MARIA BRZEZICKA-BĄK, ANNA BOJANOWSKA

TOKSYCZNOŚĆ PODOSTRA INSEKTYCYDÓW FOSFOROORGANICZNYCH: NALEDU, ETOATU METYLOWEGO I SUPRACIDU

Z Zakładu Toksykologii Sanitarnej Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie
Kierownik: prof. dr *A. Bojanowska*

Zbadano toksyczność podostrą 3 insektycydów fosforoorganicznych: naledu, etoatu metylowego i supracidu podając szczurom samicom szczepu Wistar w ciągu 9 tygodni po około 1/10 LD_{50}. Obserwowano śmiertelność, zmiany względnego ciężaru narządów oraz zmiany aktywności esterazy cholinowej pełnej krwi i tkanki mózgowej.

WSTĘP

Krajowy przemysł chemiczny środków ochrony roślin zamierza stopniowo zaprzestawać masowego wytwarzania insektycydów polichlorowych. Wynika stąd zainteresowanie organicznymi związkami fosforowymi jako nie mniej skutecznymi, a jednocześnie nie zalegającymi w środowisku.

Wprowadzenie do praktyki agrarnej tego typu środków zapewni rolnictwu rozwiązanie szeregu problemów ochrony roślin uprawnych.

Dotychczasowa produkcja preparatów fosforoorganicznych jest niewystarczająca zarówno pod względem asortymentu jak i tonażu. W chwili obecnej dysponuje się kilkoma środkami rodzimej produkcji, a mianowicie: malationem (Fostion) i trichlorfonem (Foschlor), a ostatnio fenchlorfosem (Dermafos) i dichlorfosem (Winylofos); w 1969 r. wejdą do produkcji 2 dalsze preparaty dimetoat (Amidofos) i fenitrotion (Owadofos).

Przemysł chemiczny nie jest w stanie zastąpić odrazu w szerokim zakresie tanich insektycydów polichlorowych fosforoorganicznymi. Szczególnie w gospodarce rolniczej odczuwa się brak środków ostatniego typu do zwalczania stonki ziemniaczanej oraz środków o intensywnym działaniu układowym.

Wynika stąd pilna konieczność poszukiwania skutecznych, nie kosztownych, potencjalnie bezpiecznych substancji czynnych spełniających stawiane wyżej wymagania.

Spośród szeregu związków wybrane zostały do rozszerzonych badań skuteczności, wstępnych opracowań technologicznych m.in. następujące środki: naled (Dibrom), chlorfenwinfos (Birlane, Sapecron) oraz etoat metylowy i supracid.

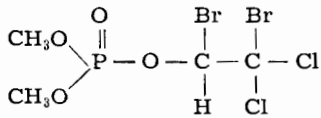
W świetle ochrony zdrowia ludności jest szczególnie ważną sprawą spieszne zastąpienie skażających trwale środowisko zewnętrzne insektycydów polichlorowych preparatami możliwie bezpiecznymi w użytkowaniu, charakteryzującymi się krótkim okresem karencji, a tym samym

mniej szkodliwymi dla spożywców plonów pochodzących z upraw chronionych.

Nasunęła się zatem pilna potrzeba przeprowadzenia badań toksykologicznych wymienionych substancji, w celu wytypowania środka najbardziej korzystnego pod względem higienicznym.

Charakterystyka wytypowanych do badań substancji

1. Naled — fosforan 0-/1,2-dwubromo-2,2-dwuchloroetylo-0,0-dwumetylowy o wzorze chemicznym:



Związek ten wykazuje wybitne właściwości owadobójcze i przędziorkobójcze odznaczając się jednocześnie szczególnie krótkotrwałym działaniem rezydualnym. Stosowany jest do dezynsekcji szklarni i przechowalni owoców oraz do zwalczania zewnętrznych pasożytów zwierząt hodowlanych, m.in. drobiu nie dając pozostałości w jajach.

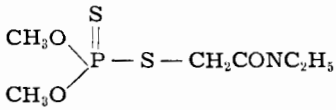
W Stanach Zjednoczonych A. Płn. zalecany jest również do zabiegów przeciw stonce ziemniaczanej, zwolniony jest przy tym od wymagań karencji i tolerancji.

Czysty naled jest stałą, o barwie białej, krystaliczną substancją, która w temperaturze wyższej od pokojowej topi się przechodząc w bezbarwną, ciężką oleistą ciecz. Nie rozpuszcza się w wodzie i alifatycznych węglowodorach, natomiast jest łatwo rozpuszczalny w rozpuszczalnikach aromatycznych. Charakterystyczna jest, szczególnie wysoka prężność pary, wynosząca 0,002 mm Hg przy 20°, jest wykorzystywana do zwalczania szkodników w pomieszczeniach zamkniętych.

W obecności środków redukujących cząsteczka naledu łatwo traci atomy bromu ulegając rozkładowi na fosforan dwuchlorowinylodwumetylowy (dichlorfos), natomiast hydroliza prowadzi do utworzenia dwuchlorobromoacetaldehydu i kwasu dwumetylofosforowego; rozkład ostatniego typu zachodzi również w podwyższonej temperaturze lub przy dużych wartościach pH.

Według danych piśmiennictwa w porównaniu z dichlorfosem ostra toksyczność doustna naledu dla szczurów samców (LD_{50} — 250 mg/kg) jest przeszło trzykrotnie niższa, a dermalna (LD_{50} — 800 mg/kg) prawie ośmiokrotnie niższa [5].

2. Etoat metylowy — jest to dwutiofosforan S-/N-etylokarbamylometylo)-0,0-dwumetylowy, o wzorze:

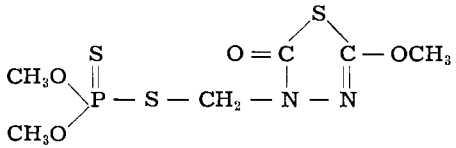


Ze względu na zbliżoną do dimetoatu budową chemiczną związek ten jest również nazywany N-etylo-dimetoatem. Wykazuje on działanie układowe w stosunku do śnietki kapuścianej i mszycy burakowej.

Pozostałości jego na i w roślinach zanikają stosunkowo dość szybko (wg danych dostarczonych przez producenta w ciągu 5 dni). Jego ostra toksyczność doustna dla szczura (LD_{50} — 125 mg/kg) jest wyższa od tok-

syczności dimetoatu (LD_{50} — 265 mg/kg), a ostra toksyczność dermalna dla królika około 3-krotnie niższa [5].

3. Supracid. Preparat ten, znany również pod nazwą Ultracid, służy do zwalczania owadów i przędziorków. Jego czynny składnik stanowi dwutiofosforan S-/2-metoksy-1,3,4-tiadiazolo-5-on-n-metylo/-0,0-dwumetylowy o wzorze strukturalnym:



Środek ten przenikając łatwo do tkanki liściowej wywiera działanie wgłębne i jest skuteczny przeciwko gąsienicom motyli, muchówkom, błonkówkom, pluskwiakom oraz przędziorkom. Niszczy również chrząszcze i larwy stonki ziemniaczanej, także i uodpornione na insektycydy polichlorowe.

Ostra toksyczność doustna substancji podstawowej preparatu supracid dla szczura wynosi od 28 do 48 mg/kg (dane od firmy produkującej).

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Materiały: 1. Naled (Dibrom) — produkt zsyntetyzowany w skali laboratoryjnej w Instytucie Przemysłu Organicznego.

2. Fitios — emulsyjny preparat włoski f-y Bombini-Parodi zawierający 20% etoatu metylowego.

3. Supracid — 40%-owy emulsyjny preparat szwajcarski f-y Geigy.

METODYKA

Na wstępie ustalono znormalizowaną metodą [1, 4] ostrą toksyczność doustną naledu dla samic szczurów szczepu Wistar stosując 4 następujące poziomy dawek: 250, 315, 397 i 500 mg/kg.

Zwierzęta testowe, 24 sztuki, były w tym samym wieku i o tych samych ciężarach ciała co i użyte we właściwym doświadczeniu. Otrzymana wartość LD_{50} wyniosła 280,9 (279,7—282,1) mg/kg.

Szczury doświadczalne, samice tego samego szczepu ważące od 160 do 190 g, podzielono na 4 grupy po 10 sztuk w taki sposób, że średni ciężar zwierząt w każdej grupie wynosił 184 g.

W ciągu 9 miesięcy podawano szczurom sondą do żołądka 5 razy w tygodniu po 0,3 ml/100 g ciężaru ciała roztwory olejowe badanych substancji w dawkach dziennych wynoszących w przybliżeniu 0,1 LD_{50} : naledu — 30 mg/kg, etoatu metylowego 15 mg/kg i supracidu 12,5 mg/kg (dawka ostatniego odpowiada w przeliczeniu na aktywną substancję podstawową 5 mg/kg).

Czwartej grupie, kontrolnej, podawano analogicznie obliczoną w stosunku do ciężaru ciała ilość samego rozpuszczalnika. W toku doświadczenia dokonywano obserwacji zachowania się zwierząt, wyglądu i występowania objawów zatrucia.

Po zakończeniu doświadczenia zwierzęta zdekapitowano. Tkankę mózgową i krew poddawano badaniu w celu określenia aktywności esterazy cholinowej (ChE). Oddzielone narządy wewnętrzne (wątrobę, nerki, śledzionę) ważono.

Do pomiarów aktywności ChE stosowano kolorymetryczną metodę *Fleishera* i *Pope'a* [3]. Jako substratu używano bromek acetylocholiny inkubując z nim pełną krew w temperaturze 25° w ciągu 40 minut.

Homogenaty z mózgu sporządzano w oziębionej lodem wodzie destylowanej, 1 ml homogenatu odpowiadającego 13,3 mg badanej tkanki, inkubowano z substratem (1 ml 0,004 M roztworu bromku acetylocholiny w buforze fosforanowym o p_H 7,2) w temperaturze 37° w ciągu 15 minut ustawiając równolegle próby kontrolne.

Zarówno próbki krwi jak i mózgu przed inkubacją ogrzewane były w ciągu 5 minut w celu wyrównania temperatury.

Dalsze postępowanie oraz ilości stosowanych odczynników do wywołania reakcji barwnej było analogiczne jak w oryginalnej metodzie *Fleishera* i *Pope'a*.

Ekstynkcję mierzono na spektrofotometrze uniwersalnym Zeissa VSU przy długości fali 540 mμ.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Objawy zatrucia, typowe dla insektycydów pochodnych kwasu fosforowego, wystąpiły już w pierwszym tygodniu doświadczenia: drżenie, zjeżenie sierści, obniżenie ciepłoty ciała, mimowolne oddawanie moczu, wydzielina (często podbarwiona krwią) z oczu i jamy nosowo-gardłowej, drgawki. Objawy te o większym lub mniejszym nasileniu, obserwowano do końca doświadczenia.

Przy każdym z badanych preparatów część zwierząt padła (tab. I); pojedyncze osobniki przy naledzie zareagowały już po otrzymaniu 1/5—1/3 LD_{50}; najwyższą śmiertelność notowano przy supracidzie, jednakże dopiero po przyjęciu dawki sumarycznie równej lub przewyższającej, nawet kilkakrotnie, LD_{50}.

Tabela I

Śmiertelność szczurów samic pod wpływem podawania naledu, etoatu metylowego i supracidu

Substancja	Liczba badanych zwierząt	Liczba padłych zwierząt	Liczba przyjętych dawek	Dawka sumaryczna mg/kg
Naled		1	2	60
	10	1	3	90
		1	4	120
		1	40	1200
Etoat metylowy	10	1	7	105
		1	8	120
Supracid		2	6	30
		1	9	45
	10	1	25	125
		1	35	175
		1	45	225
Kontrola	10	—	—	—

Średnie, liczone w stosunku do ciężaru ciała, ciężary narządów przytoczone są w tab. II. Dane liczbowe wskazują na znamienne (test Studenta) różnice w porównaniu z kontrolą: średniego ciężaru wątroby przy supracidzie i etoacie metylowym oraz średnich ciężarów śledziony i nerek przy supracidzie.

Tabela II

Średnie względne*) ciężary narządów wewnętrznych szczurów po 9 tygodniowym podawaniu naledu, etoatu metylowego i supracidu

Substancja	Wątroba		Śledziona		Nerki	
	%	WZ**)	%	WZ**)	%	WZ**
Naled	3,56±0,27	8,6	0,37±0,03	8,9	0,91±0,06	7,4
Etoat metylowy	3,99±0,16	5,6	0,33±0,05	15,2	0,87±0,03	5,4
Supracid	3,96±0,12	3,1	0,40±0,20	5,5	1,01±0,02	2,4
Kontrola	3,40±0,11	4,4	0,34±0,16	10,6	0,91±0,39	5,2

*) W odniesieniu do ciężaru ciała

**) Współczynnik zmienności wyrażony w procentach średniej z ciężarów narządu

Bramner i *Root* [2] donieśli, że aktywność esterazy cholinowej w surowicy krwi u różnych szczepów szczurów laboratoryjnych może wykazywać dość znaczne różnice. Aktywność ta wzrasta u samic wraz z wzrostem ciężaru ciała i osiąga wartość maksymalną przy 200—250 g.

Konieczne było zatem zbadanie normalnego poziomu aktywności tego enzymu w pełnej krwi u samic szczepu testowego.

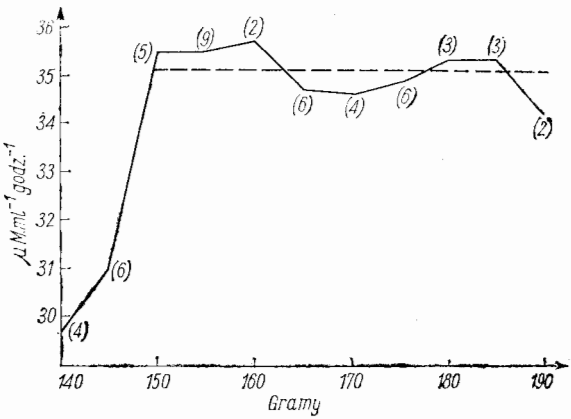
Zwierzęta zgrupowano w sposób następujący stosownie do ciężaru ciała z dokładnością do ± 2 g:

140 g — 4 szt., 145 g — 6 szt., 150 g — 5 szt., 155 g — 9 szt.,
160 g — 2 szt., 165 g — 6 szt., 170 g — 4 szt., 175 g — 6 szt.,
180 g — 3 szt., 185 g — 3 szt., 190 g — 2 szt.

Krew do badań pobierano przyżyciowo nacinając końce ogonów.

Wyniki oznaczeń przedstawia ryc. 1.

U zwierząt młodszych o ciężarze 140 i 145 g, aktywność ChE liczona w odniesieniu do zhydrolizowanej acetylocholiny wynosiła 29,7 i 31,0 μM. ml^{-1}. $godz.^{-1}$, a przy ciężarze od 150 do 190 g wahała się w nieznacznych granicach od 34,2 do 35,7, średnio sięgając 35,1 μM. ml^{-1}. $godz.^{-1}$.



Ryc. 1. Aktywność esterazy cholinowej pełnej krwi u szczurów samic szczepu Wistar, o ciężarze ciała w zakresie 146—190 g (w nawiasach liczby badanych osobników).

Po upływie 3 tygodni, gdy przyrost ciężaru ciała osiągnął przeciętnie 18 g (przy wartościach krańcowych 10 i 25 g), u połowy uprzednio badanych szczurów oznaczono powtórnie aktywność ChE pełnej krwi otrzymując średni wynik 35,7 μM. ml^{-1}. $godz^{-1}$.

Utwierdza to obserwację, że u szczurów samic szczepu Wistar po osiągnięciu ciężaru ciała w granicach 150—200 g aktywność ChE pełnej krwi utrzymuje się w przybliżeniu na stałym poziomie.

Hamowanie aktywności ChE u zwierząt otrzymujących badane insektycydy podane jest w mikromolach zhydrolizowanej acetylocholiny na 1 ml krwi lub 1 g tkanki mózgowej w ciągu 1 godz. oraz w procentach w odniesieniu do wartości oznaczonych w grupie kontrolnej w tab. III.

Inhibicja enzymu we krwi była najmniejsza przy naledzie, w mózgu zaś przy supracidzie; ostatni objaw jest związany z właściwościami wynikającymi z budowy chemicznej: pochodne kwasu dwutiofosforowego nie są bezpośrednimi inhibitorami ChE.

Tabela III

Hamowanie esterazy cholinowej w pełnej krwi i tkance mózgowej szczurów pod wpływem podawania naledu, etoatu metylowego i supracidu

Substancja	Pełna krew		Tkanka mózgowa	
	aktywność esterazy μM. $ml.^{-1}$ $godz.^{-1}$	zahamowanie* %	aktywność esterazy μM. $g.^{-1}$ $godz.^{-1}$	zahamowanie* %
Naled	32,93 ± 9,55	24,1	148,08 ± 75,89	74,4
Etoat metylowy	31,83 ± 10,20	26,7	69,70 ± 9,74	88,0
Supracid	28,05 ± 10,02	35,5	229,50 ± 58,75	61,0
Kontrola	43,39 ± 4,80		576,30 ± 115,75	

*) W odniesieniu do kontroli

Otrzymana wyższa aktywność ChE pełnej krwi u grupy kontrolnej 43,4 μM. ml^{-1} $godz.^{-1}$, w porównaniu do wyniku badań ustalających normalny poziom aktywności tego enzymu 35,1 μM. ml^{-1} $godz.^{-1}$, przypuszczalnie należy tłumaczyć odmienną techniką pobierania krwi.

WNIOSKI

1. Ostra toksyczność doustna naledu syntezy krajowej dla samic szczurów, szczepu Wistar wynosi 280,9 (279,7—282,1) mg/kg ciężaru ciała.

2. Aktywność esterazy cholinowej pełnej krwi u samic szczurów szczepu Wistar, utrzymuje się na stałym poziomie po uzyskaniu przez nie ciężaru ciała co najmniej 150 g, u zwierząt młodszych aktywność tego enzymu jest niższa.

3. Trzy zbadane w doświadczeniu podostrym insektycydy fosforoorganiczne można uszeregować pod względem właściwości toksycznych dla szczurów następująco: naled < etoat metylowy < supracid.

М. Бжезицка-Бонк, А. Бояновска

ПОДОСТРАЯ ТОКСИЧНОСТЬ ФОСФОРООРГАНИЧЕСКИХ ИНСЕКТИСИДОВ НАЛЕДА, МЕТИЛОВОГО ЭТОАТА И СУПРАЦИДА

Содержание

Совершили токсикологическую оценку 3 фосфороорганических препаратов наледа (Dibrom), метилового этоата (Fitios) и супрацида.

Определено острую пероральную токсичность для крыс самок породы Вистар наледа местной синтезы: LD_{50} = 280,,9/279,7 — 282,1/мг/кг. Определено активность холиновой эстеразы (ChмE) у самок (той же самой породы), которым подавали в продолжении 9 недель желудочным зондом дневную дозу составляющую около 1/10 LD_{50}.

Полученные под влиянием исследуемых субстанции проценты торможения активности энзима полной крови составляют от 24,1% при наледе до 35,5% при супрациде, инхибиция ChE в гомогенате мозговой ткани доходила от 61,0% при супрациде до 74,4% при наледе. Определения в крови при подавании крысам метилового этоата — дали средние ценности. Исследуемые инсектициды можно систематизировать по отношению к их токсичности для крыс следующим образом: налед, метиловый этоат, супрацид.

M. Brzezicka-Bąk, A. Bojanowska

SUBACUTE TOXICITY OF ORGANOPHOSPHORUS INSECTICIDES NALED, ETHOATE-METHYL AND SUPRACID

Summary

Toxicity of three organophosphorus insecticides: naled (Dibrom), ethoate-methyl (Fitios) and Supracid was studied. Acute per os toxicity in female Wistar rats of naled synthetized in Poland was also estimated, and LD_{50} = 280.9 (279.9—282.1) mg/kg of body weight was found.

When subacute toxicity assaying, female Wistar rats were given by stomach sound the doses of 1/10 LD_{50} daily for the period of nine weeks, and whole blood and brain cholinesterase activities assayed. Blood cholinesterase activity was found to be reduced from 24.1% by naled, and to 35.5% by Supracid, and brain cholinesterase was inhnbnted in 61.0% by Supracid and in 74.4% by naled. Administration of ethoate-methyl proved to provide intermediate results in blood. Toxicities in rats of the insecticides tested may be range as follows: naled < ethoate-methyl < Supracid.

PIŚMIENNICTWO

1. *Bojanowska A., Bielicka A.*: Zeszyty Probl. Postępów Nauk Roln., 1964, Zeszyt Nr 51, 149. — 2. *Bramner R. W., Root M. A.*: J. Pharmacol., 1946, 88, 109. — 3. *Fleisher J., Pope E.*: Arch. Ind. Hyg. A.M.A., 1954, 9, 323. — 4. Metody badania pestycydów. Opracowanie zbiorowe. Wyd. Metodyczne PZH, 1966, Nr 2 (17), Zeszyt Nr 1. — 5. U.S. Department of Agriculture: Suggested Guide for the Use of Insecticides to Control Insects Affecting Crops, Livestock, Households, Stored Products... 1967. Agricultural Handbook Nr 331.

Dn. 28-XII-1968 r.

Warszawa, ul. Chocimska 24.