

УДК 544.54

РАДИОЛИТИЧЕСКОЕ ИНАКТИВИРОВАНИЕ МУТАГЕННОСТИ ПОНСО 4R В ВОДНОМ РАСТВОРЕ

© 2023 г. А. В. Пономарев^{a, *}, Е. М. Холодкова^a, И. В. Зотова^{b, c},
А. Р. Шумега^b, Е. И. Степченкова^{b, c}

^a Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН,
Ленинский просп. 31, Москва, 119071 Россия

^b Санкт-Петербургский государственный университет,
Университетская наб., 7/9, Санкт-Петербург, 199034 Россия

^c Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Университетская наб., 7/9, Санкт-Петербург, 199034 Россия

*E-mail: ponomarev@ipc.rssi.ru

Поступила в редакцию 28.04.2023 г.

После доработки 15.05.2023 г.

Принята к публикации 19.05.2023 г.

Электронно-лучевая обработка 0.02 г/дм³ водного раствора азокрасителя Понсо 4R при дозе 1.5 кГр на воздухе приводит к полному устранению цветности и генотоксичности. Ключевым радиолитическим процессом является присоединение ОН радикалов к системе сопряженных связей красителя (образование ОН-аддуктов), что приводит к отщеплению боковых групп с более низкой энергией связи.

Ключевые слова: электронно-лучевая обработка, азокраситель, Ронсеау 4R, обесцвечивание, мутагенность

DOI: 10.31857/S002311932305011X, **EDN:** MZIVSK

Ароматические красители относятся к числу стойких соединений, обладающих высокой термодинамической стабильностью благодаря внутримолекулярному сопряжению химических связей. Их присутствие в водоемах чревато ухудшением прозрачности воды и, соответственно, ослаблением фотосинтеза, обеспечивающего естественное пополнение воды кислородом. Типичные природные микроорганизмы, живущие в водоемах, далеко не всегда способны обезвреживать ароматические красители [1, 2]. Более того, некоторые красители под действием солнечного света и растворенных примесей преобразуются в токсичные продукты. Например, водные растворы азокрасителя E124 (Ронсеау 4R), даже при длительном фотолизе солнечным светом, сохраняют мутагенность [3]. Поэтому обезвреживание красителей является одной из важнейших задач при очистки сточных вод. В настоящей работе рассматривается изменение генотоксичности азокрасителя Ронсеау 4R в процессе его электронно-лучевого обесцвечивания.

Облучали раствор 0.02 г/дм³ синтетического Ронсеау 4R (E124 – тринатрий (8Z)-7-оксо-8-[(4-сульфонатафталин-1-ил)гидразинилиден]нафталин-1,3-дисульфат, от Roha, Индия) в дистиллированной воде. Молярный коэффициент экстинкции

при 506 нм составлял 2600 м²/моль. Источником излучения служил линейный ускоритель электронов LINS-03-350-EURF (США). Облучение проводилось пучком электронов с энергией 3 МэВ в стеклянных пробирках при доступе воздуха и комнатной температуре. Электронные импульсы длительностью 4 мкс (0.88 Гр/импульс) повторялись с частотой 25 Гц, обеспечивая мгновенную мощность дозы 220 кГр/с и усредненную по времени мощность дозы 22 ± 2 Гр/с. Дозиметром служила сополимерная пленка (GSO (Certified Reference Material) № 7875-2000), легированная феназином. Оптическое поглощение растворов контролировали с помощью спектрофотометра Cary-100 UV-Vis (Agilent).

Мутагенность тестировали по методу Эймса с метаболической активацией и без нее [4, 5]. Использовались штаммы *Salmonella typhimurium*: TA97 (для учета мутаций со сдвигом рамки –1 в последовательности CCCCCC), TA98 (для учета мутаций со сдвигом рамки +1 в последовательности CGCGCGCG) и TA100 (для учета замен GGG → GAG). Для отрицательного контроля (NC) использовали дистиллированную воду. В тестах без метаболической активации положительный контроль (PC) для штаммов TA97 и TA98 осуществляли с помощью 2-нитрофлуорена (2 мкг на чашку Петри), а для штамма TA100 с помощью азида

Таблица 1. Мутагенность (число His⁺ ревертантов на чашку Петри) раствора E124 до и после облучения по отношению к трем штаммам *Salmonella typhimurium*. NC — отрицательный контроль; PC — положительный контроль

Штамм	TA97	TA98	TA100	TA97	TA98	TA100
Активация	Без метаболической активации			С метаболической активацией		
NC	201 ± 13	73 ± 8	202 ± 34	231 ± 24	78 ± 22	113 ± 12
E124, 0 кГр	516 ± 38*	2230 ± 341*	2670 ± 323*	461 ± 124	1866 ± 74*	2180 ± 428*
E124, 1.5 кГр	194 ± 19**	47 ± 2**	126 ± 17**	237 ± 32	37 ± 8**	99 ± 18**
PC	428 ± 63*	705 ± 66*	861 ± 130*	559 ± 59*	538 ± 28*	687 ± 189*

* — отличается от NC (уровень значимости $p < 0.05$). ** — отличается от необлученного E124 ($p < 0.05$) и не отличается от NC ($p > 0.05$).

натрия (2 мкг на чашку). В тестах с метаболической активацией (10% фракция S9 печени крысы и кофакторы ферментов печени) положительный контроль осуществляли с помощью 2-аминоантрацена (5 мкг на чашку) для всех штаммов. Для каждого образца использовали по три параллельных опыта. В завершении каждого теста подсчитывали среднее число колоний ревертантов His⁺ (гистидина), стандартный разброс результатов и статистическую значимость различий (по t -критерию Стьюдента). Цитотоксичность растворов тестировали с использованием аналогичного подхода, за исключением того, что использовали разбавленную клеточную суспензию (200–500 КОЕ на чашку вместо 10^8) и среду с высоким содержанием гистидина (50 мкг/см³).

Ранее [6] было показано, что радиолитическое облучение водного раствора 0.02 г/дм³ E124 приводит к его необратимому обесцвечиванию. Доза, необходимая для двукратного снижения окраски, составляет около 0.27 кГр, а наблюдаемый выход обесцвечивания составляет около 0.08 мкмоль/Дж. Вследствие малой концентрации красителя, его радиолитические превращения происходят по механизму косвенного действия излучения, т.е. в реакциях с радикалами, генерируемыми за счет радиолитического распада воды [7]. В присутствии кислорода, $\text{H}^\bullet$ и гидратированный электрон быстро превращаются в сравнительно инертные $\text{O}_2^{\bullet-}$ и $\text{HO}_2^\bullet$, тогда как радикал $\text{OH}^\bullet$, нереакционноспособный по отношению к кислороду, может эффективно присоединяться к ароматическому красителю с образованием OH -аддукта. Такой механизм существенно отличает электронно-лучевую обработку от фотолиза, при котором энергия света поглощается непосредственно молекулами красителя.

Дальнейшие тесты на цитотоксичность и гено-токсичность проводили в полностью обесцвеченном растворе, облученном при дозе 1.5 кГр. Проверка цитотоксичности показала, что статистически значимого снижения выживаемости клеток как в исходном, так и в облученном растворе, не наблю-

дается. То есть, при концентрации 0.02 г/дм³ краситель E124 нетоксичен и его радиолитическое облучение не приводит к цитотоксичным продуктам. Однако исходный раствор E124 проявляет мутагенную активность (табл. 1).

Мутагенность необлученного раствора E124 и образца PC достоверно отличается от мутагенности образца NC ($p < 0.05$). В свою очередь, облученный раствор E124 не обладает мутагенными свойствами и не показывает существенных отличий от образца NC ($p > 0.05$). Отсюда следует, что пищевой краситель E124 в 0.02%-ном водном растворе изначально является неспецифическим мутагеном и без метаболической активации вызывает $\text{G} \rightarrow \text{A}$ транзиции, а также мутации со сдвигом рамки +1 и –1. В присутствии активирующей фракции S9 печени крысы, E124 вызывает мутации в двух протестированных штаммах, TA98 и TA100. Однако электронно-лучевая обработка раствора E124 при дозе 1.5 кГр снижает его мутагенную активность до уровня спонтанного мутагенеза.

Длительный фотолиз солнечным светом не устраняет мутагенность раствора E124, поскольку в числе продуктов деградации присутствуют мутагенные ароматические амины и амиды (такие как сульфированные 2-(2-метилгидразинил)фенол, N-(нафталин-1-ил)ацетамид, N-(2-гидрокси-нафталин-1-ил)ацетамид и 1-(нафталин-1-иламино)этанол) [3]. Радиолитическое облучение при весьма низкой поглощенной дозе, напротив, устраняет мутагенность. Во-первых, происходит снижение стабильности молекулы из-за вызванного радикалами повреждения внутримолекулярной системы сопряженных связей. Об этом свидетельствует обесцвечивание раствора. Во-вторых, молекула теряет боковые сульфогруппы, что снижает ее растворимость и, следовательно, подвижность в реакциях с ДНК. В-третьих, происходит расщепление связующего мостика $-\text{N}=\text{N}-$ между нафталиновыми звеньями. Причем это расщепление происходит без образования аминов или амидов.

Вероятность распада ОН-аддуктов по бимолекулярной реакции мала из-за низкой концентрации красителя, его низкого коэффициента диффузии и стерических затруднений. Соответственно, большая часть быстрых превращений ОН-аддукта протекает по механизму мономолекулярного распада или реакций псевдо-первого порядка с молекулами воды. Введение в нафталиновое звено нового заместителя (ОН) изменяет распределение электронной плотности, существовавшее до образования ОН-аддукта. Неспаренный электрон ОН-аддукта делокализован по остатку системы сопряжения, которая включает ароматические кольца, азо- и сульфогруппы. В то же время, энергия новой связи С—ОН намного выше энергии расщепления существующих связей С—N и С—S [8]. Таким образом, релаксация ОН-аддукта происходит за счет отщепления заместителя с более слабой связью (рис. 1). В этом случае неспаренный электрон оказывается на отщепленном фрагменте. Сходные диссоциативные процессы могли бы также происходить в отсутствие воздуха — за счет захвата гидратированного электрона или Н радикала [7].

Сульфогруппа SO_3^- придает ароматическому красителю способность растворяться в воде [9], но ее связь с ароматическим звеном сравнительно слабая. Вследствие относительно большого размера и делокализации электронной плотности, сульфогруппа является энергетически выгодной уходящей группой. Элиминирование N_2 с образованием радикалов также является характерной реакцией азосоединений. Поэтому, некоторые из алифатических азосоединений используются в качестве удобных инициаторов радикальной полимеризации [9]. Введение в ароматическое звено электронодонорного заместителя OH значительно облегчает и десульфирование и отщепление N_2 .

При дозе 1.5 кГр каждая растворенная молекула Е124 может взаимодействовать с несколькими радикалами ОН и, таким образом, терять все боковые группы без образования мутагенных продуктов и интермедиатов. Происходит деградация хромофорной системы с отщеплением соединительного мостика и боковых заместителей за счет радикального присоединения новой функциональной группы ОН, энергия связи которой выше, чем у сульфогрупп и диазомостика. Исходно краситель Е124 в 0.02% водном растворе является неспецифическим мутагеном. Без метаболической активации он индуцирует переходы $G \rightarrow A$, а также мутации со сдвигом рамки +1 и -1. В свою очередь, в присутствии ферментов печени он вызывает мутации первых двух типов. Индуцированное электронным пучком снижение окраски и мутагенности происходит параллельно и обусловлено одними и теми же радикальными процессами.

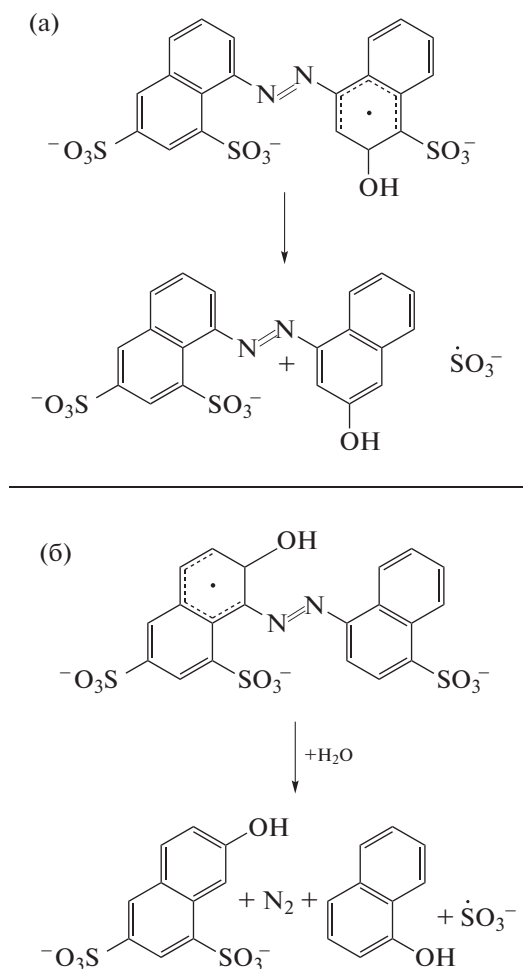


Рис. 1. Схемы деградации ОН-аддукта E124.

причем мутагенная активность уменьшается до уровня спонтанного мутагенеза. Важно отметить, что вышеописанное обезвреживание Е124 состоит из одной, радиолитической, стадии и не требует специальной подготовки раствора, что привлекательно с точки зрения использования электронно-лучевой обработки в крупнотоннажной очистке сточных вод [10].

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках НИР 122011300061-3 Российской академии наук и НИР 94031363 Санкт-Петербургского государственного университета.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Центру коллективного пользования физико-химическими методами исследований Института физической химии и электрохимии РАН за предоставленное оборудование. Благодарим доктора наук А.П. Галкина за продуктивное обсуждение задач и результатов работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tkaczyk A., Mitrowska K., Posyniak A. // *Sci. Total Environ.* 2020. V. 717. P. 137222.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137222>
2. Rocha O.P., Cesila C.A., Christovam E.M., Barros S.B., Zanoni M.V., de Oliveira D.P. // *Toxicology.* 2017. V. 376. P. 113.
<https://doi.org/10.1016/j.tox.2016.04.002>
3. Yamjala K., Subramania Nainar M., Varma S.K., Ambo-re N. // *Anal. Methods.* 2016. V. 8. P. 5017.
<https://doi.org/10.1039/C6AY00716C>
4. Ames B.N., McCann J., Yamasaki E. // *Mutat. Res. Mutagen. Relat. Subj.* 1975. V. 31. P. 347.
[https://doi.org/10.1016/0165-1161\(75\)90046-1](https://doi.org/10.1016/0165-1161(75)90046-1)
5. Mortelmans K., Zeiger E. // *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 2000. V. 455. P. 29.
[https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00064-6](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00064-6)
6. Kholodkova E.M., Ponomarev A.V. // *High Energy Chem.* 2023. V. 57. P. 146.
<https://doi.org/10.1134/S0018143923020078>
7. Ponomarev A.V., Ershov B.G. // *Environ. Sci. Technol.* 2020. V. 54. P. 5331.
<https://doi.org/10.1021/acs.est.0c00545>
8. Traven V.F. // *Frontier Orbitals and Properties of Organic Molecules* (Ellis Horwood Series in Organic Chemistry), Mellor J. ed. Ellis Horwood Ltd, New York. 1992.
9. Hunger K., Mischke P., Rieper W., Raue R., Kunde K., Engel A. // *Azo Dyes.* In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany. 2000
10. Kim Yuri, Ershov B.G., Ponomarev A.V. // *High Energy Chem.* 2020, V. 54(6). P. 462.
<https://doi.org/10.1134/S0018143920060089>