

Türkiye'de Kullanılan Karbamat İsektisitlerinin, Analitik Toksikoloji Yönünden İncelenmesi

Analytical Toxicological Examination of Some Carbamate Insecticides Used in Turkey

Mustafa GÜLEY, Ali Esat KARAKAYA*

Dünya'da ve Türkiye'de pestisit tüketimi hızla artmakta, her geçen gün yeni bileşikler bu amaçla kullanılmaya başlanmaktadır. Bu hızlı gelişim, başta çevre kirlenmesi, akut ve kronik zehirlenmeler olmak üzere, birçok sorunu da beraberinde getirmektedir (5,15,21,22). Bu sorunların çözümünde, temel adımlardan en önemlisi, duyar ve güvenilir kimyasal analiz yöntemlerinin geliştirilmesidir.

Araştırma konumuz olan karbamat insektisitleri, son yıllarda tüketimi en fazla artan gruplardan biridir (2) ve yeni bir grup olması nedeni ile, üzerinde yapılan araştırmalar yeterli değildir. Karbamat insektisitlerinin Türkiye'de kullanılanları, 1-Naftil-N-metilkarbamat (Sevin), 2-İzopropoksifenil-N-metilkarbamat (Baygon), 3,5-Dimetil-4-metilmerkaptto-fenil-N-metilkarbamat (Mesuro), 3-Metil-4-dimetilaminofenil-N-metilkarbamat (Matacil), 3-Metil-5-izopropilfenil-N-metilkarbamat (Carbamult), 2-Metiltio-propionaldehid-o-(metilkarbamoyl)-oksim (Lannate), 5,6-Dimetil-2-dimetilamino-4-pirimidinyl-dimetilkarbamat (Pirimicarb) dır (19). Araştırmamızın ilk bölümünde bu insektisitleri, ince tabaka kromatografisi ve enzim inhibisyon tekniği ile incelemeyi amaçladık.

Araştırmamızın ikinci bölümünde ise bu grup içinde en fazla tüketilenleri olan Sevin, Baygon ve Mesuro'yu ana metabolitleri ile birlikte biyolojik materyalden tanımda kullanılabilecek bir yöntem geliştirmeye çalıştık.

Ecz. Ali Esat Karakaya'nın "Türkiye'de Kullanılan Karbamat İsektisitlerinin Analitik Toksikoloji Yönünden İncelenmesi" isimli Doktora Tezinin özetidir. Sınav Tarihi: Haziran 1975

Redaksiyona Verildiği Tarih: 26 Ocak 1976

* Toksikoloji Kürsüsü, Eczacılık Fakültesi, Ankara Üniversitesi.

D E N E L K I S I M

M A T E R Y A L

Kullanılan insektisitler:

Sevin: Analitik standart, Agro-Merck, İstanbul.

Baygon: % 99.2'lik Analitik standart, Bayer, Leverkusen.

Mesurol: % 98.7'lik Analitik standart, Bayer, Leverkusen.

Matacil: % 95.5'lik Analitik standart, Bayer, Leverkusen.

Carbamult: % 98'lik Analitik standart, Schering, Berlin.

Lannate: Analitik standart, Du Pont, Wilmington.

Pirimicarb: % 99.4'lük Analitik standart, ICI, Surrey.

(Spektrofotometrik çalışmalar için Sevin, Baygon, Mesurol, etanolde rekrystalize edilerek kullanıldı).

Kullanılan metabolitler:

İzopropoksifenol: Bayer, Leverkusen.

2-Hidroksifenil-N-metilkarbamat: Bayer, Leverkusen.

Mesurol sülfoksit: Bayer, Leverkusen.

Mesurol sülfon: Bayer, Leverkusen.

α -Naftol (Merck)

Developman solvanları:

- 1) Etil asetat (Merck)-Kloroform (Merck) (60:40)
- 2) Eter (Merck)-Hekzan (Riedel) (90:10)
- 3) Siklohekzan (Riedel)-Aseton (BDH) (80:20)
- 4) Kloroform (Merck)-Benzen (Riedel)-Karbontetraklorür (Riedel) (60:30:25)
- 5) Hekzan (Riedel)-Aseton (BDH) (70:30)
- 6) Siklohekzan (Riedel)-Aseton (BDH) (70:30)
- 7) Eter (Merck)-Hekzan (Riedel) (80:20)
- 8) Etil asetat (Merck)-Toluen (Riedel) (50:50)
- 9) Kloroform (Merck)-Asetonitril (Merck) (80:20)
- 10) Benzen (Riedel)-Tetrahidrofuran (Merck) (80:20)

Püskürtme reaktifleri:

Ninhidrin: % 1'lik çözeltisi piridin içinde hazırlandı.

p-Nitrobenzendiazonyum fluoborat: % 1'lik çözeltisi aseton içinde taze olarak hazırlandı.

(p-Nitrobenzendiazonyum fluoborat, Freeman'ın (6) bildirdiği yöntem ile sentez edildi.)

2,6-Dibromkinonklorimid: % 0.5'lik çözeltisi sikloheksanda hazırlandı.

Rodamin-B: % 0.05'lik çözeltisi suda hazırlandı.

Alet:

İ.T.K. takımı (DESEGA) ve aksesuarı

Ultraviyole spektrofotometresi (Beckman DB-GT)

Homojenizatör (MSE)

Santrifüj (Hettich)

YÖNTEM**1- İnce tabaka kromatografisine ait çalışmalar**

İnce tabaka plağına tatbik edilecek insektisit numunelerinin metanoldeki % 0.1'lik çözeltileri hazırlandı. Plakların hazırlanması, tankın doyurulması, numunelerin tatbiki, developman işlemi Stahl'ın (17) yöntemi esas alınarak yapıldı.

Lekelerin yerlerinin saptanması

1) Ninhidrin'in piridindeki % 1'lik çözeltisi püskürtüldükten sonra plak 100 ° C da 30 dakika bekletildi (4) ve leke sınırları saptandı.

2) Rodamin B'nin sudaki % 0.05'lik çözeltisi püskürtüldükten sonra plak, sıcak hava akımında kurutuldu (8) ve kısa dalga boylu UV ışığı altında incelendi. Floresans veren lekeler saptandı.

3) Plak üzerine sırasıyla, metanolde hazırlanmış 1.5 N sodyum hidroksit ve sikloheksanda hazırlanmış % 0.5 2,6-dibromkinonklorimid püskürtüldü (14) ve leke sınırları saptandı.

4) Plak üzerine sırasıyla, metanolde hazırlanmış 1.5 N sodyum hidroksit ve asetonda hazırlanmış % 1 p-nitrobenzendiazonyum fluoborat püskürtüldü (6) ve leke sınırları saptandı.

5) Plak kısa dalga boylu UV ışığı altında incelendi. Floresans veren lekeler saptandı.

Reaktif duyarlık sınırlarının saptanması

İsektisitler, 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 µg miktarlarında, ince tabaka plaklarına tatbik edildi. Developman işleminde sonra, reaktif püskürtüldü. Her reaktifin sonuç verdiği en küçük isektisit miktarı bulundu. Bu miktarın saptanmasında lekenin en az bir dakika sabit kalması koşuluna uyuldu. Kısa dalga boylu UV ışığı altındaki incelemede, develope olmuş plak üzerinde floresans veren en küçük isektisit miktarı, duyarlık sınırı olarak alındı.

Enzim-inhibisyon tekniği

Oonnithan ve Casida'nın (13) yöntemi değiştirilerek uygulandı. 0.25 mm kalınlığında hazırlanmış, 10×20 boyutlarındaki Silicagel G plaklar kullanıldı. Numune tatbiki ve developman işleminden sonra plak kurutuldu. Enzim inhibitörü maddelerin yerlerinin saptanması için sırasıyla, şu işlemler yapıldı.

1) Plak saydamlaşıncaya kadar insan plazması püskürtüldü.

2) 0.1 N sodyum hidroksitte hazırlanmış % 0.6 bromtimol mavisinin pH: 6.0-7.6 + plazma (3:1) karışımı içine 9×18 boyutlarında kesilmiş Whatman No 1 kromatografi kâğıdı daldırılıp, çıkartıldı. Kâğıt bir dakika kadar dik tutularak, plazma-indikatör karışımının fazlasının akması sağlandı. Islak kâğıt, adsorban ile arasında hava kabarcığı kalmayacak şekilde adsorban üzerine kapatıldı.

3) Plak oda sıcaklığında ve nemli bir ortamda 30 dakika bekletildi. Bu sürenin sonunda, suda hazırlanmış % 4.5 asetilkolin bromür püskürtüldü ve plak tekrar nemli ortamda beklemeye bırakıldı.

4) Kolinesteraz inhibitörü maddeler, bir saat içinde, sarı zemin üzerinde mavi lekeler halinde belirdiler. Leke sınırları tespit edilip Rf değerleri hesaplandı.

Bu çalışmalarda, 20×20 boyutlarındaki plaklar kullanıldığı takdirde, adsorban üzerine kâğıt yayılması zorlaşmakta, hava kabarcıkları

cığı kalması olasılığı artmaktadır. Bu nedenle, enzim-inhibisyon tekniği ile yaptığımız çalışmalarda, 10×20 boyutlarındaki plakları kullandık.

Enzim-inhibisyon tekniğinde, duyarlık sınırının tespiti

İnsektisitler, 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 μg miktarlarında ince tabaka plaklarına tatbik edildi. Developman işleminden sonra, enzim-inhibisyon tekniği uygulandı. Sonuç veren en küçük insektisit miktarı saptandı.

2- Sevin, Baygon, Mesurol'ün major metabolitleri ile birlikte ince tabaka kromatografisinde tanınmaları ve biyolojik materyalden izolasyon için seçilen ekstraksiyon yönteminin veriminin hesaplanmasına ait çalışmalar:

Sevin- α naftol, Baygon-2 hidroksifenil N metilkarbamat-izopropoksifenol, Mesurol-mesurol sülfoksit-mesurol sülfon'un bir arada İ.T.K. de tanınmaları

Sevin, α naftol, Baygon, 2-hidroksifenil-N-metilkarbamat, izopropoksifenol, Mesurol, mesurol sülfoksit ve mesurol sülfon'un metanolde hazırlanmış % 0.1'lik çözeltilerinden 5'er μl Silicagel G plaklara tatbik edildi.

Sevin ve α naftol tatbik edilmiş plaklar eter-hekzan (80:20), Baygon, 2-hidroksifenil-N-metilkarbamat ve izopropoksifenol tatbik edilmiş plaklar eter-hekzan (80:20), Mesurol, mesurol sülfoksit ve mesurol sülfon tatbik edilmiş plaklar, kloroform-asetonitril (80:20) solvan sistemi ile developpe edildi.

Developman işleminden sonra, p-nitrobenzendiazonyum floroborat reaktifi ile lekelerin yerleri saptandı. Rf değerleri hesaplandı.

Ekstraksiyon

İdrar, kan, organdan izolasyon için Ackermann ve arkadaşlarının (1) yöntemi değiştirilerek uygulandı.

İdrardan ekstraksiyon: 5 ml idrar, 10 ml kloroform ile 25 ml'lik kapaklı santrifüj tüpünde 10 dakika çalkalandı. Fazların ayrılması için 3500 r.p.m. de 10 dakika santrifüj edildi. Alttaki kloroform fazı bir pipet yardımı ile alındı. İşlem, sulu faz üzerine 10 ml kloroform ilâve edilerek tekrar edildi. Birleştirilen kloroform fazları 50°C ı geç-

meyen bir su banyosu üzerinde saç kurutma makinası yardımı ile kuruluğa kadar uçuruldu.

Kandan ekstraksiyon: 3 g kan, 10 ml metanol ile 25 ml'lik kapaklı santrifüj tüpünde 10 dakika çalkalandı. 3500 r.p.m. de 10 dakika santrifüj edildi. Üstteki berrak kısım alındı. Kalıntı üzerine 10 ml metanol ilave edilerek işlem tekrarlandı. Birleştirilen metanol ekstraktları 50 ° C ı geçmeyen bir su banyosu üzerinde saç kurutma makinası yardımı ile kuruluğa kadar uçuruldu.

Organdan ekstraksiyon: 5 g organ, 25 ml metanol ile 20.000 r.p.m.'lik homojenizatörde 10 dakika homojenize edildi. Daha sonra homojenat, 3500 r.p.m. de 10 dakika santrifüj edilerek üstteki berrak kısım alındı. Metanol ekstraktı yukarıda anlatılan şekilde kuruluğa kadar uçuruldu.

Kan ve organdan elde edilen ekstrakt, çoğu zaman bir arıtma işlemine ihtiyaç göstermektedir. Bunun için ekstrakt, 10 ml kloroform ve 10 ml su ile kapaklı santrifüj tüpüne aktarıldı. 10 dakika çalkalandı ve 3500 r.p.m. de 30 dakika santrifüj edildi. Alttaki kloroform fazı bir pipet ile alındı. Susuz sodyum sülfat ile çalkalandıktan sonra, kuru bir süzgeç kâğıdından süzüldü ve yukarıda anlatılan yöntem ile kuruluğa kadar uçuruldu.

UV spektrofotometrik yöntem ile ekstraksiyon verimlerinin hesaplanması

Sevin, Baygon, Mesuro'lün metanoldeki UV spektrumları alındı ve maksimum absorbsiyon gösterdikleri dalga boyları saptandı. Bu dalga boylarında absorbsiyon-konsantrasyon eğrileri çizildi.

Sevin, Baygon ve Mesuro'lün biyolojik materyalden ekstraksiyon verimlerinin hesaplanması:

3'er mg Sevin ilave edilmiş, idrar, kan ve karaciğer ekstraksiyon bölümünde anlatılan yöntem ile ekstraksiyona tabi tutuldu. Ekstrakt 2 ml metanolde çözüldü ve Silicagel G plağa mikropipet yardımı ile 0.04 ml tatbik edildi.

Aynı plağın diğer tarafına 60 µg standart Sevin çözeltisi tatbik edildi. Plak, eter-hekzan (80:20) solvan sistemi ile develope edildi. Tanktan çıkarılan plak kurutuldu. Rf 0.43 civarında gerek ekstrakta, gerekse standart Sevin'e tekabül eden bölgedeki adsorban tabakaları ayrı ayrı kazınarak alındı. Adsorbanlar, 3 ml metanol ile çal-

kalanarak süzgeç kâğıdından süzüldü. ve hacımları metanol ile 3 ml' ye tamamlandı. Her iki çözeltinin de, 279 nm'de gösterdiği absorpsiyon-konsantrasyon eğrisi yardımı ile bu absorpsiyonlara karşılık olan Sevin miktarları bulundu.

\times = Plağa tatbik edilen andaki % ekstraksiyon verimini

A = Biyolojik materyalden ekstrakte edilen Sevin'in, ince tabakadan elüe edildikten sonraki miktarını ($\mu\text{g/ml}$ olarak)

B = Plağa tatbik edilen standart Sevin'in, ince tabakadan elüe edildikten sonraki miktarını ($\mu\text{g/ml}$ olarak), göstermek üzere,

$\times = 100 \frac{A}{B}$ işlemi ile plağa tatbik edilen andaki % ekstrak-

siyon verimi saptandı.

Baygon ve Mesurol'ün ekstraksiyon veriminin saptanmasında aynı yöntem uygulandı. Çözeltilerin absorpsiyonu Baygon için 271 nm, Mesurol için 221 nm de okundu. Absorpsiyon-konsantrasyon eğrisi yardımı ile bu absorpsiyonlara karşılık olan madde miktarları bulundu.

Deneyler onar kere tekrarlanarak sonuçların istatistiki değerlendirilmesi yapıldı. Sınıflandırılmamış örnekler için verilen (9), aşağıdaki formüller yardımı ile, ortalama, standart hata ve standart sapma bulundu.

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n x_i^2 - \frac{(\sum_{i=1}^n x_i)^2}{n}}{n-1}}$$

$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

\bar{x} = Ortalama

n = Örnekteki varyant sayısı

x_i = Örnekteki (i). varyantın değeri

S = Standart sapma

$S_{\bar{x}}$ = Standart hata

3- Deneysel olarak, Sevin, Baygon ve Mesurol ile zehirlenmiş deney hayvanlarından alınan materyal üzerinde kullanılan yöntemin geçerliliğinin kanıtlanması:

Deney hayvanı olarak tavşanlar kullanıldı. İnsektisitler % 0.5 metil selüloz ile süspansiyon haline getirildi. Ağız yoluyla ve lastik

sonda yardımı ile mideye verildi. Metabolit şekillenmesi için ilk iki gün küçük dozlarda üçüncü gün yüksek dozda insektisit verilerek hayvan öldürüldü. Ölüm üçüncü gün verilen dozdan sonra, 90 dakika içinde meydana geldi

Sevin, Baygon ve Mesurol ile yapılan deneylerde tavşanlara verilen insektisit dozu Tablo I de gösterilmiştir.

Tablo I. Sevin, Baygon, Mesurol ile yapılan deneylerde, deney hayvanlarına verilen insektisit dozu (mg/kg olarak).

	1.gün	2.gün	3.gün
Sevin	40	40	600
Baygon	20	20	150
Mesurol	20	20	150

Ölümden sonra 8 saat içinde tavşanlara otopsi yapıldı. İdrar kesesinden idrar, kalpten kan, karaciğer ve böbrek analiz materyali olarak alındı.

5 ml idrar, 3 g kan, 5 g böbrek ekstraksiyon bölümünde anlatılan yöntem ile ekstraksiyona tâbi tutuldu. Elde edilen ekstraktlar, insektisit ve metabolit standartları ile birlikte 20×20 boyutlarındaki Silicagel G plaklara tatbik edildi.

Sevin ve Baygon ile yapılan çalışmalarda, developman solvanı olarak eter-hekzan (80:20), Mesurol ile yapılan çalışmalarda kloroform-asetonitril (80:20) kullanıldı. Developman işleminden sonra plaklara p-nitrobenzendiazonyum fluoborat püskürtülerek beliren lekelerin yerleri saptandı.

Diğer taraftan ekstrakt ve standartlar tatbik edilmiş 10×20 boyutlarındaki Silicagel G plaklar aynı şekilde developpe edildi. Developman işleminden sonra plaklara, enzim-inhibisyon tekniği bölümünde anlatılan işlem uygulandı. Enzim inhibitörü lekeler saptandı.

BULGULAR

Karbamat insektisitlerinin, ince tabaka kromatografisinde, adsorban olarak Al₂O₃ G ve Silicagel G kullanıldığında, çeşitli developman solvanları ile verdikleri Rf değerleri Tablo II de gösterilmiştir.

Tablo II. Karbamat insektisitlerinin, Al_2O_3 G ve Silicagel G adsorban üzerinde, çeşitli developman solvanları ile verdikleri Rf değerleri ($Rf \times 100$ olarak).

DEVELOPMAN SOLVANI	1		2		3	4	5	6	7	8	9	10
	A	S	A	S	A	A	A	A	S	S	S	S
Sevin	77	58	58	53	30	36	54	49	43	52	63	46
Baygon	79	60	60	59	34	33	57	53	50	53	61	53
Mesurool	82	63	71	63	41	07	63	59	52	71	70	53
Matacil	80	52	61	51	37	44	60	55	41	45	53	44
Carbamult	85	66	77	66	47	46	67	63	58	61	70	54
Lannate	55	37	12	14	12	19	26	25	09	21	48	23
Pirimicarb	84	48	60	38	50	47	69	65	29	36	55	44

Developman solvanları

- 1) Etil asetat-Kloroform (60: 40) A= Al_2O_3 G (0.25 mm)
- 2) Eter-Hekzan (90: 10) S=Silicagel G (0.25 mm)
- 3) Sikloheksan-Aseton (80: 20)
- 4) Kloroform-Benzen-Karbondotetraklorür (60: 30: 25)
- 5) Hekzan-Aseton (70: 30)
- 6) Sikloheksan-Aseton (70: 30)
- 7) Eter-Hekzan (80: 20)
- 8) Etil asetat-Toluen (50: 50)
- 9) Kloroform-Asetonitril (80: 20)
- 10) Benzen-Tetrahidrofuran (80: 20)

Tablo II de belirtilen developman solvanları, araştırma sırasında denenen, yetmişe yakın polar ve nonpolar özellikte solvan içinde, en iyi sonuç verenleridir.

Karbamat insektisitlerinin, çeşitli renk reaktifleri ile, Al_2O_3 G ve Silicagel G adsorban üzerinde verdikleri renkler, reaktiflerin duyarlık sınırları Tablo III ve Tablo IV de gösterilmiştir.

Karbamat insektisitlerinin, Silicagel G adsorban, eter-hekzan (80:20) developman solvanında, enzim-inhibisyon tekniği ile verdikleri kromatogram, Şekil 1 de gösterilmiştir.

Tablo III. Karbamat insektisitlerinin, Al₂O₃ G ve Silicagel G adsorban üzerinde, çeşitli reaktiflerle verdikleri renkler.

REAKTİF	1		2		3		4		5	
	A	S	A S		A S		A S		A S	
Sevin	Kirli-viyole	Kırmızı	Floresans		Mavi-viyole		Mavi-viyole		-	
Baygon	Kirli viyole	Kırmızı	Floresans		Mavi-viyole		Kahverengi-pembe		-	
Mesurool	Kirli-viyole	Kırmızı	Floresans		Gri-yeşil		Kahverengi-pembe		-	
Matacil	Kirli-viyole	Kırmızı	Floresans		Gri-yeşil		-		-	
Carbamult	Kirli-viyole	Kırmızı	Floresans		Açık-mavi		Kahverengi-pembe		-	
Lannate	Kirli-viyole	Kırmızı	Floresans		-		-		-	
Pirimicarb	-	Kırmızı	Floresans		-		-		Floresans	

Reaktif

- 1- Ninhidrin
- 2- Rodamin-B
- 3- 2,6-Dibromkinonklorimid
- 4- p-Nitrobenzendiazonyum fluoborat
- 5- Kısa dalga boylu UV ışığı

A=Al₂O₃ G (0.25 mm)
S=Silicagel G (0.25 mm)

Tablo IV. Karbamat insektisitlerinin, Al₂O₃ G ve Silicagel G adsorban üzerinde, çeşitli reaktiflerle, duyarlılık sınırları (µg olarak).

REAKTİF	1		2		3		4		5	
	A	S	A	S	A	S	A	S	A	S
Sevin	1	1	3	5	0.5	0.5	0.5	0.5	-	-
Baygon	1	1	3	5	0.5	0.5	0.5	1	-	-
Mesurool	1	1	3	5	3	4	1	3	-	-
Matacil	1	1	2	3	3	4	-	-	-	-
Carbamult	1	2	3	5	3	3	0.5	1	-	-
Lannate	1	0.5	1	1	-	-	-	-	-	-
Pirimicarb	-	1	1	1	-	-	-	-	0.1	0.1

Reaktif

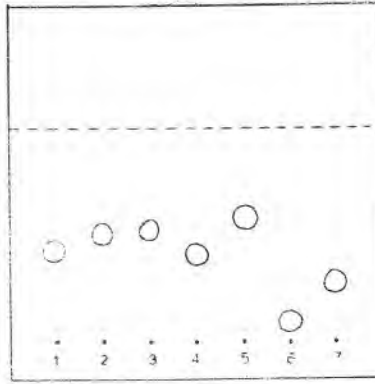
- 1- Ninhidrin
- 2- Rodamin-B
- 3- 2,6-Dibromkinonklorimid
- 4- p-Nitrobenzendiazonyum fluoborat
- 5- Kısa dalga boylu UV ışığı

A=Al₂O₃ G (0.25 mm)
S=Silicagel G (0.25 mm)

Plak üzerinde enzim inhibitörü maddelerin bulunduğu yerlerde, püskürtülen kolinesteraz enzimi inhibe olmaktadır. Arkadan püskürtülen substratın (asetilkolin), enzimin inhibe olduğu yerlerde parçalanmaması, zemin ile inhibitör maddelerin bulunduğu yerler arasında pH farkı meydana getirmektedir. Bu pH farkı indikatör (bromtimol mavisi) ile saptanmakta ve inhibitör maddelerin bulunduğu yerler mavi, asidik olan zemin ise, sarı olarak belirlenmektedir.

Adsorban: Silicagel G (0.25 mm)

Developman solvanı: Eter-Hekzan (80:20)



Şek. 1. Karbamat insektisitlerinin enzim-inhibisyon yöntemi ile verdikleri kromatogram 1. Sevin 5 μg 2. Baygon 5 μg 3. Mesuroil 5 μg 4. Matacil 5 μg 5. Carbamult 5 μg 6. Lannate 5 μg 7. Pirimicarb 5 μg

Enzim-inhibisyon tekniğinin uygulanmasında şu noktalar dikkati çekmektedir;

Lekeler, gerçek büyüklüklerinden daha büyük olarak belirlerler. Bunun nedeni, adsorbanın oldukça fazla miktarda sıvıya maruz kalması sonucu lekelerin yayılmasıdır. Buna karşın, Rf değerlerinde bir değişiklik olmamaktadır.

Absorban üzerine kaplanacak olan Whatman No 1 kromatografi kâğıdının, plak boyutlarından küçük olması gerekmektedir. Eğer bu koşula uyulmaz ise, bekleme anlarında, kâğıdın kuruyarak adsorban üzerinden kalkması kolaylaşmaktadır. Yine bekleme anlarında, kâğıdın kuruyarak adsorban üzerinden kalkmaması için, plağın nemli bir ortamda bekletilmesi gerekmektedir.

Kâğıt, indikatör-plazma karışımına daldırılıp çıkartıldıktan sonra, dik tutularak üzerindeki sıvının fazlasının akması ve kâğıt yüzeyinin homojen bir görünüş alması sağlanmalıdır.

Kâğıdın adsorban üzerine yayılması sırasında, kâğıt ile adsorban arasında hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilmelidir.

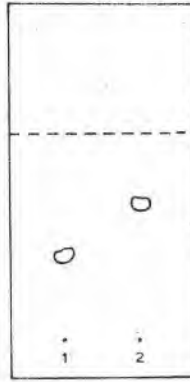
Enzim-inhibisyon tekniğinde duyarlık sınırı, Baygon, Carbamult, Matacil, Lannate, Pirimicarb için 0.5 μg , Sevin ve Mesurool için 1 μg olarak saptanmıştır.

Sevin ve major metaboliti α naftol'ün Silicagel G adsorban üzerinde, eter-hekzan (80:20) developman solvanı ile verdikleri kromatogram, Şekil 2 de gösterilmiştir. p-Nitrobenzendiazonyum fluoborat reaktifi ile her iki madde de mavi-viyole renk vermektedir. Sevin'in Rf değeri 0.42 α naftol'ün Rf değeri 0.66 olarak saptanmıştır.

Adsorban: Silicagel G (0.25 mm)

Developman solvanı: Eter-Hekzan (80:20)

Reaktif: p-Nitrobenzendiazonyum fluoborat



Şek.2. Sevin ve α naftol'ün kromatogramı

1. Sevin 5 μg 2. α Naftol 5 μg

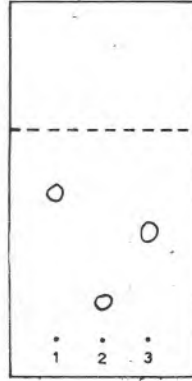
Baygon, major metaboliti 2-hidroksifenil-N-metilkarbamat ve izopropoksifenol'ün Silicagel G adsorban üzerinde, eter-hekzan (80:20) developman solvanı ile verdikleri kromatogram, Şekil 3 te gösterilmiştir. p-Nitrobenzendiazonyum fluoborat reaktifi ile Baygon, izopropoksifenol, kahverengi-pembe, 2-hidroksifenil-N-metilkarbamat,

sarı-turuncu renk vermektedir. Baygon'un Rf değeri 0.50, 2-hidroksifenil-N-metilkarbamatin Rf değeri 0.19, izopropoksifenol'ün Rf değeri 0.75 olarak saptanmıştır.

Adsorban: Silicagel G (0.25 mm)

Developman solvanı: Eter-Hekzan (80:20)

Reaktif: p-Nitrobenzendiazonyum fluoborat

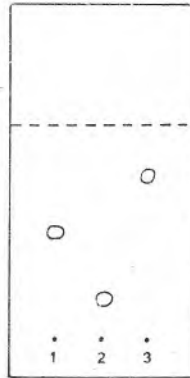


Şek. 3. Baygon, 2-hidroksifenil-N-metilkarbamat ve izopropoksifenol'ün kromatogramı
1. Baygon 5 µg 2. 2-Hidroksifenil-N-metilkarbamat 5 µg 3. İzopropoksifenol 5 µg

Adsorban: Silicagel G (0.25 mm)

Developman solvanı: Kloroform-Asetonitril (80:20)

Reaktif: p-Nitrobenzendiazonyum fluoborat

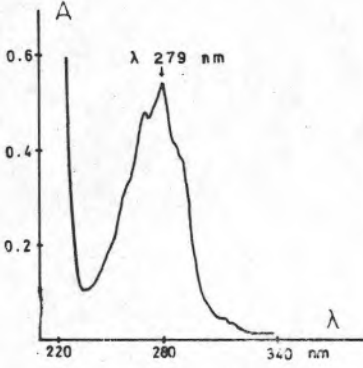


Şek. 4. Mesurol sülfoksit ve mesurol sülfon'ün kromatogramı
1. Mesurol 5 µg 2. Mesurol sülfoksit 5 µg 3. Mesurol sülfon 5 µg

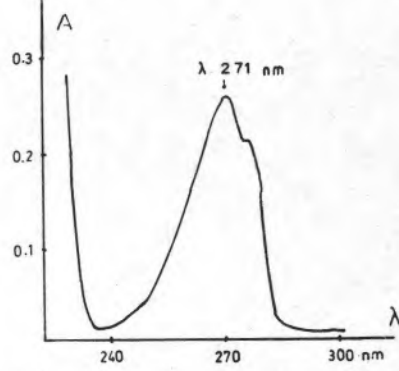
Mesurol ile major metabolitleri, mesurol sülfoksit ve mesurol sülfon'ün Silicagel G adsorban üzerinde kloroform-asetonitril (80:20) developman solvanı ile verdikleri kromatogram Şekil 4 te göste-

rilmiştir. p-Nitrobenzendiazonyum fluoborat reaktifi ile, Mesurol, mesurol sulfoksit ve mesurol sülfon kahverengi-pembe renk vermektirler. Rf değerleri Mesurol için 0.70, mesurol sülfoksit için 0.18, mesurol sulfon için 0.52 olarak saptanmıştır.

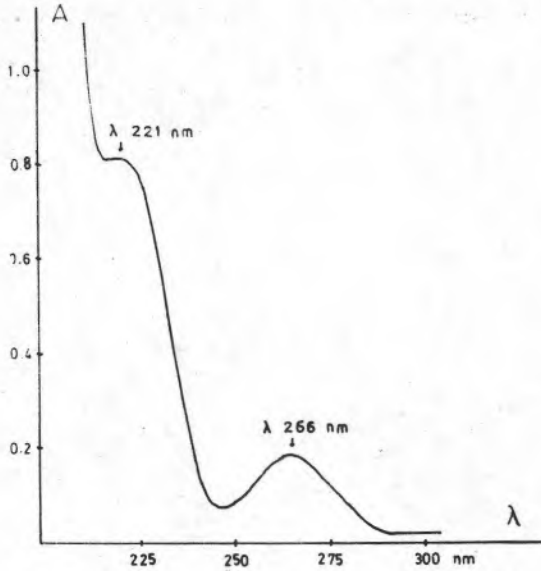
Sevin, Baygon ve Mesurol'ün metanoldeki UV spektrumları, Şekil 5, 6 ve 7 de gösterilmiştir.



Şek. 5. Sevin'in metanoldeki (15 µg/ml) UV spektrumu



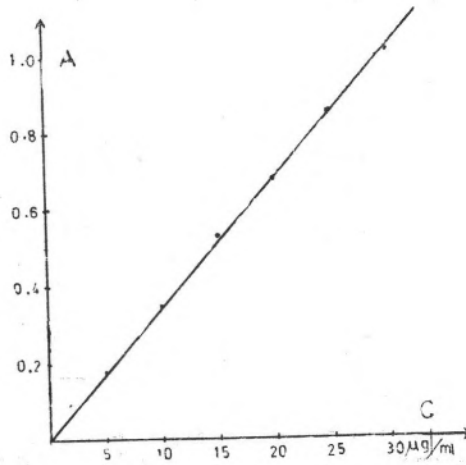
Şek. 6. Baygon'un metanoldeki (20 µg/ml) UV spektrumu



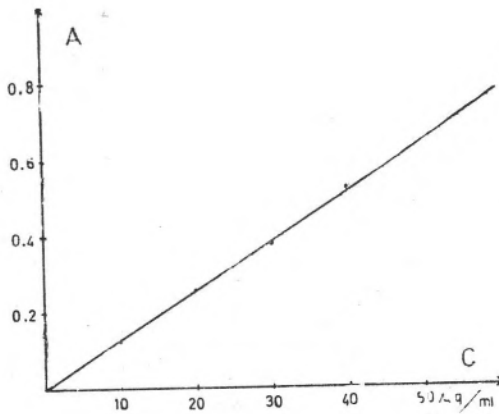
Şek. 7. Mesurol'ün metanoldeki (15 µg/ml) UV spektrumu

Sevin 279 nm, Baygon 271 nm, Mesurol 221 nm de maksimum absorpsiyon vermektedir.

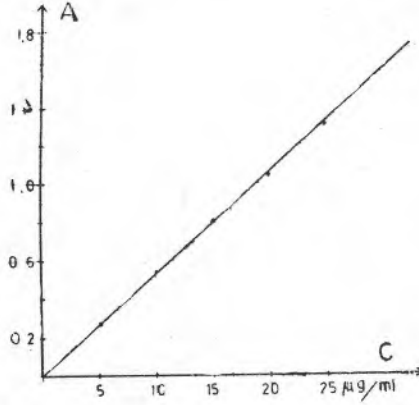
Sevin'in 279, Baygon'un 271, Mesurol'ün 221 nm de çizilen absorpsiyon-konsantrasyon eğrileri Şekil 8, 9 ve 10 da gösterilmiştir.



Şek. 8. Sevin'in absorpsiyon-konsantrasyon eğrisi ($\lambda=279$ nm)



Şek. 9. Baygon'un absorpsiyon-konsantrasyon eğrisi ($\lambda=271$ nm)

Şek. 10. Mesurol'ün absorpsiyon-konsantrasyon eğrisi ($\lambda=221$ nm)

Kullandığımız izolasyon yönteminde, Sevin, Baygon ve Mesurol'ün idrar, kan ve organdan ekstraksiyon yüzde verimleri, ortalama, standart hata ve standart sapmaları ile birlikte Tablo V de gösterilmiştir.

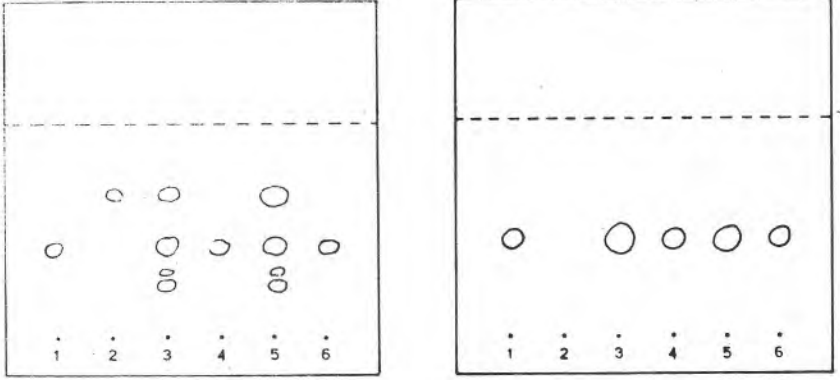
Tablo V. Sevin, Baygon ve Mesurol'ün biyolojik materyalden ekstraksiyon yüzde verimi

		Ortalama \pm St. hata	St. sapma
S E V İ N	İdrar	% 84.60 \pm 0.94	\pm 2.97
	Kan	% 69.50 \pm 1.18	\pm 3.74
	Organ	% 58.46 \pm 1.76	\pm 5.58
B A Y G O N	İdrar	% 85.65 \pm 1.60	\pm 5.06
	Kan	% 66.06 \pm 0.49	\pm 1.55
	Organ	% 53.44 \pm 0.85	\pm 2.67
M E S U R O L	İdrar	% 80.28 \pm 0.85	\pm 2.67
	Kan	% 62.76 \pm 1.40	\pm 4.42
	Organ	% 52.02 \pm 1.35	\pm 4.27

Sevin, Baygon ve Mesurol ile zehirlenmiş hayvanlardan alınan, idrar, kan, böbrek ve karaciğerden elde edilen ekstraktların kromatogramı Şekil 11, 12 ve 13 de gösterilmiştir.

Adsorban: Silicagel G (0.25 mm)

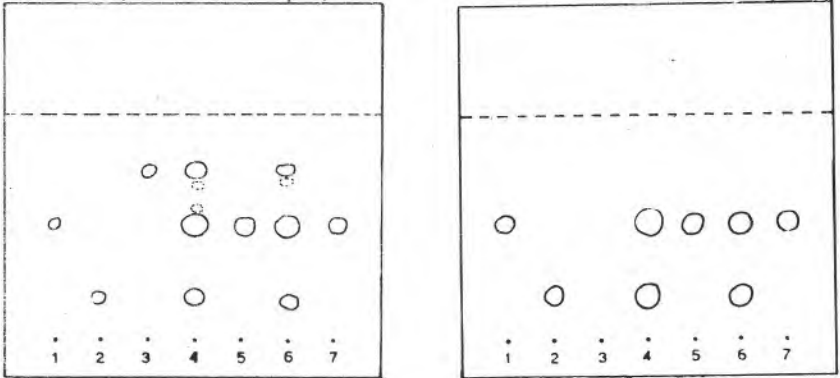
Developman solvanı: Eter-Hekzan (80:20)



Şek. 11. Sevin ile zehirlenmiş hayvanlardan elde edilen ekstraktların kromatogramı
a) p-Nitrobenzendiazonyum fluoborat, b) Enzim-inhibisyon yöntemi ile.
1. Sevin 5 μ g 2. α Naftol 5 μ g 3. İdrar ekstraktı 4. Kan ekstraktı 5. Böbrek ekstraktı 6. Karaciğer ekstraktı

Adsorban: Silicagel G (0.25 mm)

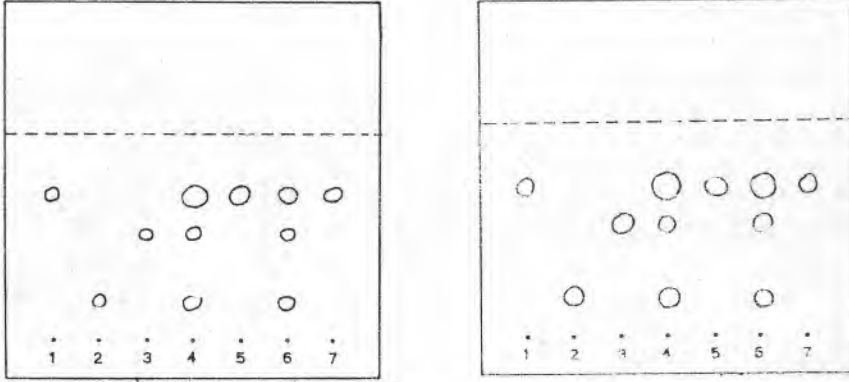
Developman solvan: Eter:Hekzan (80:20)



Şek. 12. Baygon ile zehirlenmiş hayvanlardan elde edilen ekstraktların kromatogramı
a) p-Nitrobenzendiazonyum fluoborat, b) Enzim-inhibisyon yöntemi ile.
1. Baygon 5 μ g 2. 2-Hidroksifenil-N-metilkarbamat 5 μ g 3. İzopropoksifenol 5 μ g
4. İdrar ekstraktı 5. Kan ekstraktı 6. Böbrek ekstraktı 7. Karaciğer ekstraktı

Adsorban: Silicagel G (0.25 mm)

Developman solvanı: Kloroform-Asetonitril (80:20)



Şek. 13. Mesurol ile zehirlenmiş hayvanlardan elde edilen ekstraktların kromatogramı
 a) p-Nitrobenzendiazonyum fluoborat, b) Enzim-inhibisyon yöntemi ile
 1. Mesurol 5 µg 2. Mesurol sülfoksit 5 µg 3. Mesurol sülfon 5 µg 4. İdrar ekstraktı 5. Kan ekstraktı 6. Böbrek ekstraktı 7. Karaciğer ekstraktı

TARTIŞMA

1- İnce tabaka kromatografisinde; Sevin, Baygon, Mesurol, Matacil, Carbamult, Lannate ve Pirimicarb için uyguladığımız yöntem bu insektisitlerin kalitatif analizleri için yeterlidir. Yöntemin Silicagel G ve Al_2O_3 G gibi iki adsorban üzerinde, on değişik developman solvanına dayandırılması, amaca uygun adsorban ve solvan sistemini seçme olanağını vermektedir. Lekelerin belirlenmesi için, dört ayrı reaktif ve kısa dalga boylu UV ışığının kullanılması analize kesinlik getirmektedir.

2- Enzim-inhibisyon tekniğinin karbamat insektisitleri için uygulanmasında, Oonnithan ve Casida'nın (13) yöntemini değiştirerek kullandık. İndikatör-plazma karışımı olarak, 0.025 N sodyum hidroksitte hazırlanmış % 2 krezol kırmızısı + plazma (1:1) yerine, 0.1 N sodyum hidroksitte hazırlanmış % 0.6 bromtimol mavisi + plazma (3:1) kullanarak daha iyi sonuç aldık.

Bu yöntemde bulduğumuz duyarlık, Baygon, Matacil, Carbamult, Lannate için 0.5 µg, Sevin ve Mesurol için 1 µg dir. Bu değerler;

a) Menn ve McBain'in (11) MN Selüloz 300 G adsorban üzerinde, substrat olarak asetilkolin, enzim kaynağı olarak insan plazması kullanarak buldukları, Sevin, Baygon, Matacil ve Mesurol için 0.2 µg değerinden daha büyük;

b) Van Hoof ve Heyndrickx'in (23), Al₂O₃ G adsorban üzerinde, enzim kaynağı olarak at plazması, substrat olarak β naftil asetat, kullandıklarında buldukları değerlerden daha küçük (Sevin, Carbamult, Mesurol, Matacil için 10 µg Baygon için 1 µg), substrat olarak indoksil asetat kullandıklarında buldukları değerlerden daha büyüktür (Sevin, Baygon, Carbamult, Mesurol ve Matacil için 10 ng).

c) Mendoza ve arkadaşlarının (10), Silicagel G adsorban üzerinde, substrat olarak asetilkolin, enzim kaynağı olarak insan plazması kullanarak buldukları Sevin için 0.5 ng değerinden daha büyüktür.

3- Karbamat insektisitleri organizmada kolaylıkla metabolize olan bileşiklerdir (3). Bu nedenle, karbamat insektisitlerinin rezidü ve toksikolojik analizlerinde, major metabolitlerinden de yararlanılmaktadır (16, 18, 20). Major metabolit olarak Sevin için, α naftol'ü Baygon için, 2-hidroksifenil-N-metilkarbamat'ı, Mesurol için, mesurol sülfoksit ve mesurol sulfon'u kullandık. Ayrıca metabolit olmamasına rağmen, Baygon'un hidrolizi ile kolayca şekillendiğinden, Baygon analizlerinde izopropoksifenol'ü de aradık.

4- Karbamat insektisitlerinin, biyolojik materyalden izolasyonlarına ait çalışmalar, literatürde sayıca çok azdır (1, 5, 7). Bu çalışmalar da, organik fosforlu insektisitler için geliştirilmiş ekstraksiyon yöntemlerine dayandıklarından yeterli değildirler. Farago (5) ile Ackermann ve arkadaşlarının (1) araştırması Sevin'i, Ganguly ve Bhattacharyanın (7) araştırması, Sevin ve Baygon'u konu almaktadır. Biz biyolojik materyalden ekstraksiyon için, Ackermann ve arkadaşlarının (1) yöntemini değiştirerek uyguladık. Kan ve organdan ekstraksiyon için metanol'ü tercih ettik. Bunun nedeni kaynama noktasının düşük oluşundan dolayı, uçurma işlemleri sırasında metanol'ün etanol'e gösterdiği üstünlüktür.

Metanol ile ekstraksiyon sonucu elde edilen ekstrakt, genellikle yağlı maddeler de taşımaktadır, ekstraktı yağlı maddelerden kurtarmak için uyguladığımız arıtma işlemi yeterli sonuç vermektedir.

İdrardan ekstraksiyon işleminde, ayırma hunisi yerine kapaklı santrifüj tüpü kullandık. Kuvvetli çalkalama yapılabilmesi, fazların ayrılmasına olanak sağlaması bakımından, santrifüj tüpünde çalkalama ve santrifüj ederek fazları ayırma yönteminin üstünlüğü ortadadır. İdrardan kloroform ile elde edilen ekstrakt oldukça temizdir ve arıtma işlemine ihtiyaç göstermemektedir.

İdrar, ekstraksiyon yönteminin basitliği, verimin yüksek oluşu ve teminindeki kolaylık bakımından, bu insektisitlerle meydana gelen zehirlenmelerde kullanılabilir, en iyi toksikolojik analiz materyalidir.

Kandan ve organdan ekstraksiyonda verim düşüklüğünün nedeni, arıtma işleminin kaybı arttırmasıdır.

Karbamat insektisitlerinin biyolojik materyalden izolasyonuna ait, daha önce yapılan çalışmalarda verim hesabı yapılmadığı için, sonuçları karşılaştırma olanağı yoktur. Sonuçlar, toksikolojik analizde, çeşitli ilaç grupları için kullanılan izolasyon metotlarının (12) verimleri ile karşılaştırıldığında, uyguladığımız ekstraksiyon yönteminin yeterli verime sahip olduğu görülmektedir. Ayrıca, kullandığımız tanıma yöntemlerinin 0.5 µg a kadar duyar olması verimin yeterliliğinin diğer bir kanıtıdır.

5- Deneysel olarak, Sevin, Baygon ve Mesuroil ile zehirlenmiş deney hayvanlarından alınan materyalin toksikolojik analizinde, idrar ve böbrek ekstraktlarında ana molekül ile birlikte metabolitler, kan ve karaciğerde ise, yalnız ana molekül bulunmaktadır. Bu durum insektisitlerin verilmiş periyodu ile ilgilidir. Kanımızca, idrar ve böbrekte bulunan ana molekül ve metabolitler ilk iki gün verilen dozun, metabolize olmuş ve olmamış kısımlarıdır. Kanda ve karaciğerde bulunan ana molekül ise son gün verilen ve yüksek doz nedeni ile hayvanın ani ölümü neticesi metabolize olmamış insektisittir. Bu görüş, karbamat insektisitlerinin metabolizmalarının hızlı olduğunu bildiren literatür bilgisi (3) ile de desteklenmektedir.

Zehirlenme şekline göre, ekstraktlardaki, ana molekül, metabolit ilişkisinin değişmesi doğaldır. Ne var ki, kullandığımız yöntem,

ekstraktlarda, yalnız ana molekül, yalnız metabolitler veya ana moleküle birlikte metabolitler bulunması olasılıklarında dahi, bize zehirlenmeyi teşhis olanağını vermektedir.

Çeşitli araştırmacılar, α naftol ve 2-hidroksifenil-N-metilkarbamat'ın sülfat ve glukuronit konjugatları şeklinde atıldığını ve bu maddelerin kimyasal tanınmasının yapılabilmesi için, asit hidrolizle konjugasyonun parçalanması gerektiğini bildirmişlerdir (16, 18). Çalışmalarımızda, asit hidroliz tatbik etmeden, konjuge olmamış α naftol ve 2-hidroksifenil-N-metilkarbamat'ın saptanabilmesi, bu maddelerin tamamının konjuge olmamasına veya ekstraksiyon şartlarında konjugasyonun parçalanmasına bağlanabilir. Kanımızca, kalitatif analizlerde hidroliz işlemine gerek yoktur.

Ekstraktların, enzim-inhibisyon tekniği ile incelenmesinde α naftol ve izopropoksifenol'ün tespit edilememesi, bu maddelerin, kolinesteraz inhibitörü olmadıklarını bildiren, literatür bilgisi ile uyusmaktadır (3, 18).

Toksikolojik analizde amaç, zehirlenme nedeninin kısa zamanda ve kesin şekilde saptanmasıdır. Bu işlem çoğu zaman birçok grubun aranmasını gerektirir. Enzim-inhibisyon tekniğinin toksikolojik analizde kullanılması, geniş bir grubu tanıma olanağını vermektedir. Bilinmeyen maddenin kolinesteraz inhibitörü olduğu saptandıktan sonra, spesifik grup reaktifleri kullanarak, zehirlenme nedeninin kesin olarak ortaya çıkartılması mümkündür. Bu nedenle ince tabaka kromatografisinde kimyasal tanıma dayanan metotlarla, enzim-inhibisyon tekniğinin bir arada yürütülmesi büyük üstünlük getirmektedir.

Enzim-inhibisyon yöntemi, yalnız karbamat insektisitleri için değil, uygun ekstraksiyon metodunun uygulanması kaydıyla diğer kolinesteraz inhibitörü maddelerin de (organik fosforlu insektisitler, farmasötik karbamatlar gibi), toksikolojik analizinde kullanılabilir.

ÖZET

Bu çalışmada;

1- Sevin, Baygon, Mesurol, Carbamult, Lannate ve Pirimicarb'ın ince tabaka kromatografisinde kimyasal tanıma ve enzim-inhibisyon tekniğine dayanan yöntemlerle analizi yapıldı.

a) Kimyasal tanımayaya dayanan analizde, Silicagel G ve Al_2O_3 adsorban üzerinde, on değişik solvan sistemi kullanıldı. Lekelerin belirlenmesinde, ninhidrin, rodamin-B, 2,6-dibromkinonklorimid, p-nitrobenzendiazonyum fluoborat ve kısa dalga boylu UV ışığından yararlandı. Bu reaktiflerin, Al_2O_3 G ve Silicagel G adsorban üzerinde, kullandığımız isektisitler için, duyarlık sınırları saptandı. Sonuçlar Tablo II, III ve IV de gösterilmiştir.

b) Enzim-inhibisyon yönteminin, Silicagel G adsorban üzerinde, insan plazması ve asetilkolin kullanarak uygulanmasında, indikatör-plazma karışımı olarak, 0.1 N sodyum hidroksitte hazırlanmış % 0.6 bromtimol mavisi + plazma (3:1) dan yararlandı. Kullandığımız isektisitler için, enzim-inhibisyon yönteminin duyarlık sınırı, 0.5 μg ve 1 μg olarak saptandı.

2- Sevin ile α naftol'ü, Baygon ile 2-hidroksifenil-N-metilkarbamat ve izopropoksifenol'ü, Mesurol ile mesurol sülfoksit ve mesurol sülfon'u ince tabaka kromatografisinde bir arada tanımda kullanılacak analiz yöntemi geliştirildi.

Bu amaçla, Silicagel G adsorban üzerinde, Sevin ve Baygon için eter-hekzan (80:20), Mesurol için, kloroform-asetonitril (80:20) developman solvanları kullanıldı. Leke yerlerinin tespiti için p-nitrobenzendiazonyum fluoborat reaktifi ve enzim-inhibisyon yönteminden yararlandı. Deney sonuçları Şekil 2, 3 ve 4 te gösterilmiştir.

İdrar, kan ve organdan ekstraksiyon için seçilen yöntemin verimi, UV spektrofotometrik yolla saptandı. Deney sonuçları, Tablo V de gösterilmiştir.

3- Uyguladığımız yöntemin geçerliliğinin kanıtlanması için, deneysel olarak Sevin, Baygon ve Mesurol ile zehirlenmiş deney hayvanlarından yararlandı.

Deneysel olarak zehirlenmiş hayvanlardan alınan materyalin toksikolojik analizinde idrar ve böbrekte ana molekül ve metabolitler ve karaciğerde ise yalnız ana molekül saptandı. Deney sonuçları Şekil 11, 12, 13 de gösterilmiştir.

SUMMARY

1. In this research, Sevin, Baygon, Mesurol, Matacil, Carbamult, Lannate and Pirimicarb were analyzed with methods depending on the chemical identification and enzyme-inhibition technique on the TLC plate.

a) Ten different solvent systems, Silica gel G and Al_2O_3 G were used as adsorbents during the analysis depending on chemical identification. The spots were visualized by ninhydrin, rhodamine B, 2,6-dibromoquinone chlorimide, p-nitrobenzenediazonium fluoborate and short wave UV light. The sensitivity limits of these spray reagents on Silica gel G and Al_2O_3 G for the insecticides, we used, were determined. The results are shown on tables II, III and IV.

b) Bromothymol blue (prepared in 0.1 N NaOH) + plasma (3:1) was used as indicator-plasma mixture, for the application of enzyme-inhibition method on Silica gel G, human plasma and acetylcholine were used for this application. The sensitivity limit of the enzyme-inhibition method for the insecticides we worked on, was determined to be 0.5 μ g and 1 μ g.

2. A method, differentiating Sevin from α naphthol, Baygon from 2-hydroxyphenyl-N-methylcarbamate and isopropoxyphenol, Mesurol from mesurol sulfoxide and mesurol sulfone on TLC, was developed.

For this purpose, ether-hexane (80:20) for Sevin and Baygon, chloroform-acetonitrile (80:20) for mesurol were used on Silica gel G adsorbent layers. The spots were determined by the spray reagent p-nitrobenzenediazonium fluoborate, and enzyme-inhibition method. The results are shown in figures 2, 3 and 4.

The recovery of the method selected for extraction from urine, blood and tissues was determined by UV spectrophotometry. The results are shown on table V.

3. Sevin, Baygon and Mesurol were given orally to laboratory animals to observe the applicability of the method we used. The kidneys and urine of the exposed animals were analysed for the parent carbamate and the metabolites, in blood and liver only the parent carbamate was determined. The results are shown in figures 11, 12 and 13.

LİTERATÜR

1. **Ackermann, H., Lexow, B., and Plewka, E.**, *Arch.Toxicol.* **24**, 316 (1969).
2. **Böcker, E., Draber, W.** -Chemie der Pflanzenschutz-und Schadlings-bekämpfungsmittel. Band 1, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1970).
3. **Dorough, H.W.**, *J.Agr.Food Chem.* **18**, 1015 (1970).
4. **Dorough, H.W., Casida, J.E.**, *ibid.* **12**, 294 (1964).
5. **Farago, A.**, *Arch.Toxicol.* **24**, 309 (1969).
6. **Freeman, J.H.**, *Anal.Chem.* **24**, 955 (1952).
7. **Ganguly, S.K., Bhattacharyya, J.**, *Forensic Science* **2**, 333 (1973).
8. **Henkel, H.G.**, *J.Chromatog.* **21**, 346 (1966).
9. **Kutsal, A., Muluk, Z.** -Uygulamalı Temel İstatistik. Hacettepe Üniversitesi Basım-evi, Ankara (1972).
10. **Mendoza, C.E., Grant, D.L., Braceland, B. and McCully, K.A.**, *Analyst* **94**, 605 (1969).'
11. **Menn, J.J., McBain, J.B.**, *Nature* **209**, 1351 (1966).
12. **Niyogi, S.K.**, *Journal of Forensic Medicine* **17**, 20 (1970).
13. **Oonnithan, E.S., Casida, J.E.**, *Bull. Environ.Contam.Toxicol.* **1**, 59 (1966).
14. **Ramasamy, M.**, *Analyst* **94**, 1075 (1969).
15. **Reich, G.A., Welke, J.O.**, *New Eng.J.Med.* **274**, 1432 (1966).
16. **Shafik, M.T., Sullivan, H.C. and Enos, H.F.**, *Bull.Environ.Contam.Toxicol.* **6**, 34 (1971).
17. **Stahl, E.** -Thin Layer Chromatography. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1969).
18. **Stanley, C.W., Thornton, J.S.**, *J.Agr.Food Chem.* **20**, 1269 (1972).
19. Tarım Bakanlığı Zirâi Mücadele ve Zirâi Karantina Genel Müdürlüğü. Ruhsath Zirâi Mücadele İlaçları. Ongun Kardeşler Matbaası, Ankara (1971).
20. **Thornton, J.S., Drager, G.**, *Intern.J.Environ.Anal.Chem.* **2**, 229 (1973).
21. **Vandekar, M.**, *Bull.Wld Hlth Org.* **33**, 107 (1965).
22. **Vandekar, M., Plestina, R., Wilhelm, K.**, *Bull, Wld Hlth Org.* **44**, 241 (1971).
23. **Van Hoof, F., Heyndrickx, A.**, *Medelingen Fokulteit Landbouwwetenschappen Gent* **36**, 1137 (1971).'