

PRÓBY ROZPOZNAWANIA ZATRUĆ
ZWIĄZKAMI FOSFOROORGANICZNYMI
PRZY POMOCY REAKCJI CHEMICZNYCH

BOGDAN MIZAK, JANINA PALEOLOG

Instytut Weterynarii w Puławach

W związku z częstym wykrywaniem zatruc fosforem cynku u zwierząt domowych i równocześnie z pojawieniem się w sprzedaży preparatów insektobójczych, pochodnych organicznych kwasów tio- i fosforowego, nasunęło się podejrzenie czy również związki fosforoorganiczne nie wykazują reakcji specyficznych na fosforek cynku. W tym celu przeprowadzono porównawcze badania reakcji Gutzeita i reakcji z eikonogenem stosując je do wykrywania fosforu cynku oraz związków fosforoorganicznych. Reakcja Gutzeita jest powszechnie znana, podobnie jak też typowa dla fosforów reakcja z eikonogenem. Przypomnę tylko, że ta ostatnia polega na utlenieniu fosforu do fosforanu za pomocą nadmanganianu potasu, a następnie fosforan wykrywa się reakcją barwną z eikonogenem.

Do badań użyto następujących preparatów fosforoorganicznych: Ekatin, Metasystox, Wofatox i Foschlor. Na reakcję Gutzeita otrzymano wyniki dodatnie, tak z samymi roztworami stężonymi związków fosforoorganicznych jak i z preparatami rozartymi z wątrobą (z wyjątkiem Wofatoxu). Natomiast z eikonogenem wszystkie wyniki wypadły ujemnie. Powyższe reakcje przeprowadzono również z narządami królików, które zatruto w dwojaki sposób: w pierwszej grupie królików podawano karmę spryskaną stężonymi roztworami w. w. preparatów, w drugiej grupie królików podawano zielonkę z lucerny spryskiwanej uprzednio na pniu preparatami wymienionymi, rozcieńczonymi według przepisu na etykietach. Reakcje Gutzeita i z eikonogenem zarówno na narządach z pierwszej, jak i drugiej grupy królików wypadły ujemnie. Ujemne wyniki uzyskano również z narządów królików kontrolnych i zatrutych *per os* fosforanem I-potasowym. Nasuwa się wniosek, że roztwory stężone związków fosforoorganicznych mogą dawać dodatnią reakcję Guzeita, o czym należy chyba pamiętać przy analizie toksykologicznej.

W dalszym toku pracy próbowano znaleźć reakcje charakterystyczne tylko dla związków fosforoorganicznych wykorzystując różnice w rozpuszczalności między związkami fosforoorganicznymi i fosforanami w rozpuszczalnikach organicznych (fosforany są nierozpuszczalne natomiast związki fosforoorganiczne rozpuszczają się bardzo dobrze). Brano pod uwagę następujące rozpuszczalniki organiczne: chloroform, czterochlorek węgla, benzen, aceton, i spośród nich wybrano do dalszych doświadczeń chloroform. Opierając się na tym że wszystkie preparaty fosforoorganiczne w swojej cząsteczce zawierają fosfor związany organicznie, oraz niektóre siarkę, próbowano wykryć te właśnie pierwiastki reakcjami chemicznymi. Na fosfor zastosowano reakcję z eikonogenem i molibdenianem amonu, a na siarkę reakcję Lassaigne'a. Praktycznie ekstrakt chloroformowy odparowywano do suchości, z częścią osadu przeprowadzono próbę Lassaigne'a na siarkę, a resztę utleniano w celu uzyskania fosforanów i te wykrywano próbą z molibdenianem amonu i eikonogenem. Korzystano z tych samych preparatów fosforoorganicznych jak w pierwszej części pracy tj.: z Ekatinu, Metasystoxu, Wofatoxu i Foschloru. Do ekstrakcji użyto preparatów stężonych (roztartych z wątroba) oraz narządów królików (wątroba, płuca, treść żołądkowo-jelitowa) skarmianych zielonką z lucerny skrapianą stężonymi preparatami fosforoorganicznymi, jak również zielonką z lucerny spryskiwaną na pniu preparatami fosforoorganicznymi rozcieńczonymi według przepisu na etykiecie. W analogiczny sposób badano narządy królików: kontrolnych i zatrutych *per os* fosforanem I-potasowym. We wszystkich przypadkach, także i z narządami królików kontrolnych reakcje na fosfor i siarkę wypadły niestety dodatnio. Jak wynika z przeprowadzanych doświadczeń zastosowane metody nie mogą służyć dla diagnostyki zatruc związkami fosforoorganicznymi.

Szukając lepszych metod wykrywania związków fosforoorganicznych w materiale biologicznym, zaadaptowaliśmy metodę podaną przez Położa i Poleckiego. Zasada jej polega na hamowaniu fermentu cholinesterazy pod wpływem związków fosforoorganicznych, w wyniku czego acetylocholina dodana do mieszaniny badanej nie rozkłada się i nie zmienia niebieskiego zabarwienia błękitu bromotymolowego (zakres pH 6,0—7,6). W jednocześnie przeprowadzonej kontroli, badany roztwór acetylocholino rozkłada się na cholinę i kwas octowy. Ten ostatni zmienia zabarwienie indykatora od niebieskiego poprzez zielony na jasnożółty. Wskaźnikiem obecności związków fosforoorganicznych w badanych produktach jest efekt antycholinoesterazowy, to znaczy zahamowanie zmiany barwy od niebieskiej do zielonej i dalej do jasnożółtej w próbce doświadczalnej w porównaniu z kontrolną. Zauważono, że zmiana zabarwienia błękitu bromotymolowego powstaje w pewnej zależności od zawartej ilości związków fosforoorganicznych w badanej próbce. Jeżeli w porównaniu

z kontrolną próbką zmiana koloru niebieskiego do zielonego zachodzi już po 5 minutach, to świadczy to o obecności nieznacznej ilości związków fosforoorganicznych, jeżeli po upływie 30 minut, to znaczy, że w badanym materiale znajdują się znaczne ilości związków fosforoorganicznych. Jeżeli natomiast zmiana zabarwienia nie nastąpi po 30 minutach a nawet dłużej, to jest to dowodem, że badana próba zawiera bardzo duże ilości związków fosforoorganicznych. W wypadku nieobecności związków fosforoorganicznych, zabarwienie w badanych i kontrolnych próbkach występuje jednocześnie.

Związki fosforoorganiczne są jadami funkcjonalnymi i przy dostaniu się do organizmu zwierząt ulegają po pewnym czasie rozkładowi i nie zawsze można stwierdzić obecność wolnej trucizny. Większe znaczenie diagnostyczne może mieć wówczas wykazanie następstwa intoksykacji drogą oznaczenia aktywności esterazy cholinowej w narządach i tkankach zatrutych zwierząt. Przed oznaczeniem ostatecznej aktywności cholinesterazy w organach i tkankach zatrutych zwierząt, nieodzowne jest oznaczenie pH wodnych wyciągów w badanym materiale i doprowadzenie jego do pH obojętnego. Przy zatruciach preparatami fosforoorganicznymi stwierdza się w organach i tkankach badanych pełne zahamowanie aktywności cholinesterazy. Niebieskie zabarwienie płynu w próbkach zwierząt zatrutych nie zmienia się w przeciągu doby a nawet dłużej, natomiast badane wyciągi zdrowych zwierząt dają zmianę zabarwienia od niebieskiego do zielonego i dalej do jasnożółtego w czasie 2—4 godzin. Metodą biochemiczną można wykryć związki fosforoorganiczne w materiale toksykologicznym takim jak: wątroba, nerki, śledziona, serce, mózg, mięśnie, treść żołądkowo-jelitowa, mocz, padłe pszczoły, larwy gza bydłęcego, ryby, pasza, mleko, miód, tłuszcz i innym.

Dla potwierdzenia słuszności powyższej metody może służyć również metoda biologiczna polegająca na prowadzeniu podskórnym lub *per os* wyciągów lub popłuczyn z badanego materiału zwierzętom laboratoryjnym. Można też skarmiać bezpośrednio materiałem badanym zwierzęta wrażliwe. U takich zwierząt przy obecności związków fosforoorganicznych otrzymuje się charakterystyczny obraz kliniczny zatrucia: pobudzenie, drgawki, asfikcja i porażenie, a następnie śmierć.

Opisana metoda biochemiczna sprawdzona została w naszym Zakładzie doświadczalnie na zwierzętach zatrutych i jest używana dla celów rozpoznawczych przy podejrzeniu o zatrucie zwierząt lub produktów spożywczych preparatami fosforoorganicznymi.