JADWIGA ZADROZIŃSKA

BADANIE PROCESÓW PRZEMIANY FENTIONÓW W WYBRANYCH ROŚLINACH

Z Zakładu Badania Żywności i Przedmiotów Użytku Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie
Kierownik: prof. dr *M. Nikonorow*

Przebadano powstawanie metabolitów fentionu w roślinach fasoli i owocach czarnej porzeczki poddanych zabiegom ochrony roślin roztworem preparatu „Lebaycid", zawierającym 50% fentionu. Do oznaczeń zastosowano metodę chromatografii cienkowarstwowej w połączeniu z metodą enzymatyczną.

Fention (0,0-dwumetylotionofosforan 3-metylo-4-metylotiofenylu) odkryty przez *Schradera* w 1960 r. należy do grupy związków tiofosforowych. Pod wpływem temperatury, światła, a także układów enzymatycznych zwierzęcych i roślinnych ulega szybko rozkładowi z wytworzeniem kilku toksycznych związków [1, 2].

Na temat metabolizmu fentionu w ostatnich latach ukazało się szereg prac. Badania te dotyczą procesu przemiany fentionu w ustroju owadów [3, 4], zwierząt stałocieplnych [5, 6], a także w roślinach.

U owadów [3] wykrywano oprócz fentionu 8 jego metabolitów, u szczurów [5] stwierdzono obecność 5 związków: sulfotlenku i sulfonu fentionu, fenoksonu oraz sulfotlenku i sulfonu fenoksonu.

Browman i wsp. [6] w mleku krów karmionych paszą zawierającą pozostałości fentionu wykrywali niewielkie ilości tego związku oraz 3 jego metabolity: sulfotlenek i sulfon fentionu oraz sulfotlenek fenoksonu. W moczu krów stwierdzali tylko wyżej wymienione metabolity, a w kale fention i sulfotlenek fentionu. Paszę stanowiła kiszonka przygotowana z kukurydzy spryskanej preparatem fentionu. Zawierała ona pozostałości fentionu i 3 metabolitów wykrywanych następnie w mleku i moczu.

Niessen i wsp. [7] w badaniach metabolizmu fentionu w roślinach zielonych przy użyciu związku ze znakowanym ^{32}P stwierdzali oprócz w/w związków dodatkowo obecność sulfonu fenoksonu. Autorzy podają, że znaczy wpływ na przebieg metabolizmu w roślinach mają warunki klimatyczne. Nasłonecznienie i wysoka temperatura sprzyja szybkiemu rozkładowi tego insektycydu.

Celem pracy było sprawdzenie przydatności opracowanej uprzednio metody oznaczania pozostałości fentionu [2] na doświadczalnym materiale oraz prześledzenie procesów przemiany fentionu w niektórych roślinach w krajowych warunkach klimatycznych.

Do identyfikacji związków zastosowano metodę enzymatyczną, która jest jedną z najbardziej przydatnych metod do identyfikacji toksycznych

metabolitów. Przedmiotem badań były rośliny fasoli szparagowej i owoce czarnej porzeczki. Wybór fasoli podyktowany był tym, że według danych piśmiennictwa fasola i groch najczęściej stosowane są do tego rodzaju badań. Natomiast czarne porzeczki wybrano ze względu na bardzo długi okres utrzymywania pozostałości różnych insektycydów w tych owocach.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

W Zakładzie wykonano 2 doświadczenia z fasolą; w pierwszym rośliny fasoli opryskiwano, a w drugim podlewano emulsyjnym roztworem Lebaycidu zawierającym 50% fentionu.

Fasolę szparagową hodowano w 12 dużych wazonach o wymiarach 60×40×30 cm, ustawionych na tarasie, tak aby wszystkie rośliny miały jednakowe nasłonecznienie. Wazony przykrywano płytkami szklanymi imitującymi okna inspektowe. W tydzień po wzejściu fasoli (25.V.1970) rośliny podzielono na 3 grupy, w każdej po 4 wazony. W pierwszej grupie — opryskiwano fasolę 0,15% roztworem Lebaycidu, w drugiej — podlewano fasolę 1% roztworem tego preparatu (50 ml na 1 wazon), tak, aby rośliny nie były nim opryskiwane; trzecią grupę stanowiła fasola kontrolna. Próby do oznaczeń z fasoli opryskanej pobierano w 3 godziny i 24 godziny po zabiegu, a następne w odstępach dwudniowych, aż do zaniku preparatu. Pierwszą próbę z fasoli podlewanej pobrano po 2 dniach, a następne tak jak przy fasoli opryskiwanej.

Średnią próbę stanowiły rośliny fasoli w ilości od 20 do 50 g ucinane ok. 0.5 cm od ziemi.

Opryskiwanie krzewów czarnych porzeczek wykonano 10.VI.1971 r. roztworem Lebaycidu o stężeniu 0,15%. Próby do oznaczeń pobierano po 3 i 24 godzinach po zabiegu, a następne co 2 dni. Średnią próbą porzeczek były owoce wraz z szypułkami w ilości 50 g.

Odczynniki

1) chloroform cz.d.a., 2) benzen cz.d.a., 3) aceton cz.a.d., 4) metanol cz.d.a., 5) 30% nadtlenek wodoru, 6) żel krzemionkowy G f-my Merck, 7) siarczan sodu cz.d.a. wysuszony w temp. 135° przez 2 godz., 8) węgiel aktywny oczyszczany i sprawdzony [8], 9) roztwór enzymu: 1 g wątroby drobno pokrojonej, homogenizowano z 5 ml wody przez 3—4 min., następnie rozcieńczono homogenizat wodą do 40 ml i odwirowano przez 10 min. (3 tys. obrotów/min.), 10) roztwór substratu: 125 mg octanu β-naftylu rozpuszczono w 100 ml absolutnego etanolu; bezpośrednio przed spryskaniem chromatogramów rozpuszczono 20 mg błękitu trwałego (Faust Blue Salt B) w 16 ml wody i dodawano 4 ml roztworu octanu β-naftylu, 11) wzorce: a) fention — preparat 96%-owy f-my Bayer;

b) metabolity fentionu przygotowane przez utlenianie roztworu fentionu 30% nadtlenkiem wodoru [2];

c) preparat użytkowy „Lebaycid" — f-my Bayer, zawierający 50% fentionu.

Do oznaczeń stosowano roztwory benzenowe fentionu w 3 stężeniach: 100, 10 i 1 µg w 1 ml roztworu, a metabolitów fentionu i preparatu użytkowego w 2 stężeniach: 100 i 10 µg w 1 ml.

Ekstrakcja insektycydów i oczyszczanie wyciągów roślinnych

Średnią próbę ucierano w moździerzu z niewielką ilością chloroformu, przenoszono ilościowo do słoja z doszlifowanym korkiem poj. 500 ml i dodawano chloroform tak, by stosunek materiału roślinnego do rozpuszczalnika wynosił 1 : 5. Następnie zawartość słoja wytrząsano na trzęsawce przez 1/2 godz. i sączono przez sączek z bibuły Whatman Nr 1.

Do 50 ml przesączu (odpowiada to wyciągowi z 10 g próby) umieszczonego w kolbie stożkowej z doszlifowanym korkiem poj. 250 ml, dodawano 2 g węgla aktywnego, 2 g siarczanu sodu i ponownie wystrząsano na trzęsawce przez 1 godz. Po przesączeniu przez sączek z bibuły Whatman Nr 1, pobierano 10 ml wyciągu (co odpowiada wyciągowi z 2 g próby) i zagęszczano do 2 ml w kalibrowanej probówce poj. 10 ml pod zmniejszonym ciśnieniem przy użyciu pompy wodnej.

1 ml wyciągu chloroformowego odpowiadał wyciągowi z 1 g materiału roślinnego. Roztwór ten stosowano do oznaczeń chromatograficznych.

Rozwijanie chromatogramów i identyfikacja związków metodą enzymatyczną

Płytki chromatograficzne pokrywano żelem krzemionkowym G (grubość warstwy 0,2 mm) i aktywowano przez 1/2 godz. w temp. 105—110°. Na odpowiednie tory płytki nakładano roztwór wzorcowy fentionu w stężeniach: 0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 µg, roztwór wzorcowy metabolitów fentionu w stężeniu 1 µg (suma wszystkich związków), roztwór preparatu Lebaycidu w stęż. 0,5 µg, wyciągi próby kontrolnej w ilości 0,1 ml oraz próby badanej w kilku powtórzeniach: 0,01; 0,02; 0,05; 0,1 ml. Przy oznaczeniach w porzeczkach nakładano próbę kontrolną w ilości 0,2 ml (odpowiada to wyciągowi z 0,2 g próby) i dodatkowo próbę badaną w takiej samej ilości. Chromatogramy rozwijano fazą ruchomą składającą się z mieszaniny benzenu, acetonu i metanolu w stosunku 90 : 6 : 4 do wysokości 15 cm od linii startu.

Płytki po wysuszeniu naświetlano przez 1/2 godz. pod bakteriobójczą lampą kwarcową, potem spryskiwano roztworem enzymu, inkubowano przez 1 godz. w cieplarce w temp. 38° i następnie spryskiwano roztworem substratu z dodatkiem wskaźnika. Po kilku minutach na chromatogramach powstawały żółte plamy insektycydów na różowofioletowym tle. Przez porównanie wielkości i intensywności plam prób badanych z plamami roztworów wzorcowych fentionu określano pozostałości insektycydów w badanej próbie.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Najmniejsze wykrywalne ilości fentionu i jego metabolitów podaną metodą wynoszą w fasoli 0,3 mg/kg, a w porzeczkach 0,2 mg/kg. Różnice w wykrywalności związane są z ilością wyciągów nanoszonych na płytki chromatograficzne. Maksymalne ilości wyciągów, w których zanieczyszczenia nie przeszkadzają przy identyfikacji związków, odpowiadają wyciągowi z 0,1 g fasoli i z 0,2 g porzeczek. Zastosowana w pracy metodyka w porównaniu z uprzednio opracowaną dla jabłek i śliwek uległa pewnej modyfikacji. Pominięto oczyszczanie wyciągów na kolumnie chromatograficznej, co bardzo uprościło tok postępowania. Wszystkie wyniki obliczano w stosunku do fentionu, ponieważ tylko wzorzec fentionu miał określony skład procentowy substancji czynnej. Natomiast

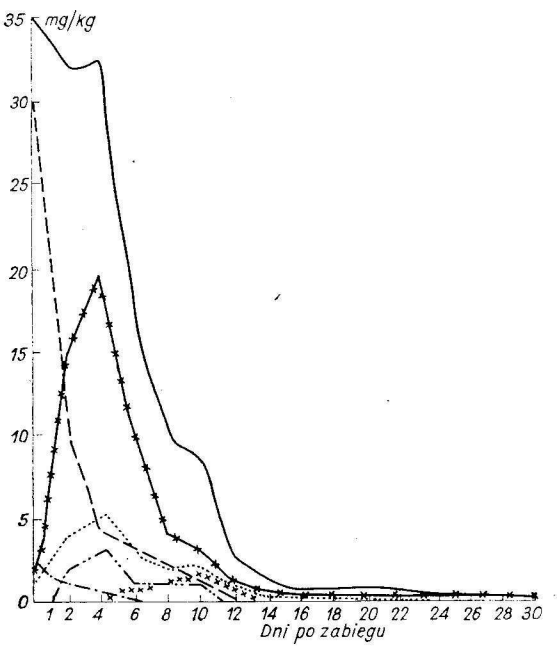
wzorce metabolitów przygotowane w pracowni służyły do identyfikacji związków powstałych w roślinach po zabiegach preparatem użytkowym.

Stosując do rozwijania chromatogramów fazę ruchomą składającą się z mieszaniny benzenu, acetonu i metanolu w stosunku 90 : 6 : 4 otrzymano dla fentionu i jego metabolitów następujące wartości Rf:

fention	0,80
sulfon fentionu	0,56
fenokson	0,50
sulfotlenek fentionu	0,31
sulfon fenoksonu	0,17
sulfotlenek fenoksonu	0,10

Preparat użytkowy „Lebaycid", stosowany do zabiegów, zanieczyszczony był pochodną tiometylową fenoksonu w ilości ok. 10%. Wartość Rf dla tego związku przy rozwijaniu chromatogramów fazą ruchomą wynosiła 0,64.

Wyniki uzyskane w doświadczeniu z fasolą opryskiwaną Lebaycidem ilustruje rycina 1. Fention i pochodna tiometylowa fenoksonu uległy

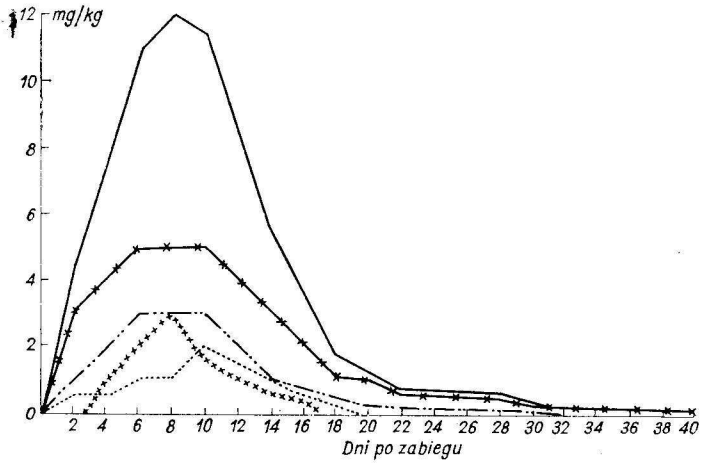


Ryc. 1. Przebieg przemiany fentionu w fasoli opryskanej 0,15% roztworem preparatu „Lebaycid". ———— ogólna zawartość insektycydów; — — — — fention; —.—.— pochodna tiometylowa fenoksonu; ×—×—× sulfotlenek fentionu; ××× sulfon fentionu; . . . . . sulfotlenek fenoksonu; ..—..— sulfon fenoksonu.

dość szybko rozkładowi; obecności fentionu nie stwierdzono już po 12 dniach, a pochodnej tiometylowej — po 6 dniach od zabiegu. W trzy godziny po zabiegu oprócz w/w związków wykrywano sulfotlenki fentionu i fenoksonu. Najdłużej w roślinach utrzymywał się sulfotlenek fentionu. Niewielkie jego ilości (0,3 mg/kg) stwierdzono jeszcze w 30 dniu

po zabiegu. Sulfotlenek fenoksonu uległ szybciej rozkładowi, nie wykrywano go po 22 dniach. Największe stężenie tych związków wystąpiło w 4 dniu po zabiegu. Obecność sulfonów fentionu oraz fenoksonu stwierdzano tylko przez kilka dni.

We wszystkich próbach fasoli podlewanej roztworem Lebaycidu (rycina 2) nie wykrywano związku macierzystego, tj. fentionu i pochodnej



Ryc. 2. Przebieg przemiany fentionu w fasoli podlanej 1% roztworem preparatu „Lebaycid". ———— ogólna zawartość insektycydów; ×—×—× sulfotlenek fentionu; ××× ×sulfon fentionu; . . . . . sulfotlenek fenoksonu; ..—..— sulfon fenoksonu.

tiometylowej fenoksonu. Pozostałości metabolitów utrzymywały się dłużej niż w doświadczeniu I-szym. Obecność sulfotlenku fentionu stwierdzano jeszcze w 42 dniu po zabiegu. Największe stężenie insektycydów w tych roślinach występowało w 8-mym dniu (12 mg/kg) od zastosowania preparatu.

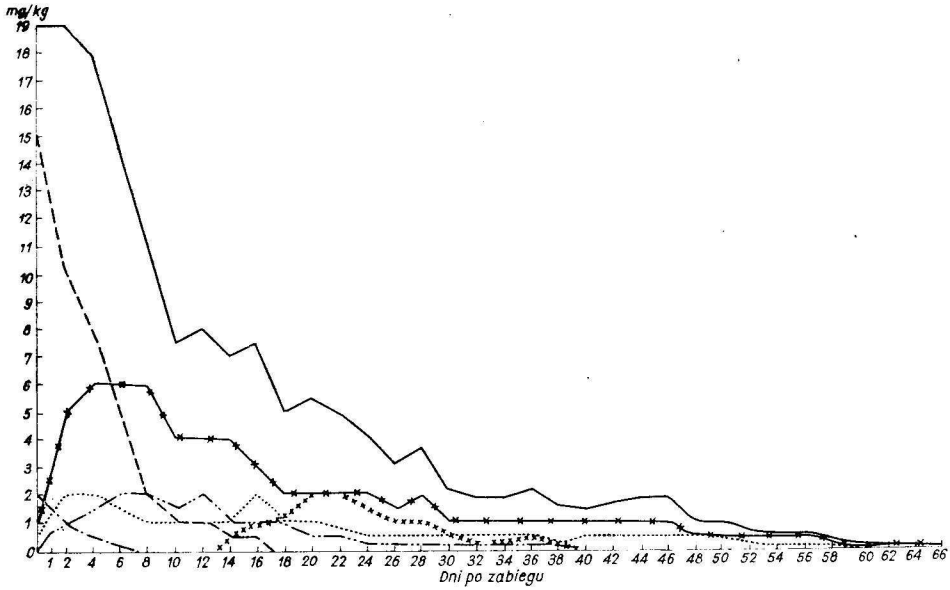
Doświadczenie to wykazało, że metabolity fentionu są pobierane z gleby przez korzenie i wraz z sokami rozprowadzane po całej roślinie.

Powstawanie metabolitów w czarnych porzeczkach (rycina 3) przebiegało podobnie jak w doświadczeniu z fasolą opryskiwaną, z tym, że pozostałości tych związków utrzymywały się przez bardzo długi okres czasu. Obecność sulfotlenku fentionu stwierdzono jeszcze po 64 dniach, a sulfotlenku fenoksonu po 56 dniach po zabiegu. Wiąże się to częściowo z małym przyrostem „masy porzeczek". Owoce porzeczek w czasie zabiegu były zielone, ale już dość duże; do 24 dnia (4.VII.) po zabiegu przeważały porzeczki zielone, a od 36 dnia (16.VII.) — porzeczki czarne. Przyrost „masy fasoli" był znacznie większy.

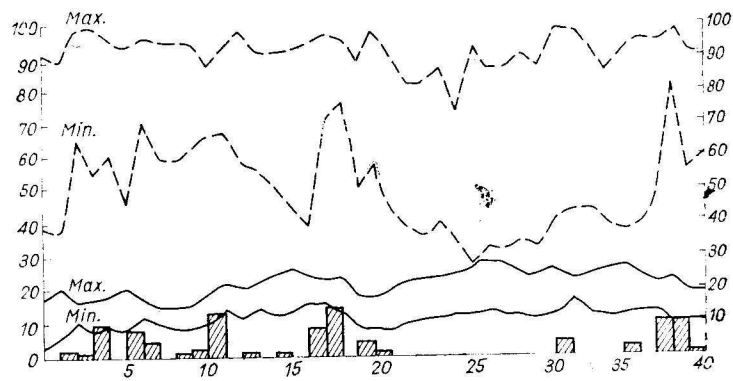
Zarówno w fasoli jak i w owocach czarnych porzeczek nie stwierdzano obecności fenoksonu, ani sulfotlenku i sulfonu formy tiometylowej fenoksonu.

W tabeli IV i V przedstawiono niektóre dane meteorologiczne zanotowane w czasie przeprowadzanych doświadczeń.

W okresie doświadczeń z fasolą (ryc. 4) wystąpiło 18 dni z opadami, w tym 11 dni z opadami poniżej 5 mm, a 7 dni — powyżej 5 mm. Dni z temperaturą maksymalną poniżej 20° i minimalną poniżej 10° było około 10. Najniższa temperatura i opady wystąpiły w ciągu pierwszych



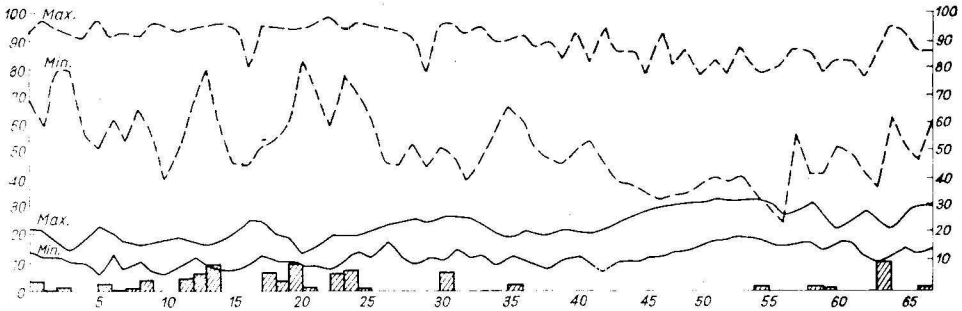
Ryc. 3. Przebieg przemiany fentionu w czarnych porzeczkach opryskanych 0,15% roztworem preparatu „Lebaycid". ———— ogólna zawartość insektycydów; – – – – – fention; —.—.— pochodna tiometylowa fenoksonu; ×—×—× sulfotlenek fentionu; ×××× sulfon fentionu; . . . . . sulfotlenek fenoksonu; ..—..— sulfon fenoksonu.



Ryc. 4. Dane meteorologiczne w okresie doświadczeń z fasolą; – – – – – wilgotność w procentach; ———— temperatura w stopniach; ///// opady w mm.

10 dni doświadczenia, natomiast od 21 do 37 dnia po zabiegu nie notowano prawie opadów, a temperatura dochodziła do 30°. Pogoda raczej typowa dla naszego klimatu.

W czasie doświadczenia z porzeczkami (ryc. 5) było 24 dni z opadami (16 dni poniżej 5 mm, 8 dni powyżej 5 mm). Dni z temperaturą maksymalną poniżej 20° notowano przez 15, a minimalną poniżej 10° przez 12 dni. Najwięcej opadów było pomiędzy 10 a 15 dniem, zaś najzimniejszy okres przypadł na początkowe dni doświadczenia. Od 30 dnia wystąpił okres suszy i bardzo wysokich temperatur przekraczających często



Ryc. 5. Dane meteorologiczne w okresie doświadczeń z czarnymi porzeczkami. — — — — wilgotność w procentach; ———— temperatura w stopniach; ///// opady w mm.

30°, co spotyka się dość rzadko w naszym klimacie.

Fasola i krzewy porzeczek przez okres 7 dni po zabiegu chroniono przed opadami celem zapobiegnięcia zmycia preparatu z powierzchni roślin.

WNIOSKI

1. W roślinach opryskiwanych preparatem „Lebaycid" oprócz fentionu, którego obecność stwierdzano tylko przez krótki okres czasu po zabiegu, wykrywano cztery jego metabolity: sulfotlenek i sulfon fentionu oraz sulfotlenek i sulfon fenoksonu.

2. W roślinach podlewanych tym preparatem nie stwierdzono fentionu, tylko jego metabolity.

3. Niezależnie od rodzaju roślin i sposobu wykonywania zabiegu głównymi metabolitami były sulfotlenki, przy czym najdłużej utrzymywał się w roślinach sulfotlenek fentionu.

4. Opracowana metoda oznaczania pozostałości fentionu i jego metabolitów jest prosta i łatwa w wykonaniu; sprawdzono ją na materiale podanym zabiegom ochrony roślin, tak że może być zalecona Stacjom San.-Epid. do oznaczeń seryjnych.

Я. Задрозиньска

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ ПЕРЕМЕНЫ ФЕНТИОНА В ИЗБРАННЫХ РАСТЕНИЯХ

Содержание

Предметом исследований были растения стручковой фасоли и фрукты черной смородины подвергнутые действию препарата „Labaycid" фирмы Bayer содержащего 50% фентиона.

Проделано 3 испытания: в I-вом — с растениями фасоли и в II-ором с кустами черной смородины, которые опрыскано 0,15% раствором Labaycid'a, а в III-ем с растениями фасоли, которые поливали 1% раствором этого препарата.

Пробы для исследования брали каждые два дня до момента исчезновения остатков метаболитов фентиона.

Определение инсектицидов совершено методом хроматографии в тонком слое в соединении с энзиматическим методом.

В растениях, кроме фентиона, присутствие которого обнаруживано в коротком периоде времени после опрыскивания, — обнаружено четыре его метаболиты: сульфоокись и сульфофентион а также сульфоокись и сульфон фоноксона.

В фасоли, которую поливали 1% раствором Labaycid'a не обнаружено фентиона а только его метаболиты.

Независимо от рода растений и способа совершения агротехнических приемов — главными метаболитами были сульфоокиси.

Сульфоокись фентиона удерживалась самое продолжительное время: 30 дней в опрыскиваемой фасоли, 42 дня в полеваемой фасоли и 64 дня в черной смородине.

J. Zadrozińska

A STUDY OF THE PHENTHION BREAKDOWN IN SELECTED PLANTS

Summary

The subject of the study were plants of broken beans, and fruits of black currant treated with the preparation „Lebaycid" manufactured by Bayer and containing 50 per cent of phenthion.

Three kinds of experiments were done: in the first the plants of broken beans were sprinkled with 0.15% Lebaycid solution; in the second the same was done with the fruits of currant; in the third experiment the beans were watered with the 1% solution of this preparation.

The samples for the study were taken in two-day intervals, until total decay of. phenthion metabolite residues. The assessment of insecticides was done using thin-layer chromatography, coupled with the enzymatic method. In the plants under preatment, aside from phenthion, presence of which has been encountered only for a short period following the experimental procedure, four its metabolites were found, namely: phention sulphoxide and sulphone, as well as phenoxon sulphoxide and sulphone.

In the watered beans only the phention metabolites, but no phention, were found. Irrespective of the kind of a plant used and of the treatment procedure, sulphoxides were the main metabolites. Phenthion sulphoxide was the most durable compound: it was still found after 30 days in the sprinkled beans, 42 days in the watered beans, and after 64 days in black currant following treatment.

PIŚMIENNICTWO

1. *Niessen H., Tietz H., Frehse H.:* J. Chromatog., 1962, 9, 111. — 2. *Zadrozińska J.:* Roczn. PZH, 1970, 21, 345. — 3. *Young S. Y., Berger Rs.:* J. Econ. Entomol., 1969, 62, 727. — 4. *Stone B. F., Brown W. A.:* Bull. Wld. Hlth. Org., 1969, 40, 401. — 5. *Brady U. E. Jr., Arthur B. W.:* J. Econ. Entomol., 1961, 54, 1232. — 6. *Browman M. C., Leuch D. B., Johnsa J. C., Knox F. E.:* J. Econ. Entomol., 1970, 63, 1523. — 7. *Niessen H., Tietz H., Frehse H.:* Pflanzenschutz-Nachrichten „Bayer", 1962, 15, 129. — 8. *Zadrozińska J.:* Roczn. PZH, 1972, 23, 23.

Dn. 12-III-1972 r.

Warszawa, ul. Chocimska 24.