

Jacek Nawrocki

Struktura i właściwości związku mutagennego MX zidentyfikowanego w wodzie pitnej

Technologia uzdatniania wody pitnej staje się dziedziną coraz bardziej złożoną — wody surowe są coraz bardziej zanieczyszczone; zrozumienie procesów chemicznych przebiegających w trakcie uzdatniania jest coraz większe; narzędzia analityczne będące w dyspozycji człowieka są coraz potężniejsze. Większe zanieczyszczenie wody surowej wymaga stosowania bogatszej technologii uzdatniania, co często wiąże się niestety z tworzeniem lub wprowadzaniem do wody nowych związków chemicznych. Nowe narzędzia analityczne dają możliwości lepszego zrozumienia procesów chemicznych przebiegających w trakcie uzdatniania wody, a także pozwalają na odkrycie nowych zagrożeń dla zdrowia człowieka wynikających z występowania nowych związków w wodach pitnych na bardzo niskich poziomach stężeń. Wody surowe zawierają zwykle związki nieorganiczne, organiczne oraz materiężywioną, jak bakterie, wirusy, organizmy roślinne i inne. Jeśli w przypadku związków nieorganicznych istnieją pewne uzasadnione przypuszczenia co do ich korzystnego oddziaływania na organizm człowieka (np. przepisy polskie ograniczają ilość fluorków do $1,5 \text{ g/m}^3$ ale jednocześnie zalecają aby stężenie F^- nie było mniejsze niż $0,3 \text{ g/m}^3$), to w przypadku związków organicznych nie są znane żadne ich korzystne oddziaływania na organizm ludzki. Ilość związków organicznych o prawnie regulowanych, dopuszczalnych poziomach w wodach pitnych stopniowo wzrasta i przewiduje się, iż będzie rosła w tempie około 25 związków na trzy lata [1]. Już obecnie Agencja Ochrony Środowiska w USA (US EPA) zaleca monitorowanie stężeń kilkudziesięciu związków organicznych nie objętych regulacją prawną.

Jedną z właściwości wody pitnej, stosunkowo często obserwowaną, jest jej mutagenność, a ściślej mutagenność jej koncentratów. Poszukiwania induwiduum chemicznego, odpowiedzialnego za tę właściwość doprowadziły do wykrycia szeregu związków zdol-

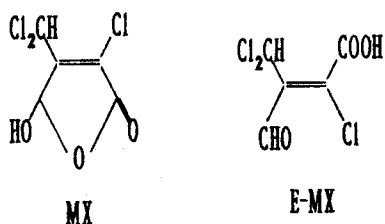
nych do takich oddziaływań w większym lub mniejszym stopniu. Odkrycia te wskazują, że istnieje, ze strony tych połączeń, pewna (bardzo trudna do oszacowania) potencjalna możliwość niebezpiecznych efektów kancerogennych w stosunku do człowieka, jako rezultat długotrwałego spożywania wody pitnej. Przeprowadzone w USA i w Europie badania epidemiologiczne nad śmiertelnością z powodu nowotworów oraz nad występowaniem raka (szczególnie układu moczowego i przewodu pokarmowego) wskazują na pewne zależności między zawartością związków organicznych w wodzie pitnej a przypadkami raka [2]. Byłoby jednak nieodpowiedzialnością twierdzenie, iż taka zależność została już w pełni potwierdzona. W wodach pitnych wykryto już około 3000 związków organicznych, z czego zidentyfikowano tylko około 1100 [3], przy czym większość z nich występuje w stężeniach niższych od $1 \text{ } \mu\text{g/dm}^3$, co stanowi minimalną część całkowitego węgla organicznego (zwykle kilka mg/dm^3). Ze względów praktycznych więc mutagenność wody pitnej sprawdza się zateżając związki w niej obecne i badając tak otrzymane koncentraty. W tym celu przyjęto stosowanie testu Ames'a [4], który zwykle przeprowadza się na różnych szczepach bakterii *Salmonella typhimurium*.

Rozwój współczesnej chemii analitycznej pozwala jednak na podejmowanie wysiłków, które doprowadzają do wyizolowania związków o szczególnej aktywności mutagennej. Takim związkiem wyizolowanym początkowo z chlorowanej pulpy drzewnej, a następnie znalezionym w wodzie pitnej, jest 3-chloro-4-(dichlorometylo)-5-hydroxy-2(5H)-furanon oznaczany w literaturze symbolem MX [5, 6, 7]. Niniejsza praca dotyczy aktualnego stanu badań nad występowaniem i mutagennością MX oraz związków pokrewnych.

Struktura MX i związków pochodnych

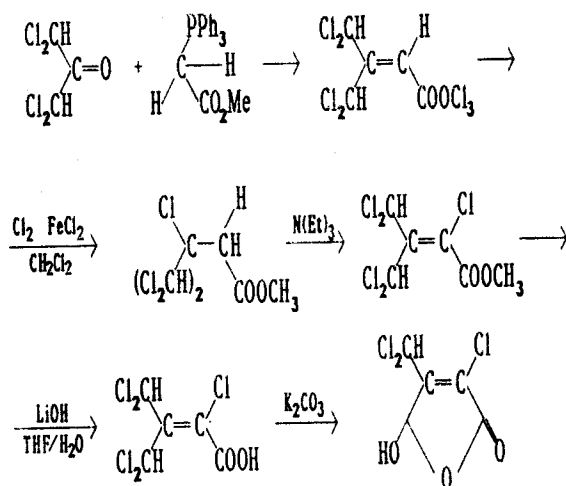
MX został zidentyfikowany jako 3-chloro-4-(dichlorometylo)-5-hydroxy-2(5H)-furanon, łatwo izomeryzujący przez otwarcie pierścienia do związku linio-

wego, oznaczanego w literaturze E-MX [8]. Wzory strukturalne tych związków przedstawiono na rysunku 1.



Rys. 1. Struktury MX i E-MX

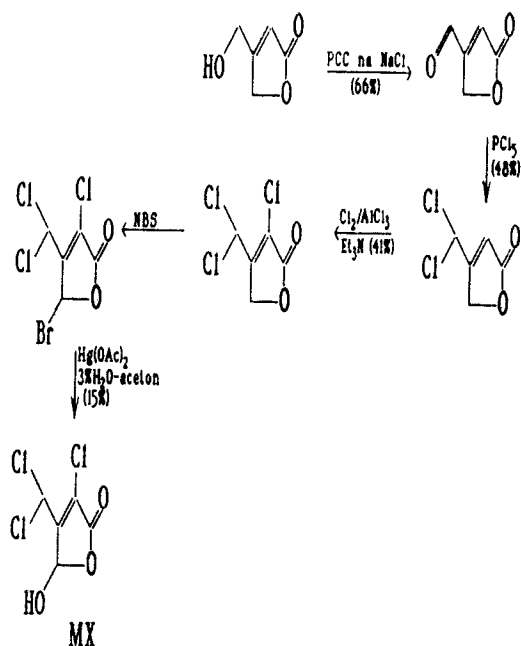
Mutagenność E-MX jest znacznie niższa niż MX [9, 10], ale przy niskim pH E-MX izomeryzuje ponownie do MX, dlatego związek ten również znajduje się w centrum uwagi. MX został zsyntetyzowany przez Padmapriya i in. [11] w pięcioetapowym procesie wychodzącym z tetrachloroacetonu i karboksymetylenometoksytrifenylofosforanu (rys. 2).



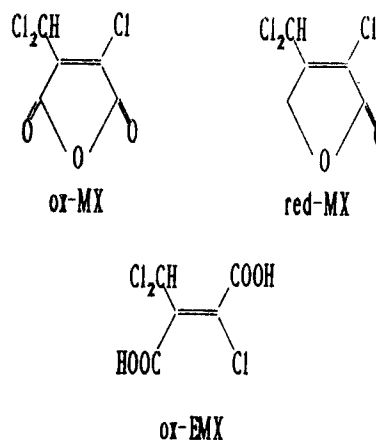
Rys. 2. Synteza MX według Padmapriya i in. [11]

Ogólna wydajność reakcji wynosiła 44%. Otrzymany związek wykazywał identyczną mutagenność w stosunku do szczepów TA98 i TA100 bakterii *Salmonella typhimurium*. Zsyntetyzowano także szereg podobnych do MX związków stosując jako podstawowy substrat 4-(hydroksymetyl)-2(5H)-furanon [12] (rys. 3).

Ten sposób syntezy pozwalał również na otrzymanie wielu związków podobnych do MX pod względem budowy, dzięki czemu w kolejnych pracach tego samego zespołu zbadano zależność aktywności mutagennej od czynników strukturalnych [13, 14]. Wykazano także, że MX krystalizuje jako bezwodnik [15]. Kronberg i współpracownicy [16] zsyntetyzowali utlenione i zredukowane analogi MX oraz utlenioną formę izomeru E-MX (rys. 4).



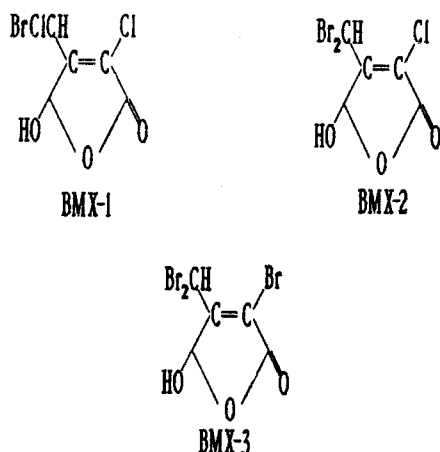
Rys. 3. Synteza MX według LaLonde i in. [12] (PCC — chromian chloropirydyniowy, NBS — N-bromo imid kwasu bursztynowego)



Rys. 4. Struktury ox-MX, red-MX i ox-E-MX

Pośród tych trzech związków tylko forma red-MX wykazywała aktywność mutagenną, ale około 70 razy niższą niż MX w stosunku do szczepu TA100. Nie obserwowano natomiast takiej aktywności w stosunku do szczepu TA98. (Test Ames'a wykonuje się zwykle na kilku szczepach bakterii *Salmonella typhimurium*. Jeśli po inkubacji otrzyma się przynajmniej na jednym z nich wynik dodatni, to próbę która podlega badaniu uznaje się również za dodatnią). Wymienione związki wykryto w ekstraktach wody chlorowanej, a stężenie formy ox-MX było 20÷40 razy wyższe niż stężenie MX. Pozostałe analogi MX występowały w porównywalnych do MX stężeniach. Badano także bromowane (BMX) analogi MX i okazały się one również wysoce aktywnymi związkami mutagennymi. Wykryto, że BMX

powstają w trakcie chlorowania tyrozyny w obecności bromków [17]. BMX-2 i BMX-3 są silniejszymi mutagenami niż MX.



Rys. 5. Struktury bromowanych analogów MX

Mutagenność i toksyczność MX

Badania mutagenności ekstraktów wody pitnej prowadzone były na długo przed wykryciem i zidentyfikowaniem MX. Dzięki tym badaniom udało się ustalić szereg cech związku (lub związków) odpowiedzialnego za aktywność mutageną. Wykryto, iż takie związki (związek) występują w wodzie w bardzo niewielkich stężeniach, które oszacowano na ng/dm³. Odkryto, iż związki te są nietrwałe w środowisku alkalicznym, a w obecności takich reduktorów jak Na₂S₂O₃, Na₂SO₃ i SO₂ tracą aktywność mutageną. Na podstawie chromatografii żelowej i ultrafiltracji oceniono ciężar cząsteczkowy związków mutagennych jako niższy od 200 lub 500 [18 i prace tam cytowane]. Przewidywania te znakomicie pasują do właściwości wykrytego później w wodach pitnych 3-chloro-4-(dichlorometylo)-5-hydroxy-2(5H)-furanu (MX), związku o bardzo silnych właściwościach mutagennych.

Mutagenność ekstraktów wody pitnej (mutagenność MX) przyjęto badać standardowym testem Ames'a [4] zwykle w stosunku do różnych szczepów bakterii *Salmonella typhimurium*. Najwyższą aktywność zwykle obserwuje się w stosunku do szczepu TA100 i dlatego najczęściej stosuje się go do oceny mutagenności. W tabeli 1 zebrano dotychczas uzyskane dane dotyczące mutagenności MX; mimo dość rozbieżnych danych liczbowych wskazują one jednak na bardzo wysoką aktywność genotoksyczną MX. Toksyczność ostra MX w stosunku do myszy wynosi 128 mg MX/kg ciała·d [19], natomiast wartość LD₅₀ dla szczura wynosi 200 mg MX/kg [20].

Oprócz wyników podanych w tabeli w pracach [9, 26, 27] przyjmowano mutagenność MX dla szczepu TA100 jako 5600 rev./nmol. Uważa się, że mutagenność MX związana jest z elektrofilowymi właściwościami związku [15]. Później wykazano korelację między mutagennością a gęstością elektronową związaną z węglami pierścienia C-2, C-3 i C-4 [14] oraz istotne znaczenie atomów Cl, szczególnie w grupie metylowej przy węglu C-4 [13].

Tabela 1. Mutagenność MX w stosunku do bakterii *Salmonella typhimurium*

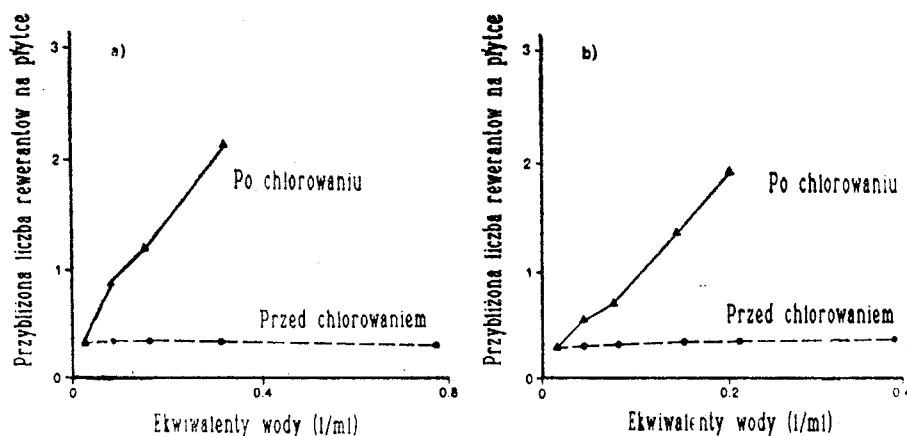
Mutagenność MX w stos. do TA100	Mutagenność MX w stos. do innych szczepów	Lit.
13000 rev./nmol ^{a)} 14200 rev./nmol ^{b)}		[21]
13000 rev./nmol	TA97 1557 rev./nmol TA98 1963 rev./nmol TA100+S9 1390 rev./nmol ^{c)} TA102 1227 rev./nmol TA1535 103 rev./nmol TA1538 28 rev./nmol TA92 69 rev./nmol	[19]
6300 rev./nmol	+S9 340 rev./nmol	[22]
5600—5700 rev./nmol		[10]
2800—10000 rev./nmol		[23]
2710 rev./nmol		[7]
5600±500 rev./nmol		[24]
5848 rev./nmol ^{d)} 3140 rev./nmol ^{e)} 3293 rev./nmol ^{e)}		[25]
6000 rev./nmol		[11]
3840±1430 rev./nmol		[14]

a) — w metanolu; b) — w wodzie; c) — z aktywacją metaboliczną homogenatem z wątroby szczura; d) — syntetyzowany wg [11]; e) — syntetyzowany wg [12].

Prekursory MX

Ponieważ występowanie MX w wodach pitnych nie ulega już wątpliwości należy zapytać jakie są źródła tych związków, jakie warunki sprzyjają ich powstawaniu a jakie temu przeciwdziałają oraz jakie procesy technologiczne będą sprzyjały usuwaniu tego typu mutagenów z wody pitnej.

Chlorowanie wody jest głównym procesem technologicznym generującym w wodzie pitnej wiele halo-genopochodnych związków organicznych. Rodzaj i ilość reakcji związków organicznych z chlorem w roztworach wodnych kontrolowana jest przez takie czynniki jak pH i stosunek ilości chloru do substancji organicznej. Takim czynnikiem może być również obecność bromków, które powodują powstawanie bromopochodnych. Cl₂ może brać udział w reakcjach podstawiania, addycji i utleniania [18]. Badania mutagenności ekstraktów wody przed i po chlorowaniu wskazują, że chlorowanie odpowiedzial-



Rys. 6. Wpływ chlorowania wody na wzrost mutagenności [18]

ne jest za wzrost mutagenności. Na rysunku 6 pokazano zależność wzrostu mutagenności od chlorowania wody.

Aby jednak powstały związki halogenopochodne woda musi zawierać związki będące źródłem węgla. Wody surowe zwykle zawierają kilka mg węgla organicznego w litrze, na co składają się kwasy humusowe, fulwowe i w mniejszej mierze inne związki organiczne. Należy jednak zaznaczyć, że OWO, parametr charakteryzujący ilość węgla organicznego, dość słabo koreluje z generowaniem mutagenności [28]. Od wielu już lat wiadomo, że chlorowanie kwasów humusowych i fulwowych prowadzi do powstawania takich związków jak haloformy i wiele halogenopochodnych aldehydów i kwasów karboksylowych. Budowa kwasów humusowych i fulwowych nie jest jeszcze dobrze poznana. Wiadomo jednak, iż zawierają one szereg struktur fenolowych w swoich cząsteczkach. Aby poznać więc mechanizmy reakcji podczas chlorowania, obserwuje się te procesy na substancjach modelowych, o znanej strukturze np. fenol lub rezorcyna, co pozwala na wyjaśnienie powstawania wielu produktów chlorowania. Typowym organicznym składnikiem wód naturalnych są aminokwasy. Występują w stężeniach do 100 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$ (zwykle w formach bardziej złożonych jak peptydy i proteiny). Wiadomo, że aminokwasy łatwo ulegają reakcjom z Cl_2 i zidentyfikowano już wiele produktów takich przemian [29]. Dlatego też właśnie w reakcjach chlorowania kwasów humusowych, fulwowych, fenoli i aminokwasów szuka się przyczyn występowania MX w wodzie pitnej.

Substancje humusowe

Chlorowanie roztworów kwasów fulwowych i humusowych prowadzi do powstawania produktów potencjalnie niebezpiecznych dla zdrowia człowieka. W 1974 wykryto powstawanie chloroformu podczas chlorowania wody [30], a w kilka lat później uzna-

no substancje humusowe za prekursory haloformów [31]. Po przytoczonych doniesieniach szczegółowo badano produkty chlorowania kwasów humusowych odkrywając szeroką różnorodność powstających związków, a w tym nasycone i nienasycone halogenowe pochodne kwasów karboksylowych [32]. W innej pracy zbadano i zidentyfikowano ponad 100 produktów chlorowania kwasów humusowych [33]. Wiadomo również, że chlorowanie roztworów kwasów humusowych prowadzi do wzrostu aktywności mutagennej, co potwierdzono w szeregu prac [18, 34, 35, 36]. Np. Bull [36] wykazał, że roztwory substancji humusowych nie wykazują aktywności mutagennej przed chlorowaniem, natomiast chlorowanie generuje taką aktywność w stosunku do szczepu TA100. Bardzo istotnego spostrzeżenia dokonał Maruoka [37], który wykazał, że chlorowanie różnych substancji humusowych prowadzi do jakościowo podobnych lub identycznych produktów. Wskazuje to na fakt istnienia wspólnych (dla różnych substancji humusowych) centrów reakcyjnych odpowiedzialnych za generowanie produktów mutagennych.

MX wykryto po raz pierwszy w wodach po chlorowaniu pulpy celulozowej [5, 6], a dopiero później w wodach wodociągowych. Strukturalne podobieństwo lignin (z którymi mamy do czynienia w przypadku pulpy drzewnej) i substancji humusowych w wodzie sugerują podobieństwo mechanizmów generowania MX w trakcie chlorowania. Biorąc to pod uwagę, nie może być zaskoczeniem upatrywanie prekursora MX w kwasach fulwowych i humusowych. I rzeczywiście szereg eksperymentów chlorowania przeprowadzonych na roztworach kwasów humusowych, fulwowych oraz wodach naturalnych zawierających substancje humusowe potwierdziło generowanie MX. Kronberg i współpracownicy [10] chlorowali wody naturalne o wysokiej zawartości substancji humusowych ($\text{OWO} = 25 \text{ mg}/\text{dm}^3$) chlorem (Cl_2 : $\text{OWO} =$

= 1 : 1) otrzymując w rezultacie wysokie zawartości MX i E-MX około $200 \div 700 \text{ ng/dm}^3$. Podobnie Backlund i współpracownicy otrzymali porównywalne ilości MX i E-MX chlorując wody naturalne o $\text{OWO} = 20 \text{ mg/dm}^3$. Zmniejszenie dawki chloru z 20 do 10 mg/dm^3 nie wpływało na obniżenie tworzenia MX. Wyraźny spadek ilości generowanego mutagenu obserwowano stosując alternatywne dezynfektanty: ClO_2 , NH_2Cl i $\text{O}_3/\text{NH}_2\text{Cl}$ [26]. Chlorowanie roztworów kwasów fulwowych i humusowych pozwalało wykryć w roztworach nie tylko stosunkowo duże ilości MX i E-MX ale także ich pochodnych red-MX, ox-MX i ox-E-MX [16]. Ponieważ substancje humusowe składają się z wysokomolekularnych cząsteczek o niezbyt dobrze poznanych strukturach, poszukuje się również prostszych substancji, których chlorowanie pozwoliłoby wyjaśnić mechanizmy reakcji prowadzących do tworzenia produktów mutagennych. Dwie grupy związków organicznych badano pod kątem generowania mutagenności pod wpływem chlorowania: aminokwasy i fenole.

Aminokwasy

Aminokwasy często są składnikami wody; zwykle jednak występują w niskich stężeniach rzędu $100 \mu\text{g/dm}^3$ i to w formie związanych cząsteczek jako proteiny i peptydy. W trakcie procesu uzdatniania ilość aminokwasów może wzrastać dzięki hydrolizie, depolimeryzacji i metabolizmowi protein i peptydów. Aminokwasy stosunkowo łatwo wchodzą w reakcje z Cl_2 tworząc początkowo mono- i dichloroaminy [18], a następnie szereg bardzo zróżnicowanych produktów reakcji, tak chloropochodnych jak i związków nie zawierających atomów chloru. Jednym z produktów chlorowania jest dichloroacetonitryl wykazujący aktywność mutagenną w stosunku do szczepu TA100 [18]. Szczególnie duże zapotrzebowanie na chlor wykazywały rozcieńczone roztwory tyrozyny. Produkty chlorowania tyrozyny (ekstrakty na XAD-2) wykazywały również stosunkowo wysoką aktywność mutagenną. Frakcjonowanie metodą HPLC pozwoliło na wyodrębnienie frakcji odpowiedzialnej za tę aktywność, a analiza GC/MS pozwoliła na wykrycie i zidentyfikowanie MX i E-MX [2]. Aktywność mutagenną wykazywało również wiele produktów chlorowania fenyloalaniny, wśród których zidentyfikowano takie substancje mutagenne jak chlorek benzoilu, chlorek benzylu, dichloroacetonitryl oraz 2-fenyl-2,2-dichloroetanal (PDCE) [2]. Obecność PDCE nie wyjaśniała jednak wysokiej aktywności mutagennej ekstraktów produktów chlorowania fenyloalaniny, izolowanych przy $\text{pH}=2$. Jak wynika z powyższych danych, aminokwasy można uważać

za potencjalne prekursory mutagenności, w tym za prekursory generujące MX.

Związki fenolowe

Ponieważ w kwasach humusowych stwierdzono występowanie wielu struktur fenolowych i wiadomo, że reagują one z chlorem [32, 33], to związki fenolowe posłużyły, jako modele kwasów humusowych, do badania przypuszczalnego mechanizmu powstawania MX. Chlorowanie rezorcyny, pirokatechiny i kwasu 3,5-dihydroksybenzoesowego prowadziło do niewielkiej aktywności mutagennej [2]; była ona minimalna w porównaniu z aktywnością produktów chlorowania tyrozyny. Holmbom i in. [24] wykryli w produktach chlorowania kilku fenoli (fenol, pirokatechina, kwas p-hydroksybenzoesowy) znaczne ilości MX i E-MX. Warunki chlorowania roztworów fenoli odpowiadały stosowanym zwykle przy chlorowaniu wód humusowych $\text{OWO} = 20 \text{ mg/dm}^3$ i $\text{Cl}_2 : \text{OWO} = 1 : 1$. Rezultaty referowane w pracach [2] i [24] są sprzeczne i jakkolwiek z pracy [24] wynika, iż fenole mogą stanowić prekursory MX w wodach uzdatnionych, to poznanie dokładnego mechanizmu tworzenia MX wymaga jeszcze wielu badań podstawowych.

Alternatywne dezynfektanty

Dane literaturowe potwierdzają w pełni hipotezę, że przyczyną powstawania MX jest chlorowanie, a więc proces ten jest odpowiedzialny za generowanie dużej części mutagenności wody pitnej. Logiczną więc kolejną rzeczą, rozpoczęto badania nad obecnością MX w wodzie pitnej po zastosowaniu alternatywnych dezynfektantów takich jak ozon, dwutlenek chloru, chloraminy. Systematyczne badania dezynfektantów pod kątem generowania mutagenności potwierdziły szczególną rolę chlorowania [38].

Ozonowanie

Dotychczas otrzymane wyniki mutagenności różnych próbek wód ozonowanych różnymi dawkami ozonu i badanych na różnych bakteriach są dosyć rozbieżne. Potwierdzano bowiem zarówno wzrost mutagenności po ozonowaniu w stosunku do wody surowej, jak i brak zmian oraz spadek aktywności mutagennej koncentratów wody ozonowanej [3]. Z punktu widzenia generowania MX, zaobserwowano spadek zdolności tworzenia tego mutagenu po wstępnym ozonowaniu wody ale należy podkreślić, iż jest to pojedynczy wynik, chociaż cytowany w dwóch pracach [24, 26]. W innej pracy sugeruje się, iż ozonowanie może usuwać lub dezaktywować prekursory mutagenności przed chlorowaniem [39].

Chloraminowanie

Wiadomo, że chloraminowanie, podobnie jak chlorowanie, jest przyczyną generowania aktywności mutagennej [3]. Chloraminowanie stosowane w podobnej dawce co chlorowanie powoduje generowanie około 5-krotnie mniejszej ilości MX [26].

Dwutlenek chloru

Dwutlenek chloru również może być przyczyną aktywności mutagennej koncentratu wody pitnej, chociaż jest ona niższa niż generowana przez chloraminy [3, 40, 41]. Zastosowanie ClO_2 w miejsce chloru znacznie zmniejsza (około 10-krotnie) ilość powstającego MX [24, 26]. Znaczne zmniejszenie aktywności mutagennej wody chlorowanej dwutlenkiem chloru potwierdzają także Tye i Breach [39] oraz Anderson i in. [38].

Usuwanie MX z wody pitnej

Prowadzono badania zarówno nad detoksykacją MX, jak i jego usuwaniem z wody przez adsorpcję na węglu aktywnym. Elektrofilowe właściwości MX [15] pozwalały na przypuszczenie, iż ekwimolarne ilości nukleofili takich jak OH^- , SO_2 (HSO_3^- , lub SO_3^{2-}), pyrolidon lub glutation mogą być pomocne w redukcji mutagenności MX. Uprzednio wykazano bowiem, że inny związek o właściwościach mutagennych, 2-chloropropenal, można detoksykować powyższymi nukleofilami [22]. Na taką możliwość wskazuje także dezaktywacja MX homogenatem (S9) z wątroby szczura, często w literaturze przytaczana [19, 22]. Detoksykacja MX glutationem tłumaczy również brak aktywności genotoksycznej tego mutagenu po doustnym podaniu tego związku gryzoniom. Z badań tych wynika, że cząsteczki MX osiagające wątrobę zostaną łatwo skoniugowane i wydalone z organizmu [42]. W trakcie reakcji *in vitro* MX z glutationem obserwuje się utratę atomów chloru i protonu aldehydowego z cząsteczki MX [22]. Wykazano także, że MX może wiązać się z albuminą BSA [43].

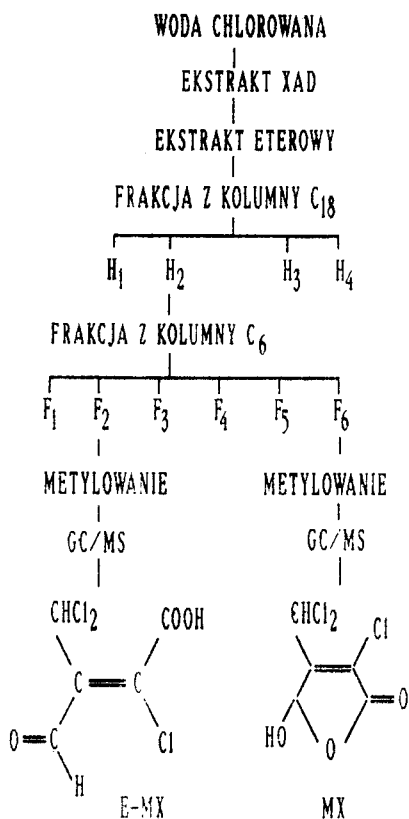
Granulowany węgiel aktywny (GAC) stosowany w wielu stacjach uzdatniania wody okazuje się dobrym środkiem do usuwania aktywności mutagennej wody pitnej [3 i literatura tam cytowana]. Usuwanie MX na filtrach węglowych było przedmiotem pracy Huck'a i in. [44], w której stwierdzono, iż MX usuwany jest z wody przez adsorpcję na GAC. Po pewnym czasie pracy filtru następuje zmiana mechanizmu usuwania MX na reakcyjno-chemiczny. Ekstrakcja filtrów węglowych udowadnia, iż zaadsorbowane mutageny MX i E-MX ulegają przekształceniom chemicznym. Wysoką efektywność filtrów węglowych w usuwaniu mutagenności po-

twierdzają również inni autorzy [27, 39]. Tye i Breach [39] stwierdzają, iż nie obserwuje się elucji mutagenów z filtrów węglowych nawet po dwóch latach ich stosowania. Autorzy ci tłumaczą to przypuszczalnymi przemianami chemicznymi jakim ulegają te związki na filtrach, co można uznać za potwierdzenie spostrzeżeń dotyczących przemian chemicznych zaadsorbowanego MX [44]. Zauważono także, że dezynfekcja wody prowadzona za filtrami GAC nie generuje już mutagenności niezależnie od użytego dezynfektanta: Cl_2 , ClO_2 czy NH_2Cl [38].

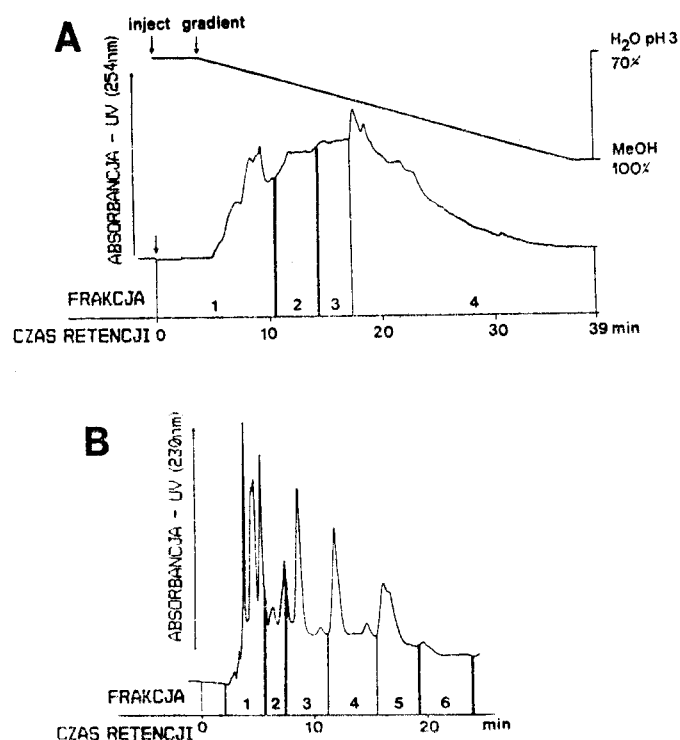
Analityka MX i E-MX

Analiza MX i E-MX w wodzie pitnej jest bardzo trudna ze względu na bardzo niskie stężenia (rzędu kilku ng/dm^3), przy których można spodziewać się tych związków. Na tych poziomach stężeń w wodzie pitnej występują setki związków organicznych, tak że wyodrębnienie i identyfikacja MX możliwe są jedynie metodą GC/MS. Procedura analityczna obejmuje zwykle adsorpcję związków organicznych zawartych w 1÷60 dm^3 wody na żywicach Amberlit XAD. Początkowo stosowano XAD-2 ale znacznie lepsze rezultaty osiąga się na żywicach XAD-4 i XAD-3 [10, 45]. Rzadziej stosuje się ekstrakcję wody eterem etylowym [26, 44]. Po adsorpcji złożę żywicy zwykle suszy się strumieniem azotu, a następnie eluuje octanem etylu [10, 16, 27, 46]. Po etapie elucji można w literaturze wyróżnić dwie drogi postępowania: albo stosuje się frakcjonowanie zatężonego eluatu metodą HPLC, albo po odparowaniu go do sucha przeprowadza się metylowanie. Pierwsza z tych dróg zakłada przeprowadzenie wyeluowanych związków do kwaśnego roztworu wodnego, ekstrakcję eterem etylowym i frakcjonowanie ekstraktu na dwóch kolumnach: półpreparatywnej 10×250 mm wypełnionej Nucleosilem 7 C_{18} , na której wyodrębnia się frakcję wykazującą najwyższą mutagenność. Wybraną frakcję rozdziela się na następnej kolumnie analitycznej 4,5×250 mm Phase Sep Spherisorb 5 C_8 , uzyskując frakcje zawierające E-MX i MX. Kolejność tych operacji przedstawiono na rysunku 7, a uzyskiwane chromatogramy na rysunku 8.

Następnym etapem w analityce MX jest jego metylowanie, które przeprowadza się 20% roztworem H_2SO_4 w metanolu w temperaturze 70°C w ciągu 1 godziny. Mieszaninę reakcyjną neutralizuje się Na_2CO_3 i ekstrahuje z niej metylowe pochodne E-MX i MX. Ekstrakt ten analizuje się już w układzie GC/MS stosując kolumny kapilarne DB-1 [16, 44] lub DB-5 [47] produkcji J&W długości 30 m i średnicy 0,25 mm albo podobne pod względem polarności i rozmiarów kolumny typu SE-30 [10] lub CPSi15-CB o parametrach: 50 m×0,25mm [27]. Do



Rys. 7. Frakcjonowanie ekstraktu związków organicznych w celu wyodrębnienia MX [9, 10]



Rys. 8. Chromatografia cieczowa (HPLC) ekstraktów XAD z wody [9, 10]

identyfikacji wykorzystuje się jonizację elektronową i odpowiednie fragmenty metylowanych pochodnych MX i E-MX [10] (tab. 2).

Tabela 2. Identyfikacja MX

Związek	Frag-ment	m/z	Intensywność wzgl.
MX	M—OCH ₃	198.912	0,51
		200.909	1,00
		202.906	0,55
E-MX	M—Cl	241.003	0,54
		243.001	0,35
	M—OCH ₃	244.954	1,00
		246.951	0,95

Występowanie MX w wodach pitnych

Występowanie MX w wodach wodociągowych jest niewątpliwie związane ze stosowaniem chloru w procesie uzdatniania, chociaż niewielkie jego ilości mogą także powstawać przy stosowaniu ClO₂ i NH₂Cl jako dezynfektantów. Związek ten wykryto już w wodach pitnych w Finlandii [7, 10], Holandii [27], Japonii [46], Wielkiej Brytanii [39], Kanady [44] i Stanów Zjednoczonych [21]. Niebezpieczeństwo powstawania MX w trakcie procesu uzdatniania znacznie wzrasta jeśli woda surowa zawiera znaczne ilości węgla organicznego (szczególnie związków humusowych). Należy jednak zaznaczyć, iż nie ma prostej zależności między OWO a ilością powstającego MX [24, 28] i wykrywano go nawet w wodach o umiarkowanej zawartości OWO ok. 2÷3 mg/dm³ [46]. Stosunkowo „bezpieczne” pod względem generowania MX są wody o podwyższonych wartościach pH, ponieważ związek ten jest niestabilny przy pH>7 [24, 47, 48]. Wyniki dotychczasowych badań nie pozwalają jeszcze nawet na przybliżoną ocenę ryzyka zdrowia człowieka związaną z obecnością MX w wodzie pitnej. Przypuszczać można, iż ryzyko spożywania MX nie jest jednak duże ze względu na wymienioną wyżej niestabilność MX w wyższych pH oraz jego podatność na dezaktywację naturalnymi nukleofilami takimi jak glutation. Jest prawdopodobne, że system obronny człowieka (wątroba) byłby zdolny do detoksykacji MX [17]. Obecnością MX w wodzie udaje się wyjaśnić ok. 35÷÷65% aktywności mutagennej. Pozostała część wymaga dalszych badań. Jest prawdopodobne, że część tej mutagenności można by było wyjaśnić powstawaniem bromopochodnych analogów MX [17]. Pozostaje otwarte jednak inne pytanie: czy tej niezwykle wysokiej aktywności mutagennej towarzyszy również kancerogenność? Odpowiedź uzyskać można dopiero po przeprowadzeniu odpowiednich badań *in vivo* na ssakach.

LITERATURA

1. M.J. McGUIRE: J.Am. Water Works Assoc., 81, 35 (1989).
2. H. HORTH: Aqua, 38, 80 (1989).
3. J.R. MEIER: Mutation Res., 196, 211 (1988).
4. B. N. AMES, J. McCANN, E. YAMASAKI: Mutation Res., 31, 347 (1975).
5. B. R. HOLMBOM, R. H. VOSS, R. D. MORTIMER, A. WONG: Tappi, 64, 172 (1981).
6. B. R. HOLMBOM, R. H. VOSS, R. D. MORTIMER, A. WONG: Environ. Sci. Technol., 18, 333 (1984).
7. J. HEMMING, B. HOLMBOM, M. REUNANEN, L. KRONBERG: Chemosphere, 15, 549 (1986).
8. L. KRONBERG, B. HOLMBOM, J. HEMMING, L. TIKKANEN: Proc. XVI Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society (Brussels, August 25—30, 1986) p. 104.
9. L. KRONBERG, B. HOLMBOM, L. TIKKANEN, in: Ed. by R. L. JOLLEY, L. W. CONDIE, J. D. JOHNSON, S. KATZ, R. A. MINEAR, J. S. MATTICE, V. A. JACOBS: Water Chlorination, 6, 137, Lewis Publ., (1990).
10. L. KRONBERG, B. HOLMBOM, M. REUNANEN, L. TIKKANEN: Environ. Sci. Technol., 22, 1097 (1988).
11. A. A. PADMAPRIYA, G. JUST, N. G. LEWIS: Can. J. Chem., 63, 828 (1985).
12. R. T. LaLONDE, H. PERAKYLA, M. P. HAYES: J. Org. Chem., 55, 2847 (1990).
13. R. T. LaLONDE, G. P. COOK, H. PERAKYLA, Lin BU: Chem. Res. Toxicol., 4, 540 (1991).
14. R. T. LaLONDE, G. P. COOK, H. PERAKYLA, C. W. DENCE: Chem. Res. Toxicol., 4, 35 (1991).
15. R. T. LaLONDE, H. PERAKYLA, Y. ISHIGURO, J. CLARDY, L. S. BRINEN: Chem. Res. Toxicol., 3, 404 (1990).
16. L. KRONBERG, R. F. CHRISTMAN, R. SINGH, L. M. BALL: Environ. Sci. Technol., 25, 99 (1991).
17. H. HORTH: J. Fr. Hydrol., 21, 135 (1990).
18. M. FIELDING, H. HORTH: Water Supply, 4, 103 (1985).
19. J. R. MEIER, W. F. BLAZAK, R. B. KNOHL: Environ. Mol. Mutagenesis, 10, 411 (1987).
20. H. KOMULAINEN, H. HUUSKONEN, V.-M. KOSMA, T. VARTIAINEN, S. LOTJÖNEN, K. SAVALAINEN, J. TUOMISTO: Paper presented at Vth International Congress of Toxicology, Brighton, England, July 1989, abstr. no. 218, p. 73.
21. J. R. MEIER, R. B. KNOHL, W. E. COLEMAN, H. R. RINGHAND, J. W. MUNCH, W. H. KAYLOR, R. P. STREICHER, F. C. KOPFLER: Mutation Res., 189, 363 (1987).
22. Y. ISHIGURO, R. T. LaLONDE, C. W. DENCE, J. SANTODONATO: Environ. Toxicol. Chem., 6, 935 (1987).
23. B. HOLMBOM, R. H. VOSS, R. D. MORTIMER, A. WONG: Environ. Sci. Technol., 18, 333 (1984).
24. B. HOLMBOM, L. KRONBERG, P. BACKLUND, V.-A. LÅNGVIK, J. HEMMING, M. REUNANEN, A. SMEDS, L. TIKKANEN: Water Chlorination, 6, 125 (1990).
25. R. T. LaLONDE, G. P. COOK, H. PERAKYLA, C. W. DENCE, J. G. BABISH: Environ. Mol. Mutagenesis, 17, 40 (1991).
26. P. BACKLUND, L. KRONBERG, L. TIKKANEN: Chemosphere, 17, 1329 (1988).
27. P. BACKLUND, E. WONDERGEM, K. VOOGD, A. de JONG: Sci. Total Environ., 84, 273 (1989).
28. T. VARTIAINEN, A. LIIMATAINEN: Chemosphere, 17, 189 (1988).
29. W. H. GLAZE, J. L. BURLESON, J. E. HENDERSON, P. C. JONES, W. KINSTLEY, G. R. PEYTON, R. RAWLEY, F. Y. SALEH, G. SMITH: Analysis of chlorinated organic compounds formed during chlorination of wastewater products, EPA-600/4-82-072, USEPA, Athens, Georgia, 1982.
30. J. J. ROOK: Water Treatment Exam., 23, 234 (1974).
31. J. J. ROOK: Environ. Sci. Technol., 11, 478 (1977).
32. R. F. CHRISTMAN, D. L. NORWOOD, Y. SEO: Paper presented at The Second Intern. Humic Subst. Soc. Conference, Birmingham, July 23—28, 1984. (cyt. za M. FIELDING, H. HORTH, lit. 18).
33. E. W. B. de LEER, J. S. S. DAMSTE, C. ERKELENS, L. de GALAN: Environ. Sci. Technol., 19, 512 (1985).
34. J. C. LOPER, M. W. TABOR, L. ROSENBLUM, J. De MARCO: Environ. Sci. Technol., 19, 333 (1985).
35. H. J. KOOL, C. F. van KREIJL, H. van OERS: Toxicol. Environ. Chem., 7, 11, (1984).
36. R. J. BULL: Toxicol. Environ. Chem., 6, 1 (1982).
37. S. MARUOKA: Sci. Total Environ., 54, 195 (1986).
38. W. B. ANDERSON, P. M. HUCK, S. A. DAIGNAULT, G. A. IRVINE, D. W. RECTOR, E. SAVAGE, R. C. von BORSTEL, D. T. WILLIAMS: Water Chlorination, 6, 201 (1990).
39. R. J. TYE, R. A. BREACH: Water Supply, 7, 33, (1989).
40. R. G. MILLER, F. C. KOPFLER, L. W. CONDIE, M. A. PEREIRA, J. R. MEIER, H. P. RINGHAND, M. ROBINSON, B. C. CASTO: Environ. Health Perspect., 69, 129 (1986).
41. J. R. MEIER, C. J. RUDD, W. F. BLAZAK, E. S. RICCIO, R. G. MILLER: Environ. Mutagenesis, 8, 55, (1986).
42. J. R. MEIER, R. B. KNOHL, B. A. MERRICK, C. L. SMALLWOOD: Water Chlorination, 6, 159 (1990).
43. L. HAATAJA, T. VARTIAINEN, S. LAMPELO, S. LOTJÖNEN, J. TUOMISTO: Toxicol. Lett., 59, 187 (1991).
44. P. M. HUCK, R. C. ANDREWS, S. A. DAIGNAULT: Vom Wasser, 74, 245 (1990).
45. K. M. SCHENK, J. R. MEIER, H. P. RINGHAND, F. C. KOPFLER: Environ. Sci. Technol., 24, 863 (1990).
46. N. SUZUKI, J. NAKANISHI: Chemosphere, 21, 387 (1990).
47. T. VARTIAINEN, K. HEISKANEN, S. LOTJÖNEN: Fresenius J. Anal. Chem., 340, 230, (1991).
48. P. BACKLUND, E. WONDERGEM, K. VOOGD, A. de JONG: Chemosphere, 18, 1093, (1989).

STRUCTURE AND PROPERTIES OF THE MUTAGENIC COMPOUND MX IDENTIFIED IN DRINKING WATER

The origin and structure of MX (3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone) and of its derivatives were discussed. The mutagenic properties of MX (which had

been identified in drinking water) were established in terms of the Ames test. Some precursors of MX (humic substances, amino acids, phenols) were presented, and the contribution of some oxidizers (Cl_2 , O_3 , ClO_2) to the origin of MX was determined. Consideration was also given to the methods by which MX can be analyzed and removed.