

JACEK CYBULSKI, DANUTA PALUT

WCHŁANIANIE, WYDALANIE I METABOLIZM KARBENDAZYMU C¹⁴
U SZCZURAZ Zakładu Toksykologii Sanitarnej
Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie
Kierownik: prof. dr T. Syrowatka

Szczury otrzymujące doustnie oraz dootrzewnowo dawkę karbendazyму C¹⁴ (MBC) około 20 mg/kg masy ciała eliminowały radioaktywność z moczem i w mniejszym stopniu z kałem głównie w czasie pierwszej doby cyklu doświadczalnego. Całkowity odzysk C¹⁴ wynosił odpowiednio: 99,0 i 98,0%. Wydalanie badanego związku było szybsze po doustnym podaniu aniżeli po dootrzewnowej jego iniekcji. Bez względu na drogę podania głównym metabolitem był 5-hydroksy-MBC, występujący w moczu szczurów w postaci siarczanu.

Karbendazym — ester metylowy kwasu 2-benzimidazolokarbaminowego (MBC) jest fungicydem układowym o szerokim zakresie działania grzybobójczego. Jest on także aktywnym metabolitem dwóch innych fungicydów, tj. benomylu i metylotiofanatu [2, 3, 5, 6, 7, 11].

Losy MBC u ssaków nie zostały w pełni wyjaśnione. Badania metabolizmu ograniczają się do trzech pozycji piśmiennictwa [2, 6, 7] dotyczących w zasadzie benomylu, a opinie na ten temat są kontrowersyjne.

W tej sytuacji wydawało się celowe podjęcie badań metabolizmu MBC z uwzględnieniem roli kwasu glukuronowego i siarkowego. Było to tym bardziej uzasadnione gdyż w Polsce uruchomiono produkcję tego fungicydu i planowane jest masowe jego stosowanie w ochronie roślin.

Praca dotyczy wchłaniania, wydalania i metabolizmu MBC C¹⁴ u szczura po doustnym i dla porównania po dootrzewnowym podaniu preparatu w dawce wynoszącej 1/750 LD₅₀.

MATERIAŁY I METODY

Odczynniki specjalne

2-C¹⁴-benzimidazolokarbaminian metylu (karbendazym, MBC) o aktywności właściwej 7,3 mCi/mM syntezy Instytutu Badań Jądrowych w Świerku, beta-glukuronidaza typ H-1 oraz arylosulfataza typ II — firmy Sigma. Żel krzemionkowy HF₂₅₄ firmy Merck, 2,5-dwufenylo-1,3,4-oksazol (PPO) i 1,4-dwu[2-(5-fenylookszalilo)]-benzen (POPOP), odczynniki do płynnej scyntytacji firmy Fluka, NCS — preparat do trawienia (skład zastrzeżony) firmy Amersham.

Substancje wzorcowe

5-hydroksykarbendazym (5-hydroksy-MBC), siarczan 5-hydroksykarbendazyму (siarczan 5-hydroksy-MBC) oraz 2-aminobenzimidazol (2-AB), hipotetyczne metabolity własnej syntezy [6, 8]. Nieznakowany MBC- syntezy Instytutu Przemysłu Organicznego w Warszawie.

Zwierzęta

Badania wykonano na szczurach szczeputy Wistar, samcach o masie ciała 250 g hodowli Instytutu Żywności i Żywienia w Warszawie, podzielonych na 2 grupy, po 6 zwierząt w każdej. Zwierzęta umieszczone pojedynczo w klatkach metabolicznych pozostawały przez 7 dni przed doświadczeniem jak i w czasie trwania jego na stałej diecie; wodę otrzymywały *ad libitum*. Przed rozpoczęciem doświadczeń zwierzęta głodzone przez okres 24 h, a następnie podawano doustnie lub dootrzewnowo, jednorazową dawkę MBC C¹⁴ wynoszącą odpowiednio: 20 mg/kg (10,1 μ Ci/szczura) i 22 mg/kg masy ciała (11,3 μ Ci/szczura).

Badania wydalania MBC

Po 24, 48 i 72 h zbierano dobowe próbki moczu i kału od poszczególnych osobników, oznaczając każdorazowo objętość moczu i masę kału. Kał suszono i próbki (50 mg) spalano w obecności tlenu do CO₂¹⁴ który pochłaniany w mieszaninie etanoloaminy i metoksyetanolu (1 : 8) umieszczonej w kolbie jodowej z korkiem *Schönigera*. Wydajność spalania kału i pochłaniania CO₂¹⁴ oznaczona z użyciem wzorca wynosiła 89%. W dobowych próbkach moczu (0,2 cm³) i w roztworach pochłaniających CO₂¹⁴ (10 cm³) oznaczano zawartość C¹⁴ metodą płynnej scyntytacji.

Badania metabolizmu karbendazy mu

Produkty przemian metabolicznych MBC identyfikowano i oznaczano w dobowych próbkach moczu zebranych po 24 h. W oznaczeniach stosowano metodę chromatografii cienkowarstwowej, enzymatyczną, radiometryczną oraz metody spektrofotometryczne.

Próbki świeżego moczu (10 mm³) nanoszono na płytki pokryte żelazem krzemionkowym HF₂₅₄ i rozwijano w układzie rozpuszczalników: I — octan etylu : dioksan : metanol : amoniak (80 : 10 : 1,0 : 0,5) i II — octan etylu : metanol : woda : amoniak (30 : 10 : 5,0 : 0,5). Po rozwinięciu chromatogramów płytki dzielono na 1-cm segmenty, które po wyskrobaniu i eluacji, 0,1 N kwasem solnym (0,5 cm³) poddawano pomiarom radiometrycznym metodą płynnej scyntytacji. Wyznaczona uprzednio wydajność eluacji kwasem solnym 5-hydroksy-MBC i siarczanu 5-hydroksy-MBC wynosiła odpowiednio: 85% i 91%. Metabolity MBC identyfikowano następnie przez porównanie chromatograficzne z substancjami wzorcowymi. Plamy metabolitów lokalizowano w świetle UV.

Próbki świeżego moczu (1 cm³) doprowadzano do pH 5, dodawano 400 jednostek beta-glukuronidazy i 15 jednostek arylosulfatazy w buforze octanowym pH 5 i mieszaniny inkubowano w 37° przez 24 h. Uzyskane hydrolizaty analizowano metodą chromatograficzną (opis metody podano wyżej) w połączeniu z oznaczeniami radiometrycznymi. Metabolity z żelu eluowano metanolem. Wydajność eluacji 5-hydroksy-MBC wynosiła 90%.

Ponieważ jednym z elementów zaplanowanych badań było określenie mechanizmów odtrawiania MBC przy udziale aktywnego kwasu glukuronowego (kwasu urydyno-5'-fosfoglukuronowego) i siarkowego (3'-fosfoadenylosiarczanu) konieczne było wyselekcjonowanie dodatkowych elementów świadczących, która z reakcji odgrywa decydującą rolę w procesie przemian badanego związku. W celu ustalenia izolowano metodą preparatywną chromatografii cienkowarstwowej metabolit, którego pozycje chromatograficzne odpowiadały wartościom R_f siarczanu 5-hydroksy-MBC. Uzyskane po eluacji próbki hydrolizowano beta-glukuronidazą i arylosulfatazą w 0,2 M buforze octanowym o pH 5 (0,2 cm³) zawierającym 0,4 mg enzymów w obecności i bez dodatku kwaśnego fosforanu sodowego, inhibitora aktywności arylosulfatazy [1]. Do analogicznych mieszanin dodawano kwaśny fosforan sodowy (0,1 M). Aktywność beta-glukuronidazy kontrolowano w mieszaninie zawierającej glukuronid fenoloftaleiny. Po 2 h inkubacji w temperaturze 37° C hydrolizaty analizowano metodą chromatografii cienkowarstwowej w połączeniu z pomiarami radiometrycznymi. Próbki kontrolne doprowadzano do pH 9 i uwolnioną fenoloftaleiną oznaczano spektrofotometrycznie przy długości fali 540 nm.

Pomiary radiometryczne metodą płynnej scyntytacji wykonywano na spektrofotometrycznym scyntylnym firmi *Packard*. Mieszaninę scyntylną stanowił roztwór zawierający w 1 dm³ toluenu 6 g PPO i 75 mg POPOP. Radioaktywność w moczu (0,2 cm³) oraz w eluatów (0,1 N kwasem solnym) z żelu krzemionkowego (0,2 cm³) mierzono w 15 cm³ roztworu scyntylnego z dodatkiem 1,5 cm³ NCS. Roztwory pochłaniające CO₂ (10 cm³) oraz eluaty metanolowe z żelu (0,2 cm³) poddawano pomiarom radiometrycznym odpowiednio w 10 i 15 cm³ scyntylnatora. Wydajność pomiarów w różnych układach zawierających mocz, mieszaninę pochłaniającą CO₂, eluaty z żelu wyznaczano z odpowiednich krzywych gaszenia sporządzonych z zastosowaniem wzorca C¹⁴.

Strukturę chemiczną metabolitów MBC potwierdzono przez wykonanie widm absorpcyjnych w podezerwieniu w KBr w zakresie 600—3500 cm⁻¹ na spektrofotometrze IR *Perkin-Elmer*. Widma w nadfiolecie z zastosowaniem spektrofotometru UV VTS Zeissa sporządzano w środowisku kwaśnym (0,1 N kwas solny) i alkalicznym (0,01 N wodorotlenek sodowy).

WYNIKI BADAŃ

Liczbowe zestawienie średnich wartości obrazujących obliczony w stosunku do podanej dawki procent radioaktywności wydalanej z moczem i kałem szczurów po doustnym oraz dootrzewnowym podaniu dawki MBC C¹⁴ wynoszącej 20 i 22 mg/kg masy ciała przedstawiono w tabeli I i II.

Tabela I. Szybkość wydalania radioaktywności w moczu i kale szczurów po doustnym podaniu 20 mg/masy ciała (10,1 μCi/szczura) MBC C¹⁴

Czas h	Liczba zwierząt	Procent podanej dawki ¹		
		mocz	kal	mocz + kal
24	6	48,2 ± 4,5	27,8 ± 4,6	76,1 ± 5,8
48	6	7,8 ± 1,7	5,1 ± 1,6	12,9 ± 3,1
72	6	4,2 ± 0,6	0,9 ± 0,2	4,9 ± 0,4
96	6	2,4 ± 0,6	0,3 ± 0,1	2,3 ± 0,5
Klatka % odzyskanej radioaktywności		62,6	34,1	2,3 ± 0,6 99,0

¹ średnia ± BS (błąd standardowy).

Tabela II. Szybkość wydalania radioaktywności w moczu i kale szczurów do dootrzewnowym wstrzyknięciu 22 mg/kg masy ciała (11,3 μCi/szczura) MBC C¹⁴

Czas h	Liczba zwierząt	Procent podanej dawki ¹		
		mocz	kal	mocz + kal
24	6	44,1 ± 5,8	15,5 ± 3,9	59,6 ± 9,5
48	6	13,8 ± 4,1	7,9 ± 5,4	21,7 ± 3,5
72	6	7,4 ± 2,0	5,3 ± 1,7	12,7 ± 3,6
Klatka % odzyskanej radioaktywności		65,3	28,7	4,0 ± 0,9 98,0

¹ średnia ± BS (błąd standardowy).

Podany doustnie preparat był łatwo resorbowany z przewodu pokarmowego szczurów i wydalany głównie w czasie pierwszej doby z moczem (48,2%) i w mniejszym stopniu z kałem (27,8%). Całkowity odzysk radioaktywności wynosił 99%. Analogiczne wyniki uzyskane po dootrzewnowej iniekcji dla moczu i kału kształtowały się na nieco niższych poziomach (44,1 i 15,5%). Eliminacja radioaktywności przebiegała szybciej po doustnym podaniu MBC aniżeli po dootrzewnowej jego iniekcji.

Przed przystąpieniem do właściwych oznaczeń biotransformacji MBC opracowano rozdział i wstępną identyfikację jego hipotetycznych metabolitów. Średnie wartości R_f MBC i syntetycznych metabolitów zestawiono w tabeli III.

Wyniki rozdziału, wstępnej identyfikacji metabolitów oraz pomiarów radiometrycznych przedstawiono w tabeli IV.

Tabela III. Średnie wartości R_f MBC i jego hipotetycznych metabolitów

Metabolit	Układ rozwijający	
	I ¹	II ²
Kerbendazym (MBC)	0,73	0,93
2-aminobenzimidazol (2-AB)	0,16	0,80
5-hydroksykarbendazym (5-hydroksy-MBC)	0,50	0,85
Siarczan 5-hydroksykarbendazymu (siarczan 5-hydroksy-MBC)	—	0,60

¹ octan etylu : dioksan : metanol : amoniak (80 : 10 : 1,0 : 0,5).

² octan etylu : metanol : woda : amoniak (30 : 10 : 5,0 : 0,5).

Tabela IV. Metabolity MBCC¹⁴ występujące w moczu szczurów po doustnym oraz dootrzewnowym podaniu preparatu w dawce wynoszącej odpowiednio 20 i 22 mg/kg masy ciała

Metabolit	Średnie wartości R_f w układzie II	Zidentyfikowany jako:	% podanej dawki ¹ po podaniu	
			doustnym	dootrzewnowym
A	0,85	5-hydroksy-MBC	2,7 ± 0,5 (5,6) ²	0,7 ± 0,01 ³ (1,6)
B	0,60	siarczan 5-hydroksy-MBC	40,3 ± 4,4 (83,6)	43,4 ± 4,5 (98,4)
Inne	start	niezidentyfikowane	2,5 ± 0,3 (5,2)	—
	0,11	niezidentyfikowane	2,7 ± 0,5 (5,6)	—

¹ Średnia ± BS (błąd standardowy).

² Procent obliczony w stosunku do zawartej po 24 h radioaktywności w moczu przyjętej jako 100.

³ Metabolity niezidentyfikowane.

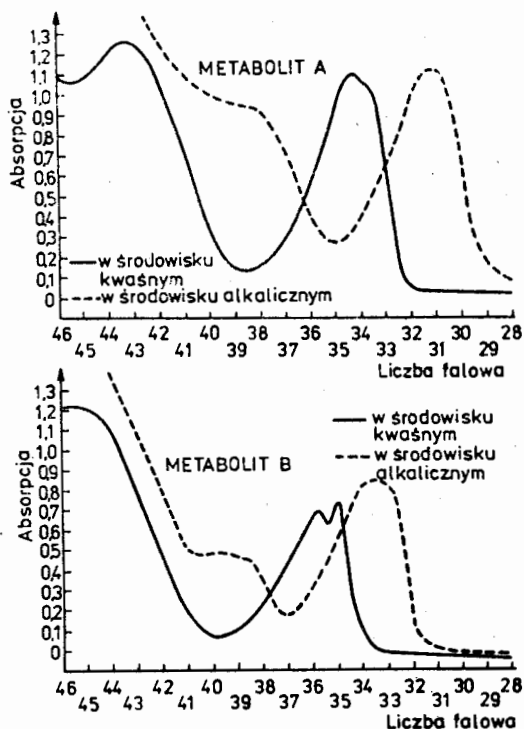
Bez względu na drogę podania MBC głównym produktem przemiany (83,6% i 98,4%) był metabolit B, którego wartości R_f były zgodne z wartościami R_f wzorca, siarczanu 5-hydroksy-MBC. Po doustnym podaniu obserwowano występowanie wolnego metabolitu A (5,6%), który wstępnie zidentyfikowano jako 5-hydroksy-MBC. Około 10% zawartej w moczu radioaktywności stanowiły niezidentyfikowane produkty pozostające na starcie chromatogramu oraz wykazujące wartości $R_f = 0,11$ (układ II). W przypadku dootrzewnowej iniekcji nie określono wolnych metabolitów, ponieważ stanowiły one zaledwie 1,6% radioaktywności zawartej w moczu.

Występowanie połączeń metabolitów MBC z kwasem glukuronowym i siarkowym badano następnie na drodze enzymatycznej hydrolizy próbek moczu. W uzyskanych hydrolizatach obserwowano obecność jednego tylko metabolitu a mianowicie 5-hydroksy-MBC. Stosując enzymatyczną hydrolizę moczu stwierdzono średni odzysk 5-hydroksy-MBC wynoszący 17,0 i 19,4% podanej dawki odpowiednio po doustnym i dootrzewnowym podaniu preparatu. Większa część radioaktywnych połączeń nie ulegała hydrolizie w wyniku hydrolizy enzymami, co sugerowało, występowanie w moczu substancji hamujących aktywność arylosulfatazy [1]. Wyjaśnię-

no to enzymatyczną hydrolizą metabolitu B w obecności i bez dodatku inhibitora arylosulfatazy. Średni odzysk 5-hydroksy-MBC wynosił 8,8% w obecności inhibitora, a bez jego dodatku sięgał 99,0%.

Powyższe dane potwierdziły wyniki wstępnej identyfikacji sugerujące, że głównym produktem przemiany MBC u szczura była jego pochodna hydroksylowana w pozycji 5 pierścienia benzimidazolowego (5-hydroksy-MBC), wydalana następnie w moczu w postaci połączenia z kwasem siarkowym.

Na ryc. 1 przedstawiono charakterystyczne widma UV metabolitów MBC takich jak 5-hydroksy-MBC i siarczan 5-hydroksy-MBC, które były iden-

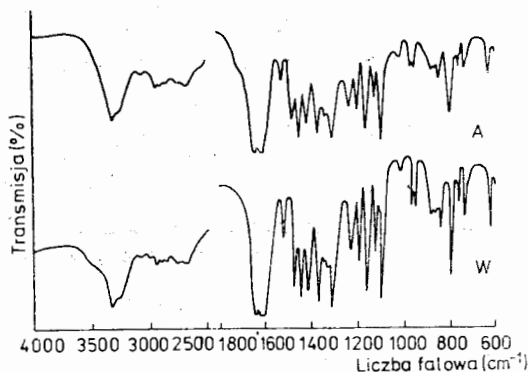


Ryc. 1. Widma UV metabolitów A i B. — w środowisku kwaśnym, - - - w środowisku alkalicznym.

tyczne z widmami odpowiednich substancji wzorcowych. Strukturę chemiczną 5-hydroksy-MBC potwierdzono dodatkowo przez porównanie widm IR z widmami syntetycznego wzorca (ryc. 2).

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Wykazano, że podany doustnie oraz dootrzewnowo MBC C¹⁴ w dawce wynoszącej 1/750 LD₅₀ wydalany był stosunkowo szybko przez szczury głównie w czasie pierwszej doby z moczem i w mniejszym stopniu z kałem. Eliminacja radioaktywności pochodzącej z pierścienia benzimidazolowego przebiegała szybciej po doustnym podaniu preparatu aniżeli po dootrzewnowej jego iniekcji. Bez względu na drogę podania głównym produktem przemiany badanego związku był 5-hydroksy-MBC, zidentyfikowany me-



Ryc. 2. Widma IR w KBr metabolitu A oraz 5-hydroksy-MBC zastosowanego jako wzorzec. A — metabolit A, W — wzorzec.

tołą chromatografii cienkowarstwowej, spektrofotometrii w poczerwieni i nadfiolecie. Metabolit ten wydalają szczury w moczu w postaci estru kwasu siarkowego. Po doustnym podaniu MBC zidentyfikowano nieznaczne ilości wolnego 5-hydroksy-MBC. Wśród produktów przemiany nie stwierdzono obecności niezmienionego związku, 2-aminobenzimidazolu (2-AB) jak również połączeń typu 0-glukuronidów.

Wcześniej *Gardiner* i wsp. [7] wykazali, że głównym kierunkiem biotransformacji MBC u szczurów, psów, kurcząt i krów była hydroksylacja pierścienia benzimidazolowego w pozycji 5. Powstający w wyniku tej reakcji metabolit wydalają zwierzęta w postaci glukuronidów i/lub estrów kwasu siarkowego. Natomiast wyniki *Doucha* [2] sugerują, że główną drogą metabolizmu MBC u myszy, owcy i królika było rozszczepienie ugrupowania karbamoilowego z utworzeniem 2-AB. Wśród metabolitów występowały także 5-hydroksy-2-AB i 5-hydroksy-MBC. Pochodne tego typu ulegały następnie sprzężeniu do 0-glukuronidów i siarczanów, które obecne były w moczu myszy, owcy, królika w ilościach wynoszących zaledwie 20% podanej dawki. Omówione wyżej dane doświadczalne sugerują występowanie znacznych różnic gatunkowych w procesie metabolizowania MBC, co jest istotnym zagadnieniem, budzącym jednak wątpliwości.

Uzyskane w niniejszej pracy wyniki różnią się od danych opublikowanych przez *Doucha* [2], natomiast nie odbiegają od wyników podanych przez *Gardinera* i wsp. [7]. Można zatem wnioskować, że są one dodatkowym dowodem świadczącym o trwałości w warunkach *in vivo* ugrupowania karbamoilowego wchodzącego w strukturę badanego związku. Przedstawione badania wykazały ponadto, że MBC jest przykładem ksenobiotyku, którego hydroksylowany metabolit w organizmie szczura łączy się z kwasem siarkowym. W podsumowaniu należy podkreślić, że MBC zarówno po podaniu doustnym jak również dootrzewnowym ulegał szybkiemu wchłanianiu w organizmie szczura. O ile szybkie wchłanianie z przewodu pokarmowego możnaby tłumaczyć niskim pH soku żołądkowego (MBC jest dobrze rozpuszczalny w kwasach) o tyle wchłanianie z jamy otrzewnowej jest trudne do interpretacji z uwagi na obojętny odczyn, w którym związek jest praktycznie nierozpuszczalny.

W porównaniu ze stosunkowo szybką degradacją MBC u zwierząt preparat ten metabolizowany był w roślinach w ograniczonym zakresie. Ule-

gał on przemianie do 2-AB (około 5% pozostałości MBC), a w dalszej kolejności do benzimidazolu, o-aminobenzonitrylu i aniliny [9, 10]. Sam MBC i 2-AB ulegały także koniugacji tworząc N-glukozydy. Nie stwierdzono natomiast metabolitów hydroksylowanych wykrywanych u zwierząt. MBC wykazywał też zdolności do zalegania w glebie i był odporny na działanie światła i temperatury [3, 4].

WNIOSKI

1. Podany doustnie oraz dootrzewnowo szczurom MBC^{14} w dawce wynoszącej około 20 mg/kg masy ciała wydalany był stosunkowo szybko w czasie pierwszej doby z moczem i w mniejszym stopniu z kałem.

2. Eliminacja radioaktywności przybiegała nieco szybciej po doustnym podaniu MBC^{14} aniżeli po dootrzewnowej jego iniekcji.

3. Wz względu na drogę podania głównym produktem przemiany badanego związku był 5-hydroksy-MBC występujący w moczu szczurów w postaci siarczanu.

Я. Цыбульски, Д. Палют

ВСАСЫВАНИЕ, ВЫДЕЛЕНИЕ И МЕТАБОЛИЗМ МЕЧЕННОГО C^{14} КАРБЕНДАЗИМА У КРЫС

Резюме

Было показано, что применённых перорально или внутривентриально C^{14} карбендазим (MBC) в дозе около 20 мг/кг веса тела выделялся в течение первых суток преимущественно с мочой, в меньшей степени с фекалиями. Вычисленный, по отношению к применённой дозе, процент радиоактивности, выделяемой в течение 24 часов, составлял $48,2 \pm 4,5$ и $44,1 \pm 5,8$ после перорального и внутривентриального применения, соответственно. Для фекалий эти величины составляют $27,8 \pm 4,6$ и $15,5 \pm 3,9$.

Независимо от способа применения, основным продуктом превращения MBC был 5-гидрокси-MBC, идентифицированный методом тонкослойной хроматографии а также ИК и УФ-спектрофотометрии. Этот метаболит выделялся в виде конъюгата с серной кислотой. После перорального применения карбендазима идентифицировали незначительные количества свободного 5-гидрокси-MBC. Среди продуктов превращения не установили наличия неизменённого соединения, 2-аминобензимидазола (2-AB) а также соединений типа 0-глюкуронидов. Проведённые исследования показали, что MBC является примером ксенобиотика, гидроксилированный метаболит которого образует в организме крысы соединение с серной кислотой.

J. Cybulski, D. Palut

ABSORPTION, ELIMINATION AND METABOLISM OF ^{14}C CARBENDAZIM IN RATS

Summary

It was demonstrated that orally and intraperitoneally administered ^{14}C carbendazim (MBC) in doses about 20 mg/kg of body weight was eliminated with urine and in a lesser degree with faeces mainly during the first 24 hours. The per cent of radioactivity eliminated with urine in relation to the administered dose was after 24 hours 48.2 ± 4.5 and 44.1 ± 5.8 respectively after oral and intraperitoneal administration. The analogous values in faeces were 27.8 ± 4.6 and 15.5 ± 3.9 respectively.

Without respect to the route of administration the main product of metabolism was 5-hydroxy-MBC identified by the TLC method and infrared and ultraviolet spectrophotometry. This metabolite was eliminated by the rats as a conjugate with sulphuric acid. After oral administration of MBC slight amounts of free 5-hydroxy-MBC were identified. Among the metabolites the unchanged compound, 2-aminobenzimidazole (2-AB) and conjugates of the type of 0-glucuronates were not found. These investigations showed that MBC is a xenobiotic whose hydroxyl metabolite gives in the rat conjugates with sulphuric acid.

PIŚMIENNICTWO

1. *Dodgson K.S., Spencer B.*: Studies on sulphatases. *Bioch. J.*, 1953, 55, 315. — 2. *Douch P.G.C.*: The metabolism of benomyl in animals. *Xenobiotica* 1973, 3, 367. — 3. *Evaluation of some pesticide residues in food. WHO Pesticide Residues* 1974, 3, 187. — 4. *Flecker J.R., Lacy H.M.*: Photolysis of methyl-2-benzimidazolecarbamate. *J. Agr. Food Chem.*, 1977, 25, 51. — 5. *Fuchs A., Fernandes D.L., Vries F.W.*: The function of an MBC releasing deposit of benomyl and thiophanate in plant roots and soil. *Neth. J. Pl. Path.*, 1974, 80, 7. — 6. *Gardiner J.A.*: Isolation and identification of a metabolite of methyl-1-(butylcarbamoyl)-2-benzimidazolecarbamate in rat urine. *J. Agr. Food Chem.*, 1968, 16, 1050. — 7. *Gardiner J.A., Kirkland J.J., Klopping H.L., Sherman H.*: Fate of benomyl in animals. *J. Agr. Food Chem.*, 1974, 24, 419. — 8. *Loux H.M.*: Process for manufacture of certain alkyl esters of methyl-2-benzimidazolecarbamate. US Patent 3.010.968, 1961. — 9. *Rouchaud J.R., Decallone J.R., Mayer J.A.*: Metabolic fate of methyl-2-benzimidazole carbamate in melon plants. *Phytopathology* 1974, 64, 1513. — 10. *Sijpesteijn A.K.*: Effects of fungal pathogens: in *Systemic Fungicides*, *Marsch R.W.* Longman London, 1977, 131.
11. *Soeda A., Kosaka S., Noguchi T.*: Identification of alkyl-2-benzimidazolecarbamate as a major metabolite of thiophanates fungicide in/on the bean plant. *Agr. Biol. Chem.*, 1972, 36, 817. — 12. *Vettorazi G.*: Carbamate and organophosphorus pesticides used in agriculture and public health. *Res. Rev.*, 1976, 63, 1.

Dn. 18 X 1981 r.

00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24