

Zakład Chemii Toksykologicznej. Instytut Analizy i Technologii Farmaceutycznej.  
Akademia Medyczna w Lublinie  
Kierownik: doc. dr hab. Stanisław Szczepaniak

Henryk ROMANOWSKI

**Wpływ chlorku (2-hydroksyetylo)-trójmetyloamoniowego  
(chlorku choliny — CC) na resorpcję i wydalanie chlorku chlorocholiny  
(CCC) u szczurów**

Влияние хлорида (2-гидроксиэтил)-триметилоамониевого (хлорида холина — CC)  
на впитывание и удаление хлорида хлорхолина (CCC) у крыс

The Influence of (2-hydroxyethyl)-trimethylammonium Chloride (Choline Chloride  
— CC) on the Resorption and Excretion of Chlorocholine Chloride (CCC) in Rats

Ostatnio przeprowadza się próby łącznego stosowania regulatora wzrostu roślin oraz „antywylegacza” zbóż chlorku chlorocholiny (chlorku 2-chloroetylotrójmetyloamoniowego, CCC, Chloromekwatu) m.in. z herbicydami, jak kwas 2,4-dwuchlorofenoksyoctowy (2,4-D) czy 2,2-dwumetylohydrazyd kwasu bursztynowego (Alar) (1, 3—8, 11, 13, 14, 17), oraz z chlorkiem (2-hydroksyetylo)-trójmetyloamoniowym — chlorkiem choliny (CC) (2, 6, 7, 9, 10, 18). W związku z tym celowe wydaje się prowadzenie badań nad ich wpływem na toksyczne oddziaływanie CCC i co się z tym m.in. wiąże — na szybkość resorpcji i wydalania chlorku chlorocholiny u szczurów. W poprzednich pracach prowadzono takie sprawdziany w odniesieniu do DDT (12) oraz wzmiankowanych herbicydów: 2,4-D (13) i Alaru (14).

W niniejszej pracy przeprowadzono kolejny sprawdzian dotyczący wpływu chlorku choliny (CC), uważanego za odtrutkę na CCC (2, 6, 7, 9, 10, 18), na resorpcję i wydalanie chlorku chlorocholiny u szczurów. Uzyskane wyniki mogą być przydatne do oceny wpływu chlorku choliny na toksyczne oddziaływanie chlorku chlorocholiny na zwierzęta stałocieplne oraz do ewentualnego potwierdzenia celowości stosowania CC jako odtrutki na ten związek. Ma to swoje znaczenie ze względu na możliwości zatrucenia chlorkiem chlorocholiny szeroko stosowanym w ogrodnictwie, sadownictwie, głównie w rolnictwie.

W pracy zastosowano uprzednio opracowane dla chlorku chlorocholiny metody chromatografii bibułowej i kolorymetrii (15, 16), jego ekstrakcji z moczu szczurów wraz z określeniem wartości odzysku CCC (12).

## BADANIA WŁASNE

WPLYW CHLORKU CHOLINY (CC) NA RESORPCJĘ CHLORKU CHLOROCHOLINY (CCC)  
Z PRZEWODU POKARMOWEGO SZCZURÓW

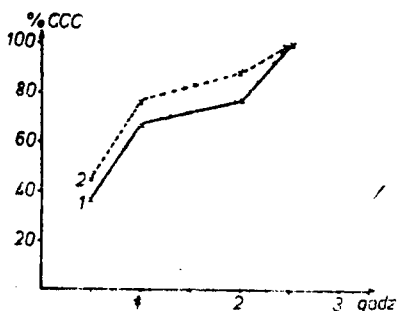
Badania resorpcji przeprowadzono na białych szczurach rasy „Wistar” o c.c. 160—220 g, żywionych znormalizowaną karmą (LSM) w oświetlonym pomieszczeniu o temp. 20°C. Roztwory wodne CCC i CC podawano sondą metalową do żołądków szczurów. Badania przeprowadzono w 4 grupach szczurów. Dwu pierwszym grupom podano jednorazowo wodne roztwory CCC, z tym że pierwszej — po 0,05 g/kg, a drugiej — po 0,1 g/kg, trzeciej zaś — 0,05 g/kg CCC i 0,1 g/kg CC, a czwartej — 0,1 g/kg CCC i 0,2 g/kg CC. Poszczególne grupy podzielono na 4 podgrupy: a, b, c i d — po 4 szczury w każdej.

Szczury poszczególnych grup zabijano po upływie: a — 1/2, b — 1, c — 2 i d — 3 godz. od chwili podania CCC. Wyizolowane żołądki wraz z treścią, dwunastnicę, jelita cienkie, jelita grube ekstrahowano uprzednio opracowanym sposobem (15).

Oznaczenia ilościowe CCC przeprowadzono w acetonowych eluatach czerwonych płam, charakterystycznych dla CCC, o wartości  $R_f=0,48$  (16), uzyskanych w trakcie badań ekstraktów z żołądków wraz z treścią. Nie stwierdzono obecności CCC w ekstraktach poszczególnych części przewodu pokarmowego poza żołądkiem.

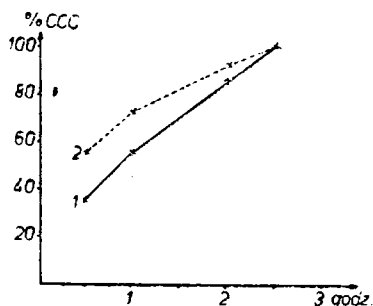
Oceny ilościowej chromatogramów dokonano kolorymetrycznie, posługując się uprzednio skalibrowaną krzywą wzorcową dla CCC w zakresie 0,01—0,15 mg. Wykrywalność — 0,001 mg, dokładność metody — 1,92% (16). Oznaczenia ilościowe pozostałego w żołądku i jego treści pokarmowej szczurów chlorku chlorocholiny pozwoliły wyliczyć (w %) resorpcję tego związku.

Otrzymane wyniki, dotyczące wpływu chlorku choliny (CC) na intensywność i czas resorpcji w zależności od jego dawek, zilustrowano w przypadku mniejszej — na ryc. 1, a większej — na ryc. 2.



Ryc. 1. Resorpcja CCC z żołądków szczurów po zatruciu dawką 0,05 g/kg: 1 — bez podania CC, 2 — po podaniu CC

Resorption of CCC in the stomach of the rats intoxicated with 0.05 g/kg of body weight: 1 — rats given CC, 2 — rats not given CC



Ryc. 2. Resorpcja CCC z żołądków szczurów po zatruciu dawką 0,1 g/kg: 1 — bez podania CC, 2 — po podaniu CC

Resorption of CCC in the stomach of the rats intoxicated with 0.1 g/kg of body weight: 1 — rats given CC, 2 — rats not given CC

Wyniki te, ujęte statystycznie, podano w tab. 1. W obliczeniach statystycznych uwzględniono:

$\bar{x}_1$  — średnią arytmetyczną oznaczeń CCC bez podania chlorku choliny;

$\bar{x}_2$  — średnią arytmetyczną oznaczeń CCC po podaniu chlorku choliny;

$\bar{x}_1 - \bar{x}_2$  — różnicę wyżej wymienionych średnich arytmetycznych;

$\bar{S}_1$  — odchylenie standardowe średnich arytmetycznych oznaczeń CCC bez podania chlorku choliny;

$\bar{S}_2$  — odchylenie standardowe średnich arytmetycznych oznaczeń CCC po podaniu chlorku choliny;

$S_d = \frac{\sqrt{\frac{\bar{S}_1^2}{n_1} + \frac{\bar{S}_2^2}{n_2}}}{n - 1}$  — losowy błąd różnicy średnich;

$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{S_d}$  — jeśli  $n_1 = n_2$  — wartość funkcji Studenta, uzyskaną w trakcie badań;

$t_0$  — wartość graniczną funkcji Studenta, zawartą w tablicy dla 95% prawdopodobieństwa i odpowiedniej liczby (6) swobody  $N_1 + N_2 - 2$  ( $N_1$  — liczba szczurów badanych przed podaniem chlorku choliny,  $N_2$  — liczba szczurów badanych po podaniu chlorku choliny).

#### WPLYW CHLORKU CHOLINY (CC) NA WYDALANIE CHLORKU CHLOROCHOLINY (CCC) U SZCZURÓW

W 4 kolejnych seriach (po 4 szczury) znajdującym się w klatkach metabolicznych szczurom (w 20°) podawano do żołądków wodne roztwory tych samych związków (CCC i CC) i w tych samych dawkach jak w trakcie badania procesu wchłaniania.

Po upływie 8, 24 i 32 godz. zbierano kał i mocz, które ekstrahowano opracowanym sposobem (12, 15), oczyszczone ekstrakty badano chromatograficznie i kolorymetrycznie (16). W moczu zebranym po 32 godz., a kale — po 8, 24 i 32 godz. nie stwierdzono chlorku chlorocholiny.

Wyniki ilościowych (w %) oznaczeń CCC wydalonego z moczem w zależności od czasu ekspozycji (po 8 i 24 godz.) w seriach bez podania CC i po podaniu CC w zależności od wielkości dawek podano na ryc. 3 i 4:

Statystyczną ocenę podanych na tych wykresach wyników zestawiono w tab. 2.

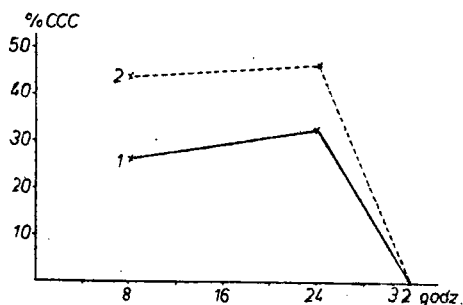
#### WPLYW CHLORKU CHOLINY (CC) NA WYDALANIE CHLORKU CHLOROCHOLINY (CCC) U SZCZURÓW W SKRÓCONYM (8-TYGODNIOWYM) ZATRUCIU PRZEWLEKŁYM

W kolejnych 4 seriach (po 4 szczury) 16 szczurom znajdującym się w klatkach metabolicznych (w 20°C) przez 8 tygodni codziennie podawano do żołądków wodne roztwory tych samych jak poprzednio związków, tj. CCC w dawkach po 0,0125 i 0,025 g/kg oraz CC — odpowiednio po 0,025 i 0,05 g/kg. Codziennie zbierano mocz, który ekstrahowano opracowanym sposobem (12, 15), oczyszczone ekstrakty badano chromatograficznie i kolorymetrycznie (16).

Wyniki ilościowych (w %) oznaczeń CCC wydalonego z moczem podczas skróconego przewlekłego zatrucia w seriach bez podania i po podaniu chlorku choliny (CC) w zależności od dawek przedstawiono w przypadku mniejszej dawki — na ryc. 5, a większej — na ryc. 6.

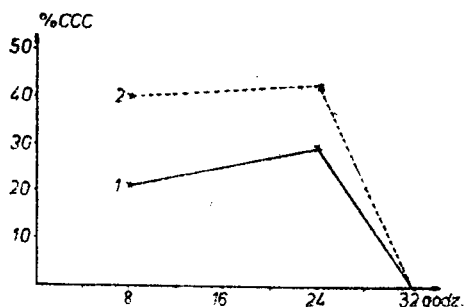
Uzyskane wyniki, ujęte statystycznie, podano odpowiednio w tab. 3.

Badano również, wg podanej metodyki, w wyżej wymienionych 4 seriach re-sorpcję CCC po upływie jednej doby od ostatniego podania CCC oraz CCC wraz z CC — w ekstraktach z żołądków oraz jelit cienkich i grubych. Nie stwierdzono chromatograficznie chlorku chlorocholiny. Świadczy to, że CCC nie kumuluje się w tych narządach szczurów podczas przewlekłego zatrucia.



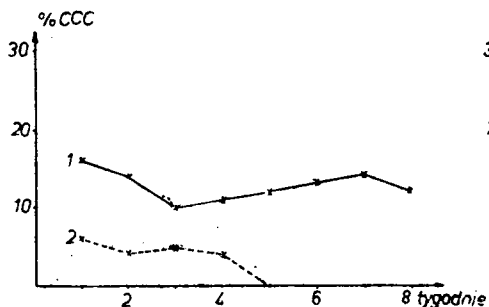
Ryc. 3. Wydalanie CCC z moczem szczurów po jednorazowym zatruciu dawką 0,05 g/kg; 1 — bez podania CC, 2 — po podaniu CC

Excretion of CCC in the urine of the rats intoxicated once with 0.05 g/kg of body weight: 1 — rats given CC, 2 — rats not given CC



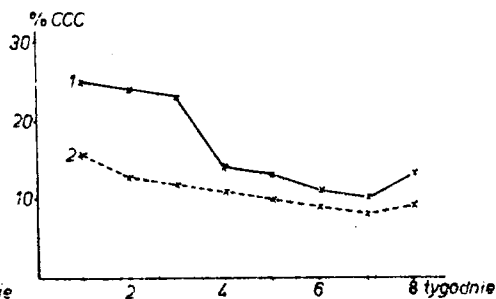
Ryc. 4. Wydalanie CCC z moczem szczurów po jednorazowym zatruciu dawką 0,1 g/kg; 1 — bez podania CC, 2 — po podaniu CC

Excretion of CCC in the urine of the rats intoxicated once with 0.1 g/kg of body weight: 1 — rats given CC, 2 — rats not given CC



Ryc. 5. Wydalanie CCC z moczem szczurów podczas 8-tygodniowego zatrucia dawką 0,0125 g/kg; 1 — bez podania CC, 2 — po podaniu CC

Excretion of CCC in the urine of the rats intoxicated for 8 weeks with a daily dose of 0.0125 g/kg of body weight: 1 — rats given CC, 2 — rats not given CC



Ryc. 6. Wydalanie CCC z moczem szczurów podczas 8-tygodniowego zatrucia dawką 0,025 g/kg; 1 — bez podania CC, 2 — po podaniu CC

Excretion of CCC in the urine of the rats intoxicated for 8 weeks with a daily dose of 0.025 g/kg of body weight: 1 — rats given CC, 2 — rats not given CC



Tab. 2. Statystyczna ocena istotności różnic w wielkości wydalania CCC z moczem szeszurów po jednorazowym zatruciu bez podania i po podaniu CC ( $N=4$ )

Statistical significance of the CCC excretion values in the urine of the rats non-intoxicated and intoxicated with CC

Dawka CCC g/kg	Badane grupy	Okres po zatruciu w godz.	% wydalania		$\bar{x}_1 - \bar{x}_2$	$S_x$	$t$	$t_0 (0,05)$	Wniosek
			$\bar{x}_1$	$\bar{x}_2$					
0,05	bez podania CC po podaniu CC	8	26	44	18	4,55	3,96	2,44	istotność
	bez podania CC po podaniu CC	24	32	46	14	3,15	4,44	2,44	wysoka istotność
	bez podania CC po podaniu CC	32	—	—	—	—	—	—	—
0,10	bez podania CC po podaniu CC	8	21	40	19	4,45	4,24	2,44	wysoka istotność
	bez podania CC po podaniu CC	24	29	42	13	3,75	3,49	2,44	istotność
	bez podania CC po podaniu CC	32	—	—	—	—	—	—	—

Tab. 3. Statystyczna ocena istotności różnic w wielkości wydalania CCC z moczem szczurów podczas 8-tygodniowego zatrucia bez podania i po podaniu CC (N=4)  
 Statistical significance of the CCC excretion values in the urine of the rats intoxicated with CCC for 8 weeks, non-intoxicated and intoxicated with CC

Dawka CCC g/kg	Badane grupy	Okres po zatruciu w tygodn.	% wydalania		$\bar{x}_1 - \bar{x}_2$	$S_T$	t	$t_0 (0,05)$	Wniosek
			$\bar{x}_1$	$\bar{x}_2$					
0,0125	bez podania CC po podaniu CC	1	16	6	10	2,18	4,58	2,44	wysoka istotność
	bez podania CC po podaniu CC	2	14	4	10	2,03	3,80	2,44	istotność
	bez podania CC po podaniu CC	3	10	5	5	1,81	2,76	2,44	istotność
	bez podania CC po podaniu CC	4	11	4	7	2,28	3,06	2,44	istotność
	bez podania CC po podaniu CC	5	12	—	—	—	—	—	—
	bez podania CC po podaniu CC	6	13	—	—	—	—	—	—
	bez podania CC po podaniu CC	7	14	—	—	—	—	—	—
	bez podania CC po podaniu CC	8	12	—	—	—	—	—	—
0,025	bez podania CC po podaniu CC	1	25	16	9	2,23	4,03	2,44	istotność
	bez podania CC po podaniu CC	2	24	13	11	2,78	3,95	2,44	istotność
	bez podania CC po podaniu CC	3	23	12	11	2,55	4,31	2,44	wysoka istotność
	bez podania CC po podaniu CC	4	14	11	3	1,05	2,85	2,44	istotność
	bez podania CC po podaniu CC	5	13	10	3	0,95	3,15	2,44	istotność
	bez podania CC po podaniu CC	6	11	9	2	1,41	1,41	2,44	—
	bez podania CC po podaniu CC	7	10	8	2	0,60	3,33	2,44	istotność
	bez podania CC po podaniu CC	8	13	9	4	1,03	3,88	2,44	istotność

## OMÓWIENIE WYNIKÓW

Z danych uzyskanych w trakcie badań (ryc. 1 i 2) wynika, że pod wpływem chlorku choliny (CC) (0,1 i 0,2 g/kg) czas resorpcji CCC (podanego odpowiednio (2 : 1) w dawkach, tj. 0,05 i 0,01 g/kg) nie zmienił się, tylko jej intensywność uległa przyspieszeniu, charakteryzującemu się statystyczną znamiennością ( $p < 0,05$ ), zarówno po upływie 1/2, jak i po 1 i 2 godz. (tab. 1).

W trakcie dalszych badań stwierdzono, że wielkość wyżej wymienionych dawek oraz stosowanie chlorku choliny po jednorazowym podaniu nie wpływa na czas (wynoszący ok. 24 godz.), lecz na intensywność wydalania chlorku chlorocholiny z moczem szczurów (ryc. 3 i 4). Wykazano statystycznie istotny ( $p < 0,05$ ), zwiększający wpływ chlorku choliny na intensywność tego procesu w przypadku obu dawek po 8 i 24 godz. (tab. 2).

W czasie zaś skróconego (8-tygodniowego) przewlekłego zatrucia szczurów chlorkiem chlorocholiny, w przypadku podawania codziennie po 0,0125 i 0,025 g/kg wykazano statystycznie istotny ( $p < 0,05$ ), inny niż po jednorazowym podaniu, bo opóźniający wpływ chlorku choliny na intensywność wydalania CCC z moczem szczurów (ryc. 5 i 6, tab. 3). Oddzielnie należy zaznaczyć, że w przypadku skróconego (8-tygodniowego) przewlekłego zatrucia mniejszą dawką (0,0125 g/kg) wydalanie CCC po upływie ok. 4 tygodni pod wpływem chlorku choliny (w dawce po 0,025 g/kg) uległo zupełnemu zahamowaniu (ryc. 5).

Na podstawie uzyskanych wyników można sądzić o celowości stosowania (2 : 1) chlorku choliny jako odtrutki na CCC po jednorazowym zatruciu dawkami 0,05 i 0,1 g/kg, ponieważ zachodzi zwiększenie intensywności resorpcji i wydalania tego związku u szczurów, a tym samym, jak się wydaje, zmniejszenie jego toksycznego oddziaływania. W przypadku zaś przewlekłego zatrucia, z uwagi na stwierdzone opóźnienie wydalania CCC z moczem szczurów, można sądzić, że pod wpływem chlorku choliny zajdzie zwiększone toksyczne oddziaływanie chlorku chlorocholiny. W związku z tym celowe wydaje się poszukiwanie innej, poza chlorkiem choliny, odtrutki na CCC w przypadku przewlekłych zatruc tym związkiem.

## PIŚMIENNICTWO

1. Bachtazin A. N.: *Chim. w sielsk. choz.* **16**, 6, 55—58, 1978.
2. Blaim K.: *Post. Nauk. Roln.* **5**, 109—115, 1969.
3. Gorienkow A. N.: *Chim. w sielsk. choz.* **16**, 5, 17—18, 1978.
4. Gorszkow A. J.: *Higijena i Sanitarija* **12**, 11, 33—36, 1971.
5. Gruzdiev Ł. G., Posmitnaja Ł. W., Nienajdienko G. N., Onochin B. N., Nienajdienko G. I.: *Chim. w sielsk. choz.* **14**, 7, 35—39, 1976.
6. Hennighausen G., Tiefenbach B.: *Arch. exper. vet. med.* **31**, 4, 527—532, 1977.



7. Hennighausen G., Tiefenbach B., Karnstedt U., Kröning G.: Acta biol. med. germ. **31**, 873, 1973.
8. Nienajdienko G. N., Bułajew W. K., Blinow A. M., Onochin B. N.: Chim. w sielsk. choz. **11**, 5, 57—59, 1973.
9. Oettel H.: CCC-Symposium der BASF am 14 XII 1965, Limburgerhof.
10. Oettel H., Froberg M., Meinecke K. H., Schilling B.: Internationaler Kongress für Arbeitsmedizin Wien 9, 19—24, 1966.
11. Pikusz G. R., Makarowa A. J.: Chim. w sielsk. choz. **15**, 9, 31—34, 1977.
12. Romanowski H.: Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Sectio D **31**, 299—305, 1976.
13. Romanowski H.: Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Sectio D **31**, 333—338, 1976.
14. Romanowski H.: Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Sectio D **33**, 401—408, 1978.
15. Romanowski H.: Bromat. Chem. Toksykol. **5**, 203—209, 1972.
16. Romanowski H.: Bromat. Chem. Toksykol. **5**, 83—88, 1972.
17. Strzelczyk E., Rożej A.: Roczn. Nauk Roln. seria A, **100**, 1, 7—15, 1974.
18. Zalewski W.: Roczn. Nauk. Roln., **15**, 13—20, 1968.

Otrzymano 4 IV 1979.

#### РЕЗЮМЕ

Используя бумажную хроматографию (растворитель: ацетон+вода (8:2), реагент Драгендорффа) и колориметрические обмеры красных ацетоновых растворов пятен CCC с  $R_f=0,48$ , установлено, что хлорид холина (CC) в дозах 0,1 г/кг и 0,2 г/кг не влияет на время (ок. 2,5 часа) впитывания CCC (0,05 г/кг и 0,1 г/кг) у крыс и удаления (ок. 32 часа) CCC с мочой крыс, но влияет на интенсивность этих процессов. Статистически ( $p<0,05$ ) установлено ускоряющие влияние хлорида холина (CC) на впитывание CCC после истечения 1/2, 1 и 2 часов и на удаление CCC после истечения 8 и 24 часов.

Удаление CCC с мочой крыс под влиянием хлорида холина (0,025 г/кг и 0,05 г/кг) задержалось ( $p<0,05$ ) во время 8-недельной, ежедневной подачи CCC в дозах 0,0125 г/кг и 0,025 г/кг.

#### SUMMARY

Using the paper chromatography technique (with acetone and water (8:2) as solvent and Dragendorff's reagent) and the colorimetry of the red acetone eluates of spots ( $R_f=0.48$ ), the author found out that choline chloride (CC) in doses of 0.1 and 0.2 g/kg of body weight had no influence on the time of the CCC resorption (2.5 hrs.) in the stomach (after intoxication with doses of 0.05 g/kg and 0.1 g/kg of body weight) and on the CCC excretion (32 hrs.) in the urine of the rats. It was found out that choline chloride accelerates both CCC resorption and CCC excretion. Statistical analysis (at  $p<0.05$ ) showed that choline chloride accelerates resorption of CCC, given in both doses, after 1/2, 1 and 2 hrs., and excretion of CCC after 8 and 24 hrs.

The results showed that choline chloride in daily doses of 0.025 g/kg and 0.05 g/kg of body weight inhibited (at  $p\leq 0.05$ ) the excretion of CCC in the rat urine during 8-weeks intoxication with CCC (daily doses of 0.0125 g/kg and 0.025 g/kg).

