

ных ТМ. Важным доказательством такой ремедиации служит обнаружение в воде пяти металлов из исследованных шести в количествах ниже ПДК. Эффект аккумуляции ТМ зависит от их вида, уровня загрязнённости ими воды, вида растения и т. д. Информация, получаемая при подобного рода полевых исследованиях, имеет большое практическое значение, так как позволяет идентифицировать виды растений, отличающиеся высокой аккумуляцией ТМ в условиях естественных ботанических площадок, а также с целью их дальнейшего использования на искусственных аналогах.

Литература

1. Кононов А.Н., Нестеренко В.С., Мочалова С.А. О комплексном экологическом мониторинге г. Челябинска // Проблемы экологии Южного Урала. 1998. № 4. С. 8–20.

2. Шадрин Л.Ф. Мониторинг загрязнения поверхностных вод // ИНФОР. 1999. № 3. С. 43–62.

3. Galiulin R.V., Bashkin V.N., Galiulina R.R., Birch P. A critical review: Protection from pollution by heavy metals – phytoremediation of industrial wastewater // Land Contamination and Reclamation. 2001. V. 9. № 4. P. 349–357.

4. Эйнон Л.О. Ботаническая площадка – биоинженерное сооружение для доочистки сточных вод // Водные ресурсы. 1990. № 4. С. 149–161.

5. Лукина Л.Ф., Смирнова Н.Н. Физиология высших водных растений. Киев: Наукова думка, 1988. 188 с.

6. Золотухина Е.Ю., Гавриленко Е.Е. Тяжёлые металлы в водных растениях. Аккумуляция и токсичность // Биологические науки. 1989. № 9. С. 93–106.

7. Экологический вестник России. 2002. № 1. С. 29.

УДК 543.97:547.234.22'211

Сравнительная оценка токсичности несимметричного диметилгидразина и продуктов его трансформации методами биотестирования

© 2013. А. Д. Смоленков, к.х.н., в.н.с., Т. О. Попутникова, к.б.н., н.с., Р. С. Смирнов, аспирант, И. А. Родин, к.х.н., н.с., О. А. Шпигун, чл.-корр. РАН, профессор, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, e-mail: smolenkov@analyt.chem.msu.ru, t.poputnikova@gmail.com

Методами биотестирования изучена токсичность компонента ракетного топлива несимметричного диметилгидразина и продуктов его трансформации. Показано, что в результате трансформации несимметричного диметилгидразина не образуются продукты более токсичные, чем исходный экотоксикант, а токсичность структурного аналога этого вещества – диметилгидразида муравьиной кислоты, ошибочно принимаемого за несимметричный диметилгидразин на месте старых разливов, ниже в 20–100000 раз. В результате опасность мест загрязнения НДМГ по мере его трансформации снижается.

The toxicity of liquid rocket propellant unsymmetrical dimethylhydrazine (UDMH) and its decomposition products was studied by methods of bioassay. It was shown that transformation of UDMH leads to products which are less toxic than initial exotoxican. For example, the toxicity of formic acid dimethylhydrazide, structural analogue of UDMH, which is mistaken for UDMH on the places of old spills, is 20–100000 times lower. As a result, the place of pollution by rocket fuel becomes less hazardous during UDMH transformation.

Ключевые слова: несимметричный диметилгидразин, продукты трансформации, биотестирование, токсичность

Keywords: unsymmetrical dimethylhydrazine, products of transformation, bioassay, toxicity

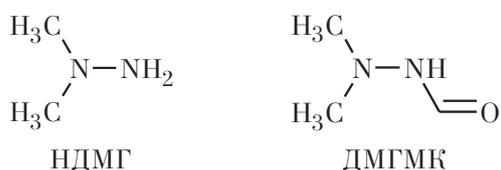
Введение

Ракетно-космическая деятельность как фактор антропогенного воздействия на окру-

жающую среду требует всестороннего изучения для обеспечения её экологической безопасности. Одним из факторов техногенного ущерба запуска космических аппаратов явля-

ется применение в качестве ракетного топлива несимметричного диметилгидразина (НДМГ, «гептил»), который поступает при штатной эксплуатации ракетно-космической техники в почву в районах падения из-за резервных запасов топлива в отделяющихся частях ракет-носителей [1]. НДМГ относится к категории опасных экотоксикантов с 1 классом опасности, для которого установлены ПДК в почве, воде и атмосферном воздухе. В то же время НДМГ является сильным восстановителем и в окружающей среде подвергается трансформации, в результате чего образуются новые химические соединения и можно ожидать вторичного загрязнения воды и почвы в местах проливов. Такие продукты, как N-нитрозодиметиламин (НДМА) и тетраметил-2-тетразен (ТМТ), известны давно, и для них установлены гигиенические нормативы [2].

В последнее время пристальное внимание уделяется проблеме идентификации продуктов трансформации НДМГ [3 – 5]. Нами проведена достоверная идентификация 12 продуктов трансформации НДМГ методами ЯМР, жидкостной и газовой хромато-масс-спектрометрии [6], среди которых при анализе загрязнённых НДМГ почв найдены диметилгидразид муравьиной кислоты (ДМГМК), 1-метил-1,2,4-триазол (МТ), диметиламин (ДМА) и 1,1-диметилгуанидин (ДМГу). Подчеркнём особо образование ДМГМК, поскольку он является структурным аналогом НДМГ:



В ходе известных методик пробоподготовки, включающих щелочную дистилляцию из вытяжек или суспензии почв, происходит гидролиз ДМГМК до НДМГ. Принимая во внимание нестойкость НДМГ, являющегося сильным восстановителем, и химическую устойчивость ДМГМК, присутствие ДМГМК в составе продуктов трансформации отвечает за ситуацию, когда НДМГ ложно обнаруживают в почве через длительные промежутки времени после разлива НДМГ на почву. Превращение значительной доли НДМГ в ДМГМК подтверждено выполненными нами анализами почв с площадок, загрязнённых НДМГ. Понятно, что превращение НДМГ в ДМГМК и другие продукты трансформации требует исследования их токсичности для адекватной

оценки воздействия пусков ракет-носителей и принятия решений по судьбе образующихся загрязнений. Таким образом, проведение работ по оценке токсичности новых продуктов трансформации актуально.

Расчётные методы исследования токсичности по отношению к организму человека использованы для ранжирования продуктов трансформации по их опасности [7 – 9]. Для оценки возможного воздействия использовали ряд готовых программных продуктов, предназначенных для поиска биологически активных соединений. Согласно полученным исследованиями данным основное внимание при создании системы химического мониторинга необходимо уделять производным НДМГ, имеющим гидразиновую структуру молекулы: три- и тетраметилгидразины, ДМГМК, а также гидразонам формальдегида и ацетальдегида. В этих же работах приведены расчётные данные экотоксичности (LC₅₀ и EC₅₀) для мышей, крыс и гидробионтов. К недостаткам расчётных моделей можно отнести возможность промаха при их недостаточной корректности.

Для исследования неблагоприятного токсического воздействия наиболее просто и эффективно использовать подходы, основанные на биотестировании. При определении степени токсичности почв методами биотестирования большое значение имеет чувствительность к токсикантам подопытных организмов. Наиболее корректный результат достигается при использовании нескольких тест-объектов из разных систематических групп.

Целью данной работы являлось исследование токсичности НДМГ и продуктов его трансформации с помощью комплекса методик биотестирования, включающих исследование на нескольких тест-объектах: инфузориях *Paramecium caudatum*, цериодафниях *Ceriodaphnia affinis*, водорослях *Scenedesmus quadricauda*, культуре клеток теплокровных животных *in vitro*, а также представителе высших растений – овсе посевном *Avena sativa*.

Материалы и методы

В работе использовали следующие реактивы: 1,1-диметилгидразин (содержание основного компонента >98%, Merck), гидразина сульфат (>99%, Aldrich), диметиламина гидрохлорид (>99%, Aldrich), диметилгуанидина сульфат (>99%, Fluka), 1-метил-1,2,4-триазол (>96%, Lancaster), N-нитрозодиметиламин (>98%, Aldrich). Остальные вещества синте-

зировали по известным методикам: ДМГМК [10] и ТМТ [11].

Тестирование токсичности растворов экотоксикантов проводили по ингибированию роста корней проростков овса на 20% и более от контроля [12]. В чашку Петри (d – 90 мм) между слоями фильтровальной бумаги помещали по 25 сухих здоровых семян, всхожесть которых составляла не менее 95%. В опытные чашки вносили по 5 мл раствора исследуемого вещества, контрольные семена обрабатывали эквивалентным количеством дистиллированной воды. Закрытые чашки термостатировали при 20–23 °С в течение 4 суток. Повторность по каждой концентрации трёхкратная.

Величину эффекта торможения (E_T) определяли по формуле 1:

$$E_T = \frac{L_K - L_{ОП}}{L_K} \times 100\% \quad (1)$$

$L_{ОП}$ и L_K – средняя длина корней в опыте и контроле соответственно, мм.

Исследуемый диапазон концентраций подбирали таким образом, чтобы получить не менее трёх биологически эффективных концентраций, удовлетворяющих условию $20 \leq E_T \leq 80\%$.

Учитывая экспериментально установленный прямолинейный характер зависимости,

$$\lg C = -m \times E_T + b, \quad (2)$$

где E_T – фитоэффект, установленный в эксперименте; C – концентрация, мг/л; m и b – коэффициенты регрессии.

Определение пороговых ($\text{Lim}R$) и среднеэффективных (EC_{50}) концентраций (параметров фитотоксичности) осуществляли расчётным методом после установления коэффициентов регрессии методом наименьших квадратов в программе Microsoft Excel.

Биотестирование различных концентраций НДМГ и продуктов его трансформации проводили по стандартным методикам.

Биотестирование с использованием простейших основано на выживаемости инфузорий-туфельек в исследуемой пробе [13]. Анализ проводили в 48-луночных планшетах в пятикратной повторности. В каждую лунку помещали инфузории (5–15 особей), приливали 0,6 мл исследуемой пробы. Планшеты инкубировали в термостате при 22,4 °С. Подсчёт количества выживших инфузорий проводили под микроскопом на 24-й час опыта.

Биотестирование на половых клетках млекопитающих основано на изменении подвиж-

ности сперматозоидов крупного рогатого скота, которая регистрируется анализатором изображений АТ-05 [14]. Предварительно испытываемые растворы и контроль доводили до изотонии с помощью глюкозы и цитрата натрия (в соотношении 100:4:1 (объём испытуемого раствора/контроля (мл) : масса глюкозы (г) : масса цитрата (г))). Затем аликвоты опытных растворов и контроля (по 0,4 мл) в пробирках устанавливали в блок пробоподготовки, поддерживающий постоянную температуру (40 °С). Для получения суспензии сперматозоидов замороженные гранулы культуры, хранившиеся в жидком азоте, оттаивали в глюкозо-цитратном буфере (контроль) в пробирке на блоке пробоподготовки. Полученную суспензию добавляли в контрольные и испытуемые растворы (по 0,1 мл). Затем приготовленные растворы помещали в кюветы (капилляры) по 5 штук для каждой пробы, которые устанавливали в каретку анализатора изображений АТ-05. После чего анализатор в течение примерно 2,5 часа автоматически фиксировал микроскопические видеоизображения суспензии сперматозоидов, оценивая подвижность и вычисляя индекс токсического действия It (отношение средневзвешенного времени подвижности сперматозоидов в испытуемой и контрольной пробе). Критерий отсутствия токсичности в пробе: $80\% \leq It \leq 120\%$.

Кроме того, были установлены параметры токсичности для НДМГ и ДМГМК по методикам с использованием низших ракообразных (цериодафний) и зелёных протоккокковых водорослей.

Биотестирование проводили на ракообразных *Ceriodaphnia affinis* [15]. В сосуды наливали по 20 мл испытуемого или контрольного раствора (культуральной воды) и помещали по 4 молодых цериодафний в возрасте 15 ± 9 часов (в 5 повторностях). Через 48 часов подсчитывали количество живых особей.

Для тестирования токсичности использовали культуру микроводорослей *Scenedesmus quadricauda (Turp.) Breb.* [17]. Испытуемый раствор разливали в пенициллиновые флаконы, добавляли суспензию водорослей (в трёх повторностях). В исходной суспензии измеряли концентрацию клеток водорослей и помещали в люминостаг на встряхиватель, на 72-й час эксперимента определяли конечную концентрацию клеток. Измерение концентрации проводили под микроскопом методом прямого счёта живых клеток в камере Горяева.

Для определения токсикологических параметров путём последовательного разбавле-

ния готовили серии растворов исследуемых веществ с различными концентрациями. В соответствии с перечисленными методиками такие растворы для тестирования на инфузориях и цериодафниях готовили с использованием пресной культивационной воды («Aqua minerale», производство компании «PepsiCo»), а для тестирования на половых клетках млекопитающих и зелёных водорослях – на дистиллированной воде. Расчёты значений LD₅₀ вели в соответствии со стандартными методиками: результаты опытов с инфузориями, цериодафниями и водорослями обрабатывали графически методом пробит-анализа; по данным опыта на половых клетках определяли действующую пороговую концентрацию LimC при It = 80.

Результаты и их обсуждение

Все использованные в работе биотесты показали свою эффективность при исследовании токсичности НДМГ и продуктов его трансформации и позволили установить токсикологические параметры для исследуемого ряда веществ.

Воздействие экотоксикантов ракетно-космической деятельности при выполнении фитотестирования исследовали в следующих диапазонах концентраций: 1–1000 мг/л (гидразин, НДМГ, ДМГу), 100–10000 мг/л (МТ, ДМА, НДМА), 100–20000 мг/л (ДМГМК). Результаты фитотестирования изучаемых веществ представлены в таблице 1.

Несмотря на то, что исследуемые соединения являются азотсодержащими веществами, стимулирующего воздействия на прорастание семян овса в исследуемом диапазоне концентраций отмечено не было. Все исследуемые соединения показали себя фитотоксичными. Наибольшую токсичность проявили НДМГ, гидразин и ДМГу. Среди продуктов

трансформации гидразин обладает большей фитотоксичностью, чем НДМГ. Сопоставимое с НДМГ негативное воздействие на прорастание семян овса показал ДМГу. Диметил-амин, МТ и НДМА менее токсичны относительно растений: их среднеэффективная концентрация минимум на порядок выше, чем у НДМГ. Для ДМГМК, который близок по своему строению с НДМГ и присутствует в почвах после трансформации последнего по истечении достаточного долгих сроков после поступления ракетного топлива в почву, экспериментально установленный эффект ингибирования роста корней в 40 раз ниже и является самым низким среди исследуемых веществ.

Биотесты с инфузориями и половыми клетками млекопитающих использованы для тестирования всех веществ, поскольку требуют меньшего объёма растворов для эксперимента и как следствие меньше опасность загрязнения окружающей среды. Особый интерес представляет собой, как указано выше, сопоставление токсичности НДМГ и ДМГМК, поэтому для сравнения этих соединений было привлечено дополнительно два биотеста с использованием ракообразных и зелёных водорослей. Сопоставление результатов биотестирования исследуемых веществ представлено в таблице 2.

По суммарным результатам биотестов, как и в случае с фитотестом, можно констатировать, что НДМГ, по сравнению с продуктами трансформации, является достаточно сильным экотоксикантом. Для него характерны низкие концентрационные показатели порогового воздействия и среднеэффективных концентраций.

Для инфузорий НДМГ оказался наиболее токсичным, его производные на основании полученных LD₅₀ можно расположить в следующий ряд:

Гидразин > МТ > ДМА > ДМГу > ТМТ > НДМА > ДМГМК.

Причём токсичность веществ достаточно сильно различается. Так, показатели токсичности НДМГ и МТ отличаются примерно в 20 раз, а НДМГ и ДМГМК примерно в 100000 раз.

Исследование токсичности по изменению подвижности половых клеток млекопитающих также выявило, что гидразин и НДМГ являются одними из наиболее токсичных соединений среди исследуемых. В то же время данный биотест проявил аномально высокую чувствительность к ТМТ, являющемуся веществом 3 класса опасности. Это может быть связано

Таблица 1

Значения пороговых (LimC) и среднеэффективных (EC₅₀) концентраций для НДМГ и продуктов его трансформации по результатам фитотестирования, мг/л

Вещество	LimC	EC ₅₀
НДМГ	30	150
Гидразин	9	30
ДМГМК	2300	6400
МТ	1500	4200
ДМА	790	1800
Нитрозодиметиламин	1300	3400
ДМГу	43	130

Таблица 2

Параметры токсичности НДМГ и продуктов его трансформации по результатам биотестирования

Вещество	LD ₅₀ , мг/л		Lim C**, мг/л	ЕС ₅₀ , мг/л
	Простейшие инфузории <i>Paramecium caudatum</i>	Ракообразные <i>Ceriodaphnia affinis</i>	Половые клетки млекопитающих in vitro	Зелёные водоросли <i>Scenedesmus quadricauda</i>
НДМГ	0,4	3,9	75	10
Гидразин	1,0	–	50	–
ДМГМК	36 000	5900	1500	23600
МТ	9,8	–	10000	–
ДМА	170	–	100	–
ДМГу	340	–	2000	–
НДМА	11 500	–	1000	–
ТМТ	540	–	10	–

Примечание: ** – пороговая концентрация при It = 80%.

с малой устойчивостью ТМТ в водных растворах и способностью распадаться с образованием свободных радикалов, повреждающих мембраны клеток и вызывающих изменение подвижности сперматозоидов. Помимо гидразина, который на всех тестах показал сопоставимую с НДМГ токсичность, на биотесте с половыми клетками пороговая концентрация диметиламина близка к НДМГ. Другие продукты трансформации (ДМГМК, НДМА, ДМГу, МТ) характеризуются пороговыми концентрациями, отличающимися от НДМГ минимум в 10 раз. Наименьшее токсическое действие на половые клетки оказал МТ, в то время как по результатам биотестирования на инфузориях МТ показал одну из самых низких среднеэффективных концентраций.

Кроме того, полученные данные по тестированию на цериодафниях и зелёных водорослях не подтверждают результатов расчёта среднеэффективных концентраций острой токсичности, приведённых в работах Карлсена [7, 9] для НДМГ и ДМГМК:

	LD ₅₀ , мг/л (дафнии, 48 ч)	ЕС ₅₀ , мг/л (зелёные водоросли, 144 ч)
НДМГ	6,2	0,53
ДМГМК	12,2	0,88

Таким образом, по результатам биотестирования, проведённого в работе, можно охарактеризовать гидразин и НДМГ как вещества с высокой острой токсичностью и, с другой стороны, НДМА и ДМГМК, наоборот, со сравнительно низкой. Другие изученные продукты трансформации также, по-видимому, являются веществами с меньшей токсичностью, чем НДМГ.

Следовательно, в ходе трансформации НДМГ в ДМГМК происходит снижение ток-

сического воздействия загрязнения на биоту, и старые места разлива ракетного горючего «гептил» не являются столь же опасными по критерию острой токсичности, как свежие, где присутствует непосредственно сам НДМГ.

Заметим, что отнесение известного канцерогена НДМА к веществам с невысокой токсичностью по результатам фито- и биотестирования настораживает, но не противоречит здравому смыслу, поскольку опасность НДМА связана с наличием у него отдаленных эффектов. В то же время известно, что аналог ДМГМК – диметилгидразид янтарной кислоты (даминозид) – не обладает хронической токсичностью, мутагенностью и не воздействует на репродуктивную функцию [17]. Агентство по охране окружающей среды США относит даминозид к потенциально возможным канцерогенам (группа В2), связывая с наличием в его молекуле фрагмента НДМГ. Таким образом, сравнение с аналогом позволяет надеяться на отсутствие негативного воздействия у ДМГМК по всему спектру возможных эффектов. В дальнейшем для окончательного установления малой опасности ДМГМК и других новых продуктов трансформации (МТ, ДМГу) необходимы исследования, связанные с подтверждением отсутствия у них не только острой токсичности, но и отдалённых эффектов.

Заключение

Методами биотестирования изучена токсичность НДМГ и продуктов его трансформации. Показано, что в результате трансформации НДМГ не образуются продукты более токсичные, чем НДМГ (за исключением, может быть, гидразина, который имеет и самостоятельное

значение как ракетное топливо). По результатам фитотестирования, необходимо обратить внимание на 1,1-диметилгуанидин, обладающий сопоставимой токсичностью с НДМГ.

Поскольку большинство продуктов трансформации НДМГ оказались менее токсичны, чем НДМГ, то можно полагать, что во времени в ходе трансформации НДМГ в окружающей среде опасность мест загрязнения НДМГ снижается. Показано, что структурный аналог НДМГ – ДМГМК, ошибочно принимаемый за НДМГ на месте старых разливов, характеризуется существенно меньшей токсичностью.

Литература

1. Экологические проблемы и риски воздействий ракетно-космической техники на окружающую природную среду / Под ред. Адушкина В.В., Козлова С.И., Петрова А.В. М.: Анкил, 2000. 640 с.
2. Справочник по токсикологии и гигиеническим нормативам (ПДК) потенциально опасных химических веществ / Под ред. Кушневой В.С., Горшковой Р.Б. М: ИздАТ, 1999. 202 с.
3. Kenessov B.N., Koziel J.A., Grotenhuis T., Carlsen L. Screening of transformation products in soils contaminated with unsymmetrical dimethylhydrazine using headspace SPME and GC-MS // *Anal. Chim. Acta.* 2010. V. 674. № 1. P. 32–39.
4. Буряк А.К., Татаурова О.Г., Ульянов А.В. Исследование продуктов трансформации несимметричного диметилгидразина на модельных сорбентах методом газовой хроматографии/масс-спектрометрии // *Масс-спектрометрия.* 2004. Т. 1. № 2. С. 147–152.
5. Кабанов П.М., Муратовская О.Б., Татаурова О.Г., Ульянов А.В., Буряк А.К. Хромато-масс-спектрометрическое исследование продуктов трансформации несимметричного диметилгидразина в водных растворах // *Сорбц. хромат. процессы.* 2006. Т. 6. № 2. С. 218–226.
6. Родин И.А., Москвин Д.Н., Смоленков А.Д., Шпигун О.А. Превращение несимметричного диметилгидразина в почвах // *Журн. физич. химии.* 2008. Т. 82. № 6. С. 1039–1045.
7. Carlsen L., Kenessov B.N., Batyrbekova S.Ye. A QSAR/QSTR study on the environmental health impact by

the rocket fuel heptyl and its transformation products. // *Environ. Health Insights.* 2008. № 1. P. 11–20.

8. Carlsen L., Kenessov B.N., Batyrbekova S.Y. A QSAR/QSTR study on the human health impact of the rocket fuel 1,1-dimethylhydrazine and its transformation products: Multicriteria hazard ranking based on partial order methodologies // *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2009. V. 28. № 3. P. 415–423.

9. Carlsen L. The interplay between QSAR/QSPR studies and partial order ranking and formal concept analyses // *Int. J. Mol. Sci.* 2009. V. 10. № 4. P. 1628–1657.

10. Beltrami R.T., Bisell E.R. Some methylhydrazonium salts. An improved synthesis of tetramethylhydrazine. // *J. Am. Chem. Soc.* 1956. V. 78. P. 2467–2468

11. McBride W.R., Kruse H.W. Alkylhydrazines. I. Formation of a New Diazo-like Species by the Oxidation of 1,1-Dialkylhydrazines in Solution. // *J. Am. Chem. Soc.* 1957. V. 79. № 5. P. 572–576.

12. Обоснование класса опасности отходов производства и потребления по фитотоксичности. Методические рекомендации МР 2.1.7.2297-07. М., 2007. 17 с.

13. Методика определения токсичности отходов, почв, осадков сточных, поверхностных и грунтовых вод методом биотестирования с использованием равноресничных инфузорий *Paramecium caudatum* Ehrenberg. ФР.1.39.2006.02506. М.: ЛЭТАП МГУ, 2006. 30 с.

14. Методика выполнения измерений индекса токсичности почв, почвогрунтов, вод и отходов по изменению подвижности половых клеток млекопитающих in vitro. ФР.1.31.2009.06301. М.: ЛЭТАП МГУ, 2009. 30 с.

15. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости цериодафний. ФР.1.39.2007.03221. М.: ООО «Акварос», 2007. 56 с.

16. Методика определения токсичности вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению уровня флуоресценции хлорофилла и численности клеток водорослей. ФР.1.39.2007.03223. М.: ООО «Акварос», 2007. 48 с.

17. Daminozide: reregistration eligibility decision (RED) fact sheet. Washington, DC: US EPA, 1993. 6 pp. <http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/factsheets/0032fact.pdf>