

MAŁGORZATA JĘDRA, MAŁGORZATA MALANOWSKA

KWAS NITRYLOTRIOCTOWY (NTA)
 – WŁAŚCIWOŚCI I ZACHOWANIE W ŚRODOWISKU
 CZ. I. WŁAŚCIWOŚCI CHEMICZNE I TOKSYKOLOGICZNE NTA

NITRILOTRIACETIC ACID (NTA)
 – PROPERTIES, ENVIRONMENTAL DISTRIBUTION AND TRANSFORMATION
 PART I. CHEMICAL AND TOXICOLOGICAL PROPERTIES

Z Zakładu Badania Żywności i Przedmiotów Użytku
 Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie
 Kierownik: doc. dr hab. K. Karłowski

W części I omówiono podstawowe właściwości chemiczne i zastosowania przemysłowe NTA. Przedstawiono toksyczne działanie na organizmy ssaków ze zwróceniem szczególnej uwagi na działanie rakotwórcze związane z właściwościami chelatującymi NTA.

WSTĘP

NTA jest związkami syntetycznym, nie występującym w przyrodzie. Po raz pierwszy zsynetyzowany został w 1862 roku [1]. Początkowo stosowany był głównie jako czynnik zapobiegający tworzeniu się kamienia kotłowego w wodnych systemach ogrzewania. Food and Drug Administration dopuszcza zastosowanie NTA do przetwórstwa spożywczego w ilości 5 mg/kg jako dodatek do wody w boilerach wytwarzających parę wodną kontaktującą się z żywnością (z wyłączeniem przemysłu mleczarskiego) [5].

W Europie od 1930 r. stosowany jest on w przemyśle tekstylnym – przy farbowaniu tkanin – w celu kompleksowania jonów metali powodujących niejednolite barwienie a także w przemyśle papierniczym aby zapobiegać procesowi rozkładu nadtlenu i wodorosiarczków, katalizowanemu przez ślady metali. Ponadto używany jest w środkach wybielających i płynach dezynfekcyjnych, zawierających podchloryn i IV-rzędowe sole amoniowe – jako zamiennik EDTA.

Obecnie NTA znalazł zastosowanie przede wszystkim w proszkach do prania. Posiada on bowiem zdolność chelatowania jonów metali ziem rzadkich wapnia i magnezu, składników t.zw. twardej wody i przeprowadzania ich w rozpuszczalne w wodzie kompleksy [8].

To zastosowanie NTA związane jest z koniecznością wyeliminowania związków fosforanowych z tych wyrobów. Polifosforany są jednym z podstawowych (obok związków powierzchniowo czynnych) składników proszków do prania. Jako takie spełniają one wielorakie funkcje. Przede wszystkim, zmiękczą wodę zapobiegając

powstawaniu nierozpuszczalnych soli wapnia i magnezu z anionowymi związkami powierzchniowo czynnymi a ponadto:

- zapobiegają ponownemu osadzaniu się cząstek brudu
- dyspergują brud w roztworze
- buforują pH kąpieli piorącej
- mają działanie strukturotwórcze (polepszają właściwości fizyczne proszku) są t.zw. wypełniaczami aktywnymi.

Zważywszy, że ponadto:

- nie stanowią zagrożenia z punktu widzenia toksykologii
- są stabilne chemicznie (magazynowanie, transport)
- łatwodostępne i tanie,

trudno sobie wyobrazić równorzędny zamiennik spełniający wszystkie funkcje polifosforanów w proszkach do prania.

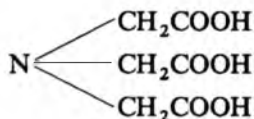
Dlaczego więc należy je wyeliminować? Powodem jest paradoksalnie fakt, że są to związki pierwiastka powszechnie obecnego w przyrodzie. Fosfor obecny jest we wszystkich organizmach żywych. Ilość fosforu zawarta w pożywieniu jest z reguły większa niż potrzeby organizmów ssaków – nadmiar jest wydalany. Związki fosforu przedostające się do środowiska stanowią nawóz dla organizmów zarówno lądowych jak i wodnych. Problem pojawia się gdy zostanie zachwiana ta ustalona w środowisku równowaga i do otoczenia zaczynają przedostawać się zbyt duże ilości fosforu. Widoczne jest to zwłaszcza w środowisku wodnym. Fosfor jest t.zw. „krytycznym pierwiastkiem odżywczym” oznacza to, że stosunkowo niewielki nadmiar fosforu powoduje gwałtowny rozwój glonów. W procesie tym zostaje zużyty tlen rozpuszczony w wodzie, co z kolei jest przyczyną obumierania organizmów wodnych, gnicia i w konsekwencji niszczenia akwenu. Proces ten nosi nazwę eutrofizacji [4, 11].

Jedną z metod zapobiegania temu zjawisku jest ograniczanie (bądź całkowite wyeliminowanie) emisji fosforanów przedostających się do środowiska wodnego w wyniku powszechnego stosowania detergentów. W tym celu stosuje się różne zamienniki – rolę taką spełnia m.in. układ zeolit + NTA + polikarboksylany, bądź polifosforany + NTA – co pozwala na zmniejszenie zawartości fosforanów w proszkach do prania [7]. Pojawia się tu jednak problem związany z ryzykiem wprowadzenia do środowiska nowej substancji w ilościach kilkudziesięciu tysięcy ton rocznie. Z tego powodu przeprowadzono gruntowne badania z zakresu toksykologii, ekotoksyczności i bioderatacji NTA. Niniejsza publikacja została napisana na podstawie raportów z tych badań, opracowanych przez grono ekspertów z poszczególnych krajów. Temat podzielony został na cztery części, w których kolejno omówione będą właściwości chemiczne NTA, działanie toksyczne na organizmy ssaków, ekotoksyczność i na koniec prześledzone zostanie zachowanie NTA w środowisku od momentu przedostania się tego związku do kanalizacji aby można było stwierdzić czy nie przedostaje się on do wody do picia. Pozwoli to odpowiedzieć na pytanie jakie konsekwencje dla ludzi i organizmów żywych pociąga za sobą wprowadzenie do środowiska kwasu nitrilotrioctowego.

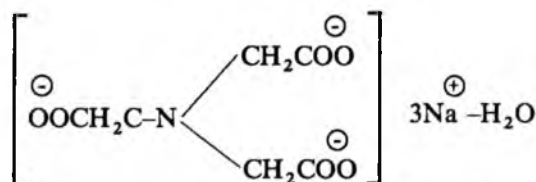
Powodem, dla którego Zakład Badania Żywności i Przedmiotów Użytku PZH zajął się właściwościami kwasu nitrilotrioctowego była konieczność podjęcia decyzji o dopuszczeniu na rynek krajowy detergentowych wyrobów chemii gospodarzej zawierających w swym składzie ten związek.

Właściwości chemiczne

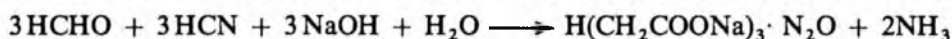
Kwas nitylotriooctowy (NTA) jest kwasem aminotrikarboksylovym o następującej strukturze chemicznej:



W 1965 r. niemiecki chemik *Heinz* przedstawił jego strukturę krystaliczną jak również strukturę trójsoli i jej postaci uwodnionej. Główne zastosowania przemysłowe dotyczą w zasadzie jednowodzianu soli trisodowej kwasu nitylotriooctowego:



Przemysłowa metoda otrzymywania tego związku przebiega zgodnie z równaniem:

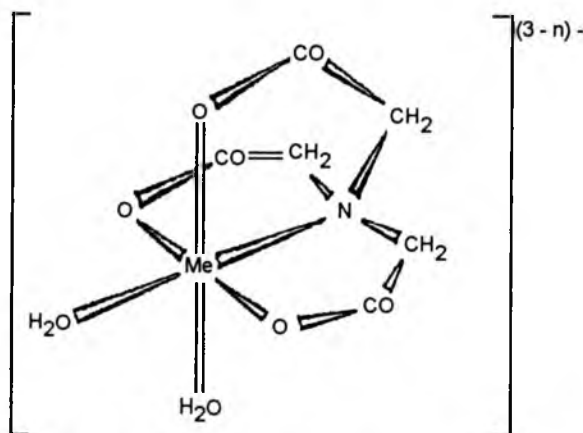


Otrzymany związek jest produktem o wysokiej czystości wynoszącej 98 – 99%. Wynik typowej analizy chemicznej tego surowca przedstawiony jest w tabeli I [2].

Tabela I. Poziom zanieczyszczeń w $\text{Na}_3\text{NTA} \cdot \text{H}_2\text{O}$
Impurities in $\text{Na}_3\text{NTA} \cdot \text{H}_2\text{O}$

Zanieczyszczenia	Poziom
NaCN	4 ± 2 ppm
NaOH	$0,3 \pm 0,2$ %
Na CO	$0,4 \pm 0,1$ %
I- i II-rzędowe aminy	~0,2%
Kwas iminodioctowy	$0,2 \pm 0,05$ %
Ślady metali:	
K	6 ppm
Zn	2 ppm
Cu	1 ppm
Fe	<10 ppm
Pb	1 – 2 ppm

Jak już wspomniano, zasadniczą aktywność chemiczną NTA przejawia jako ligand chelatujący jony metali. Jednakże reaguje on również z silnie utleniającymi związkami takimi jak podchloryn, chlor, ozon czy tlen w obecności katalizatora Pt/C [2]. W 1979 r. doniesiono [2] o możliwości powstawania kwasu N-formyloiminooctowego w reakcji krystalicznego NTA ze stężonym roztworem podchlorynu. Jednakże w roztworach



Ryc. 1. Struktura przestrzenna kompleksu metal-NTA.
Structure of Metal-NTA complex.

spotykanych w praktyce występują niskie stężenia obu substancji i często obecne są w nich jony amonowe, co na tyle zmniejsza prawdopodobieństwo powstawania pochodnych kwasu iminooctowego, że można je pominąć. Wykazano również, że reakcje z chlorem i ozonem a także tlenem w obecności katalizatora prowadzą do szybkiej degradacji NTA [2]. Tak więc jedyną podstawą chemiczną pozwalającą na opisanie interakcji NTA z komórkami ssaków jest reakcja chelatowania jonów metali. Upoważnia do tego fakt, że nie jest on metabolizowany przez organizmy ssaków [2] jak również wysoka czystość handlowego surowca.

NTA posiada 4 grupy funkcyjne: 3 karboksylowe i 1 aminową. Z większością jonów metali tworzy kompleksy 1:1, tak jak ma to miejsce w wypadku jonu wapniowego:



Strukturę przestrzenną tego kompleksu wyjaśnia ryc. 1 [6].

Stężenie wytworzonego kompleksu Me-NTA w roztworze zależy teoretycznie od stężenia jonów metalu – Me, stężenia jonów NTA^{-3} , stężenia jonów wodorowych a także od stałej równowagi reakcji.

Jak wynika z zestawionych w tabeli II [2] stałych reakcji kompleksowania jonów metali przez NTA najsłabsze kompleksy powstają z jonami metali ziem rzadkich (magnezowymi i wapniowymi), a najtrwalsze z jonami rtęciowymi i żelazowymi. Jeśli chodzi o reakcję z jonami wodorowymi przedstawiają je równania:

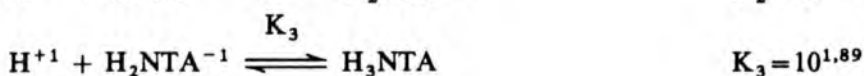
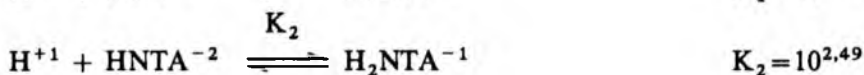
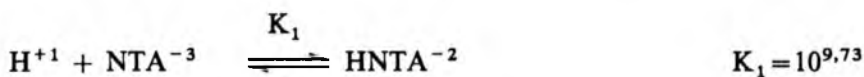


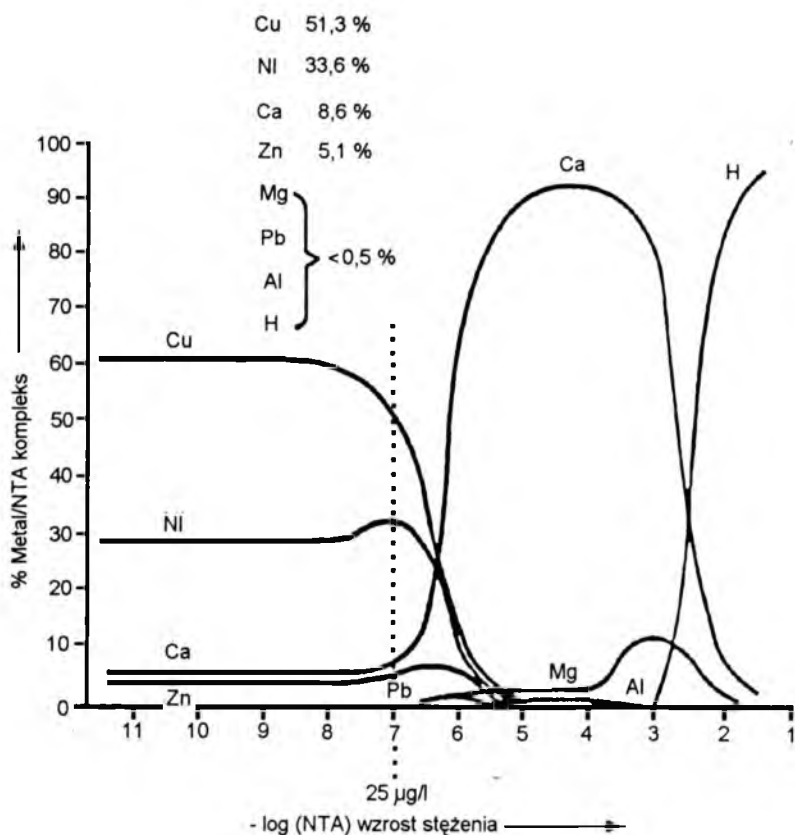
Tabela II. Stałe tworzenia kompleksów jon metalu/NTA⁻³
Metal Ion/NTA formation constants

Metal	K	log K
Mg ⁺²	10 ^{6.47}	5,47
Ca ⁺²	10 ^{6.39}	6,39
Mn ⁺²	10 ^{7.46}	7,46
Fe ⁺²	10 ^{8.33}	8,33
Cd ⁺²	10 ^{9.78}	9,78
Co ⁺²	10 ^{10.38}	10,38
Zn ⁺²	10 ^{10.67}	10,67
Pb ⁺²	10 ^{11.34}	11,34
Ni ⁺²	10 ^{11.50}	11,50
Cu ⁺²	10 ^{12.96}	12,96
Hg ⁺²	10 ^{14.6}	14,6
Fe ⁺³	10 ^{15.9}	15,9

Biorąc pod uwagę, że efektywna przy tworzeniu kompleksów z jonami metali jest zdeprotonowana forma NTA widać, że dominuje ona w środowisku kwaśnym przy wysokich wartościach pH. Tak więc dla wartości pH istotnych przy rozpatrywaniu reakcji zachodzących w środowisku czy układach fizjologicznych reakcja NTA z jonami wodorowymi znacznie przesunęła na lewo równowagę reakcji tworzenia kompleksu z jonami metali (zmniejszając ilość powstających kompleksów).

Na reakcję tę mają wpływ również inne ligandy obecne w roztworach występujących w praktyce. Współzawodniczą one w kompleksowaniu jonów metali, zmniejszając w ten sposób stężenie wolnych jonów metali. Takimi współzawodniczącymi ligandami w wodnym środowisku naturalnym są wodorotlenki, węglany a także kwasy huminowe. W organizmach ssaków są to również wodorotlenki, ponadto aminokwasy i białka.

Są to aspekty, które muszą zostać uwzględnione przy ustalaniu warunków równowagi reakcji NTA z jonami metali w roztworach rzeczywistych. Tego typu kalkulacje zarówno dla układów fizjologicznych jak i środowiskowych można spotkać w piśmiennictwie [2]. Dla wody rzecznej został zbudowany, na podstawie tego typu analizy, model komputerowy. Konieczne było do tego oszacowanie stężenia jonów metali, a także stężeń innych niż NTA ligandów występujących w środowisku – zestawienie takie ilustruje tabela III [2]. Przy tych stężeniach biorąc pod uwagę stałe tworzenia kompleksów Me-NTA można przewidzieć, stosując analizę komputerową, rozkład stężeń kompleksów NTA z jonami różnych metali – w szerokim zakresie stężenia NTA. Rezultaty w formie graficznej przedstawia wykres na ryc. 2 [2]. Dla stężeń NTA w wodzie rzecznej = 25 µg/l – wartości wynikającej z badań monitoringowych – ponad 50% zużyte zostaje na kompleksowanie jonów wapniowych, 34% jonów niklowych, 9% jonów wapniowych i 5% cynkowych. Tylko przy nierealnie wysokim stężeniu NTA kompleks z jonami wapniowymi jest formą dominującą i po związaniu całego wapnia NTA zaczyna wiązać jony wodorowe. Model ten nie bierze jednak pod uwagę obecności w wodzie rzecznej innych ligandów – co będzie dodatkowo zmniejszać podane w tym schemacie wartości stężeń poszczególnych kompleksów NTA-Me.



Ryc. 2. Stężenie procentowe kompleksu metal-NTA jako funkcja stężenia NTA w wodzie rzecznej. Pionowa, kropkowana linia oraz procentowa zawartość kompleksów metali dotyczy stężenia NTA 25 µg/l.

% Metal-NTA complex as a function of NTA concentration in a river water. The dotted vertical line and metal complex percentages illustrate NTA metal speciation for a 25 µg/l NTA concentration in this environmental matrix.

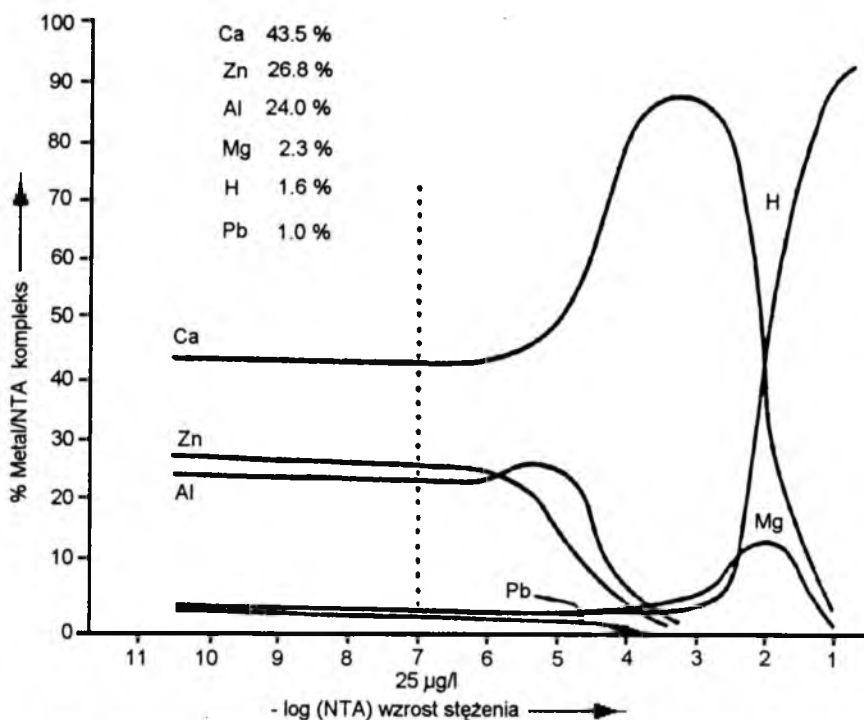
Opracowano również tego typu model dla warunków panujących w jelitach ssaków [2]. Wykorzystano tu dane empiryczne dotyczące stężeń jonów metali i innych ligandów obecnych w jelitach głodzonych zwierząt. Dane te przedstawia tabela IV [2]. Model skonstruowano dla równych objętości wody pitnej, soku żołądkowego, dwunastniczego oraz trzustkowego. Wartości stężeń Ca^{+2} , Mg^{+2} , K^{+1} , Na^{+1} i wszystkich ligandów z wyjątkiem cysteiny zostały określone na podstawie wartości podanych dla soku żołądkowego, trzustkowego i dwunastniczego. Stężenia pozostałych metali oszacowano na podstawie danych wartości dla innych płynów organizmu. Stężenie podane dla cysteiny jest w istocie stężeniem cysteiny i cystyny ponieważ nie jest możliwe odróżnienie ich w danych literaturowych. Rozpatrywane jest tylko 158 z ogólnej liczby 320 kombinacji metali z aminokwasami. Dla pozostałych 162 kombinacji nie były dostępne dane o stałych równowagi.

Tabela III. Średnie stężenie jonów metali i ligandów w modelu dla wody
 Concentrations of metal ions and ligands in average river water model

Jon metalu	Stężenie (mg/l)	Ligand	Stężenie (mg/l)
Ca ⁺²	40 ^b	CO ₃ ⁻²	60
Mg ⁺²	10 ^b	SO ₄ ⁻²	15
Sr ⁺²	0,07	Cl ⁻	25
K ⁺	5 ^b	F ⁻	1
Na ⁺	12 ^b	PO ₄ ⁻³	0,1
Fe ⁺³	0,485	NO ₃ ⁻³	0,6 ^b
Mn ⁺²	0,016	pH	8,00 ^b
Cu ⁺²	0,0076		
Ba ⁺²	0,044		
Cd ⁺²	0,00008		
Zn ⁺²	0,005		
Ni ⁺²	0,01		
Hg ⁺²	0,00008		
Pb ⁺²	0,0045		
Co ⁺³	0,00045		
Ag ⁺	0,00011		
Cr ⁺³	0,003		
Al ⁺³	0,239		

Tabela IV. Stężenie jonów metali i ligandów w modelu dla jelit ssaków
 Concentration of metal ions and ligands in gut model

Metal	Stężenie [mg/l]	Ligand	Stężenie [mg/l]
Ca ⁺²	160	CO ₃ ⁻²	600
Mg ⁺²	43,7	Cl ⁻¹	2840
Sr ⁺²	0,0044	PO ₄ ⁻³	10
K ⁺	391	Glicyna	12
Na ⁺	2300	Kwas glutaminowy	17,6
Fe ⁺³	0,025	Cysteina	13,3
Mn ⁺²	0,020	Arginina	24,4
Cu ⁺²	0,15	Lizyna	13,4
Ba ⁺²	0,010	Histydyna	9,3
Cd ⁺²	0,0040	Kwas asparginowy	18,6
Zn ⁺²	0,25	Seryna	14,7
Ni ⁺²	0,042	Alanina	19,6
Hg ⁺²	0,0020	Tyrozyna	5,4
Pb ⁺²	0,21	Metionina	11,9
Cr ⁺³	0,023	Walina	14
Al ⁺³	0,20	Treonina	14,3
		Fenylalanina	11,6
		Izoleucyna	7,9
		Leucyna	10,5
		Prolina	20,7



Ryc. 3. Stężenie procentowe kompleksu metal-NTA jako funkcja stężenia NTA w jelicie ssaka po przegłodzeniu. Pionowa kropkowana linia oraz procentowa zawartość kompleksów metali dotyczy stężenia NTA 25 µg/l.

% Metal-NTA complex as a function of NTA concentration in the gut of a food fasted mammal. The vertical dotted line and metal complex percentages illustrate NTA metal speciation for 25 µg/l NTA concentration in the gut environment.

Biorąc pod uwagę wcześniej podane stałe reakcji kompleksowania dla poszczególnych metali wyliczono rozkład NTA pomiędzy te jony w szerokim zakresie stężeń NTA. Rezultat przedstawia wykres na ryc. 3. [2].

Można tu zauważyć, że przy stężeniach mniejszych od 25 µg/l NTA będzie obecny w jelitach zwierząt głównie w postaci kompleksu z jonami wapniowymi cynkowymi i glinowymi. Jest to wniosek, który będzie wykorzystany przy interpretowaniu wyników badań toksykologicznych.

Do oznaczania poziomów NTA spotykanych w środowisku naturalnym stosowane są na ogół metody analityczne: polarograficzna i chromatografii gazowej.

Metody polarograficzne umożliwiają oznaczania NTA w wodach naturalnych i ściekach w zakresie stężeń 1–10 mg/l, przy czym wg danych literaturowych można tą metodą oznaczać również stężenia 0,05–0,1 mg/l NTA.

Metody chromatografii gazowej wymagają wstępnego przygotowania próbek. Stosuje się je przy oznaczaniu stężeń NTA spodziewanych w zakresie 0,01–5 mg/l, jednakże technika ta pozwala na oznaczanie poziomów NTA równych 0,001 mg/l – (1 ppb).

Działanie toksyczne na organizmy ssaków

NTA działając na skórę nie powoduje podrażnienia ani uczulenia, jest drażniący jedynie dla oczu. Przez skórę absorbuje się w ilościach śladowych – 0,1%. Rozpylony w powietrzu w ilości 0,34 g nie wywołuje objawów toksycznych u szczurów, świń ani małą przy wdychaniu przez 6 godzin dziennie przez 4 tygodnie.

Badania toksyczności ostrej wykonane na szczurach przy podaniu dożołądkowym wykazały, że wartość LD50 różni się w zależności od formy NTA: najsilniejsze działanie ma kompleks z jonami miedziowymi (LD50–0,81 g/kg) a kompleksy z jonami wapniowymi, cynkowymi i niklowymi okazały się praktycznie nietoksyczne (LD50–20 g/kg).

Podawana ciężarnym królikom, myszom i szczurom sól Na NTA nie wykazała działania teratogennego. Również kompleksy NTA z kadmem i rtęcią nie miały szkodliwego działania na szczury ciężarne i płody. Wykonano także badania wpływu na reprodukcję, podając szczurom kompleksy NTA z jonami żelazawymi i miedziowymi. Nie stwierdzono wpływu tych związków na rozwój noworodków, zwiększyła się tylko zawartość Fe i Cu w mleku matek i tkankach karmionych przez nie młodych. Natomiast kompleks z cynkiem nie miał takiego działania [2].

Dane piśmiennictwa wskazują, że działanie mutagenne NTA badano w licznych testach (opisano ok. 40 testów) na mikroorganizmach (bakteriach, drożdżach, pleśniach) i komórkach ssaków. Wykonano także testy *in vivo* na muszce owocowej *Drosophila melanogster*, myszach i szczurach. Podsumowując wyniki tych badań można stwierdzić, że NTA nie działa mutagennie na bakterie i drożdże, ani na tkanki gryzoni *in vitro*. Jednakże wyniki badań na organizmach wyższych *in vivo* oraz hodowlach tkankowych nie zawsze były jednoznaczne. Wysokie dawki NTA w niektórych przypadkach działały genotoksycznie [9]. Nie będąc mutagenem NTA może jednak potęgować takie działanie innych związków np. działanie PbCrO jest ograniczone z powodu słabej rozpuszczalności tego związku w wodzie a NTA kompleksując Pb zwiększa mutagenność anionu chromianowego.

Badania toksyczności podostrej i przewlekłej wykonane na szczurach i myszach wykazały, że NTA po krótkim okresie podawania w paszy lub wodzie do picia powoduje uszkodzenie układu moczowego, objawiające się zmianami histopatologicznymi w kanalikach nerkowych, miedniczkach nerkowych, moczowodach i pęcherzu. Zmiany te nasilają się wraz z dawką i czasem podawania NTA prowadząc do zmian nowotworowych. Dla potwierdzenia rakotwórczego działania NTA wykonano 7-krotnie badania 2-letnie. Amerykański National Cancer Institute (NCI) opierając się na wynikach badań przeprowadzonych przez dwa różne laboratoria przedstawił następujące wnioski:

1) działanie nefrotoksyczne NTA obserwowano przy dawkach wyższych od 0,05 mmola/kg m.c./dzień (13 mg NTAS/kg m.c./dzień)

2) zmiany nowotworowe w kanalikach nerkowych pojawiały się u szczurów i myszy gdy spożycie przekroczyło 0,5 mmola/kg m.c./dzień (138 mg NTA/kg m.c./dzień)

3) zmiany nowotworowe w miedniczkach, moczowodach i pęcherzu wystąpiły jedynie u szczurów przy dawce NTA większej niż 0,5 mmola/kg m.c./dzień.

W opracowaniu NCI są także wzmianki o zwiększonym występowaniu nowotworów płuc, nadnerczy i wątroby. Jednakże zmiany w wątrobie wystąpiły jedynie

u samic i nie powtórzyły się w innych doświadczeniach, natomiast w płucach i nadnerczach stwierdzono prawdopodobnie przerzuty nowotworowe. Te zmiany potraktowano jako przypadkowe wobec nasilonych i regularnie występujących zmian w układzie moczowym. [2].

Dla wyjaśnienia przyczyny rakotwórczego działania NTA (nie będącego związkiem mutagennym) wykonano wiele badań metabolizmu tego związku w organizmach ssaków. NTA podany w roztworze, pojawia się we krwi w najwyższym stężeniu po 1–2 godz., natomiast podany z paszą po 8 godz. i poziom jego obniża się przez następne 12 godz. Forma w jakiej występuje w pokarmie NTA nie ma wpływu na jego absorpcję, gdyż w niskim pH w żołądku kompleksy metal-NTA dysocjują a w miarę wzrostu pH w jelitach, NTA może tworzyć kompleksy z innymi metalami tam obecnymi. W organizmie zostaje związany z białkami krwi i komórek, słabo przemieszcza się i jest wolno wydalany. Nie stwierdzono obecności metabolitów NTA. Wydalany jest w postaci niezmięnionej w moczu. NTA nie jest wydalany w żółci tzn., że z kałem wydalana jest ta część pobranego związku, która nie została wchłonięta w jelitach. U ludzi, podobnie jak u małą ponad 65% związku nie ulega absorpcji i wydalane jest w kale. U myszy, szczurów i psów ponad 70% podanej dawki wydalają się w moczu.

NTA gromadzi się głównie w kościach i nerkach oraz w niewielkim stopniu w wątrobie, pęcherzu moczowym, płucach, nadnerczach i węzłach chłonnych. U wszystkich badanych gatunków zwierząt tj. szczurów, kurcząt i psów NTA gromadzi się w szkielecie w ilościach proporcjonalnych do dawki. Jednocześnie zwiększa się zawartość popiołu w kościach a w tym Zn i Mn a zmniejsza się zawartość Mg. Nie wykazano, by zmiany te wpływały na strukturę i wytrzymałość kości. Jednakże w jednym z doświadczeń – u psów karmionych przez 7 miesięcy dawką 0,009 mmola NTA/kg m.c. – nastąpiła patologiczna przebudowa struktury kości. Po doustnym podaniu 0,04 mmola NTA/kg m.c. psom stwierdzono wydalanie w moczu siarczanu chondroityny. Ponieważ chondroityna jest składnikiem tkanki łącznej, a w szczególności chrząstek nasadowych kości, może to wskazywać na szkodliwe działanie NTA na tę tkankę [2].

Wysoki poziom NTA oznaczony w nerkach pochodzi z moczu zawartego w kanalikach nerkowych a nie z samej tkanki, bowiem w komórkach kanalików nerkowych nie znaleziono receptorów, które umożliwiałyby wychwytywanie NTA z moczu. W kanalikach nerkowych nie następuje resorpcja zwrotna NTA tzn., że związek przesączony przez kłębuszki nerkowe do moczu pierwotnego w całości wydalany jest w moczu ostatecznym.

Powstawania zmian nowotworowych w nerkach nie można łączyć bezpośrednio z działaniem wysokich stężeń NTA na komórki kanalików nerkowych gdyż w takim przypadku należałoby oczekiwać analogicznych zmian w komórkach wyściełających przewód pokarmowy. Chcąc wyjaśnić mechanizm działania rakotwórczego testowano również najbardziej prawdopodobne produkty pośredniego rozpadu NTA – 0,5% imidodiaceton i jego nitrowe pochodne – w 2 letnich badaniach na szczurach i 8 miesięcznych na myszach. Nie stwierdzono właściwości kancerogennych tych związków.

Obserwując zmiany histopatologiczne powstające w nerkach zwierząt doświadczalnych stwierdzono, że w cytoplazmie komórek kanalików nerkowych już po podaniu 1 dawki NTA 0,073 mmola/kg pojawiają się liczne wakuole, które utrzymują się

ponad 72 godziny. Po kilku powtarzających się dawkach pojawiają się dalsze zmiany: następuje przerost komórek i rozszerzenie kanalików nerkowych. W doświadczeniach przewlekłych zmiany te nasilają się prowadząc do procesów nowotworowych. W przypadku wycofania NTA z diety, nawet zaawansowane zmiany przerostowe cofają się i nie dochodzi do powstania nowotworów.

Wakuole tworzące się w cytoplazmie komórek nabłonka kanalików nerkowych nie różnią się od innych np. wywołanych cukrzycą i są spowodowane powstaniem trwałych „wtórnych lizosomów”. Wiedząc, że cynk jest aktywnym stabilizatorem lizosomów zarówno *in vitro* jak i *in vivo* oraz biorąc pod uwagę właściwość silnego chelatowania metali przez NTA, zwrócono uwagę na wydalanie jonów metali dwuwartościowych w moczu. U zwierząt otrzymujących w diecie kompleksy NTA z sodem lub wapniem zawartość magnezu i wapnia w moczu nie ulegała zmianie, natomiast stwierdzono zależny od dawki wzrost stężenia cynku. Hipotezę, że NTA może indukować powstawanie wakuoli w komórkach nabłonka przez dostarczenie zwiększonych ilości cynku do lizosomów potwierdziły wyniki doświadczenia *Andersona* opublikowane w 1981 r. [1]. Poziom cynku w moczu szczurów był niski i niemal stały, niezależnie od ilości cynku jaką zwierzęta otrzymywały w diecie (8–52 ppm) i niezależnie od stężenia tego metalu w płazmie krwi, które zwiększało się wraz ze wzrostem spożycia cynku. Po wprowadzeniu do diety tych szczurów Na NTA w ilości 44 $\mu\text{mola/g}$ diety, poziom cynku w płazmie krwi nie różnił się od kontroli, natomiast zawartość cynku w moczu wzrastała proporcjonalnie do jego poziomu w paszy. Ilość NTA wydalanego w moczu utrzymywała się na stałym poziomie we wszystkich grupach zwierząt.

Z doświadczenia tego wyciągnięto wniosek, że im większe jest stężenie cynku w plazmie krwi (większe spożycie) tym więcej powstaje cząsteczek kompleksu jonów cynkowych z NTA, które następnie filtrowane są w kłębuszkach nerkowych. Resorbpcji zwrotnej w kanalikach nerkowych podlega jedynie cynk a NTA zostaje wydalony z moczem. W ten sposób ilość cynku w nerkach zostaje sztucznie zawyżona i jego bezwzględna ilość stale wzrasta. Badania histopatologiczne nerek zwierząt z tego doświadczenia wykazały, że zmiany toksyczne w nerkach nasilały się proporcjonalnie do wydalania cynku w moczu pierwotnym i resorbpcji cynku w kanalikach. Warunkiem niezbędnym do zainicjowania, utrzymania i nasilania objawów toksycznych, aż do wystąpienia guzów w kanalikach nerkowych, jest przekroczenia stężenia NTA 15 $\mu\text{moli/l}$ g plazmy.

Jeśli chodzi o zmiany nowotworowe w miedniczkach nerkowych i pęcherzu szczurów to powstają one po podaniu wyższych dawek NTA niż te, które wywołują zmiany w kanalikach nerkowych. Pierwszym objawem jest rozszerzenie miedniczek i moczowodów, następnie miejscowe ubytki nabłonka, złuszczenia i owrzodzenia powierzchni. Następuje zgrubienie nabłonka i podziały komórek. Dłuższe podawanie diety zawierającej NTA może spowodować przemianę procesów reperacyjnych w nowotworowe. Zmiana diety wpływa na szybkie cofnięcie tych zmian i jedynym ich śladem może być trwale rozszerzenie miedniczek i moczowodów. Charakter opisanych zmian sugerował, że ich przyczyną może być obniżenie w nabłonku poziomu jonów wapnia, którego funkcją między innymi jest stabilizacja wiązań ścian komórkowych i którego brak powoduje odrywanie komórek powierzchniowych nabłonka i pojawienie się mitogenezy w komórkach podstawowych.

Stwierdzono doświadczalnie, że spożycie NTA w ilości 1,4 mmola/kg m.c./g dzień zwiększa zawartość wapnia w moczu i powoduje zmiany w nabłonku wyścielającym miedniczkę, moczowody i pęcherz. U szczurów żywionych dietą z udziałem wysokiej, już toksycznej, dawki NTA 73 μ mole/g diety, oznaczono zawartość jonów metali dwuwartościowych: wapnia, magnezu i cynku oraz poziom NTA w treści jelit, surowicy krwi, ultrafiltracie krwi i moczu. Wykazano, że jedynie w moczu stężenie jonów metali jest niższe od stężenia NTA. W tych warunkach niezwiązany NTA będący związkami o silnych właściwościach kompleksotwórczych może „ekstrahować” jony wapnia z nabłonka. Stężenie jonów metali dwuwartościowych jest swego rodzaju progiem, który musi być przekroczony, aby NTA spowodował efekty toksyczne. Człowiek wydalą takich kationów około 0,14 mmola/kg masy ciała dziennie. [3].

Należy wziąć pod uwagę, że dawka NTA uznana za toksyczną jest dawką średnią, wyliczoną na podstawie badań, i w populacji może być wiele osobników o zwiększonej wrażliwości, reagujących na dawki niższe. NTA chelatując silnie jony metali dwuwartościowych może w istotny sposób wpływać na ich wchłanianie, rozmieszczenie w organizmie i wydalanie. Ponadto sam nie będąc mutagenem może aktywować inne mutageny. Stwierdzone zostało ponad wszelką wątpliwość, że wywołuje on zmiany nowotworowe w układzie moczowym gryzoni. Podawanie w wodzie do picia 0,3–2% NTA istotnie zwiększa występowanie nowotworów układu moczowego u szczurów, którym uprzednio podawano nitrozoami takie jak N-nitroso-[4-hydroksybutyl]-butylamina (NHBBA), N-nitrosoetylohydroksy-etyloamina (NEHEA) i N-nitrozobis-[2-hydroksypropyl]-amina. Łączne podawanie tych nitrozoamin i NTA lub Na NTA wywołało zmiany nowotworowe w nerkach i pęcherzu moczowym. [9].

International Agency for Research on Cancer (IARC) zaliczyła NTA i jego sole do grupy 2B – substancji rakotwórczych dla zwierząt i potencjalnych kancerogenów dla ludzi. Z tego też względu, przed powszechnym zastosowaniem NTA jako składnika proszków do prania, konieczne było wnikliwe prześledzenie jego zachowań w środowisku, w celu oceny czy nie będzie on stanowił zagrożenia dla zdrowia ludzi. Ten problem będzie tematem drugiej części publikacji.

M. Jędra, M. Malanowska

NITRILOACETIC ACID PROPERTIES, ENVIRONMENTAL DISTRIBUTION AND TRANSFORMATION PART I. CHEMICAL AND TOXICOLOGICAL PROPERTIES

Summary

The reason of the interest shown in the properties of NTA is the possibility of its use for the replacement of polyphosphates in washing powders which are the cause of water eutrophication.

In the light of literature data the chemical properties of NTA and the conditions influencing the course of the reaction of complex formation with metal ions in aqueous solutions are discussed. Equilibrium constants of these reactions are presented, with diagrams obtained in computer assisted analysis of the conditions of equilibrium of NTA reaction with metal ions in the solutions occurring in physiological conditions and in the environment.

On the basis of the opinions of expert committees the toxicity of NTA for mammalian organisms are described. It has been shown that NTA has no teratogenic or mutagenic action, however, in

2-year observations of mice and rats the intake of NTA produced lesions of uroepithelium with development of tumours. This effect of NTA has been demonstrated to be closely connected with its property of complex formation with metal ions. Experiments are described in which confirmation was obtained of the hypothesis that pathological lesions of renal tubules are caused by accumulation of zinc and bladder tumours are caused by binding by NTA of calcium from epithelial cells.

PIŚMIENNICTWO

1. *Anderson R.L.*: The role of zinc in nitrilotriacetate (NTA)-associated renal tubular cell toxicity. *Food Cosmet. Toxicol.* 1981, 19, 639. – 2. *Anderson R.L., Bishop W.E., Campbell R.L.*: A Review of the Environmental and Mammalian Toxicology of Nitrilotriacetic Acid. *CRC Critical Reviews in Toxicology*, 1985, 15, 1. – 3. *Altman P.L., Dittmer D.S.*: Excretions Products in Urine: Vertebrates, Part 1, *Man. Biological Handbooks, Metabolism*. Federation of American Societies for Experimental Biology, Bethesda, Md, 1968, 521. – 4. *Chiandani G., Premazzi G.*, Appraisal of the Possible Methods of Combating the Treat of Eutrophication in Community Waters. *Commission of the European Communities*, 1988. – 5. Code of Federal Regulation (FDA), Title 21, Section 173, 310, Office of the Federal Register, 1981. – 6. *Conseil Europeen des Federations de L'Industrie Chimique (CEPIC)* Brochure on NTA. – 7. *Economic Commission for Europe: Substitutes for Triphosphate in Detergents*. United Nations, New York, 1992. – 8. *Gafa S., Burgio F.*: Assessment of Sodium Nitrilotriacetate as Builder in Detergent Formulations: Determination of the Antiflocculating Power of Sodium Nitrilotriacetate Compared with Some Inorganic Builders. *Tenside Deterg.* 1974, 11, 7. – 9. *IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 1990, 48, 181. – 10. *Spanggord R.J., Tyson C.A.*: N-formyliminodiacetic Acid, a New Compound from the Reaction of Nitrilotriacetic Acid and Chlorine. *Science*, 1979, 204, 1081.

11. *Vollenweider R.A.*: Eutrophication: a Global Problem. *WHO Water Quality Bulletin*, 1981, 6, No 3.

Dn. 1994.11.21

00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24