

WITOLD ZALEWSKI

*Zakład Biologii Instytutu Warzywnictwa w Skierniewicach*

## TOKSYCZNOŚĆ ORAZ PRZEMIANY METABOLICZNE CHLORKU CHLOROCHOLINY (CCC)

### *Wstęp*

W ostatnich kilku latach opublikowano wiele prac nad zastosowaniem CCC w rolnictwie, sadownictwie lub warzywnictwie (Góra 1967). Po gruntownym przebadaniu działania tego retardanta na wielu gatunkach roślin oraz po ustaleniu jego okresów karencji, związek ten może mieć wartość utylitarną, tym bardziej, że wpływa na rozwój znacznie większej liczby gatunków roślin niż AMO 1618, fosfony lub B — 995. Szczególnie dużo opublikowanych prac dotyczyło przydatności tego związku w rolnictwie, gdyż CCC ma zapobiegać, między innymi, wyleganiu zbóż. Stosunkowo niewiele doniesień opublikowano na temat zastosowania tego preparatu w warzywnictwie, publikacje te dotyczą przeważnie działania CCC na pomidory (Birecka, Żebrowski 1966; Supniewska 1963; Will 1966), opracowano monografię odnośnie stosowania CCC w uprawie roślin (Góra 1967).

O wpływie CCC na rozwój roślin uprawnych wiemy obecnie już dość dużo, natomiast o jego przemianach metabolicznych w roślinach i w organizmach zwierzęcych, o jego ewentualnej toksyczności i okresach karencji, o czasie, po którym zostaje rozłożony w glebie — wiemy dotychczas stosunkowo mało. Celem niniejszego opracowania było zreasumowanie dotychczas opublikowanych prac dotyczących tego zagadnienia, tym bardziej, że jest ono interesujące i aktualne, a w piśmiennictwie krajowym opublikowano ostatnio doniesienie o translokacji i rozmieszczeniu w pszenicy chlorku chlorocholiny, posiadającej w grupie metylowej węgla radioaktywny (Birecka 1967).

Nadmienić również należy, że CCC jest znany od przeszło pięćdziesięciu lat. Pierwsze doniesienie o farmakologicznych właściwościach tego preparatu opublikował w 1914 r. Dale, następnie w 1932 r. von Oettingen i Eveleth (za Oettelem 1965). Stwierdzono, że CCC działa podobnie jak cholina, jednak działanie jego jest pięć razy silniejsze.

### *Działanie na rośliny i glebę*

Najczęściej stosowanymi drogami wprowadzania CCC do roślin jest oprysk lub podlewanie. W obu przypadkach większość preparatu dostaje

się do gleby i dlatego bardzo ważnym zagadnieniem jest stwierdzenie, po jakim czasie związek ten zostaje w glebie rozłożony i czy nie narusza jej równowagi mikrobiologicznej. Ażeby odpowiedzieć na to pytanie, umieszczono w szklarni o znanej wilgotności w temp. 20° wazony z czterema rodzajami gleby, do których dodawano CCC w ilości odpowiadającej stężeniu 5 kg/ha ciała czynnego (Jung 1964 i 1965). Stwierdzono, że w tych warunkach po upływie 4—6 tygodni od chwili wprowadzenia preparatu CCC został prawie całkowicie rozłożony i że dalszy rozwój roślin przebiegał już bez zakłóceń. Również bardzo interesujące okazało się przebadanie wpływu CCC na procesy oddechowe oraz nitryfikacyjne gleby. W tym celu wazony napełnione glebą gliniasto-piaszczystą z dodatkiem CCC w ilości 3, 30, 300 kg/ha trzymano w szklarni w stałej temperaturze i wilgotności, odpowiadającej 60% wilgotności względnej. W doświadczeniu tym nie stwierdzono żadnych wyraźnych zmian w ilości wydzielonego CO<sub>2</sub> oraz intensywności nitryfikacji, preparat ten okazał się więc zupełnie nieszkodliwy dla mikroflory gleby. Również w badaniach modelowych przeprowadzonych na pięciu rodzajach gleb w granicach stężeń od 3 do 300 kg/ha CCC nie zaobserwowano różnic w intensywności procesów nitryfikacyjnych. Dla porównania przebadano wpływ N-servenu (2-chlor-trichlormetylo-pirydyny) i stwierdzono, że stężenie 7 kg/ha tego preparatu powodowało całkowite zahamowanie procesów nitryfikacyjnych na przeszło 14 tygodni.

W dalszych doświadczeniach badano przez 14 dni wpływ CCC na procesy asymilacyjne młodej pszenicy. Nie stwierdzono w tym przypadku żadnych istotnych zmian, chociaż pszenica nie potraktowana CCC osiągnęła wysokość 55 cm, a potraktowana tylko 35—37 cm. Przebadano również aktywność wielu enzymów biorących udział w metabolizmie cukrowców. Przekonano się, że sacharaza nie zmienia aktywności pod wpływem CCC, podczas gdy aktywność amylazy pszenicznej wyraźnie wzrosła.

Dokonano również ilościowego oznaczenia tego retardanta w ziarnach pszenicy ozimej i jarej, opryskując ca 20 cm rośliny roztworem CCC w ilości 2 i 4 kg/ha. Analizę materiału przeprowadzano co 7 dni, a po wykształceniu się kłosów oddzielano je od części wegetatywnych i oznaczano CCC zarówno w ziarnie, jak i w słomie. Bezpośrednio po oprysku w pszenicy ozimej wykryto 2200 do 3600 ppm CCC, a w jarej 1200 do 2400 ppm. Udowodniono, że CCC ulega w roślinach bardzo szybko rozkładowi, gdyż po pięciu tygodniach od chwili opryskania tym preparatem w pszenicy ozimej wykryto już tylko 7 do 25 ppm, a w jarej 17 do 47 ppm CCC w przeliczeniu na suchą masę. Przekonano się, że ilość CCC w analizowanych roślinach jest wypadkową wielu parametrów, np. nasłonecznienia, wilgotności itp. Wyniki omawiane powyżej dotyczyły su-

czego roku 1964, w następnym, bardziej deszczowym od poprzedniego, zaobserwowano szybszy rozkład CCC w roślinach. Interesujące jest, że po spryskaniu pszenicy CCC w ilości 1,5 do 3 kg/ha, w słomie oraz w ziarnie nie stwierdzono obecności tego retardanta.

Dotychczas nie wykryto selektywnego odczynnika, za pomocą którego można by stwierdzić obecność CCC w materiale biologicznym, gdyż analogiczne reakcje jakościowe dają również związki zbliżone swą budową do CCC, mianowicie cholina i betaina. Oznaczenie ilości CCC w produktach spożywczych jest zagadnieniem bardzo ważnym i dlatego opracowano metodę semiilościowego oznaczania tego związku odczynnikiem Dragendorffa, po uprzednim chromatograficznym rozdzielaniu. Odczynnik ten umożliwia oznaczenie w ziarnie pszenicy ca 0,5 ppm CCC, a w słomie ok. 1 ppm tego związku (Jung 1965). W piśmiennictwie krajowym, o zastosowaniu odczynnika Dragendorffa do ilościowego oznaczania CCC w materiale biologicznym, zostało opublikowane doniesienie Blaima i Ciszewskiej (1967).

Wyliczono również ilość CCC przypadającą na jedną roślinę spryskanego pomidora, nie uwzględniając jednak strat powstałych przez rozproszenie, które mogą być dość znaczne i przekraczać nawet 50% ilości preparatu. W literaturze spotyka się na ten temat bardzo rozbieżne dane Will (1966) używał kilka mg preparatu „Cycocel” w przeliczeniu na roślinę pomidora będącą w stadium 4—5 liści. Birecka i Żebrowski (1966) używali 250 mg czystego CCC na roślinę. Dobrowolski i Ściążko (1967) stosowali ca 1800 mg krystalicznego CCC na jedną roślinę pomidora. W doświadczeniach polowych Zalewski i Paczesny (1967) używali na jedną roślinę przeciętnie 450 mg CCC, natomiast w doświadczeniach szklarniowych z pomidorami stosowano dawki większe, nie przekraczające jednak nigdy 2000 mg CCC w przeliczeniu na jedną roślinę. Retardantem tym spryskuje się rośliny małe, o wysokości nie przekraczającej 15—25 cm, które zaczynają owocować dopiero po 8—12 tygodniach od chwili oprysku, a więc w czasie, gdy ilość CCC w roślinach jest nieznaczna lub związku tego nie ma już wcale.

Według badań Bireckiej (1967) chlorek chlorocholiny nie podlega metabolicznym przemianom w apikalnych częściach młodych roślin. W ziarnach pszenicy, w zależności od wielu parametrów, ilość tego retardanta wahała się w granicach od 1,4 do 7 ppm

Spośród wielu prac o zastosowaniu CCC w warzywnictwie wspomnieć należy o jednym z ostatnich doniesień Willa (1968). Autor ten badał wpływ chlorku chlorocholiny na rozwój kalafiorów, ogórków, pomidorów i rzodkiewki.

Dotychczas nie wyjaśniono wielu procesów fizjologicznych zachodzą-

cych w roślinach warzywnych potraktowanych CCC. Z nierozpracowanych zagadnień wspomnieć należy o kilku, mianowicie:

- 1) w jaki sposób wpływa CCC na przemiany asymilatów w roślinie, czy powoduje zwiększenie lub zmniejszenie ich ilości;
- 2) po jakim czasie jest jeszcze ten związek w roślinach wykrywalny i w jakich ilościach jest toksyczny dla człowieka.

### *Działanie na zwierzęta*

Przeprowadzono również szereg badań farmakologicznych na myszach, szczurach, kotach, psach i świnkach morskich (Oettel 1965). W badaniach tych posługiwano się czystym CCC oraz preparatem „Cycocel”, będącym mieszaniną choliny z CCC, stwierdzono bowiem, że cholina neutralizuje szkodliwe działanie CCC. Przy stosowaniu środków ochrony roślin istnieje możliwość zatrucia na skutek bezpośredniego kontaktu danego preparatu z błoną śluzową lub skórą człowieka. Wykonano wiele doświadczeń, w których działano CCC na skórę lub błonę śluzową zwierząt doświadczalnych. Badania te przeprowadzono na białych królikach, aplikując im na pozbawioną owłosienia skórę grzbietu lub na spojówkę oka czysty CCC w postaci 50% roztworu wodnego oraz „Cycocel”. Zwierzęta obserwowano po upływie 1, 5, 15 minut oraz 20 godzin, nie stwierdzając żadnych lokalnych podrażnień. Na błonę spojówkową oka podawano również 50 mg krystalicznego CCC lub 0,05 ml „Cycocelu”. Dawki te powodowały tylko lekkie, szybko przemijające podrażnienia spojówki oka. Zaznaczyć należy, że podobne objawy zaobserwowano po wprowadzeniu na spojówkę oka 50 mg talku. Analogiczne badania toksyczności CCC przeprowadzono na otrzewnej białych królików, traktując 10 do 25% jej powierzchni 50%-owym wodnym roztworem CCC w czasie 4 lub 24 godzin. Działanie tego preparatu powodowało w tych warunkach stymulację układu nerwowego parasympatycznego. U zwierząt doświadczalnych zaobserwowano objawy ślinotoku, drżenia, chwiania się oraz nadwrażliwości.

Ostre objawy zatrucia zaobserwowano po doustnym podaniu myszom i szczurom dużych dawek CCC lub „Cycocelu”.  $LD_{50}$  dla czasu obserwacji 7 dni wynosiła 400—450 mg/kg. Stwierdzono, że  $LD_{50}$  dla preparatu zawierającego cholinę („Cycocel”) była jeszcze niższa i wynosiła 610—640 mg/kg. Dla innych ras szczurów  $LD_{50}$  wynosiła odpowiednio 660, w przypadku „Cycocelu” — 1490 mg/kg. Za pomocą chromatografii cienkowarstwowej stwierdzono pojawienie się CCC w moczu szczurów po upływie 30 minut od chwili podania tego związku. Wydalanie osiągało maksimum w czasie od 1 do 8 godzin, a po 48 godzinach nie wykrywano już nawet śladów CCC.

Stwierdzono, że świnki morskie i króliki są bardziej wrażliwe na CCC niż myszy i szczury, szczególnie wrażliwe okazały się koty. Zaobserwowano następujące objawy zatrucia u myszy, szczurów, świnek morskich i królików po podaniu im dawki subletalnej CCC lub „Cycocelu”: zataczanie się, trudności w oddychaniu, zaburzenia w utrzymaniu stałej wagi, nadwrażliwość, stany skurczowe z niechęcią do poruszania się oraz pozostawanie w pozycji brzusznej. We wszystkich doświadczeniach nie stwierdzono nigdy zmian morfologicznych w narządach wewnętrznych badanych zwierząt.

W dalszych badaniach przeprowadzono szereg obserwacji na szczurach (3 grupy po 10 sztuk), karmiąc je przez 3 miesiące pożywieniem, do którego dodano 0,5, 1,0 i 2,5% CCC. U zwierząt, którym dodawano do pożywienia 0,5% CCC, nie stwierdzono żadnych objawów zatrucia. Grupa, której dodawano do pożywienia 1% CCC, przybywała mniej na wadze; szczury, którym dodawano do diety 2,5% CCC, padały w ciągu tygodnia.

Interesujące jest, że spośród szczurów skarmianych pożywieniem zawierającym 2,5% CCC z dodatkiem 2,5% choliny, 80% przeżywało 3-miesięczny okres badań, co świadczyłoby, że cholina jest specyficznym antidotum na CCC. W celu gruntowniejszego przebadania tego zagadnienia, przeprowadzono doświadczenie trwające 18 miesięcy. Do badań użyto szczury o wadze ca 60 g, dzieląc je na 7 grup, z których każda składała się z 50 samców i tyluż samic. Szczurom tym dodawano do pożywienia 500 oraz 1000 ppm CCC z dodatkiem i bez dodatku choliny.

Innej grupie zwierząt dodawano do pożywienia 5000 ppm CCC oraz 3500 ppm choliny. U zwierząt tych nie stwierdzono żadnych objawów zatrucia, nie zanotowano ubytku wagi ciała ani żadnych zmian klinicznych czy biochemicznych. W grupie szczurów, którym dodawano do diety 1000 ppm CCC z dodatkiem 700 ppm choliny, zaobserwowano zwiększoną liczbę osobników tumorowatych, natomiast w grupie, której podawano jeszcze większe dawki CCC, stwierdzono mniejszą liczbę zwierząt z objawami tych zaburzeń.

W innych doświadczeniach przeprowadzonych na myszach, szczurach i królikach, którym podawano przez wiele tygodni doustnie lub parenteralnie CCC, nie zaobserwowano żadnych teratogennych zmian. Na podstawie przeprowadzonych badań autorzy przypuszczają, że CCC nie działa kancerogennie.

W doświadczeniach przeprowadzonych na psach stwierdzono wstępnie, że podawanie zwierzętom piętnastokrotnie po 25 mg CCC na kg wagi zwierzęcia, za pomocą sondy żołądkowej, powodowało silne zatrucie. W innych badaniach karmiono 4 psy przez okres 12 miesięcy ca 300 ppm CCC, stwierdzając u nich tylko lekki ślinotok. Badania te zachęciły do kontynuowania doświadczenia z czterema grupami psów, podając zwie-

rzętom do każdego posiłku 100, 300, 1000 ppm CCC. Oprócz tego jednej grupie psów podawano 1000 ppm CCC z dodatkiem 700 ppm choliny. Grupę kontrolną psów karmiono bez dodatku CCC. Wszystkie badane zwierzęta zjadały dziennie ca 350 g pożywienia. Psy, którym podawano pokarm z dodatkiem 100 i 300 ppm CCC, nie wykazywały żadnych symptomów zatrucia. U psów, którym dodawano do pożywienia 1000 ppm CCC, w pierwszych miesiącach doświadczenia zaobserwowano ślinotok, występujący w kilka godzin po zjedzeniu posiłku. Na uwagę zasługuje fakt, że psy, którym podawano w pożywieniu 1000 ppm CCC z dodatkiem 700 ppm choliny, nie wykazywały żadnych objawów zatrucia. Przypuszcza się więc, że cholina działa jako specyficzna odtrutka (antidotum), gdyż powoduje znaczne zmniejszenie toksyczności CCC lub całkowicie tę toksyczność znosi.

W ostatnich kilku latach starano się możliwie wszechstronnie przebadać działanie CCC, oznaczając pozostałości tego retardanta w glebie (Jung 1964 i 1965; Linser i inni 1965), roślinach (Jung 1965; Mayr i Presoly 1961) oraz sprawdzając jego toksyczność na zwierzętach (Oettel 1965). Udowodniono, że w roślinach, glebie oraz w ciele zwierząt CCC bardzo szybko się rozkłada. Po upływie 4—6 tygodni od czasu zastosowania tego preparatu, w roślinach wykrywano tylko znikome jego ilości, kilkaset razy mniejsze od ilości początkowej lub nie wykrywano go wcale. Również dla zwierząt preparat ten nie jest zbyt toksyczny, stwierdzono bowiem, że  $LD_{50}$  przy ostrym zatruciu, po 7 dniach doświadczenia wynosiła 400—450 mg CCC/kg. Po przeliczeniu  $LD_{50}$  na 60 kg szczurów (taka jest bowiem średnia waga człowieka), dawka ta wyniesie 27 g CCC dziennie. Ponieważ preparat podawano zwierzętom przez 7 dni, każde z nich otrzymało globalnie po 180 g CCC. Należy jednak podkreślić, że wyliczenie to jest tylko orientacyjne, określające w pewnym przybliżeniu dawki toksyczne dla człowieka, gdyż organizm ludzki może całkiem inaczej reagować na CCC, niż szczury, np. koty są o wiele bardziej wrażliwe na CCC, niż inne badane zwierzęta.

#### *Występowanie pochodnych choliny w przyrodzie*

Jak już nadmieniono w niniejszym doniesieniu, specyficzną odtrutką na CCC jest cholina, występująca powszechnie w świecie roślinnym oraz zwierzęcym (Blaim 1962, 1967; Lasota 1962). Cholina w ustroju ludzkim spełnia ważną rolę w przemianie tłuszczowej, jako czynnik lipotropowy, pobudzający i ułatwiający syntezę tłuszczowców prostych i złożonych. Dość duże ilości choliny, prawie takie jak witaminy C, znajdują się w kapuście, kalafiorach, selerach, ogórkach, marchwi, kalarepie, cebuli (Lasota 1962) oraz w grzybach (Kotowska, Młodecki 1962). Według danych

z literatury, dzienne zapotrzebowanie dorosłego człowieka na cholinę wynosi od 0,7 do 3,0 g — zapotrzebowanie to uzupełniane jest częściowo warzywami. Wynika z tego, że w diecie człowieka znajdują się dość duże ilości choliny, będącej między innymi specyficznym antidotum na CCC.

Nadmienić również należy, że przy stosowaniu CCC w uprawach roślin zbożowych bardzo ważnym zagadnieniem jest stwierdzenie, czy związek ten nie powoduje zmian w składzie aminokwasowym białek roślinnych. Z fizjologicznego punktu widzenia problem ten jest bardzo ważny, ponieważ zmiana sekwencji aminokwasów w łańcuchu peptydowym ma również wpływ na biologiczną wartość protein. Z przeprowadzonych na ziarnach pszenicy badań wynika (Bayzer i Mayr 1966), że w strukturze białek pod wpływem CCC nie zachodzą żadne zmiany.

### Wnioski

Na podstawie dotychczas przeprowadzonych badań nie można wypowiedzieć się autorytatywnie w sprawie toksyczności CCC dla człowieka. Wyniki doświadczeń przeprowadzonych na zwierzętach nie upoważniają do wyciągania wniosków odnośnie działania tego związku na organizm ludzki. Zagadnienie to wymaga dokładniejszego opracowania. Szczególnie ważne jest ustalenie okresów karencji oraz toksyczności preparatu, ażeby z punktu widzenia higieny żywienia nie było żadnych zastrzeżeń odnośnie jego stosowania.

### LITERATURA

1. Bayzer H., Mayr H. H.: Einfluss von Chlorcholinchlorid (CCC) auf die Aminosäurezusammensetzung der Weizenkornproteine. Zeitschr. Lebensmittel. Untersuch. u. Forsch., 1966, 128. s. 340—345.
2. Birecka H., Żebrowski Z.: influence of (2-chloroethyl) trimethyloammonium chloride (CCC) on photosynthetic activity and resistance of tomato plants. Bull. Acad. Pol. Sci. ser. biol. 1966. 14. 367 — 372.
3. Birecka H.: Translocation and Distribution of <sup>14</sup>C-labelled (2-chloroethyl) Trimetylammonium (CCC) in Wheat. Bull Acad. Pol. Sci. ser. biol. 1967, 15, 707 — 714.
4. Blaim K.: O występowaniu betain i choliny w nasionach. Roczniki Nauk Rolniczych, 1962. 86 — A — 3, 527 — 531.
5. Blaim K.: Czwartorzędowe związki amonowe i ich znaczenie biologiczne. Postępy Nauk Rolniczych, 1967. 14, 53 — 63.
6. Blaim K., Ciszewska R.: Zastosowanie odczynnika Dragendorffa do celów analizy ilościowej. Chemia Analityczna, 1967, 12, 761—764.
7. Dobrowolski J., Ściażko D.: Enzymany oksydoredukcyjne w roślinach pomidorów chlorocholinowanych. Praca w druku, 1967.
8. Góra B.: Możliwości stosowania CCC w uprawie roślin. C. B. R. Warszawa, 1967.

9. Jung J.: Über den Einfluss von CCC auf biologische Vorgänge im Boden. Zeitschr. Pflanzenernährung, Düngung, Bodenkunde. 1964, 107, 153—157.
10. Jung J.: Das Verhalten von CCC in Pflanzen und Boden. Materiały sympozjum Limburgerhof. Grudzień. 1965.
11. Kotowska Z., Młodecki H.: Zawartość choliny w niektórych grzybach jadalnych i niejadalnych Roczniki P. Z. H. 1962, 13, 359—364.
12. Lasota W.: Badania nad zawartością choliny w grzybach i warzywach. Przemysł Spożywczy, 1962, 16, 32—35.
13. Linser H., Kühn J., Bohring J.: Der Abbau von CCC in Boden und sein Nachweis mit geeigneten CCC-Bestimmungsmethoden. Zeitschr. f. Pflanzenernährung, Düngung, Bodenkunde. 1965, 108, 57—65.
14. Mayr H. H., Presoly E.: Zum Nachweis von chlorcholinchlorid in Pflanzen. Planta, 1961, 57, s. 478—480.
15. Oettel H. i współprac.: Zur Toxizität von chlorcholinchlorid (CCC). Materiały sympozjum Limburgerhof. Grudzień 1965.
16. Supiewska H.: Observation on the action of trimethyl - $\beta$ -chlorethylammonium chloride on plants. Bull. Acad. Pol. Ser. Sci. Biol. 1963, 11, 149—155.
17. Will H.: Erste Versuchsergebnisse mit Cycocel zu Tomaten. Die Gartenbauwissenschaft, 1966, 31, 115—123.
18. Will H.: Cycocel im Gemüsebau — Anwendungsmöglichkeiten bei Tomaten, Gurken, Rettich und Blumenkohl. Gemüse, 1968, nr 1.
19. Zalewski W., Paczesny Z.: 1967 — wyniki nieopublikowane.