters versamel is. Die hoof oogmerk van die moniteringsprogram was om met kliniese toetse die blootstelling aan plaaagdoders

te bepaal. Later is besluit dat die bepaling van plaagdoderreste op bloed 'n onderafdeling van hierdie omvattende program sal wees. Van die kliniese toetse wat uitgevoer is, het onder andere die bepaling van serum- en rooiesel cholinesterase ingesluit. Monsters is versamel gedurende Augustus (begin van die spuitseisoen), November (middel van die spuitseisoen) en Februarie (einde van die spuitseisoen).

'n Multi-residu metode is ontwikkel om organofosfaat- en organochloriedplaagdoders in die volbloed te bepaal. Hoewel verskeie metodes reeds bestaan vir die bepaling van óf organofosfate óf organochloriede in bloed of serum, is daar geen multi-residu metode nie. Hierdie multi-residu metode berus op die vloeistof-vloeistof ekstraksie van 'n bloed/Celite/etanolmengsel vir ekstraksie van die volgende plaagdoders: Asinfos-metiel, Chloorpirifos, Endosulfaan, Metidation en Protiofos.

Die plaagdoderresiduvlakke is bepaal op gaschromatograwe wat toegerus was met DB-5 en DB-210 kapillêre kolomme en vlam-fotometriese, elektronontvangs- en stikstof/fosfordetektors. Bevestiging van bevindings is op 'n gaschromatograaf met 'n massa-selektiewe detektor in die selektiewe ioonwyse gedoen.

Van die 402 bloedmonsters wat ontleed is, is 23 monsters vir organofosfate en 29 monsters vir organochloriede vir finale bevestiging op die massaspektrometer gestuur. Slegs

een monster kon positief bevestig word. Die plaagdoder Endosulfaan- β is gevind. Die bevestiging van plaagdoders is bemoeilik deurdat belemmerende stowwe wat in die proppe van die monsterbuis voorkom, in die bloed uitloog.

Hoewel die studie getoon het dat daar prakties gesproke geen plaagdoders gevind is nie, is belangrike inligting verkry oor die hantering en ontleding van bloedmonsters vir plaagdoders.

SUMMARY

Pesticides are generally used in South-Africa for the control of various pests; from insects and fungi to weeds. The agricultural industry is probably the biggest user of pesticides and therefore workers in this part of the labour force have the biggest risk of being exposed to the hazards of these essential products.

During the 1988/89 deciduous fruit season the deciduous fruit industry earned approximately R1000 million in foreign exchange. It is therefore very important for this industry to produce fruit of high quality in a very competitive market. Of the total deciduous exports, apples comprised approximately 62,5%. The Elgin-Grabouw area is the biggest producer of apples.

This industry is clearly very dependant on pesticides to protect its crops against pests. From time to time farm -

workers are exposed to pesticides, a study was therefore performed to assess the levels of exposure of farm workers.

Blood and urine samples were collected in a comprehensive biological monitoring program in the Elgin area to determine, using clinical tests, the level of exposure to pesticides. It was decided later that the determination of pesticide residues in blood would form part of this main study. Other tests included serum and red cell cholinesterase. Samples were collected during August (start of spraying season), November (midseason) and February (end of spraying season).

A multi-residue method was developed to extract organophosphate and organochlorine pesticides in whole blood. Although various methods exist, they allow only for the extraction of either organophosphates or organochlorines and not multi-residue extractions. This multi-residue method is based on the liquid/liquid extraction of a blood/Celite/ethanol mixture to extract the following pesticides: Azinphos-methyl, Chlorpyrifos, Endosulfan, Methidathion and Prothiophos.

The pesticide residue levels were determined on gas chromatographs equipped with DB-5 and DB-210 capillary columns and flame photometric-, electron capture- and nitrogen/phosphorous detectors. The results were confirmed

on a gas chromatograph with mass-selective detector in selective ion mode.

Of the 402 blood samples analysed, 23 samples showed positive for organophosphates and 29 for organochlorines, and were sent for analysis on the mass spectrometer. Of those samples only one could be positively identified. The presence of the pesticide Endosulfan- β was confirmed. The confirmation of the pesticides was complicated by interfering substances that leached from the rubber stoppers of the collection vessels into the blood.

Although the study showed that for practical purposes no pesticides were present, other important information was obtained about the handling and analyses of blood samples for pesticides.

HOOFSTUK 1

INLEIDING.

Plaagdoders word algemeen in Suid-Afrika gebruik vir die beheer van allerlei plae; van die beheer van insekte en swamme tot onkruidmiddels. Die grootste gebruiker van plaagdoders in Suid-Afrika is waarskynlik die landbou-sektor en daarom is werkers in hierdie deel van die arbeidsmark potensieel die mense wat die meeste bloot-gestel word aan die gevare van hierdie onontbeerlike produkte.

Die vervaardigers van plaagdoders in Suid-Afrika word sedert 1951 deur die Wet op Misstowwe, Veevoedsel, Landboumiddels en Veemiddels (Wet 36 van 1947) verplig om plaagdoders te registreer vir gebruik teen spesifieke plae op spesifieke gewasse. Hierdie wet vereis ook dat sekere inligting op die etikette van plaagdoders moet verskyn.

Plaagdoders is algemeen beskikbaar; ook by die supermark en dus is dit baie moeilik om in alle gevalle beheer uit te oefen oor die korrekte en veilige gebruik van hierdie middels. Die etikette op plaagdoderhouers gee wel aan-wysings oor die korrekte en veilige gebruik van die produk, maar die finale keuse van die manier waarop hy dit gaan hanteer berus nog by die gebruiker self.

Die gemiddelde mens gebruik plaagdoders slegs op 'n relatief klein skaal by sy huis en word dus nie so baie daaraan blootgestel nie. In die landbou, veral op sagtevrugteplase, word plaagdoders egter op groot skaal in spuitprogramme gebruik en dus is die moontlikheid van blootstelling daar groter.

Die sagtevrugtebedryf het sy ontstaan in Suid-Afrika gehad op 24 Augustus 1652 toe die eerste vrugtebome aangeplant is. Cecil John Rhodes het in 1896 aan Harry Pickstone opdrag gegee om soveel moontlik plase aan te koop in die Boland; van Franschoek tot Wellington en Tulbagh, en hierdie plase het, en staan vandag nog bekend as Rhodes Fruit Farms. Toe hierdie plase begin vrugte lewer, is met uitvoere begin en het die bedryf gegroei sodat daar in die 1988/89 seisoen ongeveer R1 000 miljoen aan buitelandse valuta verdien is. (Van Rensburg, 1989:125).

In die 1988/89 sagtevrugteseisoen is ongeveer 355 000 ton sagtevrugte uitgevoer, waarvan ongeveer 62,5% appels was. Volgens Van Rensburg (1989:127-8) word ongeveer die helfte van die appeloes binnelands bemark wat dan die totale produksie van appels op ongeveer 443 000 ton vir die 1988/89 seisoen te staan bring. Die Elgin-Grabouw gebied is die belangrikste appel produksiegebied en ongeveer 37% van alle sagtevrugte uitvoere kom uit hierdie gebied.

Om dus vas te stel wat die huidige stand van blootstelling van werkers aan plaagdoders is, is die sagtevrugtebedryf, en in die besonder die appelbedryf in die Elgin-gebied, 'n goeie vertrekpunt. In hierdie bedryf word 'n verskeidenheid van plaagdoders onder beheerde toestande aangewend, aangesien die koöperasie die spuitprogram wat gevolg moet word, voorskryf. Die vlakke van plaagdoders wat op vrugte toelaatbaar is, word beheer deur die Direktoraat Landbou-produkstandaarde van die Departement van Landbou en die Departement van Nasionale Gesondheid.

1.1. DOELSTELLINGS.

- (1) Ontwikkel 'n koste-effektiewe metode vir die bepaling van organofosfate en organochloriede in bloed.
- (2) Doen die bepalings van plaagdodervlakke op die bloed van plaaswerkers wat aktief betrokke is by plaagdoderbespuitings in appelboorde, gedurende én buite die spuitseisoen.
- (3) Stel vas of die bepaling van plaagdoders op die bloed van plaaswerkers 'n aanduiding kan gee van die vlakke van blootstelling aan plaagdoders.

1.2. AGTERGROND.

Voorvalle van vergiftiging vind plaas wanneer mense plaagdoders of plaagdoderhouers nalatig hanteer. Dit kom van tyd tot tyd voor en lei meestal tot ernstige gevolge. 'n Groot probleem is dat nie alle mense wat plaagdoders hanteer altyd bewus is van die gevare of korrekte aanwen-

ding van hierdie produkte nie. Die volgende paar gevalle is duidelike voorbeelde daarvan.

In Januarie 1984 hang 'n man vergiftigde vye in 'n boom om die sprees wat sy vye eet, te dood. Hy tref nie genoeg voorsorgmaatreëls nie en sy kinders eet van die vye. Drie van sy vier kinders sterf 'n aaklige dood van die organofosfaat Paration waarmee die vye vergiftig is. (SAP Uniondale GNO 2-4/1984).

Gedurende Januarie 1991 berig Die Burger (1991a) dat twee plaaswerkers gesterf het nadat hulle die vorige week die huis waarin hulle woon met 'n plaagdoder bespuit het. In Februarie van dieselfde jaar word daar in Die Burger (1991b) berig van agt mense wat in die hospitaal opgeneem word nadat hulle koeldrank gedrink het. Die boer se vrou het die koeldrank voorberei in 'n houer waarin voorheen gif was. Weer in Maart van dieselfde jaar word in Die Burger (1991c) en (1991d) verslag gedoen van 'n kleuter wat sterf nadat sy en twee ander kinders op onbekende wyse 'n organofosfaat ingeneem het.

Die Burger (1987) berig dat die Minister van Nasionale Gesondheid en Bevolkingsontwikkeling opdrag gegee het dat 'n komitee ondersoek moes instel na die moontlikheid om voorligting te gee oor die korrekte hantering van plaagdoders, veral aan werkers wat kontak met plaagdoders het. Die komitee het die opdrag gekry nadat 'n artikel in die

SA Mediese Joernaal (Joubert et al, 1987) verskyn het, waarin gesê is dat die toename in organofosfaatvergiftiging plaasvind agv gebrek aan beheer en toesig oor spuitstowwe. Verder moes ook aandag aan Landbouwetgewing gegee word sodat die gebrekkige inligting wat op plaagdoderetikette verskyn het, reggestel kon word.

Hoewel daar by geleentheid in die Huisgenoot (Le Roux, 1987) en in ander populêre tydskrifte wel artikels verskyn wat duidelik voorligting gee oor die korrekte gebruik en gevare van plaagdoders en die noodsaaklikheid van opleiding van werkers, vind daar van tyd tot tyd wel ongelukke plaas.

Daar is ook gevalle van growwe nalatigheid in die landbou-gemeenskap. Die Weekly Mail (1992a en b) berig dat daar op 'n plaas wat aan 'n groot korporasie behoort verskeie gevaarlike gifstowwe gevind is. Die plaaswerkers het beweer dat houters met die woorde "HIGHLY TOXIC" op die plaas rondgelê het en in 'n ondersoek is leë, sowel as halfvol houters, buite 'n stoorkamer gevind. Die plaagdoders betrokke was Paration, 2,4-D, EDB en Parakwat. Verder word berig dat plaaswerkers die plaagdoders met kaal hande hanteer en ook spuitwerk sonder beskermende klere of maskers doen. 'n Woordvoerder van die plaas het egter aan verslaggewers vertel dat beskermende klere en maskers wel vir gebruik beskikbaar was.

Die Weekly Mail (1992a en b) berig dat plaaswerkers vertel het van die effek wat die plaagdoders op hulle gehad het: oë wat brand en die gesig wat vervel, verlies van eetlus, asook duiseligheid. Langdurige blootstelling aan plaagdoders kan tot ernstige probleme lei, aangesien dit kanker, embriomisvorming of chromosoomafwykings kan veroorsaak.

Moses (1988) het 105 plaaswerkers in Amerika en Kanada ondervra oor werkstoestande wat kontak met plaagdoders insluit. 'n Vraelys het getoon dat 23,2% van die werkers geen skoolopleiding gehad het nie, terwyl 'n verdere 41,4% slegs vir 'n tydperk van 1 tot 6 jaar op skool was. Op die vraag waar hulle inligting kry oor die plaagdoders waarmee hulle werk, het 68% gesê dat hulle nie weet nie en 32% het hul toesighouers aangedui as bron vir inligting. Tien persent van die mense wat ondervra is, het aangedui dat hulle leë plaagdoderhouers vir ander gebruike in die huis aanwend.

Gevalle soos die voorafgaande skeep geleentheid wat daartoe kan lei dat mense blootgestel word aan plaagdoders en in sommige gevalle kan hierdie blootstelling tot die dood lei.

Cravey en Baselt (1981) berig dat 2% van alle sterftes agv toevallige vergiftigings gedurende 1973 in Amerika te wyte was aan plaagdoders. 79% hiervan het voorgekom in die

ouderdomsgroep 5 jaar en jonger. Van 1953 tot 1969 was daar ongeveer 20000 gevalle van vergiftiging in Japan, waarvan ongeveer die helfte tot die dood gelei het. (Namba, 1971).

Met ondersoek na die oorsake van onnatuurlike sterftes by die Forensiese Chemie Laboratorium van die Departement van Nasionale Gesondheid in Kaapstad, is die volgende hoeveelheid plaagdodervergiftigings gevind:

Tabel 1-1: Plaagdodervergiftigings by onnatuurlike sterftes.

JAARTAL	TOTALE AANTAL SAKE ONTLEED	PLAAGDODERS GEVIND	PERSENTASIE PLAAGDODERS
1982	252	58	23.0
1983	231	39	16.9
1984	255	57	22.3
1985	252	47	18.7
1986	286	47	16.4
1987	282	62	22.0
1988	275	59	21.5
1989	302	77	25.5
1990	307	58	18.9
1991	346	57	16.5
1992	304	49	16.1

Volgens Coplestone (1986) kom daar jaarliks ongeveer 1 miljoen gevalle van akute vergiftiging voor agv nalatigheid of ongelukke. Ongeveer 1% van die mense wat vergiftiging opdoen, sterf. Tabel 1-1 se syfers toon dat gemiddeld 55 mense per jaar sterf in die bedieningsarea van hierdie laboratorium. Indien Coplestone se syfers toegepas word, beteken dit dan dat ongeveer 5500 mense jaarliks in daardie area akute plaagdodervergiftiging opdoen.

Bardin et al (1987) dui aan dat in 1985 organofosfaat-vergiftiging die tweede grootste oorsaak van toelating tot die intensiewe eenhede van die Tygerberg Hospitaal in Parow was. Die voorafgaande dui daarop dat plaagdodervergiftiging 'n ernstige probleem is wat aandag verdien.

1.2.1. *Chroniese blootstelling aan plaagdoders.*

Daar is egter 'n ander aspek wat ook aandag verdien en dit is dat plaagdodertoedieners chronies aan plaagdoders blootgestel word. Hoewel daar vroeër berig is van gevalle van nalatigheid in die landbou, is dit tog die uitsondering op die reël en poog die meeste van die gebruikers van plaagdoders om alle aanwysings op houters betreffende gebruike en veiligheidsmaatreëls noukeurig te volg.

Hoewel alle veiligheidsmaatreëls gevolg is, rapporteer Weisskopf et al (1988) dat absorpsie van plaagdoders nog steeds kan plaasvind. In 'n projek waar die plaagdoder Diasinon aangewend is vir die bespuiting van weivelde om larwes en kewers te beheer, het ontleding van die urine van die verskillende klasse werkers vir die metaboliet DETF (Di-etieltiofosfaat) die volgende getoon:

Tabel 1-2: Blootstelling van werkers aan DETF.

Taak	µg DETF/g Kreatinien
Toediener	5.8
Voorman	4.1
Toesighouer	2.5
Kontrole	1.8

Vanaf Tabel 1-2 is dit duidelik dat die persone wat die grootste blootstelling aan die plaagdoder het, ook die grootste moontlikheid van besmetting en nagevolge het.

'n Ander faktor wat in ag geneem moet word, is weersomstandighede. Wanneer dit baie warm is, word dit ongemaklik onder die beskermende klere. Die moontlikheid ontstaan dat die werkers dan van hulle klere wil uittrek en so raak die risiko van besmetting groter. Moses (1988) dui aan dat aan slegs 70% van die plaaswerkers wat aan plaagdoders blootgestel kon word, beskermende klere uitgereik is. Wetende dat dit nodig is, het 71% van die mense wat dirék met plaagdoders werk, geen beskermende klere gedra nie. Een van die hoofredes, by 46% van die mense, was dat die klere te warm was. 'n Verdere 12% van die ondervraagdes het as ander rede aangevoer dat hulle nie geweet het hoe om hierdie beskermende klere te gebruik nie.

Met die bespuiting van die insek- en onkruidodder DNOC, wat 'n geel vloeistof is, is kontak met die plaagdoder duidelik sigbaar. Trekkerbestuurders wat die bespuiting doen se skermbrille word baie gou oortrek met die geel vloeistof en hulle sig word dan belemmer. In winderige toestande word hierdie probleem vererger. Indien hulle die bespuiting doen sonder skermbrille, word die oogslymvlies en die vel rondom die oë direk blootgestel. Absorpsie van die plaagdoder op die gesig vind dan deur die vel en die bloedryke oë plaas. Die Wêreld Gesondheidsorganisasie (WHO

Study Group, 1982) dui aan dat blootstelling aan DNOC die liggaam se metabolisme versnel en die liggaamstemperatuur verhoog. Die toksiese effek op die lewer het in sommige gevalle sterftes veroorsaak en hierdie sterftes het veral tydens uitsonderlike warm weer voorgekom.

1.2.2. *Plaagdoders en die omgewing.*

Selfs die korrekte aanwending van plaagdoders kan ook nadelige gevolge op die mens en omgewing hê. Die Oosterlig (1992) berig dat mense in die Sondagsriviervallei aangetas word deur die plaagdoders wat op sitrusboorde gebruik word. Hoewel die plaagdoders baie selektief gekeur en gebruik word, veroorsaak dit nog steeds allergieë en longprobleme by sekere mense.

Op Bredasdorp het 'n probleem met afloopwater ontstaan nadat 'n onkruidmiddel gebruik is. In 1992 het afloopwater veroorsaak dat die plante op 'n naburige erf doodgaan. Die aktiewe bestanddele van die middels wat vermoedelik betrokke was, is Glifosaat, Anilasiën of 'n formulاسie bestaande uit Amitrool/Proprop/Diuron. (Navraag Bredasdorp, 1992). Die uitloog van onkruidmiddels uit grond word deur Van Dyk en Bot (1987) verduidelik wanneer hulle sê dat dit by sekere grondsoorte kan voorkom. Nadat die onkruidmiddel en die grond gebind het, kan 'n verandering in die grondtoestand weer die onkruidmiddel vrystel en kan gewasse dan skade opdoen.

Landboupraktyke was verantwoordelik vir ten minste 17 plaagdoders wat gevind is in die grondwater van 23 Amerikaanse state, berig Cohen et al (1987). Die grondwater is gemonster uit boorgate wat verteenwoordigend van die spesifieke gebiede was. Moses (1988) dui aan dat die vlakke van die plaagdoder Chloortal wat in Amerikaanse grondwater gevind is, gewissel het tussen 50 en 700 mg/kg. Die vlak van die onkruidoder Bromasil wat ook in grondwater gevind is, was 300 mg/kg. Die DD_{50} vir Chloortal is 3000 mg/kg terwyl die DD_{50} vir Bromasil 5200 mg/kg is. (DD_{50} is 'n term wat gebruik word om aan te dui dat 50% van die proefdiere by daardie dosis gesterf het.)

Die gebruik van plaagdoders kan katastrofies wees vir voëls en kleiner diere in die omgewing. Wanneer plaagdoders op aas gebruik word om probleemdiere dood te maak, word ook ander nie-teikendiere en -voëls aan die gif blootgestel. Die voëls in Suid-Afrika wat die meeste blootgestel word is die witkop- en Egiptiese aasvoëls. Hulle is almal aasvreters en van tyd tot tyd sterf van hierdie voëls wanneer hulle aas aan karkasse wat met gif behandel is. Dit gee direk aanleiding daartoe dat sekere spesies voëls bedreig raak en moontlik kan uitsterf. In 'n pamflet van 'n bekende winkelgroep, Pick 'n Pay Omgewingsfeite, word berig dat die geelbekspeg in 1910 die eerste Suid-Afrikaanse voël was wat uitgesterf het. Veedip wat arseen bevat was sedert 1902 in Suid-Afrika in gebruik en word direk verbind met die uitsterf van hierdie voël.

1.2.3. *Die noodsaaklikheid van biologiese monitering.*

Bernard en Lauwerys (1986) sê dat die doel van biologiese monitering die bepaling is van die interne dosis van skadelike stowwe. Hierdie inligting kan dan gebruik word sodat die gesondheidsrisiko bepaal kan word.

Moses (1988) het 'n studie in die noorde van Amerika gedoen op plaaswerkers wat blootgestel is aan plaagdoders. Sy het tot die gevolgtrekking gekom dat selfs met die goeie plaagdoderbeheerprogramme soos wat daar in gebruik is, daar nog steeds tekortkominge is, omdat dit nie ten volle uitgevoer en toegepas word nie.

Van die probleme wat Moses (1988) teëgekomp het, is dat plaaswerkers nie ingelig word oor die plaagdoders waarmee hulle werk nie en die gevare word nie aan hulle verduidelik nie. Daar word ook nie basiese skoonmaakmiddels soos water en seep aan hulle voorsien wanneer hulle met die plaagdoders werk nie.

Die Wet op Masjinerie en Beroepsveiligheid (Wet No 6, 1983) het daarvoor voorsiening gemaak dat alle werkers, ook plaaswerkers, onder veilige omstandighede hulle werk kon verrig. Hierdie wet word op 1 Januarie 1994 vervang deur 'n nuwe wet, die Wet op Beroepsgesondheid en -veiligheid (Wet No 85, 1993). Hierdie nuwe wet is verder uitgebou en bring nuwe begrippe na vore om werkers beter te beskerm.

Van die nuwe begrippe waarvoor voorsiening gemaak word in die Wet op Beroepsgesondheid en -veiligheid (Wet No 85, 1993), is:

Beroepshigiëne: die antisipasie, herkenning, evaluering en kontrolering van toestande wat ontstaan in of vanuit die werkplek en wat siekte of 'n nadelige effek op die gesondheid van persone kan veroorsaak.

Biologiese monitering: 'n beplande program van periodieke versameling en ontleding van liggaamsvloei-stowwe, weefsels, ekskreta of uitgeasemde lug ten einde die blootstelling aan of absorpsie van enige substansie of organisme in persone vas te stel en te kwantifiseer

Hierdie nuwe wet stel dit ook in die vooruitsig, soos die Wet op Masjinerie en Beroepsveiligheid (Wet No 6, 1983), om die werkgever te verplig om sy werknemers veilig te hou deur 'n veilige werksomgewing te skep, en dat die toerusting en artikels wat gebruik word, veilig moet wees. Verder word daar ook vereis dat wanneer 'n werknemer blootgestel word aan 'n werk wat risiko inhou, die werkgever voldoende veiligheidsmaatreëls sal tref om daardie persoon te beskerm.

Wanneer werk 'n risiko vir werkers inhou, kan dit by regulasie onder die Wet op Beroepsgesondheid en -veilig-

heid (Wet no 85, 1993) tot gelyste werk verklaar word. Die volgende word dan van die werkgewer verwag; dat:

- (a) die bedreiging geïdentifiseer moet word,
- (b) blootstelling voorkom, of tot die minimum beperk word en,
- (c) die werknemer aan 'n volledige biologiese moniteringsprogram onderwerp sal word.

Verder word ook vereis dat die werknemer vertrouwd gemaak moet word met die gevare wat die toerusting of middels wat hy gebruik, vir sy veiligheid kan inhou.

Die hantering van plaagdoders sou gesien kon word as 'n moontlike bedreiging vir die gesondheid van die plaaswerkers, selfs al word daar voldoende voorsiening getref om hierdie mense met veiligheidstoerusting te beskerm. Deur biologiese monitering kan die vlak van blootstelling aan plaagdoders vasgestel word, om dan 'n aanduiding te gee van die gesondheidsrisiko; mits die effek van daardie plaagdoder op die mens bekend is. (Copplestone, 1986).

1.2.4. *Vereistes van biologiese monitering.*

Bernard en Lauwerys (1986) het voorgestel dat 'n biologiese moniteringsprogram uit die volgende moet bestaan:

- (1) Omgewingsmonitering; waar die eksterne blootstelling aan die chemiese middel bepaal word, bv in voedsel, water, lug, ens.

- (2) Biologiese monitering; die bepaling van vlakke van die chemiese middel en metaboliëte in die liggaam.
- (3) Gesondheidswaarneming; 'n ondersoek om die nadelige gevolge van die chemiese middel op die liggaam te bepaal, bv verlaging van cholienesterase.

Coye et al (1986a) stel verder voor dat 'n biologiese moniteringsprogram ook 'n afdeling moet hê wat kriteria insluit wat bepaal wanneer 'n werker tydelik of permanent onttrek moet word van blootstelling aan gevaarlike stowwe.

Coye et al (1986a) berig dat Kalifornië die enigste Amerikaanse staat is waar dit verpligtend is om plaaswerkers gereeld te toets vir die effek van plaagdoders. Wanneer gevind word dat blootstelling aan plaagdoders veroorsaak dat die cholienesterase vlakke met meer as 30% vanaf die basisvlak daal, moet ondersoek ingestel word na die boerderypraktyke. Indien die verlaagde cholienesterase vlak van die werker voortduur, word die persoon onttrek. Hy mag nie verder met plaagdoders werk totdat die cholienesterase vlakke tot 'n bevredigende vlak terugkeer het nie.

Die Kaliforniese Departement van Voedsel en Landbou vereis verder ook dat met registrasie van plaagdoders, data verskaf word vir die bepaling van urinemetaboliëte wat

gebruik kan word in biologiese monitering, aldus Coye et al (1986b).

Dit is slegs wanneer 'n volledige biologiese moniteringsprogram gedoen is en die gesondheidsrisiko bekend is, dat regstellende stappe gedoen kan word. Hierdie regstellende stappe kan voorligting en opvoeding insluit. Indien hierdie streng stelsel van biologiese monitering in Suid-Afrika ingestel word, kan dit die gesondheidsrisiko van plaaswerkers wat aan plaagdoders blootgestel word aansienlik verlaag.

1.2.5. *Waarom is plaagdoders nodig?*

Volgens Ames (1992) is in die vorige eeu net meer as 'n miljoen mense in Ierland dood, nadat die aartappeloes deur 'n swam vernietig is. Hulle het van wanvoeding en honger gesterf. Verder sê Ames dat die voorkoms van malaria in Sri-Lanka afgeneem het. Oor 'n tydperk van twintig jaar het dit vanaf 2,8 miljoen tot slegs 17 gevalle per jaar gedaal sedert die plaagdoder DDT in gebruik geneem is. Nadat die gebruik van DDT gestaak is, het die voorkoms van malaria egter weer begin styg.

Plaagdoders word in die landbou op verskeie maniere aangewend en het tot die gevolg gehad dat voedsel in groot hoeveelhede geproduseer kan word. Weens die groter beskikbaarheid van voedsel het die pryse gedaal en is dit dus nou meer bekostigbaar en so kan meer mense toegang tot

voedsel hê. Plaagdoders speel dus 'n onontbeerlike rol in die voortbestaan van 'n groeiende bevolking.

HOOFSTUK 2

METABOLISME

Wanneer 'n biologiese moniteringsprogram ingestel word; en 'n gedeelte hiervan sluit in die bepaling van plaagdoders of plaagdodermetaboliete; is 'n kennis van metabolisme nodig. Metabolisme is al die fisiese en chemiese veranderinge waardeur stowwe in die liggaam verander word sodat die energie in die liggaam gebruik kan word, of waardeur nadelige stowwe verander sodat dit uitgeskei kan word.

2.1. AGTERGROND.

Daaglik kom mens en dier in aanraking met sintetiese en natuurlike gifstowwe. Dit is veral die vetoplosbare stowwe wat maklik deur die vel, longe en spysverteringskanaal geabsorbeer word. Sekere lipofiliese organochloriede of metaboliete word in die vetweefsel gestoor. Chroniese blootstelling mag dan daartoe lei dat hierdie stowwe in die liggaam ophoop en dan toksiese vlakke bereik aangesien hul eienskappe hulle uitsluit van die normale uitskeidingsprosesse. (Amdur et al, 1991:88; Murphy et al, 1983).

Die liggaam het 'n effektiewe manier ontwikkel om sommige van hierdie vetoplosbare gifstowwe metabolies te verander in polêre wateroplosbare stowwe sodat hulle uitgeskei kan word. Die vlugtige wateroplosbare stowwe word deur die

longe, en die nie-vlugtige stowwe deur die urine en stoelgange uitgeskei. Enige vetoplosbare stowwe wat nog in die uitskeidingsvloei-stowwe voorkom word wéér deur die weefsel geabsorbeer en kan nou verder deur die metaboliese stelsels verwerk word. (Amdur et al, 1991:88).

Die metaboliese proses bestaan uit twee hoofstappe, naamlik: primêre en sekondêre metabolisme. Primêre metabolisme het ten doel om funksionele groepe by te voeg of bloot te lê. Sekondêre metabolisme behels die konjugasie van die funksionele groepe wat 'n verhoogde wateroplosbaarheid veroorsaak. Die gekonjugeerde molekule kan nou deelneem aan die oordragstelsels wat dit deur die lewer-, nier- en ingewandsmembrane laat beweeg, die uitskeidingsstowwe in. (Amdur et al, 1991:88).

Hierdie metaboliese omskakelingsprosesse vind hoofsaaklik in lewerselle plaas. Lewerselle bestaan onder andere uit 'n netwerk van buisvormige membrane wat die selvloeistof deurkruis en die endoplasmiese retikulum genoem word. Die buisvormige membraan bestaan uit lipiede en proteïene en die vetoplosbare stowwe beweeg by voorkeur na die lipiedgedeelte van die membraan. Twee soorte endoplasmiese retikulum word gevind, naamlik die granulêre en die agranulêre. Dit is die agranulêre (gladde) endoplasmiese retikulum wat die ensieme bevat wat verantwoordelik is vir primêre metabolisme. (Amdur et al, 1991:89; Meyer et al, 1983:1.5).

Die semivloeibare selvloeistof, wat die sitosol genoem word, bevat baie van die ensieme wat verantwoordelik is vir sekondêre metabolisme. Na hierdie ensieme word gewoonlik verwys as sitosoliese of mikrosomale ensieme. Konjugate word gewoonlik gevorm met inheemse stowwe soos glukose, glukuronsuur, sulfate, fosfate of aminosure. (Amdur et al, 1991:89; Meyer et al, 1983:1.4).

Hoewel die metaboliese omskakelingsprosesse ten doel het om die vreemde stowwe te verander in polêre neweprodukte wat minder toksies is en wat uitgeskei kan word, gebeur dit egter nie altyd dat die neweprodukte minder toksies is nie. 'n Voorbeeld hiervan is die onkruidmiddels MCPA en 2,4-D. Hierdie middels word as esters opgeneem deur die plante, metabolies gehidroliseer na sure en word dan skadelik teenoor die plante. (Kuhr & Dorough, 1979:125; Hassall, 1983:50, 267)

2.2. PRIMÊRE METABOLISME.

Die ensieme wat verantwoordelik is vir hierdie tipe metabolisme het ten doel die invoeging of blootlê van funksionele groepe deur hidrolise, oksidasie en reduksie. Daar bestaan hoofsaaklik twee tipes ensieme, naamlik hidrolases en oksigenases. Hulle funksies en die tipe reaksies waarvoor hulle verantwoordelik is word nou bespreek. (Hassall, 1983:47)

2.2.1. *Hidrolases.*

Die ensieme verantwoordelik vir hidrolise word hidrolases genoem. Met differensiële sentrifugasie word die gebonde hidrolases in die mikrosomale fraksie, en die oplosbare hidrolases in die sitosol gevind. Daar is geen koënsieme nodig om hidrolases te aktiveer nie, maar van tyd tot tyd mag dit wel nodig wees vir katione om te help met aktivering. (Hassall, 1983:48).

Tabel 2-1: Sommige van die hidrolases wat bestaan:

HIDROLASES	SOORT BINDING
fosfatases	R-O-P
karboksielesterases	R-COOR'
karboksielamidases	R-CONHR'
epoksiedhidrolases	RCHOCH ₂

Die name van die verskillende soorte hidrolases word gegee na aanleiding van die soort bindings wat hulle aanval. (Hassall, 1983:50).

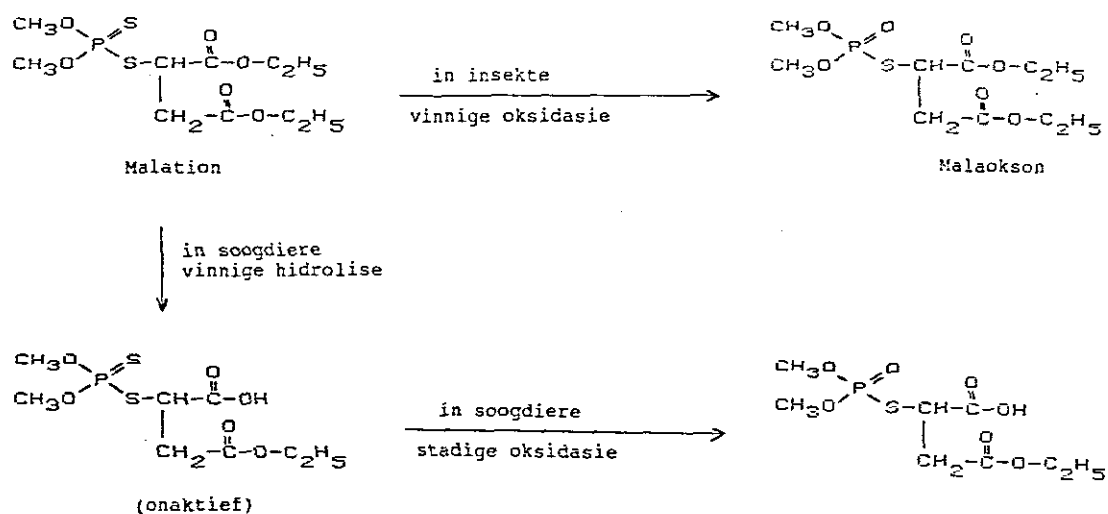
Die ensieme esterases en amidases kom albei sitosolies en mikrosomaal voor. Die sitosoliese esterases of amidases word gewoonlik geassosieer met spesifieke reaksies soos asetielcholiënesterase en pseudocholiënesterase. Die mikrosomale esterases is weer verantwoordelik vir die hidrolise van 'n wye verskeidenheid van gifstowwe wat as esters die liggaam binnekom. (Hassall, 1983:48).

2.2.1.1. Esterases.

Esterases, 'n sekere soort hidrolases, kan ook weer verdeel word in vier groepe: A-, B-, C-tipe en cholien-esterases. Elkeen van hierdie soorte reageer verskillend met of op die verskillende soorte plaagdoders. A-tipe esterases hidroliseer organofosfate terwyl B-tipe esterases belemmer word deur egte organofosfate. Karbimate weer, reageer gewoonlik met B-tipe esterases. C-tipe esterases reageer weer by voorkeur met asynsuuresters terwyl cholienesterases slegs reageer met esters waarvan die alkohol-gedeelte cholien, $\{(CH_3)_3N^+CH_2CH_2O-\}$, is. (Amdur, 1991:98; Hassall, 1983:50).

Dit is C-tipe esterase-reaksies wat help om te verklaar waarom MALATION 'n relatief lae toksisiteit vir hoër lewensvorms het, aangesien dit so effektief is in die hidrolise van die oorspronklike molekule om dit onaktief te maak. By insekte word die MALATION geoksideer na die hoogs reaktiewe MALAOKSON. (Hassall, 1983:81).

Fig 2-1: Die reaksie van Malation



Cholienesterase-reaksies is belangrik omdat plaagdoders die vermoë het om hierdie soort esterases onaktief te maak. Die plaagdoders bind stewig aan die aktiewe groepe van esterases of amidases. Dit kan ook gebeur dat die produkte van hidrolise van die plaagdoders so reaktief is dat hulle ook aan die aktiewe groepe bind en esterases of amidases nie weer vrygestel kan word nie. (Amdur et al, 1991:99)..

Cholienesterases is nodig by die oordrag van elektron-impulse in die senuweestelsel. Vir volgehoue elektron-oordrag in die sinaps (senuwee-oordragpunte) moet die asetielcholien verwyder word om die oordragpunte gepolariseerd te hou. Asetielcholien word gehidroliseer deur asetiel-cholienesterases na cholien en asetaat. Asetiel-cholienesterases is 'n spesifieke cholienesterases omdat dit 'n groot voorkeur het vir asetielcholien. (Jacob et al, 1978:230; Stryer, 1981:887).

Wanneer karbamate B-tipe esterase-reaksies ondergaan word metiel- of dimetielkarbamaatsuur en die fenole, enole of oksieme van die moedermolekule gevorm. Karbamate hidroliseer teen wisselende spoed en dit is in sommige gevalle onmoontlik om te bepaal of oksidasie eerste plaasvind en hidrolise daarna, of andersom. Wanneer hidrolise vinnig genoeg plaasvind, is dit moontlik dat die karbamaat vernietig word en die ensieme weer vrygestel word. In die gevalle waar oksidasie eerste plaasvind is dit die ok-

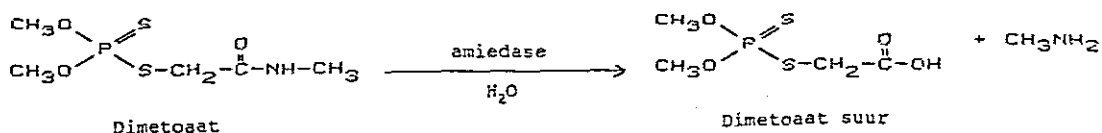
sidasie van die sulfied na sulfoon of sulfoksied wat die molekule verswak, sodat hidrolise dan makliker kan plaasvind. (Hassall, 1983:51; Khur & Dorough, 1979:125).

B-tipe esterase-reaksies reageer verskillend onder sekere omstandighede, soos gesien kan word uit die volgende voorbeelde. In plante en insekte is karbamate meer stabiel terwyl soogdiere meer geneig is om dit af te breek. Een van die uitsonderings is die karbamaat Karbariel wat maklik in rotte, skape en honde gehidroliseer word, maar redelik weerstandig is in ape en varke. Verder is hidrolise die hoof metaboliese roete by Duitse kakkerlakke en slegs 'n sekondêre metaboliese roete by die Amerikaanse kakkerlak. (Kuhr & Dorough, 1979:126).

2.2.1.2. *Amidases.*

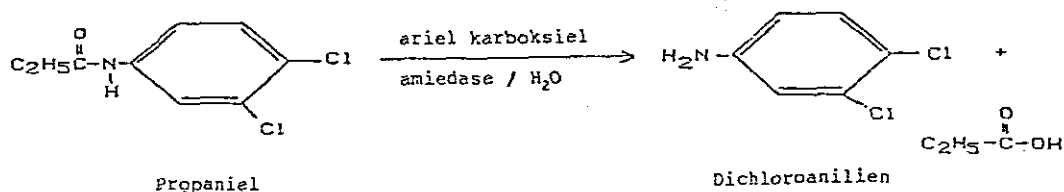
Amidases is verantwoordelik vir die hidrolise van die amiedbinding in die plaagdoder Dimetoaat. Die amiedbinding toon ooreenkomste met 'n ester en dus is die produkte ná hidrolise 'n suur en 'n amien. In die geval van Dimetoaat is die produkte van hidrolise Dimetoaatsuur en 'n amien, metielamien. (Hassall, 1983:51).

Fig 2-2: Die hidrolise van Dimetoaat



Amiedhidrolise kan ook plaasvind in aromatiese amiede soos gesien kan word uit die hidrolise van die onkruidodder Propaniel. (Hassall, 1983:51).

Fig 2-3: Die hidrolise van Propaniel



Gewoonlik geskied ensiematiese hidrolise van amiede stadiger as dié van esters. Hoewel daar verskeie redes hiervoor kan wees, is dit moontlik dat sekere ensieme net op amiede werk. 'n Ander faktor kan substituentgroepe aan die amiedbinding wees. Elektronegatiwe substituentgroepe aan primêre, sekondêre en tersiêre amiede kan die stabilisasie van die amiedbinding ontwrig, sodat dit verswak en meer vatbaar word vir hidrolise. (Amdur et al, 1991:99).

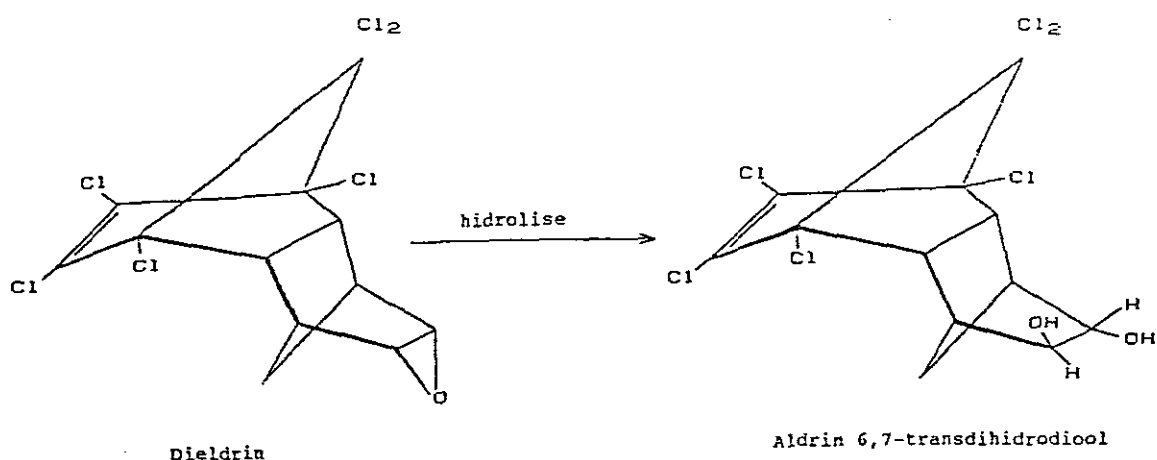
Alkielgroepe kan weer elektronskenkend optree, wat nou weer die elektrondigtheid in die amiedbinding verhoog en dit stabiliseer. Die tempobepalende stap in die hidrolise van amiede is die verlies van die uitgaande groep, en hier mag die teenwoordigheid van 'n protondonor, bv H₂O, nodig wees. Afwesigheid van so 'n protondonor sal dan die effek hê dat hidrolise vertraag word. (Amdur et al, 1991:99).

2.2.1.3. Epoksiedhidrolases.

Die hidrolise van epoksiede word bewerkstellig deur epoksiedhidrolases. Die ensieme kom voor in die mikrosomale fraksie van die lewer en ander selle, in dieselfde omgewing as sitochroom P-450. Epoksiedhidrolases is verantwoordelik vir die katalise van aromatiese oksiede en alifatiese epoksiede na hul onderskeie trans-1,2-dihidrodiolle. Die gevolg van hierdie metaboliese verandering is dat die produk minder elektrofilies is en daarom chemies minder reaktief is. In die algemeen is die aromatiese oksiede chemies onstabiel en mag herrangskik na die ooreenstemmende fenol, wat dan weer beskikbaar is vir deelname aan sekondêre metabolisme. (Amdur et al, 1991:97; Hassall, 1983:52).

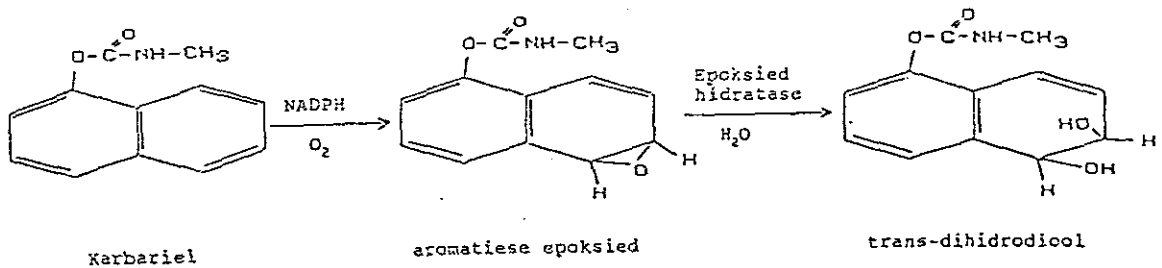
Epoksiedhidrolases is verantwoordelik vir die hidrolise van 'n wye reeks plaagdoders en selfs daartoe in staat om die baie stabiele epoksied, Dieldrin, te hidroliseer. Die hidrolise na Aldrin-trans-dihidrodiol is stadig. (Hassall, 1983:52, 138).

Fig 2-4: Die hidrolise van Dieldrin



In sommige gevalle werk ander ensieme saam met epoksiedhidrolases om hidrolise te bewerkstellig. Die hidrolise van Karbariel is 'n voorbeeld van hierdie samewerking. Mikrosomale mono-oksigenases oksideer eers die Karbariel na 'n aromtiese epoksied, wat op sy beurt weer epoksiedhidrolise ondergaan na die ooreenstemmende trans-dihidrodiol. (Hassall,1983:52).

Fig 2-5: Die hidrolise van Karbariel



Die metabolisme deur epoksiedhidrolases vind plaas deurdat die oksiede hidrasie ondergaan na 'n nukleofiliese spesie. Hierdie nukleofiel val nou die koolstof aan wat steries weg van die oksiedring is en in die mins belemmerde posisie is. Die gevolg is dat die ring op 'n posisie wég van die hidrosilasie oopgaan en dan word diole in die trans-konfigurasie gevorm. (Amdur et al, 1991:98).

Epoksiedhidrolases is in die algemeen verantwoordelik vir die detoksifikasie van plaagdoders, aangesien dit die baie reaktiewe oksiede metabolies verander na minder reaktiewe spesies. Baie van hierdie oksiede word vir die beskadiging en misvorming van weefsel blameer en epoksiedhidrolases

dien dan as teenvoeter en beskermer. Dit is wel moontlik, soos met enige metaboliese reaksie, dat spesies kan ontstaan wat meer reaktief is en dit kan selfs kankerwekkend wees. (Amdur et al, 1991:98).

2.2.2. *Mikrosomale mono-oksigenases.*

Mikrosomale oksidases of gemengde-funksie-oksidases het die vermoë om die atome van 'n suurstofmolekule te skei sodat hulle uiteindelik in verskillende eindprodukte beland. Een van die atome word opgeneem in 'n geskikte substraat, R-H, terwyl die ander suurstofatoom uiteindelik deel vorm van 'n watermolekule. (Hassall, 1983:53).

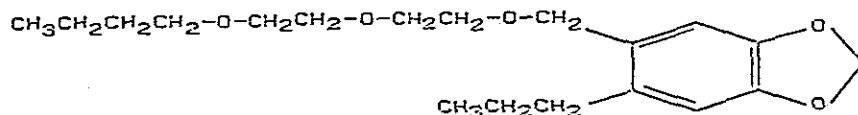
'n Eienskap van die reaksie is dat die reduseervermoë wat die suurstofmolekule in staat stel om in twee atome te breek, indirek verskaf word deur NADPH. 'n Tweede eienskap van mikrosomale oksidases is dat die finale elektrondraer 'n koënsiem is met die naam Sitochroom P-450. Sitochroom-P450 word beskou as die belangrikste ensiem van primêre metabolisme. (Hassall, 1983:53; Stryer, 1981:313).

Mikrosomale oksidasie vind plaas wanneer die substraat bind aan die geoksideerde vorm van Sitochroom P-450. Die yster is in die ferri (Fe^{3+}) oksidasietoestand en 'n kompleks word gevorm tussen die substraat en die Sitochroom P-450. Met die hulp van NADPH-Sitochroom P-450 reduktase neem die kompleks hierna 'n elektron van NADPH op, wat dan die yster in die Sitochroom P-450 gedeeltelik

redukeer na Fe^{2+} . Binding vind nou plaas tussen molekulêre suurstof en die gereduseerde substraat-Sitochroom P-450-kompleks, wat nog 'n elektron van NADPH aanvaar. Soms word hierdie tweede elektron verskaf deur NADH met behulp van Sitochroom b_5 . 'n Tydelike kompleks word nou gevorm na die elektronbeweging. Die peroksied-RH-ferri-P-450-kompleks verloor nou 'n oksied-ioon aan die protone in die media en vorm water. Die agterblywende, hoogs aktiewe, suurstof-atoom reageer nou met R-H, wat daar naby gebind is, om R-OH te vorm. Die geoksideerde vorm van Sitochroom P-450 word weer vrygestel om verder met nog substraat te reageer. (Amdur et al, 1991:92-93; White et al, 1978:416).

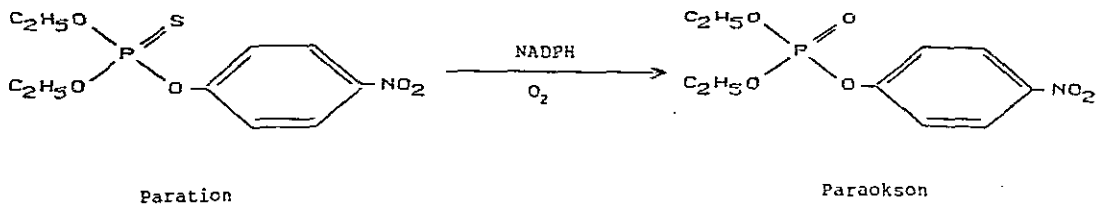
Die reaksies waaraan mono-oksigenases deelneem word aan bande gelê deur koolstofmonoksied en metileendioksifenole. Die naam, Sitochroom P-450, het juis sy ontstaan as gevolg van sy spektrale eienskappe agv koolstofmonoksied. Wanneer Sitochroom P-450 in sy gereduseerde vorm (Fe^{2+}) met koolstofmonoksied gekontamineer word, verkry dit 'n maksimum absorpsie by 450 nm. 'n Belangrike voorbeeld van 'n metileendioksifenool is Piperonielbutoksied. (Hassall, 1983:53-4).

Fig 2-6: Die struktuur van Piperonielbutoksied



'n Reaksie wat baie belangrik is, is die vervanging van 'n swawelatoom deur 'n suurstofatoom. Hierdie reaksie is belangrik omdat dit biologiese aktivering veroorsaak in plaas van detoksifikasie. Die groep plaagdoders wat hierdeur bevoordeel word, is die tioonfosfate, bv Paration. Die oksidasie veroorsaak dat 'n molekulêre gevorm word wat 'n groot invloed het op die aktiwiteit van die cholinesterase metabolisme. Wanneer mikrosomale oksidasie van Paration in insekte plaasvind, word Paraokson gevorm wat dodelik is. (Hassall, 1983:57).

Fig 2-7: Die oksidasie van Paration



Mikrosomale oksidasie is 'n belangrike metaboliese sisteem omdat diere wat hoë vlakke hiervan het, 'n groter weerstand het teenoor 'n groot verskeidenheid van chemikalieë. By insekte kan mikrosomale oksidasie weer lei tot weerstandigheid en daarom is dit belangrik dat die middels wat vir 'n sekere plaag gebruik word, van tyd tot tyd gewissel word. Die hoofroete van metabolisme by karbamate is deur middel van mikrosomale oksidasie. (Georghiou & Saito, 1983:177).

Sitochroom P-450 word in die algemeen beskou as 'n oksidatiewe ensiemstelsel, maar dit kan ook die reduksie van vreemde chemiese stowwe kataliseer. Hierdie reaksie kan plaasvind indien die suurstofmolekule weens min druk nie die elektron aanvaar nie, maar wel die substraat. In gevalle waar dit gebeur, kan daar tog kompetisie ontstaan tussen die suurstof en die substraat vir die elektron en tree suurstof dus as belemmeraar van die reaksie op. Dieselfde middels wat Sitochroom P-450 metabolisme belemmer, veroorsaak ook belemmering van hierdie reduksiereaksies. Bindings wat deur hierdie metaboliese sisteem gereduseer word, sluit in aromatiese oksiede, stikstofoksiede en alkielhaliede. (Amdur et al, 1991:94).

2.2.3. *Mikrosomale FAD-bevattende mono-oksigenases.*

'n Ander mikrosomale oksidasiesisteem wat bestaan, is mikrosomale mono-oksigenases wat flavienadeniendinukleotied (FAD) bevat. In die verlede is na hierdie oksidatiewe metabolisme verwys as gemengde-funksie amienoksidase, omdat dit nukleofiliese stikstof kan oksideer met behulp van NADPH en suurstof. Hierdie FAD-flavoproteïen kom ook soos Sitochroom P-450 in die endoplasmiese retikulum voor en die aktiwiteit daarvan is besonder hoog by mense. (Amdur et al, 1991:96).

Daar is mededinging tussen Sitochroom P-450 en gemengde-funksie amienoksidases om die stikstof te oksideer. Hierdie sisteem is verantwoordelik vir die oksidasie van

tersiêre amiene na amienoksiede, sekondêre amiene na hidroksielamiene en nitrone, en primêre amiene na hidroksielamiene en oksieme. Dit is ook moontlik vir hierdie ensiemsisteem om nukleofiliese divalente swavel te oksideer en dus kan sulfiede, tio-eters, tiokarbamate en organofosfate geoksideer word. (Amdur et al, 1991:96).

2.3. SEKONDÊRE METABOLISME

Die reaksies van sekondêre metabolisme is gewoonlik konjugasiereaksies. Hulle word geklassifiseer op grond van die konjugeermiddel en het slegs beperkte kapasiteit. Glukuronidasie het 'n hoë kapasiteit, terwyl aminosuurkonjugasie weer slegs medium kapasiteit het. Die kapasiteit van glutatioonkonjugasie en sulfering is laag, maar dié van asetilering is veranderlik. (Amdur et al, 1991:88, 100; Hassall, 1983:62).

Die dryfkrag vir sekondêre metabolismereaksies is afkomstig van die energie van ko-faktore wat op hulle beurt weer direk of indirek deur ATP geaktiveer word. ATP bestaan uit 'n adenien-, 'n ribose- en drie fosfaatgroepe. Energie word gestoor in die fosfaatbindings en word verskaf wanneer die fosfaatbinding met ribose verbreek word. Dit is moontlik vir ATP om die energie geleidelik vry te stel deur die fosfaatbindings een na die ander te breek, vir 'n totale hoeveelheid energie van ongeveer 70

kJ/mol ATP. (Amdur et al, 1991:100; Meyer et al, 1983:5.7).

2.3.1 *Glukuronidasie.*

Die primêre konjugeermiddel vir landdiere is glukuronidases. Hierdie ensiemstelsel is een van die belangrikste konjugasie-reaksies omdat dit uit minstens 11 verskillende soorte bestaan en die vermoë het om met 'n wye verskeidenheid van substrate te reageer. Die konjugate wat die eindprodukte is van hierdie reaksies word uitgeskei deur die urine of die gal. (Amdur et al, 1991:100, 111).

Die ensieme wat verantwoordelik is vir hierdie reaksie, is uridiendifosfaatglukuronosieltransferase (UDPGA). Dit verskaf die glukuronsuur wat gedurende die reaksie oorgedra word vanaf die hoë energie nukleotied UDPGA na die funksionele groep van die substraat. (Amdur et al, 1991:100).

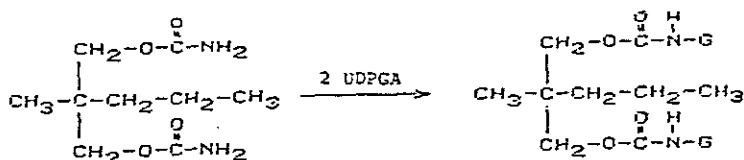
Glukuronosieltransferases word in die endoplasmiese retikulum van hoofsaaklik die lewerselle gevind, teenoor ander sekondêre metabolisme-ensieme wat in die sitosol voorkom. Die voordeel van hierdie ensiem se voorkoms in die endoplasmiese retikulum lê daarin dat dit direkte toegang het tot die produkte van die primêre metaboliese mikrosomale Sitochroom P-450. Dit het 'n ineengeskakelde

metaboliese ketting tot gevolg vir die verwerking van gifstowwe. (Amdur et al, 1991:100, 101).

Die metaboliese reaksie vind plaas wanneer die UDPGA-ko-faktor wat in die α -konfigurasië is, omskakel na die β -konfigurasië. Gedurende die reaksie word 'n karboksiel-groep, wat in die geïoniseerde vorm is, oorgedra om met die substraat te bind. Die teenwoordigheid van die karboksiel-groep in die substraat bevorder wateroplosbaarheid, asook deelname aan anioonoordragstelsels in die gal en nier. Uitskeiding van die konjugate vind plaas in die gal of urine en die grootte van die konjugaat bepaal in watter van die twee vloeistowwe dit uitgeskei word. (Amdur et al, 1991:101).

N-glukuronidasas, een van die verskeidenheid van ensieme wat deel uitmaak van glukuronidasas, is verantwoordelik vir die konjugasië van sekere karbamaatagtige verbindings, bv Meprobaat. (Amdur et al, 1991:101, 102).

Fig 2-8: Die konjugasië van Meprobaat mbv UDPGA



2.3.2. *Glutatioon-S-transferases.*

Die ensiemwerking van glutatioon-S-transferase-reaksies is 'n hoof metaboliese roete met as finale produk die merkapturiensuur-derivate. Die ensieme kom voor in die sitoplasma en die endoplasmiese retikulum. Die sitosoliese ensieme het 'n aktiwiteit wat tussen vyf en veertig maal groter is as dié van die mikrosomale aktiwiteit. (Amdur et al, 1991:107; White et al, 1978:710).

Glutatioon-S-transferase-reaksies word geaktiveer deur die tripeptied glutatioon. Glutatioon bestaan uit glisien, sisteïen en glutamiensuur. Die reaksie vind plaas wanneer die sisteïengedeelte van die molekule 'n nukleofiliese aanval op 'n elektrofiliese koolstof van die substraatmolekule doen, om dan 'n tio-eter te vorm. (Amdur et al, 1991:107; Hassall, 1983:58).

Nadat die tio-eterkonjugaat gevorm is, word die glutamiensuur en die glisiendele van glutatioon van die konjugaat verwyder deur hidrolise. Die sisteïengedeelte word gesetileer om merkapturiensuur te vorm, met behulp van asetiel-koënsiem A. (Amdur et al, 1991:108; Hassall, 1983:65; White et al, 1978:710).

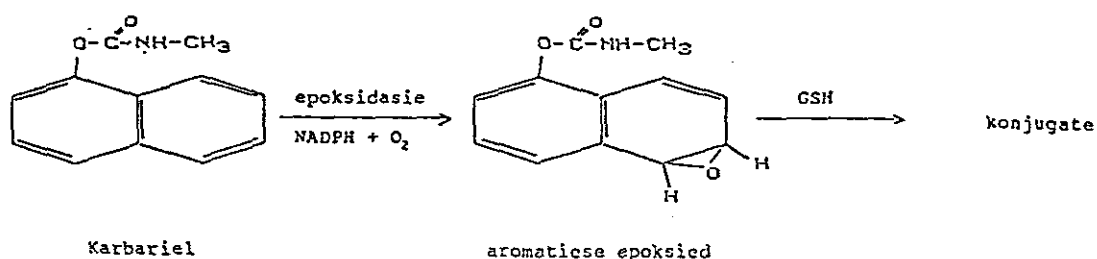
Glutatioon-S-transferases reageer met indringermolekules sodat hulle verander kan word in wateroplosbare, minder toksiese verbindings, wat dan deur die urine uitgeskei kan word. Dit het ook ten doel om die belangrike bestanddele

van die sel te beskerm deurdat die invloed van groot hoeveelhede organiese anione vanuit die plasma na weefsel beheer word. Die organiese anione moet gedeeltelik hidrofobies wees, 'n elektrofiliese koolstofatoom hê en ook nie-ensiematies met glutatioon kan reageer, sodat glutatioon-S-transferase-reaksies kan plaas vind. (Amdur et al, 1991:108).

Daar bestaan verskeie soorte reaksies waaraan glutatioon-S-transferases deelneem, maar slegs 'n paar is betrokke by plaagdodermetabolisme: epoksied-, aromatiese- en alkiel-transferase. (Hassall, 1983:58).

2.3.2.1. *Glutatioon-S-epoksiedtransferases.*

Met glutatioon-S-epoksiedtransferase-reaksies word die ring oopgemaak en die glutatioon word dmv 'n addisiereaksie aan die substraatmolekule gebind. Benseen-epoksiede sonder elektronegatiwe groepe aan die ring, reageer nie maklik nie; terwyl die naftaleen- en fenantriene-epoksiede maklik reageer. Wanneer aromatiese verbindings reeds metabolisme ondergaan het, en epoksiedderivate as tussenprodukte het, is dit moontlik vir glutatioon-S-transferases om met hierdie produkte te bind. 'n Voorbeeld van 'n plaagdoder wat moontlik in hierdie kategorie val is Karbariel. (Hassall, 1983:58).

Fig 2-9: Glutatioon-S-epoksiedtransferase en Karbariel

2.3.2.2. *Glutatioon-S-aromatiese transferases.*

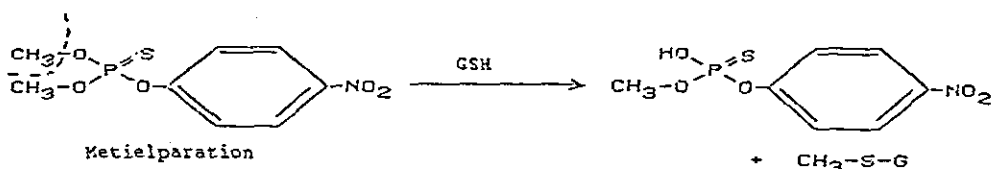
Die ensieme van glutatioon-S-aromatiese transferase-reaksies kom in plante en die lewers van diere voor. Aktiewe tiolgroepe kom voor in hierdie ensieme aangesien die reaksie belemmer word deur alkieleringsreagense. Wanneer 'n reaksie met die substraat plaasvind, word 'n waterstofhalied uitgeskei terwyl die glutatioon 'n kompleks vorm. Die voorkoms van glutatioon-S-aromatiese transferase tree op as beskermingsmiddel vir mielies en sommige ander gewasse teen atrasien en sommige van die gechlorineerde triasienonkruidodders. Hierdie gewasse het redelike konsentrasies van hierdie ensieme en is dus redelik weerstandig teen hierdie middels. (Hassall, 1983:58).

2.3.2.3. *Glutatioon-S-alkieltransferases.*

In teenstelling met die aromatiese transferase verwyder die ensieme van glutatioon-S-alkieltransferase 'n metielgroep van plaagdodders wat 'n CH₃-O-P basis het en bind glutatioon aan die uitgaande metielgroep. Die oorblywende deel van die molekule wat nou 'n alkoholgroep bevat, bly

ongekonjugeerd. Hierdie tipe ensiemreaksie is veral effektief by organofosfate vir die verwydering van metiel-groepe. Etil- en groter alkielgroepe word ook verwyder, maar nie so maklik nie. Organofosfate wat vatbaar is vir hierdie soort transferases is bv Metielparation, Fenitro-tion, Mevinfos en Dichloorvos. Die reaksie van Metiel-paration en Glutatioon-S-alkieltransferases volg hierna as 'n voorbeeld van hierdie metaboliese meganisme. (Hassall, 1983:60).

Fig 2-10: Die reaksie van Metielparation



2.3.3. Metilering.

Metilering is 'n algemene metaboliese reaksie wat verskil van ander konjugasiereaksies omdat dit verantwoordelik is vir die bedekking, in plaas van die blootlê, van die funksionele groepe. Hierdie eienskap het dan tot gevolg dat die wateroplosbaarheid en ook deelname aan normale selffunksies belemmer word. Die gevolg is dat hierdie stowwe kan ophoop en lei tot verhoogde vlakke in veral die lewer en niere. (Amdur et al, 1991:103).

Funksionele groepe wat metilering kan ondergaan, sluit die volgende in: aromatiese en alifatiese amiene, mono- en polyhidriese fenole, N-heterogene sikliese verbindings en

sekere swawelverbindings. Hierdie soort konjugasiereaksie is meer opmerklik by die aromatiëse en alifatiese amiene. Verskeie soorte metielkonjugasies kom voor naamlik: O-metilering, N-metilering en S-metilering. Elkeen van hierdie konjugasiereaksies reageer met verskillende substrate. (Amdur et al, 1991:104).

2.3.4. *Algemeen*

Die reaksies van primêre en sekondêre metabolisme wat in die voorafgaande bespreek is, is nie die enigste metaboliese reaksies in die liggaam vir die verwerking van vreemde chemiese stowwe nie. Daar bestaan nog verskeie ander, maar daar is gepoog om die reaksies betrokke by plaagdodermetabolisme te bespreek.

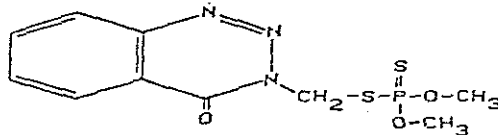
Plaagdoders kan 'n verskeidenheid van metaboliese reaksies ondergaan en daarom is dit beter om na die indiwiduele plaagdoders te kyk om hul onderskeie metaboliese reaksies te sien. Om die punt te illustreer kan Karbariel as voorbeeld dien. Hierdie plaagdoder ondergaan verskeie metaboliese reaksies terwyl sommige ander plaagdoders slegs een metaboliese roete volg.

HOOFSTUK 3

PLAAGDODERDATA

Verskeie plaagdoders is geregistreer vir gebruik op appels, maar slegs enkele hiervan word deur die koöperasie voorgeskryf in hulle spuitprogram. Die data van die plaagdoders wat hier volg is sommige van die wat deur die koöperasie in die Elgin-gebied voorgeskryf word. Dit sluit ook data in van die metabolisme wat hierdie middels kan ondergaan. (Verwys na hoofstuk 2 vir meer besonderhede oor die spesifieke metaboliese sisteem.)

3.1 ASINFOS-METIEL



Funksie: nie-sistemiese insekdoder en akariendoder

Chemiese groep: organofosfaat, triasien

Molekulêre formule: C₁₀H₁₂N₃O₃PS₂

Molekulêre massa: 317,33

Giftigheid: mondelike toediening; rotte en marmotte: DD₅₀ is 4-20 en 80 mg/kg onderskeidelik. Op die vel van rotte: DD₅₀ is 220 mg/kg. (The Agrochemicals Handbook, 1990).

Algemene inligting:

Asinfos-metiel is vir die eerste keer in 1953 bekendgestel. Dit onderdruk cholienesterase indirek. In 'n studie waaraan werkers deelgeneem het wat aan hierdie plaagdoder blootgestel is, kon geen nadelige effekte gevind word nie. 'n Geval is egter aangemeld waar 'n loods wat besig was met lugbespuiting van die gifstof op sy gesig gekry het. Die simptome wat hy ervaar het was: hoofpyn, benoudheid op die bors, naarheid en oormatige speekselvorming. Sy herstel was egter sonder nagevolge. (Hayes, 1982:358-9).

In toetse is gevind dat ongeveer 70% van die toegediende binnearse dosis van Asinfos-metiel na 120 uur deur die urine uitgeskei word. Wanneer 'n dosis op die vel toegedien word, word 15,9% van hierdie dosis deur die vel geabsorbeer. In toetse is verder gevind dat wanneer die toetsarea bedek word, dit die absorpsie van die plaagdoder verhoog tot 56,1%. Die toetsarea word bedek om toestande voor te stel waar die plaagdoder onder die werker se klere beland en dan geabsorbeer word. (Wester & Maibach, 1985).

Daar is ook bevind dat ongeveer 16% van die geabsorbeerde dosis na 120 uur deur die urine uitgeskei word. In ander toetse is gevind dat Asinfos-metiel van 1 tot 112 dae na blootstelling nog op die hande kan voorkom. (Hayes, 1982:358-9; Wester & Maibach, 1985).

Hierdie plaagdoder is nie sistemies nie. Metabolisme aktiveer dit voordat die insek bereik word. Hierdie aktivering maak die molekule meer polêr en daarom het dit 'n groter sistemiese aksie. Die plaagdoder dring die plant se blare binne omdat dit lipofilies is, maar beweeg nie rond in die blaarnetwerk nie. Omdat dit die blaar binnedring, word dit nie afgewas deur reën of besproeiing nie. (Hassall, 1983:80)

Afbraak en metabolisme:

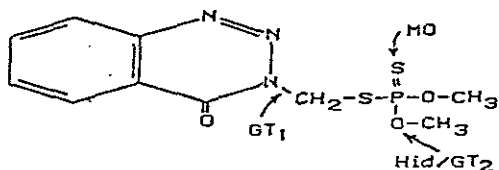
In die omgewing: afbreking vind plaas mbv oksidasie,
demetilering en hidrolise.

In plante: die metaboliet is Bensasimid.

In soogdiere:

- (i) Mono-oksigenases aktiveer die molekule deurdat die swawelatoom vervang word deur 'n suurstof mbv NADPH. Hierdie aktivering veroorsaak dat die molekule 'n baie sterk belemmeraar is van cholienesterase. Verder werk die NADPH-oksidasies in op die P-O-arielbinding en breek dit.
- (ii) 'n Ander metabolismiese roete wat gevolg word, is glutatioon-S-alkiel- en -arieltransferase. (The Agrochemicals Handbook, 1990).

Die metabolisme van Asinfos-metiel:



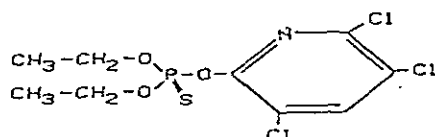
MO -mikrosomale mono-oksigenases

Hid -hidrolases (fosfatases, A-tipe esterases)

GT₁ -glutatioon-S-arieltransferases

GT₂ -glutatioon-S-alkieltransferases

3.2. CHLOORPIRIFOS



Funksie: nie-sistemiese kontakinsekdoder

Chemiese groep: organofosfaat, piridien

Molekulêre formule: C₉H₁₁Cl₃NO₃PS

Molekulêre massa: 350,62

Giftigheid: mondelike toediening; rotte, marmotte en hase: DD₅₀ is 135-163, 504 en 1000-2000 mg/kg onderskeidelik. Op die vel van hase: DD₅₀ is 2000 mg/kg. (The Agrochemicals Handbook, 1990).

Algemene inligting:

Chloorpirifos is in 1965 bekendgestel. In laboratoriumtoetse op menslike vrywilligers is geen veranderinge in gedrag of bloed- en urinesamestelling gevind nie. Die plasma-cholienesterasevlakke het verlaag, maar na 4 weke het dit weer die normale vlakke bereik. In 'n ondersoek na 'n persoon wat die plaagdoder ingekry het, is vlakke van die ongemetaboliseerde plaagdoder in die persoon se bloed gevind. Metaboliete, maar geen ongemetaboliseerde plaagdoder, het in die urine voorgekom nie. (Hayes, 1982:397-9).

'n Persoon wat 'n mengsel van plaagdoders ingeneem het wat onder andere Chloorpirifos bevat het, het 30 ure na die inname van die plaagdoders gesterf. Met 'n nadoodse ondersoek is die volgende vlakke gevind:

Tabel 3-1: Vlakke van Chloorpirifos in weefsel.

weefsel	ng/g
bloed	0
brein	665
lewer	4187
pankreas	2373
niere	415

Die vlak van Chloorpirifos in die bloed het van < 30ng/g (1,6 uur na inname) gedaal tot 'n onopspoorbare vlak met dood. Met opname was die vlak van hierdie plaagdoder in die maagsappe egter 17200 ng/g. (Osterloh et al, 1983).

Hierdie plaagdoder is nie sistemies nie. Metabolisme aktiveer dit voordat die insek bereik word. Hierdie ak-

tivering maak die molekule meer polêr en daarom het dit 'n groter sistemiese aksie. Die plaagdoder dring die plant se blare binne omdat dit lipofilies is, maar beweeg nie rond in die blaarnetwerk nie. Omdat dit die blaar binnedring, word dit nie afgewas deur reën of besproeiing nie. (Hassall, 1983:80)

Afbraak en metabolisme:

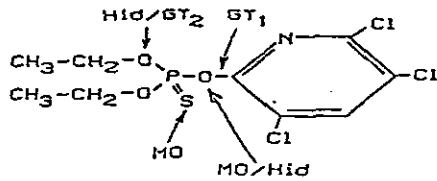
In die omgewing:

In grond word die Chloorpirifos stadig afgebreek na 3,5,6-Trichloro-2-piridinol (die halfleeftyd van Chloorpirifos in grond is 80-100 dae).

In soogdiere:

- (i) Twee hoofmetaboliëte word gevorm: 3,5,6-Trichloro-2-piridinol en Mono-etiel-chloorpirifos. Die metaboliëse reaksies wat plaasvind is hidrolases (fosfatases, tipe A-esterases) agv die aksie van die ensieme op die P-O-etiel- en die P-O-ariëlbinding.
- (ii) Mono-oksigenases aktiveer die molekule deurdat die swawelatoom vervang word deur 'n suurstof mbv NADPH. Hierdie aktivering veroorsaak dat die molekule 'n baie sterk belemmeraar is van choliënerase. Verder werk die NADPH-oksidasies in op die P-O-ariëlbinding en breek dit.
- (iii) 'n Ander metaboliëse roete wat gevolg word, is glutatioon-S-alkiel- en -ariëltransferase. (The Agrochemicals Handbook, 1990).

Die metabolisme van Chloorpirifos:



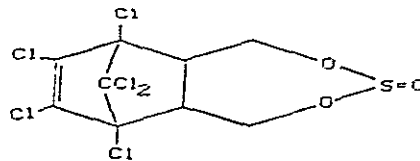
MO -mikrosomale mono-oksigenases

Hid -hidrolases (fosfatases, A-tipe esterases)

GT₁ -glutatioon-S-arieltransferases

GT₂ -glutatioon-S-alkieltransferases

3.3. ENDOSULFAAN



Funksie: nie-sistemiese kontak- en maag insekdoder en akariendoder.

Chemiese groep: organochloried

Molekulêre formule: C₉H₆Cl₆O₃S

Molekulêre massa: 406,96

Giftigheid: mondelike toediening: rotte en honde: DD₅₀ is 70 en 77 mg/kg onderskeidelik. Op die vel van hase: DD₅₀ is 359 mg/kg (Endosulfaan in olie opgelos). (The Agrochemicals Handbook, 1990).

Algemene inligting:

Endosulfaan is vir die eerste keer in 1956 gebruik. Die formulاسie bestaan gewoonlik uit 64 - 67% van Endosulfaan- α en 29 - 32% van Endosulfaan- β . Die simptome van vergiftiging is: klem in die kaak, vomering, diarree, agitاسie, stuiptrekkings, skuim om die mond, moeilike asemhaling, asemtekort, die vel vertoon blou en bewusteloosheid. Gevalle is opgeteken waar mense wat die plaagdoder hanteer het, sommige van die bogenoemde simptome getoon het. By een persoon was die stuiptrekkings so erg dat beenbreuke voorgekom het. Sommige van die mense het ook bewusteloos geraak, maar het later herstel. (Hayes, 1982:252-3)

Nadoodse ondersoek van 'n persoon wat Endosulfaan gedrink het, toon die volgende vlakke van Endosulfaan- α en - β onderskeidelik:

Tabel 3-2: Vlakke van Endosulfaan- α en - β in weefsel.

weefsel	Endosulfaan (mg/l)	
	α	β
bloed	0,06	0,015
urine	1,78	0,87
lewer	12,4	5,2

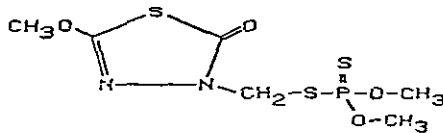
In 'n ander geval het die lewer 'n vlak van 3,4 mg/l van Endosulfaan-sulfaat getoon. (Hayes, 1982:252-3).

Afbraak en metabolisme:

In plante: Endosulfaan word gemetaboliseer na Endosulfaan-sulfaat.

In soogdiere: Endosulfaan word gemetaboliseer na Endosulfaan-sulfaat, α -Hidroksie-endosulfaan en Endosulfaandiool. Hierdie metaboliete word in die urine uitgeskei. Geen ophoping vind in die melk, vet of spierweefsel plaas nie. (The Agrochemicals Handbook, 1990).

3.4. METIDATION



Funksie: nie-sistemiese insekdoder/akariendoder

Chemiese groep: organofosfaat, tiadiazol

Molekulêre formule: C₆H₁₁N₂O₄PS₃

Molekulêre massa: 302,33

Giftigheid: mondelike toediening: rotte en hase: DD₅₀ is 25-54 en 63-80 mg/kg onderskeidelik. Op die vel van hase: DD₅₀ is 200 mg/kg. (The Agrochemicals Handbook, 1990).

Algemene inligting:

Metidation word vir die eerste keer in 1966 gebruik. In laboratoriumtoetse met lae dosering kon geen nadelige effekte gevind word nie. By 'n ander geleentheid is 'n bewustelose boer gevind wat 'n onbekende hoeveelheid van hierdie plaagdoder ingeneem het. Na intensiewe behandeling

het hy herstel en met opvolg ondersoek maande later kon geen nagevolg gevind word nie. (Hayes, 1982:371-2).

Hierdie plaagdoder is nie sistemies nie. Metabolisme aktiveer dit voordat die insek bereik word. Hierdie aktivering maak die molekule meer polêr en daarom het dit 'n groter sistemiese aksie. Die plaagdoder dring die plant se blare binne omdat dit lipofilies is, maar beweeg nie rond in die blaarnetwerk nie. Omdat dit die blaar binnedring, word dit nie afgewas deur reën of besproeiing nie. (Hassall, 1983:80)

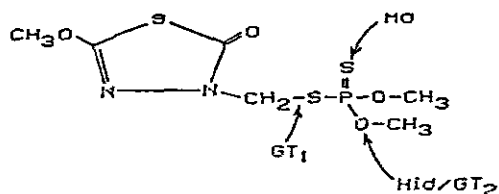
Afbraak en metabolisme:

In plante: vinnige metabolisme vind plaas.

In soogdiere:

- (i) Mono-oksigenases aktiveer die molekule deurdat die swawelatoom vervang word deur 'n suurstof mbv NADPH. Hierdie aktivering veroorsaak dat die molekule 'n baie sterk belemmeraar is van cholienesterase. Verder werk die NADPH-oksidasas in op die P-O-arielbinding en breek dit.
- (ii) 'n Ander metaboliese roete wat gevolg word, is glutatioon-S-alkiel- en -arieltransferase. (The Agrochemicals Handbook, 1990).

Die metabolisme van Metidation:



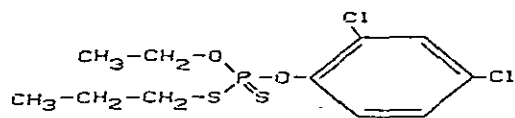
MO -mikrosomale mono-oksigenases

Hid -hidrolases (fosfatases, A-tipe esterases)

GT₁ -glutatioon-S-arieltransferases

GT₂ -glutatioon-S-alkieltransferases

3.5. PROTIOFOS



Funksie: Insekdoder

Chemiese groep: organofosfaat

Molekulêre formule: C₁₁H₁₅Cl₂O₂PS₂

Molekulêre massa: 345,25

Giftigheid: mondelike toediening: rotte: DD₅₀ is 925-966 mg/kg. Op die vel van rotte: DD₅₀ is >1300 mg/kg. (The Agrochemicals Handbook, 1990).

Algemene inligting: Hierdie plaagdoder is nie sistemies nie. Metabolisme aktiveer dit voordat die insek bereik word. Hierdie aktivering maak die molekule meer polêr en

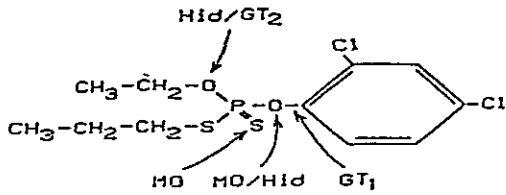
daarom het dit 'n groter sistemiese aksie. Die plaagdoder dring die plant se blare binne omdat dit lipofilies is, maar beweeg nie rond in die blaarnetwerk nie. Omdat dit die blaar binnedring, word dit nie afgewas deur reën of besproeiing nie. (Hassall, 1983:80)

Afbraak en metabolisme:

In soogdiere:

- (i) Die metaboliese reaksie wat plaasvind is hidrolise (fosfatases, tipe A-esterases) agv die aksie van die ensieme op die P-O-etiel- en die P-O-arielbinding.
- (ii) Mono-oksigenases aktiveer ook die molekule deurdat die swawelatoom vervang word deur 'n suurstof mbv NADPH. Hierdie aktivering veroorsaak dat die molekule 'n baie sterk belemmeraar is van cholinesterase. Verder werk die NADPH-oksidasies in op die P-O-arielbinding en breek dit.
- (iii) 'n Ander metaboliese roete wat gevolg word, is glutatioon-S-alkiel- en -arieltransferases. (The Agrochemicals Handbook, 1990)

Die metabolisme van Protiofos:



MO -mikrosomale mono-oksigenases

Hid -hidrolases (fosfatases, A-tipe esterases)

GT₁ -glutatioon-S-arieltransferases

GT₂ -glutatioon-S-alkieltransferases

HOOFSTUK 4

Die bepaling van ASINFOS-METIEL, CHLOORPIRIFOS, ENDOSULFAAN, METIDATION en PROTIOFOS.

4.1. ALGEMENE OORWEGINGS VIR DIE BEPALING VAN 'n GESKIKTE
METODE.

Met die nodige kennis van die tipe metabolisme wat die plaagdoder kan ondergaan en derhalwe die waarskynlikste medium in die liggaam waar die plaagdoder of metaboliete kan voorkom, kan op 'n geskikte metode besluit word.

Vir die bepaling van die vlak van blootstelling aan plaagdoders, is die eerste oorweging, en waarskynlik die belangrikste, die beskikbaarheid van bloed en urine. Wanneer 'n volledige moniteringsprogram onder veldtoestande gedoen word, is dit verder ook nodig om die blootstelling van die vel te bepaal, aangesien die vel die grootste orgaan van die liggaam is.

Die Wêreld Gesondheidsorganisasie (WHO, 1986a) het 'n protokol opgestel vir die bepaling van blootstelling aan plaagdoders onder veldtoestande. Die blootstelling van die vel word bepaal deur absorberende materiaal op strategiese plekke op die vel te plaas. Ontleding van hierdie materiaal gee dan 'n profiel van blootstelling, asook 'n

aanduiding van die hoeveelheid plaagdoder wat die vel sou absorbeer.

'n Verdere belangrike oorweging is die toerusting wat nodig is vir die bepaling van die plaagdoders en metaboliete. Gewoonlik word Gas- en/of Vloeistofchromatografie gebruik vir die bepaling, terwyl bevestiging van resultate gedoen word met Massaspektrometrie. Hiermee saam gaan dan ook die beskikbaarheid van standarde van plaagdoders. Dit is nodig om standarde van hoogstaande kwaliteit te hê, aangesien die betroubaarheid van die konsentrasie van die standaard vir die kwantifisering noodsaaklik is. (Murphy et al, 1983).

4.2. ANALITIESE PROSEDURES BESKIKBAAR VIR DIE BEPALING VAN PLAAGDODERS.

Daar is verskeie metodes beskikbaar vir die ekstraksie en skeiding van plaagdoders. Sommige van die metodes word kortliks bespreek.

Watts (1980) dui 'n paar metodes aan vir die bepaling van plaagdoders. Hierdie metodes berus op die vloeistof-vloeistofekstraksie van serum wat gevolg word deur 'n skoonmaakproses in 'n Florisil- of Silikakolom. Hierdie metodes is egter van toepassing op óf organofosfate óf organochloriede.

'n Tegniek wat ook gebruik word, is Vaste-fase ekstraksie, maar hierdie tegniek is gewoonlik van toepassing op 'n enkele plaagdoder of 'n spesifieke groep plaagdoders. Analytichem International gee 'n metode (Analytichem International M53) vir die ekstraksie van organochloriede uit weefsel deur gebruik te maak van 'n C18 vaste-fase kolom.

Baker dui onder andere twee verskillende metodes (Baker M246 en Baker M168) aan vir die bepaling van organochloriede en poli-gechloreerde bifeniele uit dierevet. Albei metodes maak gebruik van vaste-fase kolomme en die twee stasionêre fases wat gebruik word is: C18 en 'n aromatiese sulfoonsuur.

Wells en Johnstone (1977) bespreek 'n proses wat deur hulle ontwikkel is vir die skeiding van 17 organochloriede en diereweefsel. Hulle gebruik slegs n-heksaan as elueermiddel en 'n alumina- en 'n silikakolom. Hulle bespreek onder andere ook die effek van kolomwydte en -lengte op die chromatografiese skeiding, die invloed van deaktivering van die silika op die skeiding van die plaagdoders, die elueerpatroon van die plaagdoders op die aluminakolom, hoe die vetinhoud van die diereweefsel die herwinste van die plaagdoders beïnvloed en die retensie van vet op die aluminakolom.

Telling et al (1977) gebruik geaktiveerde Alumina in 'n 1 cm glas chromatografiekolom vir die skeiding van organochloriede van olie en vette. Plaagdoders word geëkstraheer tot so laag as 5 - 10 µg/kg. Hulle bespreek ook die retensie van vette en olies en plaagdoders deur Alumina by verskillende aktiwiteite sodat die optimum aktiwiteit gevind kan word. Die invloed van die elueermiddel, die balans tussen tydsduur van skeiding en resoluëie, en die resultate van 'n deelneemstudie tussen laboratoriums word ook bespreek.

Wariishi et al (1986) gee 'n metode vir die ekstraksie van die chloordaangroep plaagdoders uit bloed. Die ekstrak word dan op 'n Florisilkolom gekonsentreer en in fraksies geskei vir chromatografie.

Wariishi en Nishiyama (1989) gebruik die metode soos beskryf deur Wariishi (1986) in 'n opvolgstudie in Japan na Chloordaan in bloed en beskryf verder 'n metode vir die ekstraksie van die genoemde plaagdodergroep in huidvet. Na ekstraksie met hekasaan, word die plaagdoderreste gekonsentreer en dan op 'n Florisilkolom skoongemaak.

In 'n program van biologiese en gesondheidsmonitering deur Desi et al (1986) op die bloed en urine van plaagdoderaanwenders, is die vlakke van piretroïde bepaal. Na die ekstraksie van die plaagdoders uit die urine en serum en konsentrasie deur distillasie, volg 'n skoonmaakproses

deur 'n kolom van alumina. Hierna vind verdere konsentrasie plaas en daarna word die plaagdoders gechromatografeer.

Van Dyk et al (1987) het 'n studie gedoen waarin die voorkoms van organochloriede in die vet en melk van mense in Suid-Afrika bepaal is. Warm heksaan is gebruik om die vet te ekstraheer en daarna skoongemaak mbv gel-permeasiechromatografie. Die melk is geëkstraheer deur 'n metode wat deur Pick et al (1981) beskryf is. Die residu's is mbv gaschromatografie bepaal en bevestiging is deur selektiewe-ioonmonitering op 'n gaschromatograaf gedoen.

Greve en Heusenkveld (1985) doen 'n bepaling van organofosfate in vleis. Hulle maal die vleis, voeg dan watervrye natriumsulfaat by en meng alles tot 'n droë poeier. Die poeier word daarna in 'n menger geplaas. Asetoon, asetonië, Celite en Calflo E word bygevoeg en dit word gemeng. Die oplosmiddels word uitgefiltreer, gekonsentreer en finaal deur vloeistof/vloeistofekstraksie skoongemaak. Hierna word die plaagdoders mbv gaschromatografie bepaal. Die herwinste van die verskillende plaagdoders wissel tussen 66 en 102% met 'n opspoorbare vlak van tussen 0,005 en 0,04 mg/kg.

De Potter et al (1978) gebruik 'n direkte vloeistofekstraksie van serum vir die bepaling van organofosfate. Na konsentrasie van die oplosmiddel, word die plaagdoders

op 'n gaschromatograaf met 'n stikstof/fosfor detektor bepaal. Die opspoorbare vlak is 2 ng/ml.

Singh et al (1986) gebruik ook 'n direkte ekstraksie van plasma en urine om organofosfate te bepaal. Hulle het egter gevind dat 'n tweede ekstraksie van die waterfase verantwoordelik was vir 'n bykomende 20% van die plaagdodervlakke. Die identifisering en kwantifisering van die plaagdoders is op 'n gaschromatograaf/massaspektrometer mbv elektron-impak, en chemiese ionisasie met metaan gedoen.

Neidert en Saschenbrecker (1984) beskryf die gebruik van 'n Storherr-buis en 'n proses van ondersteunde distillasie en/of veeg-ko-distillasie vir die ekstraksie en skoonmaak van plaagdoders uit dierevet. Die plaagdoders wat met hierdie prosesse geëkstraheer word sluit in organofosfate, organochloriede, poli-gechloreerde bifeniële en penta-chlorofenol. Herwinste word getoon van 'n verskeidenheid van plaagdoders en wissel tussen 75 en 101% vir die ondersteunde distillasie; en 92 en 102% vir veeg-ko-distillasie.

Farran et al (1988) beskryf 'n baie interessante tegniek vir die bepaling van organofosfate. Dit behels 'n proses van deurlopende vloeï-ekstraksie en is gebaseer op vloeï-stof-vloeïstofekstraksie. Die ekstraksiesistiem word direk aan 'n vloeïstofchromatograaf gekoppel en die plaagdoders

word met 'n ultravioletdetektor opgespoor. Herwinste van die plaagdoder Asinfos-metiel uit afvalwater is in die orde van 70%.

Missen (1979) beskryf 'n metode vir die ekstraksie van farmaseutiese middels uit bloed. Dit behels die meng van die bloed met 'n absorpsiemateriaal, Celite. 'n Kolom word gepak met die mengsel en dan volg ekstraksie met elueermiddels.

Wood (1969) beskryf 'n metode waar die Celite met die monster gemeng word vir die ekstraksie van organochloriede uit botter, olie, melk, ens. Hierna voeg hy die Celite/-monstermengsel egter by 'n kolom wat Florisil bevat en elueer die plaagdoders. Hy sê verder dat die monster hier dien as die stasionêre fase, met Celite as die draermateriaal.

4.3. OORWEGINGS VIR HIERDIE METODE.

Die bloed en urine wat in die oorhoofse biologiese moniteringsprogram vir kliniese toetse geneem is (Barnes et al, 1992), is beskikbaar gestel vir hierdie projek om plaagdoders te bepaal. Aangesien die oorhoofse biologiese moniteringsprogram nie sou dien as 'n program onder veldtoestande nie, is blootstelling van plaagdoders deur die vel nie bepaal nie.

Die standaard van die plaagdoders wat deel was van die spuitprogram in die Elgin-gebied was beskikbaar by die ontledingslaboratorium, die Forensiese Chemie Laboratorium (Kaapstad) van die Departement van Nasionale Gesondheid. Geen standaard van die finale urinemetaboliëte van die organofosfate was beskikbaar nie, slegs sommige van die intermediêre metaboliëte.

Die Wêreld Gesondheidsorganisasie (WHO, 1986b) het in 'n verslag op 'n loodsstudie vir die bepaling van die gesondheidsgevaar van plaagdoders ook die beskikbaarheid van standaard van die urinemetaboliëte as 'n probleem bevind. Franklin et al (1986) het verder beweer dat die verwantskap tussen urinemetaboliëte, die vlakke van plaagdoders in die absorberende materiaal op die vel, en die dosis plaagdoder, nie bekend is nie. Die chemikalië wat benodig word vir die bepaling van die urinemetaboliëte is uiters gevaarlik en ook moeilik bekombaar, aldus die Wêreld Gesondheidsorganisasie (WHO, 1986b). Gevolglik is besluit dat slegs die bloed ontleed sal word.

Gaschromatografie word in die algemeen gebruik vir die bepaling van organofosfate en organochloriede, terwyl karbamate weer mbv vloeistofchromatografie en in sommige gevalle met gaschromatografie bepaal word (Luke et al, 1975; Luke et al, 1981; De Potter et al, 1978; Greve en Heusinkveld, 1985; Wells en Johnstone, 1977; Krause, 1980). Die organofosfate kan in hoofsaaklik twee hoof-

groepe ingedeel word, naamlik polêr en nie-polêr. Die nie-polêre organofosfate en organochloriede word gewoonlik gechromatografeer op nie-polêre en intermediêre polariteit kolomme terwyl die polêre plaagdoders op polêre en intermediêre polariteit kolomme gechromatografeer word.

Organofosfate kan met vlam-fotometriese en/of stikstof/fosfordetektors op 'n gaschromatograaf bepaal word. Vir die bepaling van organochloriede is 'n elektron-ontvangs en/of Hall-halogeen-spesifieke detektor nodig. Gaschromatograwe met vlam-fotometriese -, stikstof/fosfor - en elektron-ontvangsdetektors wat nodig was vir die bepaling van die plaagdoders in hierdie studie, is by die ontledingslaboratorium beskikbaar. Vlakke van plaagdoderreste word gereeld hier bepaal op vrugte en groente, en daar word gereeld meegedoen aan inter-laboratorium kalibrasie oefeninge vir die handhawing van 'n hoë standaard in plaagdoderontleding.

4.4. METODE ONTWIKKELING.

Daar bestaan verskeie metodes vir die ekstraksie van plaagdoders uit bloed of serum. Vir doeleindes van hierdie studie is 'n multi-residu metode nodig vir die bepaling van organofosfate, sowel as organochloriede.

Die metode wat in hierdie studie gebruik word, berus op die beginsels van die metodes wat deur Missen (1979) en Wood (1969) beskryf word. Die metode in hierdie studie kom

daarop neer dat die bloed met etielalkohol en 'n interne standaard gemeng word, daarna met Celite gemeng en dan in 'n kolom gepak word. Deurdat die Celite/bloedmengsel nou met 'n geskikte mobiele fase geëlueer word, kan die proses beskryf word as vloeistof-vloeistofekstraksie.

Met aanvang van die ekstraksie word 'n interne standaard bygevoeg. (De Potter et al, 1978; Braeckman et al, 1980; Osterloh et al, 1983). Deur gebruik te maak van piekareas en noukeurige kalibrasie kan, volgens Weiss (1986:169), 'n akuraatheid bereik word van ongeveer 0.1%. Daarteenoor kan met eksterne kalibrasie en 'n akuraat herhaalbare inspuit-volume, 'n akuraatheid van ongeveer 0.3% behaal word.

Vir kwantifisering met behulp van 'n interne standaard word 'n responsfaktor bepaal deur 'n kalibrasiekurve op te stel. Die verhouding van die piekhoogte van die plaagdoder tot die piekhoogte van die interne standaard teenoor wisselende konsentrasies van die plaagdoder word geplot. Die konsentrasie van die interne standaard bly egter konstant (Weiss, 1986:168-9). Braeckman et al (1980) stel ook kalibrasiekurwes op. Hulle ekstraheer die plaagdoder en interne standaard vanaf gedoseerde kontrolemonsters.

Die doel van die byvoeging van die etielalkohol is om die proteïne te denatureer deur dit minder oplosbaar in die waterfase te maak. Donahue et al (1988) gebruik metielalkohol vir hierdie doel aangesien dit beter herwinste gee

(sien tabel 4-1). Eie eksperimentering het egter getoon dat etielalkohol vir hierdie metode redelike herwinste gee (behalwe in die geval van die Endosulfaan-sulfaat) en, anders as die metielalkohol, ook die waterfase beter bind. Die gevolg is dat minder van die waterfase in die eluaat voorkom en die eluaat dus vinniger afgedamp kan word.

Tabel 4-1: Die invloed van Etanol en Metanol op die herwins van die plaagdoders.

Plaagdoder	Etanol	Metanol
Asinfos-metiel	128%	152%
Chloorpirifos	97%	137%
Endosulfan- α	67%	109%
Endosulfan- β	93%	132%
Endosulfan-SO ₄	38%	119%
Metidation	149%	211%
Protiofos	82%	96%

Vir die berekening van herwinste is die interne standaard kalibrasiemetode gevolg.

Verskeie elueermiddels word vir kolomchromatografie voorgestel. Donahue et al (1988) gebruik heksaan/-etieleter (1:1), terwyl Wood (1969) dimetielsulfoksied en daarna heksaan gebruik. Beide die genoemde metodes word gebruik vir die elueëring van organochloriede.

Van Dyk et al (1982:80) stel heksaan/asetoon (96:4) voor vir die ekstraksie van nie-polêre plaagdoders uit vrugte en groente. Luke et al (1975) en (1981) gebruik weer dichlormetaan vir die ekstraksie van polêre plaagdoders. Na eie eksperimentering met verskeie kombinasies van oplosmiddels soos: heksaan/dichlormetaan (1:1), iso-

propielalkohol, asetonitriël, dichlormetaan/isopropielalkohol/heksaan (1:1:1), is gevind dat die elueermiddel wat effektief gebruik kan word vir die ekstraksie van die plaagdoders, dichlormetaan/heksaan/asetoon (50:48:2) is. Hierdie kombinasie maak voorsiening vir die ekstraksie van polêre- en nie-polêre plaagdoders.

Tabel 4-2: Die effektiwiteit van die elueermiddels.

Plaagdoder	% herwins				
	A	B	C	D	E
Asinfos-metiel	128	111	61	68	87
Chloorpirifos	97	92	66	52	104
Endosulfaan- α	67	68	55	37	90
Endosulfaan- β	93	88	68	50	117
Endosulfaan-SO ₄	38	37	30	28	40
Metidation	149	128	77	82	95
Protiofos	82	71	39	44	55

Elueermiddels:

- A- heksaan/asetoon/dichlormetaan (50:48:2)
- B- heksaan/dichlormetaan (1:1)
- C- isopropielalkohol
- D- asetonitriël
- E- dichlormetaan/isopropielalkohol/heksaan (1:1:1)

Eie eksperimentering met verskillende elueervolumes van heksaan/asetoon/dichlormetaan (50:48:2) het herwinste van die interne standaard soos volg getoon:

Tabel 4-3: Die invloed van elueervolume op die herwins van die interne standaard.

ml	% herwins
4,5	20
7,5	30
10	25
15	20

Hoewel die ekstraksie by 7,5 ml die effektiëfste is, is daar om praktiese redes besluit om liever 4,5 ml te gebruik. Die opvangfles kan hierdie volume met gemak hanteer, terwyl die eluaat nie kan uitspat wanneer dit afgedamp word nie. Enige volume groter as 4,5 ml in die opvangfles wat gebruik is, het veroorsaak dat van die eluaat verlore gaan.

Die eluaat word op 'n waterbad by 50 °C afgedamp tot net droog, terwyl stikstof gebruik word om die dampe te verwyder (Singh et al, 1986; Telling et al, 1977). Greve en Heusinkveld (1985) en Leoni et al (1992) gebruik roterende filmverdamper onder vakuum met 'n waterbad by 45 °C. Die moontlikheid van termiese afbreking van die plaagdoders neem toe by temperature van meer as 50 °C en dus word daardie temperatuur nie oorskrei nie.

Die ekstrak word gechromatografeer op 'n gaschromatograaf om die plaagdoders te bepaal. Vir kwantifisering van die plaagdoders word piekhoogtes gebruik ipv piekarea aangesien die bloed baie pieke op die detektors veroorsaak. Weiss (1986) dui aan dat wanneer chromatografiepieke oorvleuel, piekhoogte meer betroubaar is aangesien dit onafhanklik is van resolusie.

Om die responsfaktor van die plaagdoders te bepaal word 'n mengsel van bekende konsentrasie berei met die plaagdoders en die interne standaard. Hierdie mengsel word gechromato-

grafeer. Die piekhoogte van die plaagdoder ($PKHT_x$) en die piekhoogte van die interne standaard ($PKHT_{IS}$) word geneem. 'n Responsfaktor vir elke plaagdoder word nou bereken deur die volgende formule te gebruik (Weiss, 1986:168):

$$RF_x = \frac{PKHT_x \times CONC_{IS}}{PKHT_{IS} \times CONC_x}$$

($CONC_x$ en $CONC_{IS}$ verteenwoordig die konsentrasie van die plaagdoder en die interne standaard onderskeidelik.)

Gebruik hierdie responsfaktor soos volg om die konsentrasie van die plaagdoders in die bloed te bepaal:

$$\text{konsentrasie}(\mu\text{g/ml}) = \frac{PKHT_x \times CONC_{IS}}{PKHT_{IS} \times RF_x}$$

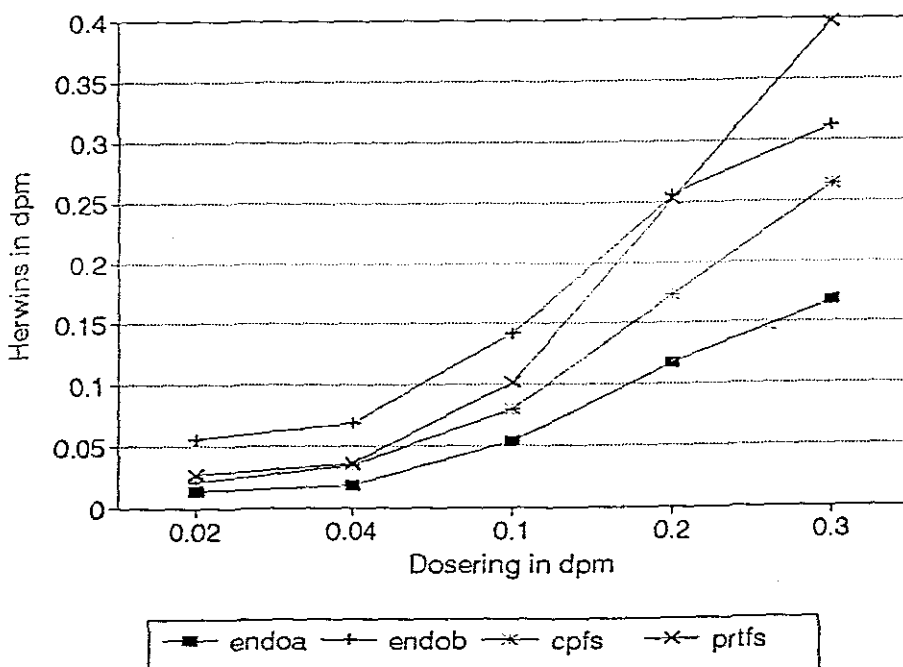
Aangesien die herwinste van al die plaagdoders en die interne standaard bekend is, kan korreksiefaktore nou gebruik word om die vlak van die plaagdoder aan te pas, sodat die ware vlak gevind kan word.

'n Ander metode van kwantifisering wat ook gebruik kan word, is die fase-verdeelde standaard metode. Indien eksterne kalibrasie vir kwantifisering gebruik word, skakel hierdie metode die aanpassing van die plaagdodervlakke uit, aangesien die standarde deur dieselfde ekstraksieproses gestuur word as waardeur die monsters gaan. Die konsentrasie wat aan die standaard toegeken word

na ekstraksie, is dieselfde as dit wat dit voor ekstraksie was en dus word die korreksiefaktor uitgeskakel.

Die lineariteit van ekstraksie van die plaagdoders by verskillende doseringsvlakke is ook bepaal. Die bloed word by verskillende vlakke gedoseer, geëkstraheer en dan gechromatografeer. Dit is belangrik om daarop te let dat 'n blankomonster ook deur dieselfde proses moet gaan, aangesien belemmerende stowwe die ontleding kan beïnvloed. Hierna volg 'n voorbeeld van 'n kurwe opgestel van sommige van die plaagdoders van hierdie studie. Om die kurwe op te stel is doserings van die volgende vlakke van plaagdoders gebruik: Chloorpirifos 0,203 mg/l, Endosulfaan- α 0,20 mg/l, Endosulfaan- β 0,234 mg/l en Protiofos 0,275 mg/l.

Fig 4-1: Lineariteit van plaagdoderekstraksie uit bloed.



4.5. *METODE.*

Die volgende metode is vir hierdie studie gebruik:

Meet 1,0 ml bloed akuraat uit in 'n 100 ml glasbeker en voeg hierna 1,0 ml van die alkohol/interne standaard mengsel by. Meng deeglik met 'n glasstafie en laat staan vir 20 minute. Voeg nou 1g van die Celite by die bloed/-alkoholmengsel en meng deeglik.

Neem 'n leë vastefasekolom en voeg 1g Celite daarin. Stamp die Celite liggies vas terwyl 'n vakuum getrek word. Dra nou die bloed/alkohol/Celite-mengsel kwantitatief oor na die vastefasekolom. Stamp liggies vas terwyl die vakuum getrek word. Plaas 'n opvangfles in die vakuum-ekstraksiehouer onder die kolom en elueer met 4,5 ml van die elueermiddel.

Damp die elueermiddel af op 'n waterbad by 50°, terwyl stikstof in die opvangfles geblaas word. Damp af tot net droog en verwyder dan die fles. Los die residu op in 1 ml van die chromatografie-oplosmiddel en chromatografeer.

Vir inligting oor die apparaat en reagense, sien afdeling 8.

HOOFSTUK 5

RESULTATE

5.1. DIE ONTLEDINGSPROSES.

In 'n biologiese moniteringsprogram in die Elgin-gebied is bloed- en urinemonsters versamel. Hierdie moniteringsprogram het uit die volgende afdelings bestaan (Barnes et al, 1992):

- (1) 'n fisiese ondersoek van die plaaswerkers,
- (2) 'n alkoholgeskiedenis van die plaaswerkers,
- (3) die neem van bloedmonsters vir die volgende toetse: hematologie, elektroliete, lewerfunksie, serum- en rooisel choliesterase,
- (4) die neem van urinemonsters vir roetine toetse, suiker en albumien.

Die bloed- en urinemonsters is versamel by plaaswerkers wat aktief betrokke was by die spuit van plaagdoders, en as kontrole groep is monsters by werkers in die pakstore in dieselfde omgewing versamel. Monsterneming het gedurende Augustus (met die aanvang van die spuitseisoen), gedurende November (middel van die spuitseisoen) en gedurende Februarie (teen die einde van die spuitseisoen) plaasgevind. (Barnes et al, 1992).

Die bepaling van plaagdoderreste op die bloed was aanvanklik nie deel van die omvattende program nie. Later,

nadat die eerste monsters reeds versamel is, is besluit om die bepaling van plaagdoderreste in te sluit as 'n aanvullende program.

Die bloedmonsters is versamel in "Vacutainer" buise. Nadat die verskillende kliniese toetse op die bloedmonsters gedoen is, is dit oorhandig vir die ekstraksie van die plaagdoders. Die oorhandiging het ongeveer 'n maand tot twee maande na monsterneming plaasgevind met die afhandeling van alle ander toetse. Gedurende die kliniese toetse is die monsters onder verkoeling gehou en nadat die toetse afgehandel is, is dit gevries by -20°C .

By ontvangs van die bloedmonsters vir plaagdoderontledings is die monsters ontdooi en oorgeplaas in polipropileen monsterhouers en gevries by -20°C . Dit is deurentyd onder bevriesing bewaar totdat die ekstraksies vir plaagdoders gedoen is.

Osterloh (1983) dui aan dat hulle bloed, plasma, urine, maaginhoud, brein, gal, lewer en ander organe bekom het 16 uur na die dood van 'n pasient. Die weefsel moes ontleed word vir die plaagdoders 2,4-D, MCPD en Chloorpirifos. Hulle het die weefsel gestoor by -70°C vir 'n tydperk van tot 2 maande voordat plaagdoderontleding plaasgevind het.

Vir die ontleding van bloed vir Lindaan het Drummond et al (1988) die bloed ontvang 'n dag nadat dit geneem is. By

ontvangs is die serum versamel en gestoor by -20°C totdat ontleding kon plaasvind. Volgens Cravey en Baselt (1981:89,148) verkies die meeste analiste wat chromatografiese tegnieke gebruik om monsters te vries aangesien geen kontaminante bygevoeg word nie, dit bakteriese groei voldoende verhoed en die afbreek van die komponente vertraag. Die temperatuur waarby hulle monsters bêre is -10°C .

Die bloedmonsters is geëkstraheer volgens die metode wat in afdeling 4.5. beskryf word. Die ekstrakte is ontleed op 'n gaschromatograaf wat toegerus is met 'n vlam-fotometriese en 'n elektron-ontvangsdetektor en 'n DB-1 kapillêre kolom. Die monsters is gesif deur die chromatogramme van die bloedmonsters te vergelyk met dié van plaagdodergedoseerde bloedmonsters. Sien afdeling 9.1.

Vir bevestiging van die teenwoordigheid van plaagdoders, is die positiewe monsters weer geëkstraheer en op 'n ander gaschromatograaf met stikstof/fosfor- en elektronontvangsdetektors en 'n DB-210 kapillêre kolom ontleed. Indien die resultate van die eerste en tweede ontledings ooreenstem, is aanvaar dat 'n monster positief is, en is 'n verdere finale bevestiging gedoen. Sien afdeling 9.2.

Die keuse van 'n geskikte kolom vir die bevestiging van resultate word gewoonlik gedoen aan die hand van die "polariteit" van die kolom se vloeistoffase. Volgens

Jennings (1978:101-3) het Rohrschneider Squalane as 'n verwysing gebruik in 'n poging om vloeistoffases te beskryf omdat dit die mees nie-polêre vloeistoffase was. Met behulp van 5 verskillende oplosmiddels en Kováts retensie-indekse (I), het hy probeer om die retensie van die oplosmiddels in die vloeistoffase beskryf. 'n Meer polêre kolom sal 'n groter I as Squalane hê en dus kan die selektiwiteit van die kolom vir 'n spesifieke oplosmiddel dus itv I beskryf word. Later het McReynolds hierdie beginsels gebruik en 'n lys van die retensie-indekse van vloeistoffases vir gepakte gaschromatografiekolomme opgestel. Dit word vandag nog steeds algemeen gebruik om die polariteit van vloeistoffases te beskryf, ook die van kapillêre kolomme. (Jennings, 1978:101-3).

Deur gebruik te maak van McReynolds retensie-indekse kan die vloeistoffases dus volgens polariteit ingedeel word. Die volgende tabel toon hoe die retensie-indekse opgestel is:

Tabel 5-1: McReynolds retensie-indekse van vloeistoffases in Gaschromatografie (Peters et al 1974:569).

Vloeistoffase	McReynolds Retensie-indeks	
	Benseen	Butanol (Oplosmiddels)
Squalane	653	590
SE-30	668	643
OV-17	772	748
QF-1	797	823
OV-225	881	959

Met ondervinding ontwikkel die chromatografis gewoonlik 'n gevoel vir die kolom wat geskik sal wees vir bevestiging.

Wanneer hierdie keuse gedoen moet word is dit goed om ingedagte te hou dat 'n retensie-indeksverskil van ongeveer 100 eenhede 'n goeie keuse is. Wanneer die kolom se retensie-indekse min verskil is die polariteite en dus selektiwiteit baie dieselfde maar met 'n verskil van ongeveer 100 eenhede is die verskil in eienskappe van die kolom groot. (Daar is ongeveer 200 eenhede verskil tussen die nie-polêre en polêre kolom.) Ander faktore wat bydra tot groter selektiwiteit en die verskil meer prominent maak is o.a. oondtemperatuur en die spoed waarteen die draergas deur die kolom vloei.

Indien die McReynolds retensie-indekse gebruik word, stem die DB-1 kolom se polariteit ongeveer ooreen met die SE-30 vloeistoffase, terwyl DB-210 ongeveer ooreenstem met QF-1. Indien die retensietye van 'n plaagdoder en 'n onbekende komponent ooreenstem op die DB-1 kolom en albei stem weer ooreen op die DB-210 kolom, dan kan met redelike sekerheid (>95%) aanvaar word dat die onbekende komponent en die plaagdoder identies is. 'n Derde kolom met verskillende polariteit of 'n ander analitiese tegniek kan die onsekerheid heeltemal uitskakel.

Vir die finale bevestiging is 'n verdere ekstraksie gedoen en die teenwoordigheid van die plaagdoder is bevestig op 'n gaschromatograaf toegerus met 'n massa-selektiewe detektor en 'n DB-1 kapillêre kolom. Aangesien die verwagte vlakke van die plaagdoders redelik laag is (ng/ml),

kon die teenwoordigheid van die plaagdoders slegs met selektiewe-ionmonitering bevestig word. Sien afdeling 9.3.

Massaspektrometrie word hier gebruik as finale bevestiging van die identiteit van die onbekende komponent (in hierdie geval die plaagdoder). Die gaschromatograaf met sy kolom is verantwoordelik vir die skeiding van die mengsel waarin die komponent voorkom en die massaspektrometer breek die komponent in massafragmente op. Die massafragmente word as massa-eenhede (m/e) op rekenaar gestoor vir data-verwerking.

Deur die hele reeks massafragmente afkomstig van die komponent te vergelyk met dié van 'n standaard, kan die identiteit van die komponent vasgestel word. Indien die retensietye van beide standaard en komponent ook nog dieselfde is, kan met absolute sekerheid (>99%) aanvaar word dat die komponent en die standaard identies is.

5.2. UITSLAG EN BESPREKING VAN DIE PLAAGDODER- ONTLEDINGS.

Die volbloed van die plaaswerkers en kontrole persone is vir die volgende plaagdoders ontleed: Asinfos-metiel, Chloorpirifos, Endosulfaan (α , β en sulfaat), Metidation en Protiofos. 'n Totaal van 402 monsters is ontleed van dieselfde 134 persone wat elk van die volgende tydperke

verteenwoordig: aanvang, middel en einde van die spuitseisoen.

Aangesien die verwagte vlakke van die plaagdoders in die bloed so laag is (ng/ml), was dit nie moontlik om die massaspektrometer in die aftaswyse te gebruik vir 'n algemene soektog na plaagdoders nie. In die aftaswyse monitor en stoor die massaspektrometer alle massafraksies wat dus noodwendig die sensitiwiteit inboet. Die massaspektrometer is daarom slegs in die selektiewe-ioonwyse gebruik en die 4 belangrikste massafragmente is gekies. Hoe meer massafragmente gekies word, hoe meer akuraat is die bepaling, maar hoe minder sensitief raak die detektor. Dit is dus belangrik om karakteristieke massafragmente wat uniek aan daardie plaagdoder is, te kies.

Nadat die siftingsproses op die gaschromatograwe voltooi is, is die monsters wat op die 2 kolomme positief vertoon het aan massaspektrometrie onderwerp. Die 4 belangrikste en kenmerkendste massafraksies van elke plaagdoder is gekies en daar is slegs gesoek vir daardie massafraksies.

5.2.1. *Belemmerende stowwe.*

Die interpretasie van die chromatogramme en gevolglike resultate is bemoeilik deur belemmerende stowwe wat in die bloed voorgekom het. Die belemmerende stowwe kom in die propies van die "Vacutainer" buise voor en loog uit wanneer die bloed daarmee in aanraking kom.

In 'n studie om die vlakke van plaagdoders in die bloed van mense wat in die noorde van Amerika woon te bepaal, het Murphy et al (1983) ook hierdie stowwe opgespoor. Alle bloedmonsters in hulle studie wat hierdie middels bevat het, is weggelaat en nie verder ontleed nie.

Monsters in hierdie studie is wel ontleed en daar is probeer om die effek van hierdie belemmerende stowwe so laag moontlik te hou. Deur die monsters oor te plaas in polipropileenhouers, is probeer om die verdere kontak tussen die bloed en die proppe uit te skakel. Die effek van hierdie belemmerende stowwe is veral merkbaar wanneer monsterekstrakte gekonsentreer word vir selektiewe ioonmonitering tydens die finale bevestiging. (Sien 9.5 vir 'n voorbeeld).

Met deeglike beplanning van die biologiese moniteringsprogram kon die effek van belemmerende stowwe vermy word, deurdat aparte monsters in geskikte houers versamel kon word vir plaagdoderontledings. Ongelukkig was die bepaling van plaagdoderreste aanvanklik nie deel van die moniteringsprogram nie. Cravey en Baselt (1981:89) dui ook die voorkoms van hierdie belemmerende stowwe aan en beveel ook aan dat hierdie nadelige effek uitgeskakel word deur ander houers te gebruik.

Aangesien die kliniese toetse (Barnes, 1992) by kamertemperatuur plaasgevind het en die bloed dus by daardie

temperatuur aan die proppe blootgestel is, is die effek van die verskillende "Vacutainer"-buis proppe op die bloed bepaal. In eie eksperimentering is die bloed-ekstrakte gechromatografeer om die invloed van hierdie belemmerende stowwe op die detektors en dus die plaagdoderontledings te bepaal.

Om goeie blootstelling te verseker is die proppe versnipper en in bloed gelaat teen kamertemperatuur vir 10 dae. Die belemmerende stowwe uit die verskillende kleure proppe het die verskillende detektors soos volg beïnvloed:

Tabel 5-2: Die invloed van belemmerende middels uit proppe op die detektors.

Prop kleur	Detektors		
	VFD	EOD	NFD
grys	geen	min	heelwat
rooibruin	geen	geen	min
rooibruin/swart	geen	min	heelwat
groen	hewig	geen	hewig
pers	geen	min	min

- Afkortings gebruik: (i) VFD: Vlam Fotometriese detektor met 'n fosforfilter,
(ii) EOD: Elektron-ontvangsdetektor,
(iii) NFD: Stikstof/fosfordetektor.

Voorbeelde van chromatogramme om aan te toon hoe die belemmerende stowwe die plaagdoderstandaarde oorskadu, verskyn in afdeling 9.6.

Die bloedmonsters wat vir plaagdoderontleding oorhandig is, was almal in buise wat groen proppe gehad het. Iden-

tifikasie mbv die massa-selektiewe detektor in die aftaswyse toon dat die belemmerende middel wat in die groen proppe voorkom en dus die analise bemoeilik van organofosfate, (2-butoksi-etanol)₃-fosfaat (CAS no: 000078-51-3), is. 'n Voorbeeld van die spektrum verskyn in afdeling 9.7. Van die ander middels wat ook al in die groen, rooibruin en pers proppe geïdentifiseer is, is: 2,2'-metileenbis[6-(1,1-dimetieletiel)-4-etiel]fenol (CAS no: 000088-24-4), 1,2-benseendikarboksielsuur en bis(2-metielpropiel)ester (CAS no:000084-69-5). Missen (1979) het onderskeidelik tri-butoksi-etiel-fosfaat en N-(1-metieletiel)-N'-feniel-1,4-benseendiamien gevind in die proppe van "Vacutainer" buise en 'n ander, ongeïdentifiseerde bloedhouer, ongelukkig dui hy nie die kleur van die proppe aan nie.

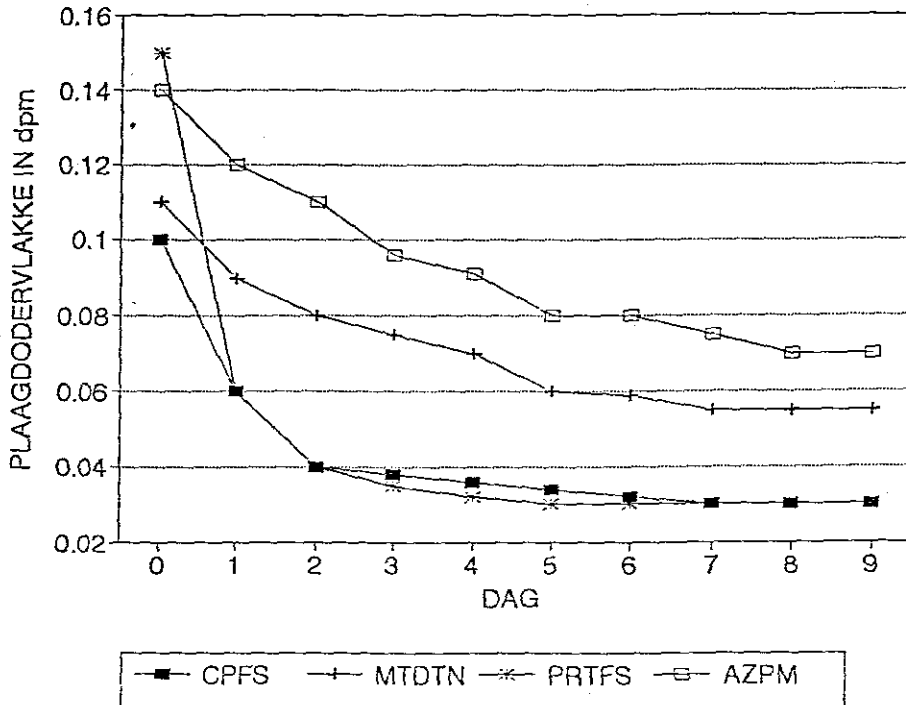
5.2.2. *Organofosfate.*

Met die siftingsproses op die gaschromatograwe is bevind dat 23 monsters positief getoets het vir organofosfate. Van die 4 organofosfate waarvoor getoets is, kon slegs Metidation nie gevind word nie. Twee monsters het vermoedelik Chloorpirifos gehad, 17 Asinfos-metiel en 4 Protiofos. Met selektiewe ioonmonitering op die massaspektrometer kon die teenwoordigheid van hierdie plaagdoders egter nie bevestig word nie.

In eie eksperimentering met gedoseerde bloedmonsters by kamertemperatuur is gevind dat die organofosfate betrokke by hierdie studie redelik vinnig in die bloed afbreek na

baie lae vlakke terwyl die vlakke van die organochloriede redelik konstant bly. In die volgende tabel kan die effek duidelik gesien word:

Fig 5-1: Afbreekkurve van die plaagdoders in bloed.



Daar kan verskeie redes wees waarom die teenwoordigheid van die organofosfate nie op die bloed bevestig kon word nie. 'n Waarskynlike rede is dat die lae vlakke in die bloed gedurende die kliniese toetsing nog verder gedaal het tot 'n punt waar dit onopspoorbaar op die massaspektrometer is, selfs met selektiewe ionmonitering.

'n Ander rede kan moontlike lae herwinste van die organofosfate wees. Osterloh et al (1983) dui 'n paar redes aan vir moontlike lae herwinste van plaagdoders. Van die

redes wat hy noem is: onomkeerbare binding aan weefsel, hidrolise agv ensieme, of ander nie-ensiematiese hidrolise.

Singh et al (1986) dui verder aan dat met gedoseerde organofosfate by serum en soutoplossings gevind is dat die serum laer herwinste toon. Hulle het vasgestel dat sekere ensieme met die bloed bind en dus is minder van die ongemetaboliseerde plaagdoders beskikbaar vir ekstraksie. 'n Verdere bevinding wat hulle gemaak het, is dat daar 'n verband bestaan tussen die DD_{50} en die herwins van die organofosfaat uit serum. Hoe laer die DD_{50} , hoe laer is die herwins. By organofosfate met 'n laer DD_{50} is daar 'n groter geneigdheid tot binding met plasmaproteïene, terwyl 'n hoër DD_{50} tot 'n kleiner geneigdheid van binding met die plasmaproteïene lei.

Die DD_{50} vir rotte van die onderskeie plaagdoders is soos volg: Asinfos-metiel 10 mg/kg, Chloorpirifos 145 mg/kg, Metidation 40 mg/kg en Protiofos 925 mg/kg. Indien Singh et al (1986) se DD_{50} -teorie op die resultate toegepas word, sou daar waarskynlik heelwat meer monsters wees wat positief was vir Asinfos-metiel en Metidation indien binding met plasma-proteïene nie 'n rol sou speel nie. Moontlik sou daar meer monsters wees wat Chloorpirifos bevat het, maar die aantal monsters met Protiofos in sou waarskynlik nie baie verander nie.

Volgens Singh et al (1986) is 'n ander faktor wat verantwoordelik kan wees vir lae herwinste die hoeveelheid plaagdoder wat teenwoordig is. By lae vlakke is die organofosfate teenwoordig in 'n ensiem- of proteïengebonde vorm en die herwinst is laag; by hoër vlakke word 'n stadium van versadiging bereik en nou is meer van die plaagdoder beskikbaar vir ekstraksie.

Dit is dus nie moontlik om met sekerheid te sê of daar enige blootstelling aan organofosfate was nie.

5.2.3. *Organochloriede.*

Die aanvanklike siftingsproses op die gaschromatograwe het getoon dat 29 monsters positief was vir Endosulfaan- α , - β en -sulfaat. Hiervan was 1 in die α -konfigurasie, 4 in die β -konfigurasie en 24 in die sulfaat-konfigurasie. Vier van die monsters wat in die sulfaat-konfigurasie was, het ook saam daarmee die β -konfigurasie gehad. Slegs 1 van hierdie 29 monsters kon met die massa-selektiewe detektor positief bevestig word, en dit is bevind dat hierdie monster Endosulfaan- β bevat het.

Volgens Hayes (1982:252-3) is aldie vorms van Endosulfaan al by mense tydens nadoodse ondersoeke gevind. Verder sê hy ook dat die formulاسie gewoonlik bestaan uit 64 - 67% van die α -konfigurasie en 29 - 32% van die β -konfigurasie. Dit is dan ook interessant om daarop te let dat tydens een van die nadoodse ondersoeke Endosulfaan- α en - β gevind is.

Die hoeveelhede was persentsgewyse min of meer in verhouding tot mekaar soos dit in die formulاسie voorkom.

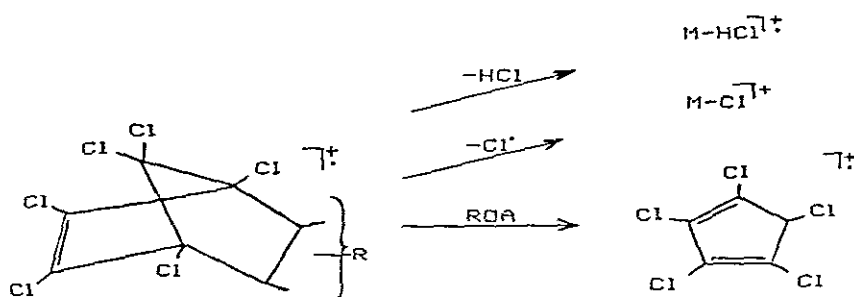
In hierdie studie is 4 monsters gevind wat 2 van Endosulfaan se konfigurasies per monster het. Dit is nie duidelik waarom dit die β - en die sulfaat-konfigurasie was wat saam voorgekom het nie. Een van die hidroliseprodukte van Endosulfaan- α en - β is oa Endosulfaan-sulfaat. Volgens Hayes (1982:252) word Endosulfaan- β baie vinniger gemetaboliseer as Endosulfaan- α in die serum van rotte. (Halfleeftyte: α - 235 en β - 5.97 uur). 'n Mens sou dus verwag dat dit eerder Endosulfaan- α en -sulfaat sou wees wat saam moes voorkom, omdat die Endosulfaan- β reeds gemetaboliseer is na Endosulfaan-sulfaat en ander wateroplosbare produkte.

Die teenwoordigheid van Endosulfaan-sulfaat by 24 monsters kan dien as bewys dat die werkers aan Endosulfaan blootgestel was. Die rede dat daar nie meer werkers was wat tekens van Endosulfaanblootstelling getoon het nie, lê waarskynlik in die tydsverloop voor monsterontleding en die tye waartydens die kliniese toetse uitgevoer is waar die temperatuur bo -20°C was. Ongelukkig kon die teenwoordigheid van die Endosulfaan-sulfaat nie met selektiewe-ionmonitering bevestig word nie, moontlik was die vlakke te laag.

By slegs een monster kon die teenwoordigheid van 'n plaagdoder met selektiewe-ioonmonitering bevestig word, naamlik Endosulfaan- β . Die retensietyd van die piek in die monster en die standaard het ooreengestem, en ook die chromatogramme van die onderskeie massa-eenhede (sien afdeling 9.3.1 en 2).

Endosulfaan behoort tot 'n groep plaagdoders wat die metano-indene genoem word. Hierdie groep plaagdoders ondergaan gemeenskaplike fragmentasieroetes wanneer hulle aan massaspektrometrie onderwerp word. Die fragmentasieroetes word hieronder aangedui (Safe & Hutzinger, 1980:125):

Fig 5-2: Fragmentasieroetes van Endosulfaan.



Die fragmentasie roetes wat die metano-indeenmolekule ondergaan, behels die eliminasië van HCl en Cl. Verder kan die molekule 'n omgekeerde Diels-Alderreaksie (RDA) ondergaan om heksa-chloro-siklopenta-dieën te vorm. (Safe & Hutzinger, 1980:125).

Volgens Safe & Hutzinger (1980:126) is die massaspektra van Endosulfaan- α en - β byna identies. Vir onderskeiding tussen die twee is dit dus noodsaaklik dat op retensietye staatgemaak moet word. Dit is dus belangrik om die gaschromatografietoestande so te kies dat daar voldoende skeiding tussen hierdie twee konfigurasies is.

Die massaspektrum van Endosulfaan veroorsaak 'n baie interessante fragmentasiepatroon agv die teenwoordigheid van chloor-isotope. Die isotooppatrone agv die 6, 5 en later 4 chlooratome is duidelik sigbaar. Die eerste van hierdie patrone kom voor by m/e 404, die molekulêre ioonpiek. Die patrone wat gevorm word is soos volg:

Tabel 5-3: Die isotooppatrone van chloor in massaspektrometrie.

m/e	% Relatiewe intensiteit van isotooppeke		
	6	5	4
x	52	63	78
x+2	100	100	100
x+4	80	64	48
x+6	34	21	10
x+8	8	3.3	0.8
x+10	1	0.2	
x+12	0.05		

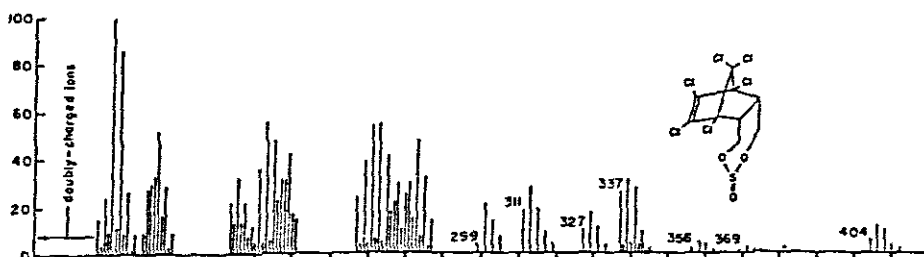
Volgens Safe & Hutzinger (1980:126) is massapieke van minder as m/e 197 agv ione met dubbele ladings. Dit is baie moeilik om die massaspektrum van Endosulfaan te ontleed en die fragmentasie patroon te bepaal sonder die hulp van 'n magnetiese-sektor massaspektrometer en meta-stabiele ione. Metastabiele ione word gebruik om die

fragmentasiepatroon van die molekule te bevestig, die graad van isotopiese verryking, die molekulêre her-rangskikings agv die elektronbotsings en energetika van ioniese afbreekreaksies te bepaal. (Safe & Hutzinger, 1980:6,7).

Safe en Hutzinger (1980:126) wys egter 'n paar fragmen-tasies aan: m/e 404, molekulêre ionpiek (M); m/e 369 agv $[M-Cl]^+$; m/e 356 agv $[M-SO]^+$; m/e 337 agv $[M-(Cl+S)]^+$; en ander. Die piek by m/e 270 is agv die omgekeerde Diels-Alderreaksie (RDA) wat Endosulfaan ondergaan om heksa-chloro-siklopenta-dieen te vorm.

Die ionpieke wat gekies is vir selektiewe ionmonitering was: m/e 195, 237, 267 en 339. Die m/e 339 piek is gekies omdat dit die grootste ionpiek verteenwoordig in die groep waarin dit voorkom. Hierdie ionpiek (M+2) word veroorsaak deur die fragmentasiepatroon van chloor-isotope en die 6 chlooratome (Sien tabel 5-3) om $[M-(Cl+S)]^+$ te vorm. Die ander ionpieke is gekies omdat dit voorkom in die ander piekgroepe van die massaspektrum.

Fig 5-3: Die massaspektrum van Endosulfaan- α en - β soos deur Safe en Hutzinger (1980:126) bepaal:



Tydens 'n ondersoek na die plaagdodervlakke in die bloed van mense wat in die noorde van Amerika woon het Murphy et al (1983) 'n verskeidenheid van plaagdoders gevind. Die plaagdoders wat hy gevind het sluit in DDT, BHC, Dieldrin en andere met vlakke van 1-2 ng/ml.

5.3. *Algemene opmerkings.*

Alhoewel die teenwoordigheid van die plaagdoders vir praktiese doeleindes nie met selektiewe ioonmonitering bevestig kon word nie, beteken dit dus nie dat daar geen plaagdoders in die bloed teenwoordig was nie. Soos gesien, is daar verskeie faktore wat die ekstraksie van die plaagdoders beïnvloed. Dit is dus baie belangrik om te onthou dat 'n biologiese moniteringsprogram uit verskillende fasette bestaan en dit is slegs nadat ál hierdie dele bymekaar gevoeg is, wat 'n ware oordeel gevel kan word. In die oorhoofse moniteringsprogram het die kliniese toetse geen aanduiding gegee van blootstelling van die plaaswerkers aan plaagdoders nie. (Barnes et al, 1992).

"Poison which has been absorbed into the system and may consequently be detected in certain circumstances in the textures of the body at a distance from the alimentary canal, may also be removed beyond the reach of analysis, by being gradually discharged along with the excretions.

Sir Robert Christison

A Treatise on Poisons, 1845"

Aanhaling uit Cravey en Baselt (1981:41).

HOOFSTUK 6

GEVOLGTREKKINGS EN AANBEVELINGS

6.1. GEVOLGTREKKINGS.

Hierdie projek het al die doelstellings bereik, naamlik:

- (1) 'n koste-effektiewe metode vir die bepaling van sekere organofosfate en organochloriede in bloed is gevind. Die metode kan uitgebrei word om voorsiening te maak vir ander plaagdoders deur slegs die herwinste van daardie plaagdoders te bepaal. Hierdie metode sal dus ook gebruik kan word in die bepaling van ongebonde, ongemetaboliseerde plaagdoders in nadoodse ondersoeke.

- (2) Die bloed van die plaaswerkers, asook persone wat geen kontak met plaagdoders gehad het nie, is ontleed. Belangrike inligting oor moontlike plaagdoderblootstelling is ingewin, hoewel slegs een monster positief bevestig kon word met massaspektrometrie. Hierdie inligting sluit in:
 - (i) die tydperk wat verloop voordat die organofosfate afbreek in die gemonsterde bloed,

 - (ii) die houers waarin die bloed versamel word en,

(iii) die belemmerende stowwe wat in die proppe van die monsterbuis voorkom.

(3) (i) Die bepaling van vlakke van plaagdoders in bloed alléén kan nie dien as indikator van blootstelling nie. 'n Volledige biologiese moniteringsprogram, wat die bepaling van plaagdoders en -metaboliëte in bloed insluit, behoort 'n goeie weerspieëling van blootstelling te gee. Waarskynlik is bloed nie 'n goeie medium vir die bepaling van organofosfate nie, maar wel vir organochloriede.

(ii) Die bepaling van plaagdoders in bloed is 'n komplekse ontleding met baie bykomende fasette wat ingedagte gehou moet word wanneer die vlak van blootstelling aan plaagdoders gemonitor word.

6.2. AANBEVELINGS.

Wanneer 'n biologiese moniteringsprogram onderneem word, moet dit die bepaling van plaagdoders en -metaboliëte in bloed insluit, asook die bepaling van metaboliëte in die urine.

Hoewel dit met groot weerstand gepaard sal gaan, sou 'n ontleding van die vetweefsel, in die geval van organochloriede, ook kon dien as 'n belangrike indikator van

plaagdoderblootstelling. Ratner et al (1983) beskryf 'n paar gevalle van mense wat siek geword het agv onderdrukte cholienesterasevlakke nadat hulle diëte gevolg het wat uitsluitlik uit vrugte en groente bestaan het. Die moontlikheid bestaan dus dat mense wat baie vrugte en groente eet wat behandel is met organochloriede, indirek blootgestel kan word aan vergiftiging van hierdie plaagdoders. Aangesien hierdie plaagdoders in die vetweefsel gestoor word, kan 'n verslankingsdieet veroorsaak dat die vetweefsel verminder en dat hierdie plaagdoders weer in die bloed vrygestel word. 'n Studie waarin hierdie effek ondersoek word, is 'n moontlikheid.

'n Uitgebreide studie is nodig om te bepaal wat die vlakke is van plaagdoders in groente en vrugte wat by die formele en informele sektor aangebied word, sodat die vlakke van blootstelling van die publiek bepaal kan word. Loubser (1992) se studie om die vlakke van plaagdoders op tamaties, slaai, blomkool en kool vas te stel het getoon dat daar wel 'n behoefte hiervoor bestaan. Sy het bevind dat die vlakke van plaagdoders by 28% van die slaai en 18% van die kool meer was as wat toegelaat word deur die Wet op Voedingsmiddels, Skoonheidsmiddels en Ontsmettingsmiddels (Wet No 54, 1972). Verder het 63% van die blomkoolmonsters plaagdoders bevat wat nie vir gebruik op blomkool geregistreer was nie, die vlakke was egter minder as 0,05 mg/kg.

Hoewel die vlakke van blootstelling van mense aan plaagdoders nie bekend is nie, behoort 'n daadwerklike poging aangewend te word deur die verspreiders van plaagdoders en die Departement van Nasionale Gesondheid, om mense bewus te maak van die gevare van plaagdoders indien dit nie korrek gebruik word nie. 'n Inligtingsprogram behoort die volgende aspekte te dek:

(1) dat dit belangrik is dat mense wat plaagdoders hanteer

(a) beskermende klere dra,

(b) dat hierdie klere voldoende beskerming bied,

(c) dat dit by die weerstoestande pas, en

(d) dat hulle vertrouwd gemaak word met die gebruik van beskermende klere en -toerusting.

(2) dat studies waarin plaagdoders bepaal word bekend gemaak word en dat die inhoud verantwoordelik hanteer en geïnterpreteer word. Copplestone (1986) wys daarop dat borsvoeding in Amerika 'n ernstige knou gekry het nadat die resultate van 'n studie op moedersmelk vlakke van organochloriede aangedui het, sonder om dit in perspektief te stel.

Die persone wat plaagdoders hanteer met die vervaardigingsproses en ook dié wat plaagdoders aanwend, die plaagbeheeroperateurs, behoort gereeld gemonitor te word vir blootstelling daaraan. Om monitering op 'n geordende wyse te koördineer en verpligtend te maak, behoort hierdie twee bedrywe by wyse van 'n regulasie

onder die Wet op Beroepsgesondheid en -veiligheid (Wet No 85, 1993) tot gelyste werk verklaar te word. Hierdie wet behoort ook voorsiening te maak vir onthoudingsmaatreëls in die gevalle waar blootstelling aan plaagdoders 'n merkbare invloed het op die cholinesterase vlakke van hierdie persone wat plaagdoders hanteer. Met hierdie stap van verpligte monitering en onthoudingsmaatreëls sal Suid-Afrika dān in pas kom met Kalifornië waar dit reeds sedert 1977 van krag is (Coye et al, 1986a). 'n Positiewe stap wat in Suid-Afrika geneem is, was die verpligte registrasie van plaagbeheeroperateurs onder die Wet op Misstowwe, Veevoedsel, Landboumiddels en Veemiddels (Wet No 36, 1947).

'n Verdere studieveld wat belangrike inligting kan gee, is om te bepaal watter prosesse in bloed plaasvind, of ophou om plaas te vind, nádat dit uit die liggaam geneem is. Die invloed hiervan op plaagdoders of farmaseutiese middels kan 'n aanduiding gee van die korrekte hantering van bloedmonsters vir die bepaling van residuvlakke van hierdie middels.

Die Wet op Misstowwe, Veevoedsel, Landboumiddels en Veemiddels (Wet No 36, 1947) reguleer die inligting wat op die etikette van plaagdoderhouers moet verskyn. Hierdie inligting behoort aangevul te word met eenvoudige tekeninge of simbole sodat die inligting ook toeganklik

kan wees vir mense wat nie kan lees of die tale magtig is nie.

Aangesien hierdie moniteringsprogram slegs in die vrugtebedryf gedoen is, behoort dit uitgebrei te word na ander vertakkinge in die landbou. As een van die belangrikste lande in Afrika, is dit die plig van alle betrokkenes by plaagdoders om toe te sien dat Suid-Afrika ook 'n leier word op die gebied van hantering en beskerming van die mense wat plaagdoders hanteer.

ANNEKS 1

7. 'n UITEENSETTING VAN DIE PLAAGDODERS BETROKKE BY
STERFGEVALLE.

	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92
ALDIKARB											1
ARSEEN	1								2		
ASINPHOS-METIEL	2	1	1		1			1	1		1
BROMODIALOON										1	
BROMOFOS-ETIEL		1		1							
KAMFECHLOOR					1						1
KARBARIEL								1			1
KARBOFURAN									1	1	1
KARBOKSIN			1								
CHLOORFENVINFOS	3	1	6	4	7	8	5	10	6	10	4
CHLOORPIRIFOS		1	1		3	3	1	2			1
DBCP						1					
DEMETON-S-METIEL	1	1	1	2	1	1					2
DIASINON	2	2	4	4	2	5	8	2	6	7	2
DICHLOORVOS	1				1		1			1	
DIKROTOFOS	1										
DIELDRIN	4	4	1	3	2	1	1	6	1	2	
DIMETOAAT	2	1	1			2	1	1			
DINOSEB		1									
DIOKSAKARBAMAAT								2			
DIOKSATION				1							
DIKWAT	1										
ENDOSULFAN	11	6	5	5	3	4	2	3	11	6	9
FENAMIFOS				1	1	1		1			
FENCHLOORFOS			1	1	1						
FENITROTION						1	1		2		
FENTION	2	1		2	2	3	1	3	4	1	
FENTION-ETIEL	1	2	1	1	1	4	4	2	2	3	5
FENTOAAT									1		
FOSFIEN	1	1	2	1			4	2	2		2
GAMMA-BHC	2		2		1	2	3	6	4	4	2
HHDN											
ISASAFOS								1	2	2	
KALKSWAWEL				1			1				
"LITTLE'S" DIP				1							
MANKOSEB	1						1				
MCPA				1							
MALATION	1		2	2	1	1	3	1			1
METAMIDOFOS			1						2	1	1
METIDATION			1								1
METIOKARB	1										
METOMIL							1				1
MEVINFOS			1	1						1	
MONOKROTOFOS	1		2	1		1	1	4			
OMETOAAT			1		1	1		1		2	
OKSIDEMETON-METIEL				1		1	1				
PARAKWAT	1	1	1	1		1	5	2	1	1	
PARATION	16	8	15	11	15	13	11	20	7	12	8
PCP					1						
PIRIMEFOS-METIEL		1									
PROFENOFOS							1				
PROPETAMFOS									1		
PROPOKSUR					1	1	1		1		
PIRASOFOS							1				
STRIGNIEN	3	7	6	2	1	4	4	4	2	2	4
TETRADIFON			1								
TIRAM			1								
TRIASOFOS						1					
TRICHLOORFON		1								2	
WARFARIN			1								1
ONGEIDENTIFISEERDE PLAAGDODERS					1	5	2				

ANNEKS 2

8. APPARAAT EN REAGENSE

Reagense:

- (1) Celite-545, Saarchem Unitek, katno. 1562000. Beskikbaar vanaf Saarchem.
- (2) Heksaan, Trueblue, 1 keer gedistilleer in glas en gechromatografeer om die graad van skoonheid te bepaal. Beskikbaar vanaf M&T Chemicals.
- (3) Asetoon, BDH Analar, Katno. 10003. Beskikbaar vanaf Merck.
- (4) Dichlorometaan, Merck Pro-analysi, katno. 6050. Beskikbaar vanaf Merck.
- (5) Etanol, 96%, 1 keer gedistilleer in glas. Beskikbaar vanaf Barrs Industrial.
- (6) Plaagdoderstandaarde: sertifikate van ontleding mbt suiwerheid en konsentrasie, Chemservice:
 - (a) Asinfos-metiel, PS 666.
 - (b) Chloorpirifos, PS 674.
 - (c) Endosulfaan- α , PS 81-1.
 - (d) Endosulfaan- β , PS 81-2.
 - (e) Endosulfaan-sulfaat, PS 81-3.
 - (f) Fenchloorfos, PS 657.
 - (g) Metidation, PS 679.
 - (h) Protiofos, PS 1094.

Alle plaagdoderstandaarde beskikbaar vanaf Separations.

Berei die volgende mengsels:

- (i) Elueermiddel: Heksaan/asetoon/dichlorometaan
(48:2:50).
- (ii) Etanol met Fenchloorfos as interne standaard. Die konsentrasie van die interne standaard moet 0.2 mg/l wees.
- (iii) Oplosmiddel vir die Chromatografie van monsters:
Heksaan/asetoon (96:4).

Apparaat:

- (1) 'n Waterbad by 50°C.
- (2) 'n Stroom stikstof vir die droogblaas van eluate.
- (3) 'n Temperatuurprogrammeerbare gaschromatograaf:
 - (i) HP 5890 series II met 'n elektron-ontvangsdetektor (300°C) en 'n vlam-fotometriese detektor (300°C) en inspuitblok (230°C); en
 - (ii) HP 5890 series II met 'n elektron-ontvangsdetektor (300°C) en 'n stikstof/fosfordetektor (300°C) en inspuitblok (230°C).

Albei gekoppel aan HP 3396A-integreerders vir die meet van retensietye en piekhoogtes.

- (4) Die gaschromatograaf moet toegerus wees met 'n 15m J&W DB-5 kapillêre kolom en vir bevestiging word 'n 15m J&W DB-210 kapillêre kolom benodig. Die temperatuurprogramme word so opgestel:

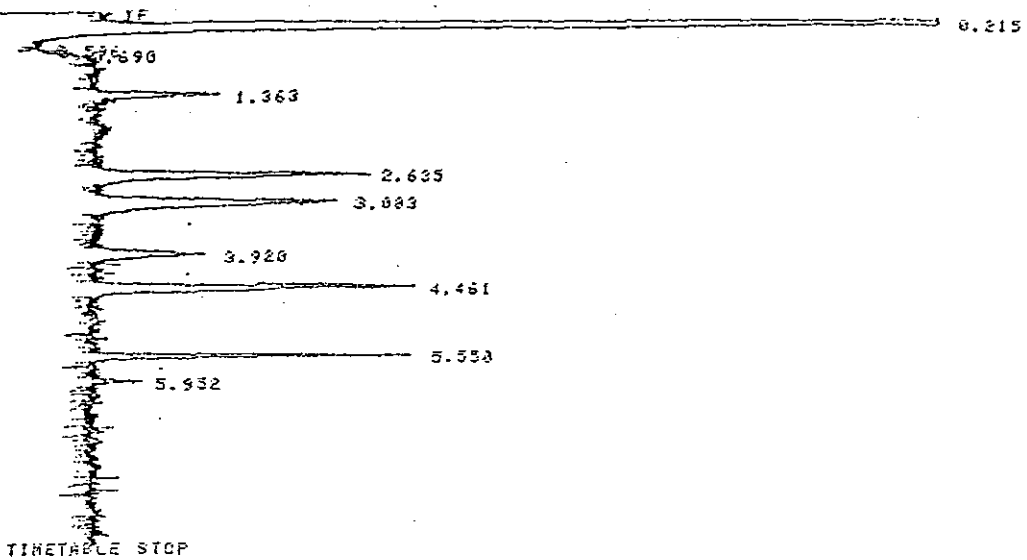
DB-5 kolom: 170°C (0,5 min), verhoog na 195°C teen 20°C/min, 195°C (1,75 min), verhoog na 280°C teen 30°C/min, 280°C (2,25min).

- DB-210 kolom: 160°C (0,5 min), verhoog na 180°C teen 20°C/min, 180°C (1 min), verhoog na 195°C teen 30°C/min, 195°C (1 min), verhoog na 280°C teen 30°C/min, 280°C (1,5 min).
- (5) 'n Gaschromatograaf, HP 5890 met 'n massa-selektiewe detektor HP 5971A. 'n 30 m Quadrex DB-1 kapillêre kolom word gebruik met die volgende temperature:
detektor: 300°C, inspuitblok: 280°C
program: 150°C (1 min), op na 300°C teen 20°C/min, 300°C (8min).
Tydprogram: na 1 min: afdryfklep oop
na 3 min: massa-spektrum aan
na 18 min: massa-spektrum af.
- (6) Leë 8 ml vaste-fase kolomme, Analytichem Bond Elut (katno. 1213-1015) met 20 micron sinterglas (katno. 1213-1021), asook 'n vakuumeekstraksiehouer vir gebruik saam met hierdie kolomme. Beskikbaar vanaf SMM.
- (7) Verskeie glasware.

ANNEKS 3

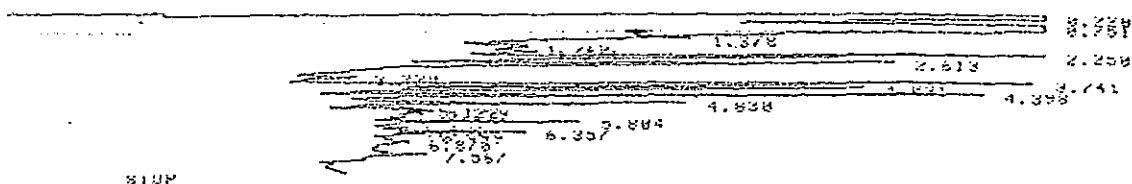
9. CHROMATOGRAMME EN MASSASPEKTROMETRIE DATA

9.1.1 Chromatogram van bloedmonster gedoseer met plaagdoders op 'n DB-5 kapillêre kolom: Vlamfotometriese detektor.



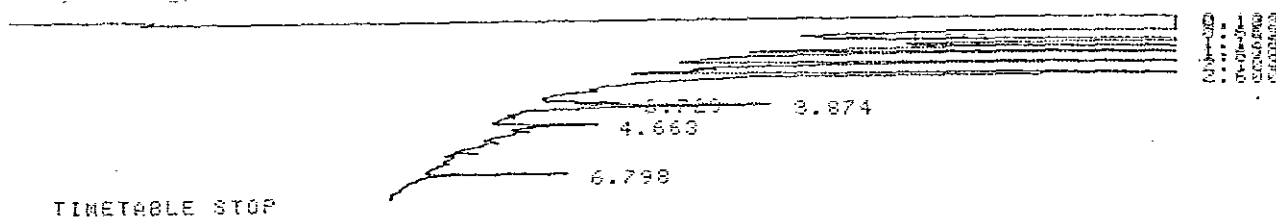
Retensietyd (min)	Plaagdoder
2,635	Interne standaard
3,083	Chloorpirifos
3,920	Metidation
4,461	Protiofos
5,952	Asinfos-metiel

9.1.2 Chromatogram van bloedmonster gedoseer met
plaagdoders op 'n DB-5 kapillêre kolom:
Elektron-ontvangsdetektor.



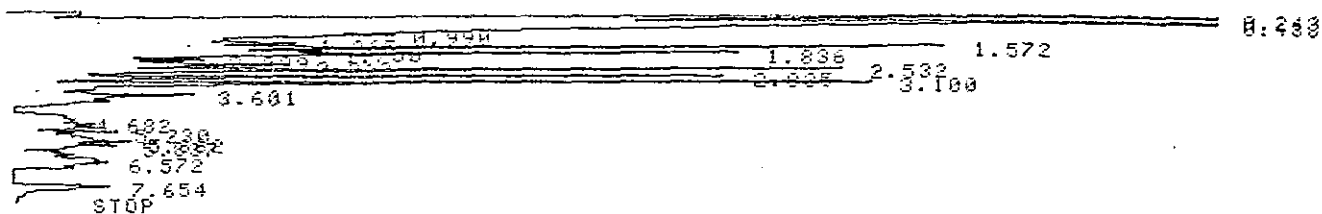
Retensietyd (min)	Plaagdoder
2,25	Interne standaard
3,74	Endosulfaan- α
4,398	Endosulfaan- β
4,83	Endosulfaan-sulfaat

9.2.1 Chromatogram van bloedmonster gedoseer met plaagdoders op 'n DB-210 kapillêre kolom: Stikstof/fosfordetektor.



Retensietyd (min)	Plaagdoder
1,44	Interne standaard
1,67	Chloorpirifos
2,106	Metidation
2,60	Protiofos
4,66	Asinfos-metiel

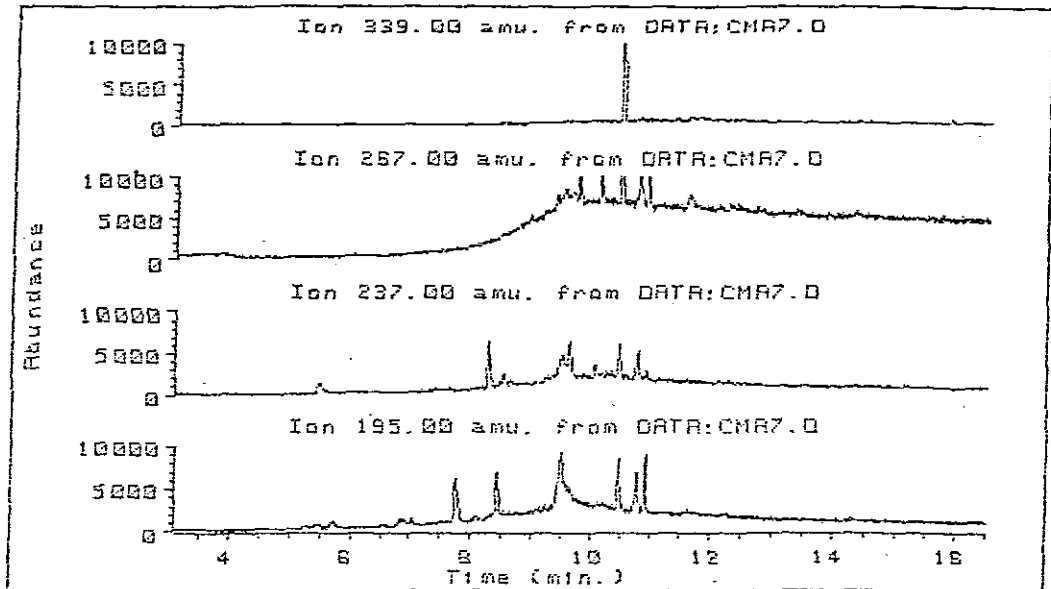
9.2.2 Chromatogram van bloedmonster gedoseer met
plaagdoders op 'n DB-210 kapillêre kolom:
Elektron-ontvangsdetektor.



Retensietyd (min)	Plaagdoder
1,58	Interne standaard
2,52	Endosulfaan- α
3,10	Endosulfaan- β
3,602	Endosulfaan-sulfaat

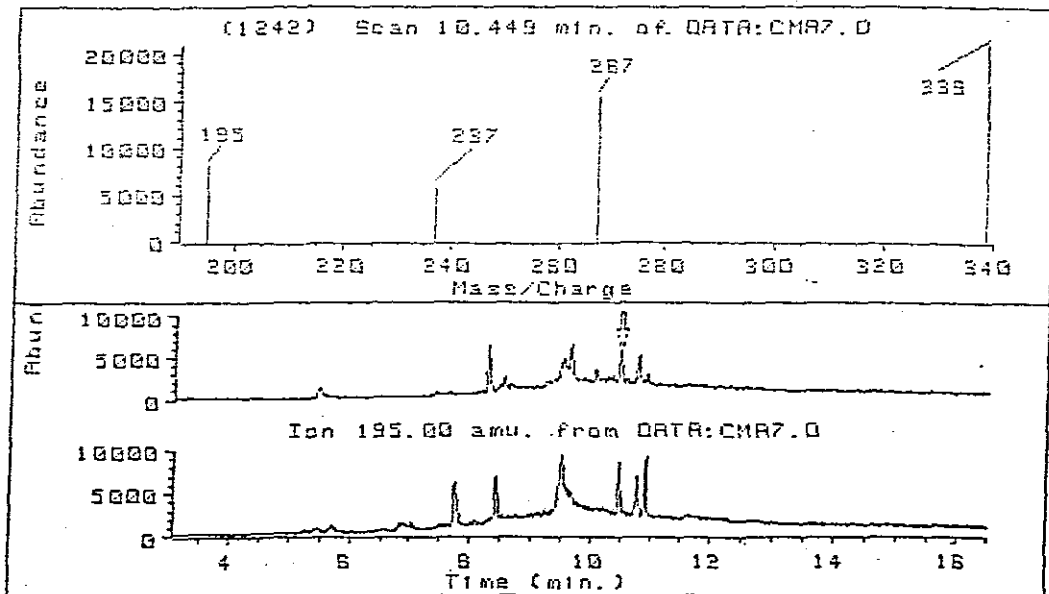
9.3.1. Die bevestiging van Endosulfaan-B in die positiewe monster op die massa-selektiewe detektor mbv selektiewe ione.

(Keuse van ione: 195, 237, 267 en 339)



T: -----
 Z: Set of 4 Trace Objects.
 Y: Scan 10.445 min. of DATA:S
 X: Scan 10.449 min. of DATA:C

[CHRO]

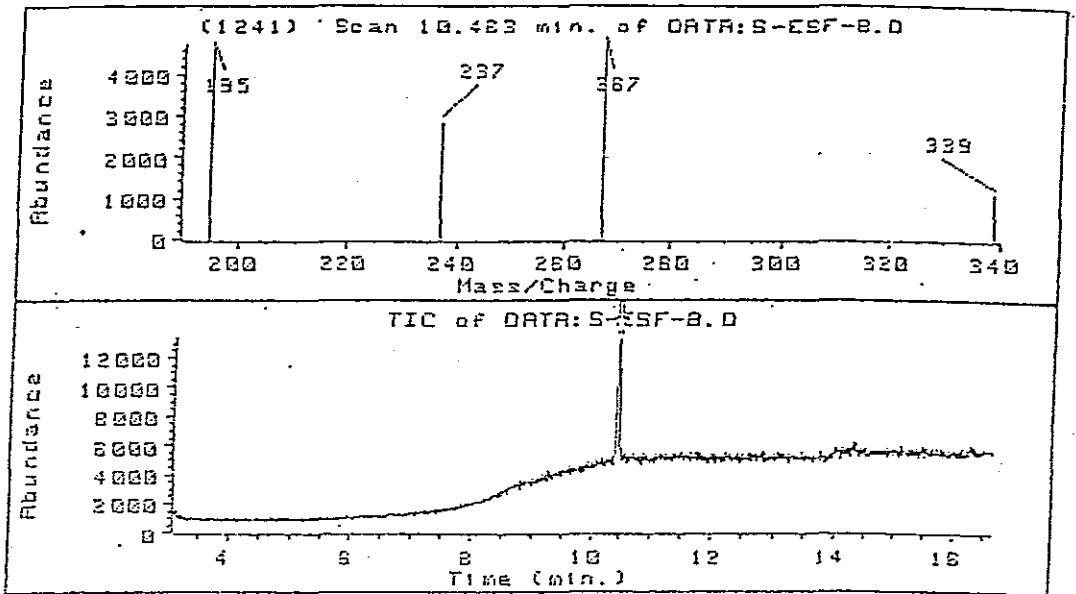


T: Scan 10.445 min. of DATA:S
 Z: Set of 4 Trace Objects.
 Y: Scan 10.449 min. of DATA:C
 X: Scan 10.449 min. of DATA:C

[DE]

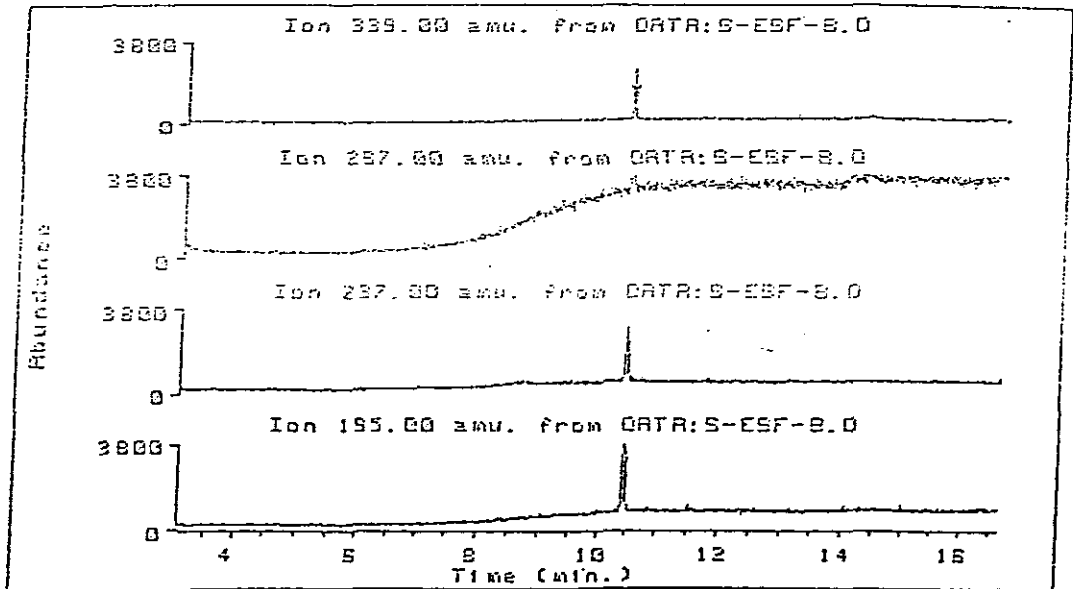
9.3.2. Die Endosulfaan- β standaard met selektiewe ione bepaal op die massa-selektiewe detektor.

(Keuse van ione: 195, 237, 267 en 339)



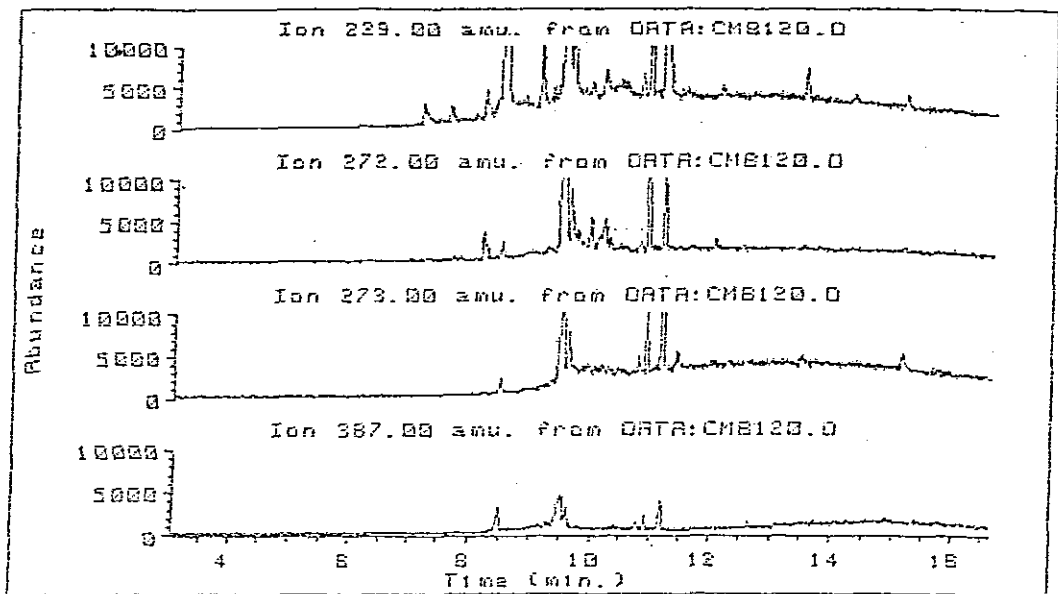
T: Scan 10.433 min. of DATA:S
 Z: TIC of DATA:S-ESF-B.D
 Y: Scan 10.457 min. of DATA:S
 X: Scan 10.463 min. of DATA:S

[DE]



T: Scan 10.433 min. of DATA:S

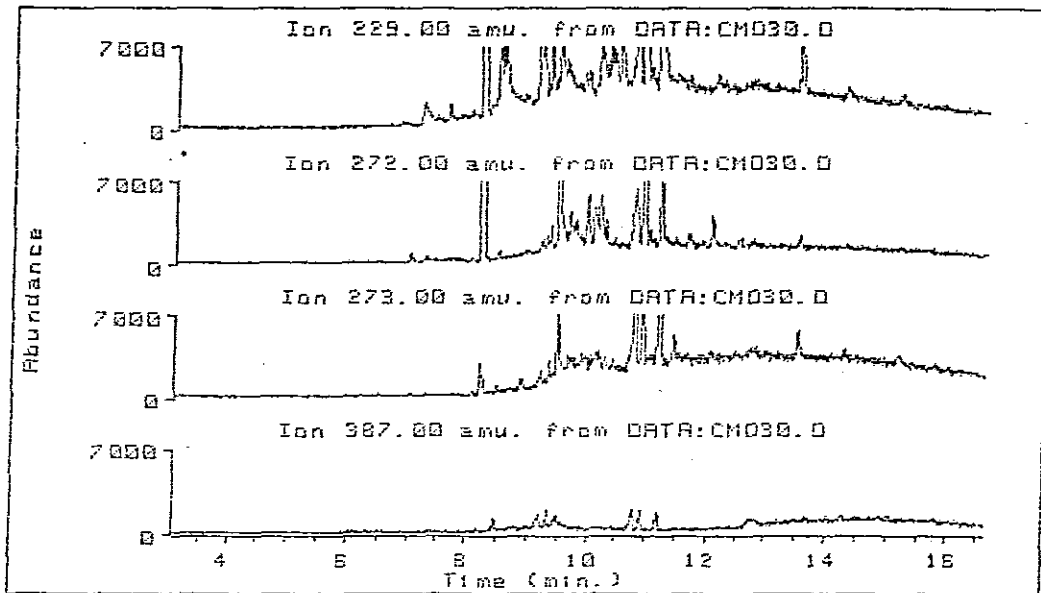
9.4. 'n Voorbeeld van 'n monster waarvan die teenwoordigheid van die plaagdoder nie met absolute sekerheid met selektiewe ione bevestig kon word nie.



T: Scan 11.144 min. of DATA:C
Z: Set of 4 Trace Objects.
Y: Scan 11.448 min. of DATA:C
X: Scan 11.195 min. of DATA:C

(CHSD)

9.5. Die belemmerende stowwe is veral merkbaar wanneer monsterekstrakte gekonsentreer word vir selektiewe ionmonitering.



T: -----
Z: Set of 4 Trace Objects.
Y: -----
X: Scan 11.297 min. of DATA:S

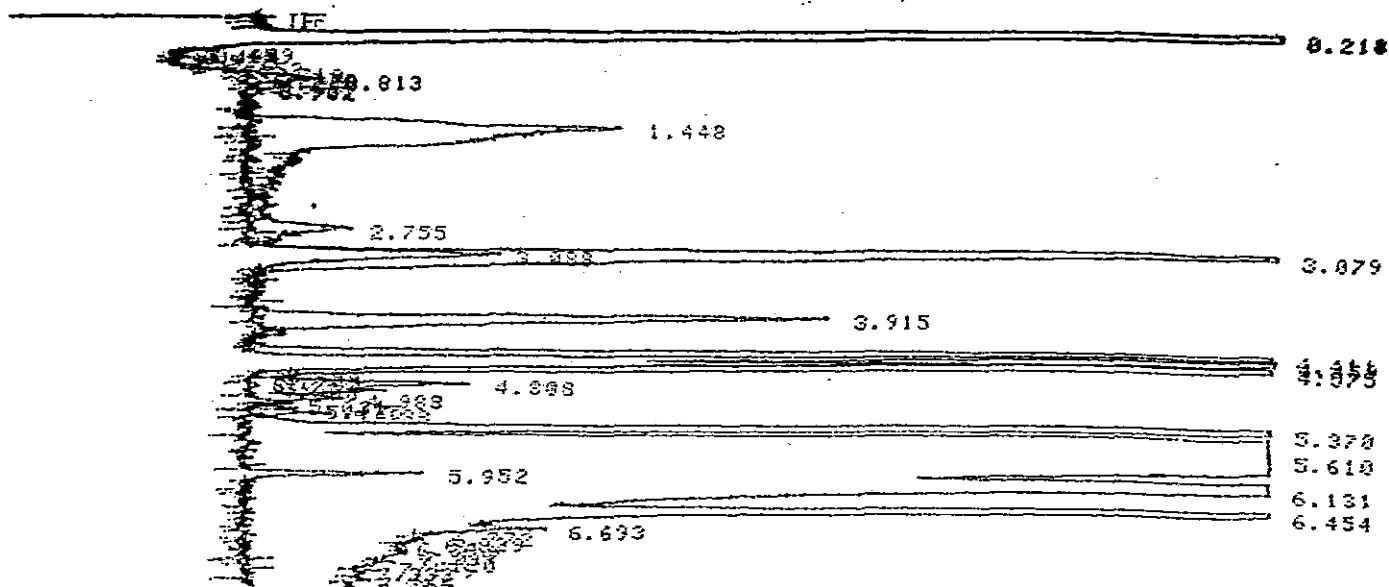
[CHRD]

9.6. Voorbeelde van chromatogramme om aan te toon hoe die belemmerende stowwe die plaagdoderstandaarde oorskadu.

Vlam-fotometriese detektor:

Standaarde

Belemmerende stowwe

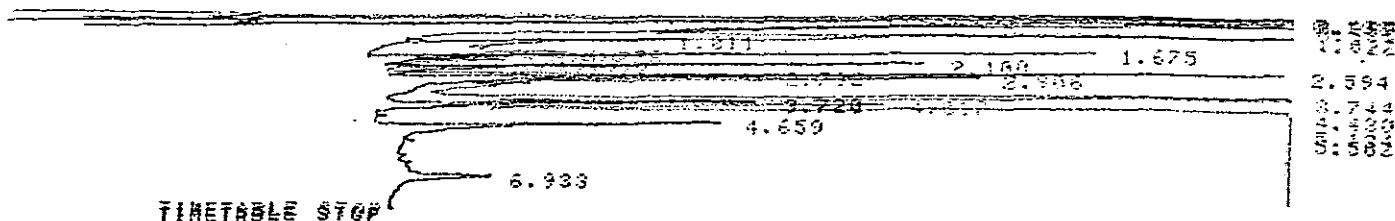


Retensietyd (min)	Plaagdoder
3,079	Chloorpirifos
3,915	Metidation
4,451	Protiofos
5,952	Asinfos-metiel

Stikstof/fosfordetektor:

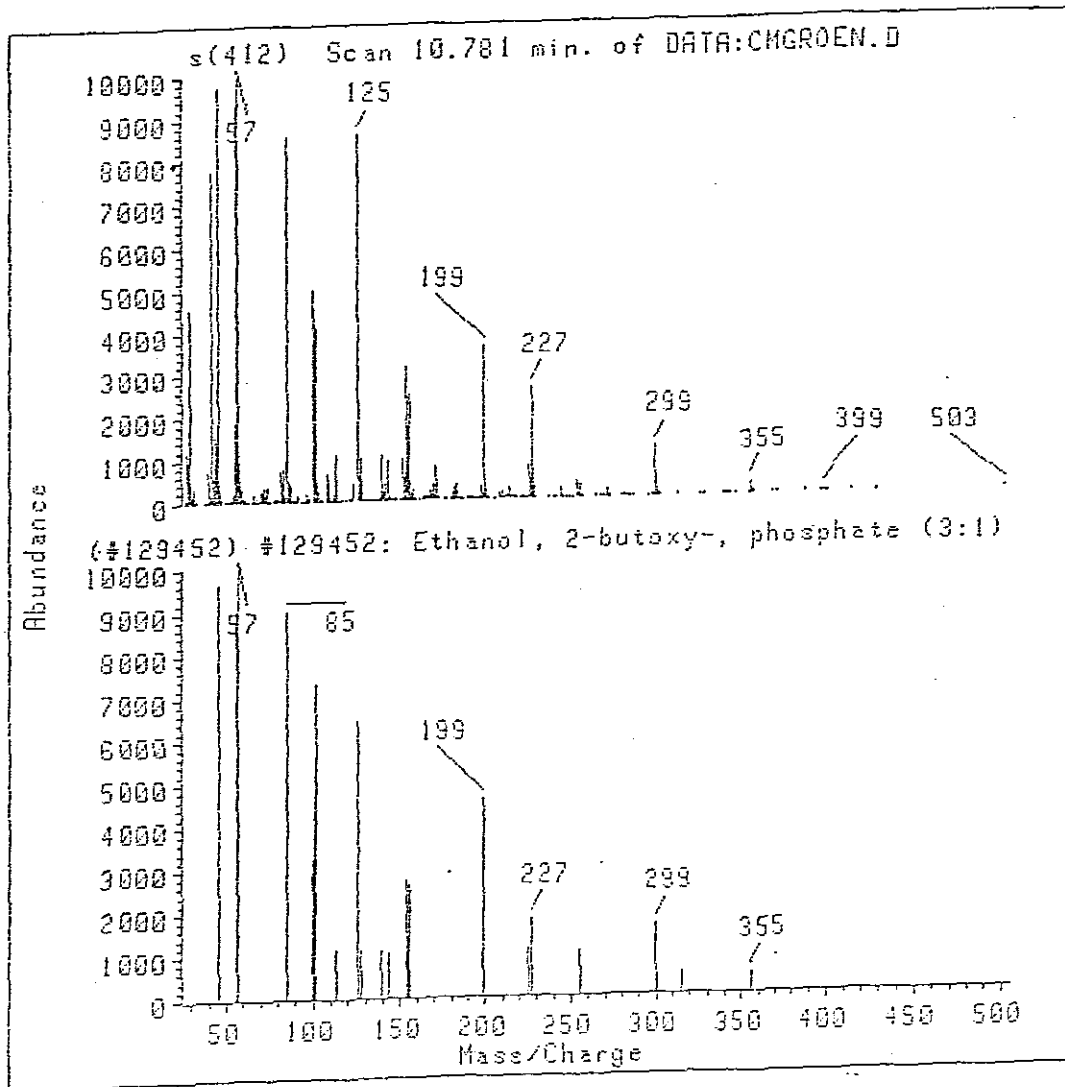
Standaarde

Belemmerende stowwe



Retensietyd (min)	Plaagdoder
1,675	Chloorpirifos
2,100	Metidation
2,594	Protiofos
4,659	Asinfos-metiel

9.7. Massaspektrometrie data van die belemmerende stof, (2-butoksi-etanol)₃-fosfaat (CAS no: 000078-51-3) wat in "Vacutainer"-buis voorkom.



BRONNELYS:

Amdur, MO; Doull, J & Klaassen, CD. 1991. TOXICOLOGY, The Basic Science of Poisons. USA, Pergamon Press.

Ames BN. 1992. Pollution, pesticides, and cancer. Journal of Association of Official Analytical Chemists International, 75(1), 1-5.

Analytichem International M53. Bond Elut Disposable Extraction Columns for the Rapid Extraction of ORGANO-CHLORINE PESTICIDES from Plant and Animal Tissues.

Baker M168. Rapid Extraction of Organochlorine Pesticides and PCB'S from Animal Fat with Baker-10 SPE Disposable Column: Aromatic Sulfonic Acid ($C_6H_5SO_3H$), 3 ml.

Baker M246. Rapid Extraction of Organochlorine Pesticides and PCB'S from Animal Fat with Baker-10 SPE Disposable Column: Octadecyl (C_{18}), 3 ml.

Bardin, PG; Van Eeden, SF & Joubert, JR. 1987. Intensive Care Management of Acute Organophosphate Poisoning. Suid-Afrikaanse Mediese Joernaal, 72, 593-7.

Barnes, JM; Müller, GJ & Lamprecht, JH. 1992. Health Survey of Deciduous Fruit Farm Workers Occupationally Exposed to Organophosphate Sprays. Abstract from Pharmacology Congress, Bloemfontein.

Bernard A & Lauwerys R. 1986. Present Status and Trends in Biological Monitoring of Exposure to Industrial Chemicals. *Journal of Occupational Medicine*, 28(8), 558-62.

Braeckman, RA; Godefroot, MG; Blondeel, GM; Belpaire, FM & Willems, JL. 1980. Kinetic Analysis of the Fate of Methyl Paration in the Dog. *Archives of Toxicology*, 43, 263-71.

Bredasdorp Munisipaliteit. 1992. Navraag: Ontleding van Grondmonsters vir Gifstowwe, verwysing 17/1/1.

Cohen, SZ; Eiden, C & Lorber, MN. 1987. Monitoring Ground Water for Pesticides in the USA. *Schriften-Reihe der Verein für Wasser-, Boden- und Lufthygiene*, 48, 265-94.

Copplestone, JF. 1986. Some Observations on Biological Monitoring. *Toxicology Letters*, 33, 203-4.

Coye, MJ; Lowe, JA & Maddy, KJ. 1986a. Biological Monitoring of Agricultural Workers Exposed to Pesticides: I. Cholinesterase Activity Determinations. *Journal of Occupational Medicine*, 28(8), 619-27.

Coye, MJ; Lowe, JA & Maddy, KJ. 1986b. Biological Monitoring of Agricultural Workers Exposed to Pesticides: II. Monitoring of Intact Pesticides and their Metabolites. *Journal of Occupational Medicine*, 28(8), 628-36.

Cravey, RH & Baselt, RC. 1981. *Introduction to Forensic Toxicology*. California, Biomedical Publications.

De Potter, M; Muller, R & Willems, J. 1978. A Method for the Determination of Some Organophosphorus Insecticides in Human Serum. *Chromatographia*, 11(4), 220-22.

Desi, I; Palotas, M; Vetro, G; Csolle, I; Nehez, M; Zimanyi, M; Ferke, A; Huszta, E & Nagymajtenyi, L. 1986. Biological Monitoring and Health Surveillance of a Group of Greenhouse Pesticide Sprayers. *Toxicology Letters*, 33(1-3), 91-105.

Die Burger. 1987. Minister gelas optrede teen vergiftiging. 15 November. Kaapstad.

Die Burger. 1991a. Huis met gif bespuit; 2 plaaswerkers sterf. 17 Januarie. Kaapstad.

Die Burger. 1991b. Agt dalk vergiftig weens koeldrank. 13 Februarie. Kaapstad.

Die Burger. 1991c. Kleuters op plaas vergiftig. 16 Maart. Kaapstad.

Die Burger. 1991d. Kleuter sterf aan gif op Paarlse plaas. 17 Maart. Kaapstad.

Donahue, JF; Burse, VW; Head, SL & Andrews, JS. 1988. Comparison of Two Techniques For Quantifying Environmental Contaminants in Human Serum. *Life Sciences*, 43(26), 2257-64.

Drummond, L; Gillanders, EM & Wilson, HK. 1988. Plasma γ -hexachlorohexane Concentrations in Forstry Workers Exposed to Lindane. *British Journal of Industrial Medicine*, 45, 493-7.

Farran, A; De Pablo, J & Hernández, S. 1988. Continuous-flow Extraction of Organophosphorus Pesticides Coupled On-line With High-performance Liquid Chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 212, 123-31.

Franklin, CA; Muir, NI & Moody, RP. 1986. The Use of Biological Monitoring In The Estimation of Exposure During The Application of Pesticides. *Toxicology Letters*, 33(1-3), 127-36.

Georghiou, GP & Saito, T. 1983. *Pest Resistance to Pesticides*. New York, Plenum Press.

Greve, PA & Heusinkveld HA. 1985. Bepaling van enkele organofosforbestrijdingsmiddelen in vlees. *Analytical Methods for Residues of Pesticides*. 4 th Edition. Leidschendam - Netherlands, Ministry of Welfare, Health and Cultural Affairs.

Hassall, K A. 1983. *The Chemistry of Pesticides*. London & Basingstoke, The Macmillan Press Ltd.

Hayes, WJ. 1982. *Pesticides Studied in Man*. Baltimore/-London, Williams & Wilkens.

Jacob, SW; Francone, CA & Lossow, WJ. 1978. *Structure and Function in Man*. USA, WB Saunders Company.

Jennings, W. 1978. *Gas Chromatography with Glass Capillary Columns*. USA, Academic Press, Inc.

Joubert, JR; Bardin, PG & Van Eeden, SF. 1987. Insekdoder gebruik teen hoë prys. *Suid-Afrikaanse Mediese Joernaal*, 72, 587-8.

Kuhr, RJ & Dorrough, HW. 1979. *Carbamate Insecticides: Chemistry, Biochemistry, and Toxicology*. Florida, CRC Press.

Krause, RT. 1980. Multiresidue Method for Determining N-Methylcarbamate Insecticides in Crops, Using High Performance Liquid Chromatography. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 63(5), 1114-24.

Leoni, V; Caricchia, AM & Chiavarini, S. 1992. Multi-residue Method for Quantitation of Organophosphorus Pesticides in Vegetable and Animal foods. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 75(3), 511-18.

Le Roux, M. 1987. Verlam deur jou tuingif. *Die Huisgenoot*, 26 November, 190-191.

Loubser, MME. 1992. *The Prevalence of Pesticide Residues on Vegetables Offered for Sale in the Greater Cape Town Area*. M MSc verhandeling, Universiteit van Stellenbosch.

Luke, MA; Froberg, JE & Masumoto, HT. 1975. Extraction and Cleanup of Organochlorine, Organophosphate, Organonitrogen, and Hydrocarbon Pesticides in Produce for Determination by Gas-Liquid Chromatography. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, 58(5), 1020-26.

Luke, MA; Froberg, JE; Doose, GM & Masumoto, HT. 1981. Improved Multi-residue Gas-chromatographic Determination of Organophosphorous, Organonitrogen and Organohalogen Pesticides in Produce, Using Flame-Photometric and Electrolytic Conductivity Detectors. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, 64(5), 1187-95.

Meyer, BJ. 1983. **Fisiologie van die Mens**. Pretoria, HAUM.

Missen, AW. 1979. A Gas-Liquid Chromatographic Procedure for the Determination of Drugs in Small Blood Samples. Report no. CD 2282, Chemistry Division, Department of Science and Industrial Research, New Zealand.

Moses M. 1988. A Field Survey of Pesticide-related Working Conditions in the US and Canada. **The Pesticide Education and Action Project**. San Francisco.

Murphy, RS; Kutz, FW & Strassman, SC. 1983. Selected Pesticide Residues or Metabolites in Blood or Urine

Specimens from a General Population Survey. **Environmental Health Perspectives**, 48, 81-6.

Namba, T; Nolte, CT; Jackrel, J & Grob, D. 1971. Poisoning Due to Organophosphate Insecticides. **The American Journal of Medicine**, 50, 475-92.

Neidert, E & Saschenbrecker, PW. 1984. Improved Storherr Tube for Assisted and Sweep Co-Distillation Cleanup of Pesticides, Polychlorinated Biphenyls, and Pentachlorophenol from Animal Fats. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, 67(4), 773-75.

Omgewings feite. Boerdery, gifstowwe en die natuurlewe. Omgewingsfeite 27. Natuurlewevereniging, Howick.

Oosterlig. 1992. Gifstowwe in vallei maak mense siek. 11 November. Port Elizabeth.

Osterloh, J; Lotti, M & Pond, SM. 1983. Toxicologic Studies in a Fatal Overdose of 2,4-D, MCP, and Chlorpirifos. **Journal of Analytical toxicology**, 7, 125-9.

Peters, DG; Hayes, JM & Hieftje, GM. 1974. **Chemical Separations and Measurements: The Theory and Practice of Analytical Chemistry**. USA, Press of WB Saunders Company.

Pick, FE; De Beer, PR & Van Dyk, LP. 1981. Organochlorine Insecticide Residues in Birds and Fish from the Transvaal, South Africa. *Chemosphere*, 10, 1243-51.

Ratner, D; Oren, B & Vigder, K. 1983. Chronic Dietary Anticholinesterase Poisoning. *Israel Journal of Medical Sciences*, 19, 810-4.

Safe, S & Hutzinger, O. 1980. *Mass Spectrometry of Pesticides and Pollutants*. Florida, CRC Press, Inc.

Singh, AK; Hewetson, DW; Jordon, KC & Ashraf, M. 1986. Analysis of Organophosphorous Insecticides in Biological Samples by Selective Ion Monitoring Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography*, 369, 83-96.

Stryer, L. 1981. *Biochemistry*. USA, WH Freeman and company.

Suid-Afrikaanse Polisie. 1984. *Unionele Geregtelike Nadoodse Ondersoek 2-4/1984*.

Telling, GM; Sissons & Brinkman, HW. 1977. Determination of Organochlorine Insecticide Residues in Fatty Foodstuffs using a Clean-up Technique based on a Single Column of Activated Alumina. *Journal of Chromatography*, 137, 405-23.

The Agrochemicals Handbook. 1990. Cambridge, The Royal Society of Chemistry.

Van Dyk, LP, Wiese, IH & Mullen, JEC. 1982. Management and Determination of Pesticide Residues in South Africa. *Residue Reviews*, 82, 37-124.

Van Dyk, LP; Lötter, LH; Mullen, JEC & De Kock, A. 1987. Organochlorine Insecticide Residues in Human Fat and Milk Samples in South Africa. *Chemosphere*, 16(4), 705-11.

Van Dyk, LP & Bot, J. 1987. The Problem of Pesticide Residues in Crop Production. *Research Highlights, Plant Production, Department of Agriculture and Water Supplies*, 151-2. Pretoria, Staatsdrukker.

Van Rensburg, C (Uitgewer). 1989. *Landbou in Suid-Afrika*. 4 de uitgawe: 125,127-8. Johannesburg, Chris van Rensburg Publikasies.

Wariishi, M; Suzuki, Y & Nishiyama, K. 1986. Chlordane Residues in Normal Human Blood. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 36, 635-43.

Wariishi, M & Nishiyama, K. 1989. Observations on the Progress of Chlordane Contamination in Humans by Blood and

Sebum Analysis. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 18, 501-7.

Watts, RR (Redakteur). 1980. Manual of analytical methods for the analysis of pesticides in humans and environmental samples. EPA 600/8-80-038, Sections 5,A and 6,A. United States Environmental Protection Agency, Health Effects Research Laboratory, Research Triangle Park, N.C.

Weekly Mail. 1992a. Dirty dozen pesticide on Anglo farm. 6-12 Maart. Johannesburg.

Weekly Mail. 1992b. Lethal crop of poisons on SA farms. 13-19 Maart. Johannesburg.

Weiss, J. 1986. *Handbook of Ion Chromatography*. California, Dionex Corporation.

Weisskopf, CP; Seiber, JN; Maizlish, N & Schenker, M. 1988. Personnel Exposure to Diazinon in a Supervised Pest Eradication Program. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 17, 201-12.

Wells, DE & Johnstone, JJ. 1977. Method for the Separation of Organochlorine Residues before Gas-liquid Chromatographic Analysis. *Journal of Chromatography*, 140, 17-28.

Wester, RC & Maibach, HI. 1985. In Vivo Percutaneous Absorption and Decontamination of Pesticides in Humans. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 16, 25-37.

Wet No 36, 1947. *Wet op Misstowwe, Veevoedsel, Landboumid-*
dels en Veemiddels, 1947. Pretoria, Staatsdrukker.

Wet No 54, 1972. *Wet op Voedingsmiddels, Skoonheidsmiddels*
en Ontsmettingsmiddels, 1972. Pretoria, Staatsdrukker.

Wet No 6, 1983. *Wet op Masjinerie en Beroepsveiligheid,*
1983. Pretoria, Staatsdrukker.

Wet No 85, 1993. *Wet op Beroepsgesondheid en Veiligheid,*
1993. Pretoria, Staatsdrukker.

White, A; Handler, P; Smith, EL; Hill, RL & Lehman, LR.
1978. *Principles of Biochemistry.* Tokio, McGraw-Hill.

WHO Study Group, 1982. Recommended Health-based Limits in
Occupational Exposure to Pesticides. *World Health Or-*
ganization Technical Report Series, 677.

Wood, NF. 1969. Extraction and Clean-up of Organochlorine
Pesticide Residues by Column Chromatography. *Analyst*, 94,
399-405.

World Health Organization (WHO). 1986a. Field Surveys of Exposure to Pesticides Standard Protocol. *Toxicology Letters*, 33(1-3), 223-35.

World Health Organization (WHO). 1986b. The WHO-UNDP Epidemiological Study On The Health Effects of Exposure to Organophosphorous Pesticides. *Toxicology Letters*, 33(1-3), 115-23.
