

Jacek Nawrocki, Leif Kronberg, Przemysław Andrzejewski

MX – związek o silnej aktywności mutagennej w wodzie do picia

Związek wykazujący niezwykłą aktywność mutagenną, czyli 3-chloro-4-(dichlorometylo)-5-hydroksy-2(5H)-furanon, znany w literaturze jako MX, po raz pierwszy wyizolowano z chlorowanej pulpy drzewnej, a następnie stwierdzono jego obecność w wodzie do picia [1-3]. Wykazano, że MX powstaje również podczas chlorowania ścieków biologicznie oczyszczonych [4-6]. Także chloraminowanie wody generowało jej aktywność mutagenną, która co prawda poddawała się działaniu protein (S9 mix, BSA, glutation), ale w znacznie mniejszym stopniu niż roztwory MX [7]. Stan wiedzy dotyczący MX do roku 1992 został przedstawiony w artykule przeglądowym [8]. Celem niniejszej pracy było omówienie dalszego postępu w badaniach nad właściwościami MX oraz przedstawienie wyników badań przeprowadzonych po raz pierwszy w Polsce.

Aktywność mutagenna MX jest tak wysoka, iż można ją tylko porównywać z aktywnością przejawianą przez aflatoksyny [9]. Ta właśnie aktywność i powszechna obecność MX w wodach do picia [8] skłoniły Światową Organizację Zdrowia (WHO) do umieszczenia tego związku na liście potencjalnie szkodliwych dla człowieka produktów ubocznych procesu dezynfekcji [10]. Jednak brak odpowiednich danych doświadczalnych uniemożliwia wyznaczenie zalecanej, dopuszczalnej wartości stężenia MX w wodzie do picia. MX odpowiedzialny jest za około 30+60% aktywności mutagennej ekstraktów wody pitnej [11-13]. Nasuwa się więc pytanie, jakie związki odpowiadają za pozostałe 40+70% aktywności? Czy jest to stosunkowo liczna grupa związków o średniej aktywności, czy też kilka związków o stosunkowo wysokiej aktywności mutagennej? Czy są to związki pokrewne z MX [12]? Przebadano wiele połączeń z rodziny furanonów, związków zbliżonych strukturą do MX [11,13-15], lecz jedynie bromowane analogi MX wykazują aktywność mutagenną porównywalną z MX [11], choć doniesienie to nie zostało dotychczas potwierdzone przez innych autorów. Stwierdza się, że mutagenność BMX jest niższa niż MX, a poza tym związki te są bardzo nietrwałe [35]. Dotychczasowe doniesienia wskazują, że nie ma wyraźnej korelacji pomiędzy OWO a ilością generowanego MX [17]. Natomiast istnieje wyraźna zależność między ilością MX a pH reakcji: im niższe pH chlorowania tym więcej powstaje MX [18]. Podobną zależność generowania MX od pH zaobserwowano przy chlorowaniu fenoli i związków strukturalnie pokrewnych [19]. Zdolność powstawania MX w trakcie chlorowania fenoli jest podobna do wydajności otrzymywania MX przez chlorowanie tyrozyny [20]. Obniżanie więc pH w celu zmniejszenia ilości

generowanych trihalometanów (THM) ma więc swoje drugie oblicze. Badano także sezonowe wahania stężenia MX i choć zauważa się różnice w różnych porach roku to nie układają się one w powtarzalną korelację [21].

Stabilność MX w wodzie zależy nie tylko od pH ale także od temperatury [4,21]. Gotowanie wody zawierającej MX zdecydowanie zmniejsza jego stężenie, podobnie naświetlanie promieniami UV oraz obecność Na_2SO_3 [4]. W dziedzinie analityki MX wykazano wyższą rozdzielczość spektrometrii masowej nad niskorozdzielczą [9]. Proponuje się derywatyzację MX alkoholem pentafluoropropylowym [5,16]. Również analiza MX przy pomocy GC/ECD jest około 3,5-krotnie czulsza niż po metylacji [5,16].

Zwrócić także należy uwagę na prace nie dotyczące bezpośrednio MX, ale związku o zbliżonej strukturze, tj. kwasu mukochlorowego. Wykazano, iż między nukleozydami a kwasem mukochlorowym dochodzi do reakcji i utworzenia nowych produktów [26-28]. Biologiczne znaczenie tego odkrycia nie jest jeszcze znane.

Trwają także poszukiwania związków pokrewnych MX, które wykazywałyby zbliżoną aktywność mutagenną. Jednak mimo przetestowania szeregu związków o strukturze furanonu dotychczas nie znaleziono substancji o tak wysokiej aktywności mutagennej jak MX [13,28,29]. Szereg z tych pochodnych wykrywa się także w wodzie pitnej w stężeniach $1\text{--}45\text{ ng/dm}^3$ [13], a wiele z nich wykazuje aktywność mutagenną od umiarkowanej do wysokiej. Dowiedziono także, że struktury liniowe (izomery liniowe badanych furanonów) są mniej aktywne mutagennie niż analogi furanonowe [29]. Mutagenność furanonów głównie zależy od obecności grupy hydroksylowej [29]. Wskazywano także na istotną rolę pierścienia furanonowego oraz grupy dichlorometylowej przy węglu C-4 [14,30].

Do badania oddziaływań związku ze składnikami krwi szczura użyto ^{14}C -MX i wykazano, że około 32% MX łączy się z hemoglobina, ale tylko w umiarkowany sposób obniżało to jej zdolność do przenoszenia tlenu [22]. Wykazano statystyczne korelacje pomiędzy zachorowalnością na raka nerek i pęcherza moczowego a mutagennością wody do picia w Finlandii w latach 1955–1986 [23]. Ta korelacja dobrze koresponduje z farmakokinetyką MX, który w organizmie człowieka uwalnia się w nerkach [24], lecz wyniki te wzbudziły także szereg kontrowersji [25].

Toksyczność ostrą MX badano na szczurach i myszach. Stosunkowo duże dawki MX powodowały obniżenie konsumpcji wody i żywności, a w konsekwencji zmniejszenie przyrostu wagi gryzoni. Zmiany chorobowe zaobserwowano w przewodzie pokarmowym gryzoni [31]. Największe zmiany obserwowano w żołądkach gryzoni, jednak przenoszenie tych spostrzeżeń na człowieka jest dość ryzykowne, ponieważ budowa żołądka gryzoni znacznie różni się od ludzkiego, jak i stosowane dawki MX znacznie przekraczały te spotykane w rzeczywistości.

Dr hab. J.Nawrocki, prof.nadzw., mgr P.Andrzejewski: Uniwersytet im. A.Mickiewicza, Zakład Technologii Uzdatniania Wody, ul. M.Drzymały 24, 60-613 Poznań

Doc.dr L.Kronberg: Department of Organic Chemistry, University of Åbo Akademi, Akademigatan 1, SF-20500 Åbo/Turku, Finlandia

Metodyka badań i dyskusja wyników

MX – (3-chloro-4-(dichlorometylo)-5-hydroksy-2(5H)-furanon) zsyntetyzowano w Åbo Akademi (Turku, Finlandia), według procedury opisanej w pracy [32]. Derywatyzację alkoholami (metylowym, etylowym i pentafluoropropylowym) przeprowadzono według ogólnie znanych procedur [5,16,33,34]. Procedura oznaczania MX zawsze zawiera etap derywatyzacji, dzięki któremu blokuje się aktywną grupę hydroksylową. Zwykle stosuje się reakcję metylowania [33,34]. Proponowano też derywatyzację alkoholem pentafluoropropylowym [5,16]. Ponieważ reakcja estryfikacji przebiega również łatwo z etanolem, porównano te trzy metody derywatyzacji MX pod kątem czułości detektora ECD. Derywatyzowano po trzy roztwory MX o różnych stężeniach (153, 460 i 767 ng/cm³) i porównano sygnały detektora otrzymywane dla każdej derywatyzowanej próbki.

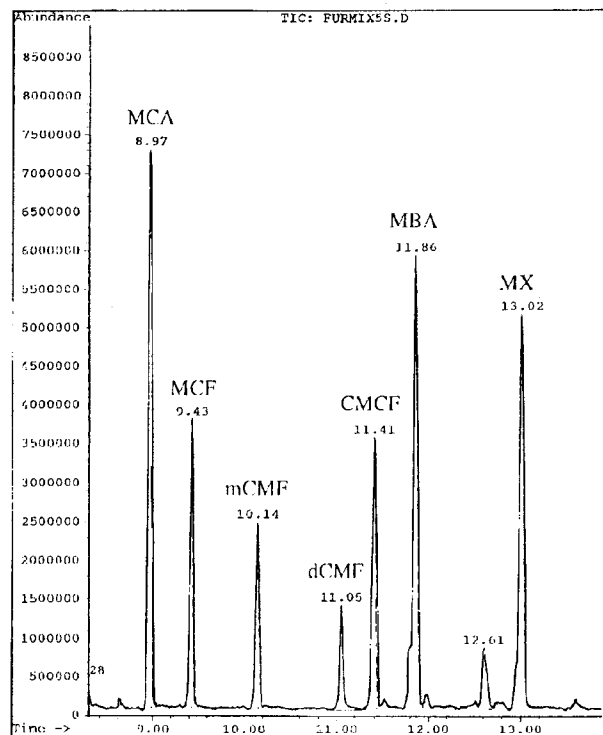
Należy podkreślić, że w literaturze nie ma zgody na temat wydajności reakcji metylowania MX. W badaniach [12] wykazano, że wydajność tej reakcji nie przekracza 60%, natomiast w pracy [35] podaje się, że reakcja ta przebiega ze 100% wydajnością. Według autorów prac [5,16] derywatyzacja MX alkoholem pentafluoropropylowym poprawia wykrywalność MX około 3,5-krotnie w stosunku do pochodnej metylowej. Z wyników przedstawionych w tabeli 1 wynika jednak, że derywatyzacja pentafluoropropanolem poprawia tę wykrywalność tylko około 1,3+1,8-krotnie.

Tabela 1. Współczynniki odpowiedzi detektora ECD (jedn. pola/pg MX ± odch.st.) w zależności od sposobu derywatyzacji

Stężenie MX ng/cm ³	Odczynnik derywatyzujący		
	Metanol	Etanol	Pentafluoropropanol
153	3.200 ±100	2.100 ±320	5.700 ±270
460	6.900 ±250	4.500 ±280	11.000 ±460
767	14.000 ±400	9.200 ±420	18.800 ±890

Dodatkowym zadaniem niniejszej pracy była analiza występowania MX w poznańskiej wodzie wodociągowej. W tym celu do 10 dm³ wody dodawano standardu wewnętrznego, którym był kwas mukobromowy. Po zakwaszeniu wody do pH=2 przepuszczano ją przez złożę Amberlitów XAD-4 i XAD-8 (1:1), które oczyszczano uprzednio w aparacie Soxhleta przez ekstrakcję metanolem, octanem etylu, acetonem i heksanem. Po przepuszczeniu całej objętości wody złożę Amberlitów suszono w strumieniu azotu, po czym eluowano zaadsorbowane związki octanem etylu. Eluat octanowy odparowywano do sucha i derywatyzowano go 200 µl 2% H₂SO₄/metanolu przez 1 godzinę w temperaturze 70 °C. Derywatyzowany MX ekstrahowano trzema porcjami heksanu o objętości 0,5 cm³.

Próbki analizowano przy pomocy dwóch zestawów analitycznych. Pierwszy z nich to chromatograf gazowy Hewlett-Packard 5890 sprzężony z detektorem masowym (MSD) Hewlett-Packard 5971A, drugi to chromatograf gazowy Dani 3800 podłączony do spektrometru masowego VG 7070E. Oba chromatografy były wyposażone w kolumnę kapilarną HP-1 (25 m × 0,20 mm × 0,33 µm). Analizę GC/MS prowadzić można w zasadzie tylko techniką monitorowania pojedynczych jonów (SIM), pomimo bowiem skomplikowanej i długiej procedury oczyszczania Amberlitów stanowią one źródło olbrzymiej ilości związków w ekstrakcie octanowym. Ekstrakt ten zawiera także całą gamę związków pochodzących z wody. Chromatografia gazowa czystego, dery-



Rys. 1. Chromatogram (TIC) wzorca MX oraz kilku pokrewnych związków

watyzowanego wzorca MX dostarcza informacji o czasie retencji MX. Otrzymany chromatogram MX pokazano na rysunku 1.

Fragmentacja metylowanego MX polega przede wszystkim na odszczepieniu grupy metoksyłowej, dzięki czemu w widmie masowym obserwuje się jon (M–OCH₃)⁺. Ze względu na obecność trzech atomów chloru w tym jonie fragmentacyjnym i naturalny skład izotopowy chloru, fragment (M–OCH₃)⁺ składa się z trzech pików o m/z równych 199, 201 i 203. Stosunki intensywności tych trzech jonów fragmentacyjnych mają się do siebie (w przybliżeniu) jak 1:2:1, co również wynika z naturalnego składu izotopowego chloru (rys.2, tab.2).

Badania te po raz pierwszy w Polsce wykazały obecność MX w wodzie wodociągowej. Pomimo ogólnie dobrej jakości wody w Poznaniu, stwierdzono obecność 8+18 ngMX/dm³. Nie są to wielkości odbiegające od innych, znanych z literatury oznaczeń.

Tabela 2. Wyniki analiz wybranych chlorowanych hydroksyfuranonów w wodzie wodociągowej Poznania (ng/dm³)

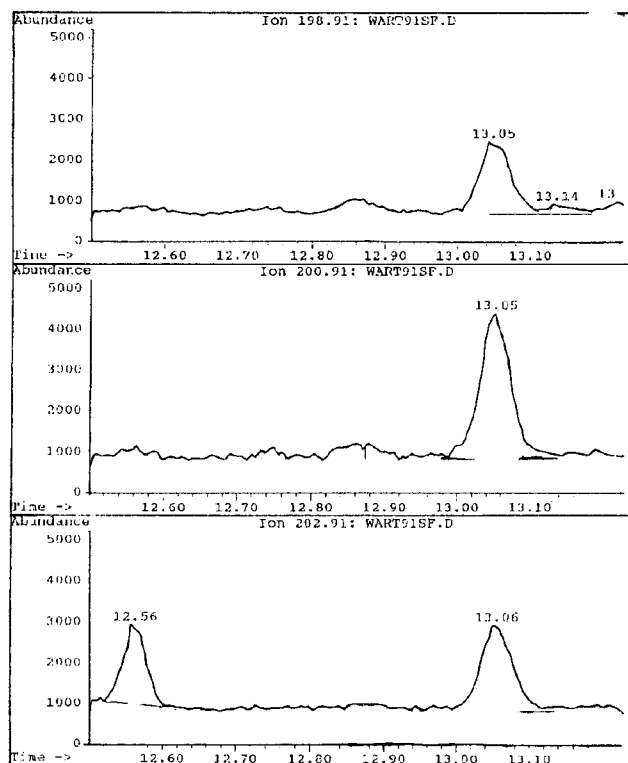
Próbka	MBA	MCA	MCF	CMCF	MX	E-MX
Standard	112 ^{a)} 106 ^{b)}	116	173	86	80	97
Poznań-1	56	3,4	3,4	2,4	8,4	1,8
Poznań-1 ^{HP}	56	3,6	5,9	0,8	8,5	nb
Poznań-2	28	4,9	*	4,3	12,0	4,9
Poznań-2 ^{HP}	28	7,1	10,0	1,5	18,0	nb

^{a)} – stężenie standardu dla wszystkich wzorców oprócz MX

^{b)} – stężenie standardu dla MX

^{HP} – analizowano stosując zestaw GC-MSD firmy Hewlett-Packard (inne próbki analizowano stosując zestaw Dani 3800/VG 7070E)

* – w oznaczeniu przeszkodził nieznaną związek



Rys. 2. Jony fragmentacyjne $(M-OCH_3)^+$ o m/z 199, 201 i 203 oraz ich intensywności

Dotychczasowy stan badań nad obecnością MX w wodach uzdatnionych wskazuje na powszechność występowania tego mutagenu wszędzie tam, gdzie do dezynfekcji wody stosowany jest chlor.

Oprócz MX wykryto także kilka związków strukturalnie spokrewnionych z tym związkiem, takich jak: 3,4-dichloro-5-hydroksy-2(5H)-furanon (MCA), 3-chloro-4-metylo-5-hydroksy-2(5H)-furanon (MCF), 3-chloro-4-chlorometylo-5-hydroksy-2(5H)-furanon (CMCF) oraz kwas E-2-chloro-3-(dichlorometylo)-4-okso-butenowy (E-MX). Spośród tych substancji E-MX jest izomerem MX (ipod wpływem niskiego pH E-MX przekształca się w MX), a CMCF wykazuje stosunkowo wysoką aktywność mutagenną.

LITERATURA

1. B.R. HOLMBOM, R.H. VOSS, R.D. MORTIMER, A. WONG: Isolation and identification of an Ames-mutagenic compounds in kraft chlorination effluents. *Tappi*, 1981, Vol. 64, pp. 172-174.
2. B.R. HOLMBOM, R.H. VOSS, R.D. MORTIMER, A. WONG: Fractionation, isolation and characterization of Ames mutagenic compounds in kraft chlorination effluents. *Environ. Sci. Technol.*, 1984, Vol. 18, pp. 333-337.
3. J. HEMMING, B. HOLMBOM, M. REUNANEN, L. KRONBERG: Determination of the strong mutagen 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone in chlorinated drinking and humic water. *Chemosphere*, 1986, Vol. 5, pp. 549-556.
4. S. FUKUI, S. OGAWA, T. MOTOZUKA, Y. HANASAKI: Removal of 3-chloro-4-(dichlorometylo)-5-hydroksy-2(5H)-furanon (MX) in water by oxydative, reductive, thermal or photochemical treatments. *Chemosphere*, 1991, Vol.23, No. 6, pp. 761-775.
5. S. OGAWA, H. KITA, Y. HANASAKI, S. FUKUI, H. KAMI: Determination of the potent mutagen 3-chloro-4-(dichlorometylo)-5-hydroksy-2(5H)-furanon (MX) in water by gas chromatography with electron capture detection. *Journal Chromatogr.*, 1993, Vol. 643, pp. 221-226.
6. S. FUKUI, Y. YOSHIMIRA, S. OGAWA, Y. HANAZAKI: Formation of non-volatile, potent mutagens in domestic wewage by chlorination. *Chemosphere*, 1990, Vol. 21, pp. 705-716.
7. D.A. COZZIE, R. KANNIGANTI, M.J. CHARLES, J.D. JOHNSON, L.M. BALL: Formation and characterization of bacterial mutagens from reaction of the alternative disinfectant monochloramine with model aqueous solutions of fulvic acids. *Environ. Mol. Mutagen.*, 1993, Vol. 21, pp. 237-246.
8. J. NAWROCKI: Struktura i właściwości związku mutagennego MX zidentyfikowanego w wodzie pitnej. *Ochrona Środowiska*, 1992, nr 2-3(46-47), ss. 11-18.
9. M.J. CHARLES, G. CHEN, R. KANNIGANTI, G.D. MARBURY: High resolution mass spectrometry method for the analysis of 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX) in waters. *Environ. Sci. Technol.*, 1992, Vol. 26, pp. 1030-1034.
10. Guidelines for drinking water quality. WHO, Genève, 1993.
11. H. HORTH: Identification of mutagens in drinking water. *Journal Fr. Hydrolog.*, 1990, Vol. 21, No. 1, pp. 135-145.
12. T.W. COLLETE, R.F. CHRISTMAN, J.M. GUIRE, C. TRUSTY: Multispectral identification of potentially hazardous byproducts of ozonation and chlorination. EPA/600/4-91/004, Cincinnati 1991.
13. R. FRANZÉN, L. KRONBERG: Determination of chlorinated 5-methyl-5-hydroxyfuranones in drinking water, in chlorinated humic water, and in pulp bleaching liquor. *Environ. Sci. Technol.*, 1994, Vol. 28, pp. 2222-2227.
14. R.T. LALONDE, G.P. COOK, H. PERAKYLA, LIN BU: Structure-activity relationships of bacterial mutagens related to 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone: An emphasis on the effect of stepwise removal of chlorine from the dichloromethyl group. *Chem. Res. Toxicol.*, 1994, Vol. 4, pp. 540-545.
15. R.T. LALONDE, G.P. COOK, H. PERAKYLA, C.W. DENCE: Effect on mutagenicity of the stepwise removal of hydroxyl group and chlorine atoms from 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone: ^{14}C NMR chemical shifts as determinants of mutagenicity. *Chem. Res. Toxicol.*, 1991, Vol. 4, p. 35.
16. S. FUKUI, S. OGAWA, H. KITA, Y. HAMASAKI, H. KAMUI: 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone in chlorinated domestic Sewage. *Chemosphere*, 1992, Vol. 24, No. 7, pp. 927-934.
17. T. VARTIAINEN, A. LIIMATAINEN, P. KAURANEN: Relations between drinking water mutagenity and water quality parameters. *Chemosphere*, 1988, Vol. 17, No. 1, pp. 189-202.
18. P. BACKLUND, E. WONDERGEM, K. VOOGD, A. de JONG: Influence of chlorination pH and chlorine dose on the formation of mutagenic activity and the strong bacterial mutagen 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX) in water. *Chemosphere*, 1989, Vol. 18, No. 9-10, p. 1093.
19. V.A. LNGVIK, O. HORMI, L. TIKKANEN, B. HOLMBOM: Formation of the mutagen 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX) and related compounds by chlorination of phenolic compounds. *Chemosphere*, 1991, Vol. 22, No. 5/6, pp. 547-555.
20. H. HORTH: Identification of mutagens in drinking water. *Aqua*, 1989, Vol. 38, pp. 80-100.
21. N. KINAE, C. SUGIYAMA, M.Y. NASUDA, K. GOTO, K. TOKUMOTO, M. FURUGORI, K. SHIMOI: Seasonal variation and stability of chlorinated organic mutagens in drinking water. *Water Sci. Technol.*, 1992, Vol. 25, No. 11, pp. 333-340.

22. L. RISTO, T. VARTIAINEN, H. KOMULAINEN: Formation of methemoglobine by 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanon (MX) in rat erythrocytes in vitro. *Toxicol. Lett.*, 1993, Vol. 68, pp. 325-332.
23. M. KOIVUSALO, J.J.K. JAAKKOLA, T. VARTIAINEN, T. HAKULINEN, S. KARJALAINEN, E. PUKKALA: Drinking water mutagenicity and gastrointestinal and urinary tract cancers: an ecological study in finland. *Am. J. Publ. Health.*, 1994, Vol. 84, No. 8, pp. 1223-1228.
24. H. KOMULAINEN, S.L. VAITTINEN, T. VARTIAINEN, S. LÖTJÖNEN, P. PARONEN, J. TUOMISTO: Pharmacokinetics of 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX) a drinking water mutagen after a single dose in the rat. *Pharmacol. Toxicol.*, 1992, Vol. 70, pp. 424-428.
25. K.P. CANTOR: Water chlorination, mutagenicity and cancer epidemiology. *Am. J. Public Health*, 1994, Vol. 84, No. 8, pp. 1211-1213.
26. L. KRONBERG, R. SJÖHOLM, S. KARLSSON: Formation of 3,N⁴-ethenecytidine, 1,N⁶-etheneadenosine and 1,N²-etheneguanosine in reactions of mucochloric acids with nucleosides. *Chem. Res. Toxicol.*, 1992, Vol. 5, No. 6, pp. 852-855.
27. L. KRONBERG, S. KARLSSON, R. SJÖHOLM: Ethenocarbaldehyde derivatives of adenosine and cytidine in reactions with mucochloric acids. *Chem. Res. Toxicol.*, 1993, Vol. 6, No. 4, pp. 495-499.
28. L. KRONBERG, R. FRANZÉN, A. SMEDS: Presence of the strong mutagen "MX" and of other chlorinated hydroxyfuranones in chlorine disinfected drinking water. *Mat. XIII konf. „Zaopatrzenie w wodę miast i wsi”*. PZITS, Poznań 1994, ss. 461-467.
29. L. KRONBERG, R. FRANZÉN: Determination of chlorinated furanones, hydroxyfuranones and butenoic acids in chlorine treated water and in pulp bleaching liquor. *Environ. Sci. Technol.*, 1993, Vol. 27, pp. 1811-18.
30. R.T. LALONDE, G.P. COOK, H. PERAKYLA, C.W. DENCE, J.G. BABISH: Salmonella typhimurium (TA 100). Mutagenicity of 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone and its open- and closed-ring analogs. *Environmental and Molecular Mutagenesis.*, 1991, Vol. 17, pp. 40-48.
31. F.B. DANIEL, H. ROBINSON, G.R. OLSON, J.A. STROBER, N.P. PORGE: Toxicological studies on MX, a disinfection by-products. *Journal AWWA*, 1994, Vol. 87, No. 3, p. 103.
32. A.A. PADMAPRIYA, G. JUST, N.G. LEWIS: Synthesis of 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone a potent mutagen. *Can. J. Chem.*, 1985, Vol. 63, pp. 828-832.
33. L. KRONBERG, B. HOLMBOM, L. TIKKANEN: Formation and properties of 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone, a potent mutagen in chlorinated waters. In: *Water Chlorination*, Vol. 6, pp. 125, Lewis Publ., 1990.
34. L. KRONBERG, B. HOLMBOM, M. REUNANEN, L. TIKKANEN: Identification and quantification of the Ames mutagenic compound 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone and of its geometric isomer (e)-2-chloro-3-(dichloromethyl)-oxobutenoic acid in chlorine-treated humic water and drinking water extracts. *Environ. Sci. Technol.*, 1988, Vol. 22, p. 1097.
35. L. KRONBERG: Private communication, 1995.

MX – High-Activity Mutagen in Drinking Water

Presented is a detailed account of reports on MX (3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone) which have been published since 1991. There has been a growing interest in this mutagenic species all over the world. The experimental section substantiates a higher sensitivity of ECD

to pentafluoropropanol-derived than to methylated MX. To detect the presence of MX in the drinking water of Poznań use was made of GC/MS in the SIM mode. Together with MX, we identified a number of compounds of a similar structure.