

Рис. 3. Взаимосвязь различных путей диссимиляции глюкозы и возможные направления воздействия отравляющих веществ кожно-нарывного действия на растительные организмы

нетения роста на ранних этапах развития проростков не наблюдается. Дальнейшие исследования в данном направлении позволят более аргументированно подойти к ответу на вопрос о механизме действия отравляющих веществ кожно-нарывного действия на растительные организмы и о возможности их использования в качестве природных тест-систем для дополнительной экологической оценки состояния окружающей среды на объектах по хранению и уничтожению химического оружия.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Курсанов А.Л. Корневая система растений как орган обмена веществ. М.: АН СССР, 1983, с. 815.
2. Красильникова Л.А., Авксентьева О.А., Жмурко В.В. и др. Биохимия растений. Ростов-на-Дону: «Феникс», 2004, с. 224.
3. Полевой В.В. Физиология растений. М.: Высшая школа, 1989, с. 464.

УДК 623.459:546.217.004.5

## Направления совершенствования технических средств мониторинга воздуха на содержание фосфорорганических отравляющих веществ

А. М. Антохин, Э. Т. Гайнуллина, К. В. Кондратьев, С. Б. Рыжиков, В. Ф. Таранченко

ФГУ «27 Научный центр Министерства обороны Российской Федерации»  
НТЦ Федерального управления по безопасному хранению и уничтожению химического оружия  
МГУ им. М.В. Ломоносова, Физический факультет

Одной из задач мониторинга на территории объектов по уничтожению химического оружия (ХО) и в зонах защитных мероприятий является обеспечение санитарно-гигиенических норм труда, для чего должен проводиться непрерывный автоматический контроль воздуха рабочей зоны и вентиляционных выбросов на наличие токсичных веществ. Технические средства аналитического контроля должны выявлять опасные вещества в количествах, соответствующих их ПДК в воздухе рабочей зоны (ПДК<sub>р.з.</sub>). Согласно [1], в случае угрозы поступления веществ с остронаправленным поражающим действием аналитические методы и средства должны обеспечивать контроль на уровне 0,5 ПДК<sub>р.з.</sub> и менее. Таким образом, требования, предъявляемые к чувствительности приборов санитарно-гигиенического контроля, достаточно высокие.

Существующие технические средства и приборы анализа и контроля отличаются недостаточной устойчивостью работы, велика вероятность выдачи ложных показаний о превышении ПДК<sub>р.з.</sub>. Причиной тому является сопоставимость чувствительности методов,

положенных в основу работы того или иного прибора, с уровнем ПДК, так что функционирование прибора происходит практически на пределе его технических возможностей.

Проблема ведения непрерывного и достоверного санитарно-гигиенического контроля воздуха рабочей зоны и вентиляционных выбросов на уровне ПДК<sub>р.з.</sub> встает особенно остро в отношении обеспечения безопасности работ по уничтожению фосфорорганических отравляющих веществ (ФОВ), на долю которых приходится более 2/3 запасов отравляющих веществ, хранящихся на территории Российской Федерации. Так, санитарные требования к содержанию фосфорорганических отравляющих веществ составляют: в воздухе рабочей зоны  $10^{-5}$ – $10^{-6}$  мг/м<sup>3</sup>, в атмосферном воздухе населенных мест  $10^{-7}$ – $10^{-8}$  мг/м<sup>3</sup> [1].

В большинстве средств химической разведки и химического контроля, предназначенных для определения фосфорорганических отравляющих веществ и принятых в армии РФ и зарубежных стран, используется биохимический метод на основе холинэстеразной

реакции. Основными достоинствами этого метода являются высокая чувствительность, относительно высокая специфичность по фосфорорганическим отравляющим веществам, простота пробоподготовки (для проведения анализа в большинстве случаев необходимо только нейтрализовать пробу до значения pH 7,0—7,5), несложное приборное оформление, сравнительно малые массовые и габаритные характеристики приборов, наглядность аналитического эффекта. Благодаря указанным достоинствам биохимический метод реализован во многих устройствах химической разведки и контроля. Подобными отечественными средствами химической разведки являются газосигнализаторы ГСА-12, ГСА-13, ГСА-14, а также газосигнализатор «Ветерок». Назначение, основные характеристики и принцип действия отечественных и зарубежных технических средств и приборов химико-аналитического контроля, в основу которых положен биохимический метод, представлены в табл. 1 и 2 [2—4].

Из отечественных войсковых приборов автоматические газосигнализаторы ГСА-12, ГСА-13, ГСА-14 и газосигнализатор ГСБ «Ветерок» не отвечают требованиям по чувствительности определения содержания фосфорорганических отравляющих веществ в атмосферном воздухе населенных мест [1]. Поэтому актуальной остается задача разработки метода определения этих токсикантов на уровне ПДК<sub>р.з.</sub> и создания на его основе приборов, предназначенных для непрерывного санитарно-гигиенического контроля.

Одним из перспективных направлений достижения поставленной цели является создание сенсорных устройств, к числу которых относятся и биосенсоры — устройства, состоящие из биологически активного компонента и преобразователя аналитического отклика в регистрируемый сигнал (световой, звуковой и т.п.).

Биологически активный компонент играет в основном роль «узнающего» агента, который специфически взаимодействует с определяемым веществом, например по типу фермент—субстрат, фермент—ингибитор и др. Этой роли хорошо соответствует холинэстераза, отличающаяся высокой чувствительностью и специфичностью по отношению к фосфорорганическим ингибиторам. Именно на основе холинэстеразной реакции с использованием различных преобразователей сконструировано значительное число биосенсоров: пьезоэлектрических, амперометрических, спектроскопических и др.

Анализ литературных данных позволяет сделать заключение о том, что наибольшей чувствительности биосенсоров на основе биохимического метода можно достигнуть при использовании флуоресцентного способа регистрации аналитического эффекта. Среди многообразия модификаций флуоресцентного способа по оптимальному сочетанию параметров «чувствительность—быстрота отклика» наиболее перспективными представляются три направления для конструирования биосенсоров: с использованием флуорогенного субстрата, на основе бессубстратной модификации с использованием флуорофора-ингибитора и фермент-субстратной модификации с использованием в качестве индикатора флуорогена, который при взаимодействии с продуктом гидролиза субстрата образует интенсивно флуоресцирующее соединение.

Первое направление реализовано в биосенсоре, в котором качестве флуорогенного субстрата использован N-метилендоксилацетат [6]. Данное устройство предназначено для обнаружения ингибиторов холинэстеразы в водных пробах путем измерения флуоресценции N-метилендоксила — продукта ферментативного превращения указанного синтетического субстрата. Конструкция биосенсора предусматривает поступление раствора ацетилхолинэстеразы одновременно с анализируемой водной пробой в смеситель. Затем после определенной экспозиции, необходимой для ингибирования фермента, раствор, содержащий ацетилхолинэстеразу и анализируемую пробу, поступает во второй смеситель, в который одновременно подается раствор N-метилендоксилацетата. Далее раствор поступает в оптический детектор, регистрирующий интенсивность флуоресценции раствора. Свет флуоресценции через оптическое волокно проходит через сферическую линзу, сплиттер (делитель светового луча), фильтр и далее через линзу поступает на фотодиод.

Данный биосенсор имеет ряд недостатков: сложная конструкция, что вызвано необходимостью одновременной подачи субстрата и анализируемой жидкой пробы в проточный реактор (два насоса, проточный реактор, смеситель и т.д.) и др. Использование такого устройства для анализа воздуха предусматривает предварительную пробоподготовку, а именно, адсорбцию содержащихся в воздухе токсичных веществ на сорбенте с последующей их экстракцией в соответствующий растворитель. Однако основным его недостатком является неудовлетворительная чувствительность вследствие низкой скорости ферментативного гидролиза «чужого» субстрата — N-метилендоксилацетата.

Использование «своего» специфичного субстрата — ацетилхолина — позволило сконструировать более чувствительный к ингибитору оптический биосенсор [7]. В качестве биологически активного компонента в этом устройстве используется иммобилизованная на волокнах кварца ацетилхолинэстераза электрического органа угря, меченная флуоресцеинизотиоцианатом (FITC). Активность иммобилизованного фермента контролируется по pH-зависимости флуоресцентного сигнала комплекса FITC с ацетилхолинэстеразой на поверхности волокна. В результате ферментативного гидролиза субстрата меченая ацетилхолинэстераза ингибируется продуктом гидролиза ацетилхолина (протонами), что приводит к тушению флуоресценции реакционного раствора.

Обратимый ингибитор эдрофониум (лекарственное вещество) в концентрации 0,1 мМ ингибирует меченую ацетилхолинэстеразу, что приводит к уменьшению тушения флуоресценции. Отклик биосенсора возникает немедленно и быстро восстанавливается после реактивации 2-пиридинальдоксимметидом (ПАМ-2). Обратимый ингибитор неостигмин (лекарственное вещество) в концентрации 0,1 мМ также ингибирует меченую ацетилхолинэстеразу, влияя на отклик биосенсора, но восстановление активного элемента достигается намного медленнее. Фосфорорганический ингибитор диизопропилфторфосфат в присутствии ацетилхолина практически не влияет на отклик биосенсора, но в его отсутствие аналитический отклик под действием диизопропилфторфосфата полностью подавляется.

Отечественные технические средства химической разведки и контроля, реализующие биохимический метод [2—4]

Название средства	Назначение	Основные технические характеристики	Принцип действия
<b>В о й с к о в ы е с р е д с т в а</b>			
Индивидуальное средство химического контроля ИСХК	Контроль зараженности фосфорорганическими отравляющими веществами (ФОВ) для установления возможности снятия противогаса	Чувствительность $5 \cdot 10^{-6}$ мг/л, быстродействие не более 10 мин, время сохранения индикационного эффекта 2 мин, время подготовки к анализу 1 мин, масса комплекта 20 г	Сорбция паров вещества на поверхностный слой ферментного диска, затем анализ по холинэстеразной реакции
Войсковой комплект индивидуального химического контроля ВИ КХК	Контроль зараженности воздуха и воды ФОВ, ипритом, люизитом; обнаружение зомана, Vx, иприта на непитывающих поверхностях	Быстродействие не более 15 мин, время сохранения индикационного эффекта 5 мин, масса комплекта 85 г	Колориметрическая модификация биохимического метода для определения ФОВ
Автоматический газо-сигнализатор ГСА-12	Обнаружение в воздухе паров ФОВ	Чувствительность: по зоману $(6-8) \cdot 10^{-6}$ мг/л, по Vx $(8-20) \cdot 10^{-7}$ мг/л, быстродействие 5—7 мин, время непрерывной работы 8—24 ч	Ленточный оптико-электронный колориметр. Аналитический эффект определяется по скорости изменения окраски индикатора на тиольную группу. Изменение окраски регистрируется фотоколориметрической системой. Обнаружение ФОВ производится при сравнении сигналов на 5 и 30 секунде фотометрирования. При уровне сигнала выше порогового прибор фиксирует наличие ФОВ в воздухе
Автоматический газо-сигнализатор ГСА-13	Обнаружение в воздухе паров ФОВ	Чувствительность: по зоману $(6-8) \cdot 10^{-6}$ мг/л, по Vx $(8-20) \cdot 10^{-7}$ мг/л, быстродействие 1,5—2 мин, время непрерывной работы 3—24 ч	Принцип действия аналогичен ГСА-12, но информация выдает-ся чаще, за счет чего повышается быстродействие прибора
Автоматический газо-сигнализатор ГСА-14	Обнаружение в воздухе паров ФОВ	Чувствительность — опасные и малоопасные концентрации, быстродействие 2—4,5 мин, время непрерывной работы 3—48 ч	Принцип в целом аналогичен ГСА-12 и ГСА-13. Имеется устройство, прекращающее подачу воздуха при воздействии больших концентраций ФОВ (за счет этого снижается время последствия прибора)
<b>С р е д с т в а х и м и ч е с к о г о к о н т р о л я н а о б ъ е к т а х п о у н и ч т о ж е н и ю Х О</b>			
Газосигнализатор биохимический ГСБ «Ветерок»	Сигнализация о превышении ПДК зарина, зомана, Vx в воздухе рабочей зоны и в вентиляционных выбросах	Чувствительность: по парам зарина $(2-6) \cdot 10^{-5}$ мг/м <sup>3</sup> , по парам зомана $(1-3) \cdot 10^{-5}$ мг/м <sup>3</sup> , по парам Vx $(0,5-1,5) \cdot 10^{-5}$ мг/м <sup>3</sup> , быстродействие 10 мин, последствие после воздействия 10 ПДК ФОВ 30 мин, время непрерывной работы 26 ч	Ленточный оптико-электронный колориметр. Принцип действия аналогичен ГСА-12, ГСА-13, ГСА-14
Тест-набор ТН-01	Экспресс-обнаружение ФОВ в растворах и на поверхностях технологического оборудования с выполнением анализа на месте отбора проб	Чувствительность по ФОВ: в растворах $3 \cdot 10^{-6}$ мг/мл, на поверхностях $5 \cdot 10^{-5}$ мг/дм <sup>2</sup> , быстродействие: в растворах 18 мин на поверхностях 23 мин	Колориметрическая модификация холинэстеразной реакции

Зарубежные средства индикации, реализующие биохимический метод (холинэстеразную реакцию) [5]

Название средства	Назначение	Основные технические характеристики	Принцип действия
Ферментные пластины (США)	Обнаружение ФОВ в воздухе и воде	Чувствительность по ФОВ: в воздухе $5 \cdot 10^{-6}$ мг/л, в воде $2 \cdot 10^{-6}$ мг/мл	Набор из ферментного и субстратного дисков. Ферментный диск выполнен из фильтровальной бумаги, пропитанной ацетилхолинэстеразой в буферном растворе. Субстратный диск — бумага, пропитанная субстратом индоксилацетатом
Индикаторный билет (США)	Обнаружение ФОВ в воде	Чувствительность по ФОВ $2 \cdot 10^{-5}$ мг/мл	Фермент — ацетил- или бутарилхолинэстераза, индикатор нарастания концентрации продуктов гидролиза — феноловый красный или бромтимоловый синий
Индивидуальный детектор «the Button» (Нидерланды)	Контроль зараженности воздуха ФОВ	Чувствительность по ФОВ $(1-2) \cdot 10^{-5}$ мг/л, время обнаружения не более 5 мин	Два индикаторных диска — ферментный и субстрат-индикаторный. Анализируемое вещество накапливается в ферментном диске при аспирации через него зараженного воздуха. Фермент — бутирилхолинэстераза, субстрат — 2,6-дихлориндофенилацетат
Газоопределятель М-256 (США)	Обнаружение и групповая индикация ФОВ, отравляющих веществ кожно-нарывного и общедовитого действия в парообразном состоянии	Чувствительность по ФОВ после 10 мин экспозиции $2 \cdot 10^{-5}$ мг/л, время одного анализа 15 мин, время появления индикаторного эффекта 30 с	Определение ФОВ по колориметрической модификации холинэстеразной реакции, субстрат — 2,6-дихлориндофенилацетат
Автоматический газо-сигнализатор АСАЛ (Нидерланды)	Экспресс-обнаружение ФОВ в воздухе и оповещение о химическом нападении	Чувствительность по ФОВ $1,5 \cdot 10^{-5}$ мг/л, время непрерывной работы 24 ч	Принцип действия основан на холинэстеразной реакции, электрохимический детектор
Автоматический газо-сигнализатор L1A1 (Англия)	Экспресс-обнаружение ФОВ в воздухе и оповещение о химическом нападении	Чувствительность по ФОВ $5 \cdot 10^{-6}$ мг/л, время непрерывной работы 12 ч	То же

Эхоthиофат — фосфорорганический ингибитор с четвертичной аммониевой группой — ингибирует ацетилхолинэстеразу и препятствует тушению флуоресценции.

Обсуждаемый биосенсор определяет диизопропилфторфосфат, инсектициды эхоthиофат и параоксон в области концентраций нМ—мкМ. Он отличается высокой чувствительностью, быстрым аналитическим откликом, возможностью многократного использования, относительно прост в эксплуатации. Данное устройство портативно, имеет автономное питание, что определяет его потенциальную адаптируемость к полевому использованию. Недостатком биосенсора является высокая чувствительность к кислотным парам, что делает его непригодным для мониторинга атмосферного воздуха на территории объектов по уничтожению ХО в зоне защитных мероприятий.

Преимущество в простоте конструкции имеет оптический биосенсор с активным элементом, в котором реализуется бессубстратная модификация биохимического метода [8]. Данная модификация основана на образовании нефлуоресцирующего комплекса флуорофора-ингибитора ( $I_f$ ) в результате обратимого взаимодействия с холинэстеразой [9, 10]. При воздействии на образующийся при этом нефлуоресцирующий комплекс  $E I_f$  (где  $E$  — холинэстераза) необратимого инги-

битора, например диизопропилфторфосфата, интенсивность флуоресценции увеличивается. Это связано с тем, что при необратимом связывании холинэстеразы равновесие в системе смещается в сторону диссоциации комплекса  $E I_f$  и концентрация флуорофора-ингибитора  $I_f$  в растворе возрастает. Наблюдаемое увеличение интенсивности флуоресценции и является аналитическим откликом.

Основная задача при разработке активного элемента биосенсора — выбор флуорофора-ингибитора. Так, используемый для указанной цели флуорофор-ингибитор должен отвечать следующим основным требованиям: обладать хорошей растворимостью в водных средах, быть фото- и термостабильным, интенсивность его флуоресценции не должна зависеть от значения рН в интервале от 6 до 9; флуорофор не должен флуоресцировать в спектральной области, в которой флуоресцируют холинэстераза и сопутствующие белки.

Известен целый ряд обратимых ингибиторов-флуорофоров: сульфат хинидина, сульфат хинина, лактаг 2-этокси-6,9-диаминоакридиния, N-метилакридин и другие, флуоресценция которых тушится при взаимодействии с холинэстеразой [9].

В рассматриваемом биосенсоре на основе бессубстратной модификации биохимического метода

активный компонент выполнен из комплекса холинэстеразы с ее обратимым ингибитором-флуорогеном, иммобилизованном на прозрачной нейтральной подложке. Флуоресцентный детектор представляет собой оптический волновод, внутри которого последовательно расположены по ходу светового луча от источника света (см. схему): фокусирующая сферическая линза, диафрагма, фильтр для выделения длины волны возбуждающего света, призма, фокусирующая линза, активный элемент с иммобилизованным комплексом холинэстеразы с обратимым ингибитором-люминогеном. Далее по ходу луча флуоресценции от активного элемента последовательно расположены фокусирующая флуоресцирующий луч сферическая линза, призма, фильтр для выделения флуоресцирующего луча, фокусирующая линза, фотодиод для вывода сигнала на световое табло или для получения звукового сигнала.

Активный элемент с иммобилизованным из геля комплексом выполнен съемным и после регистрации наличия ингибитора холинэстеразы в анализируемом воздухе подлежит замене.

Чувствительность биосенсора определяется природой флуорофора-ингибитора, из которого изготовлен активный элемент. В качестве активного элемента может быть использован также комплекс ацетилхолинэстеразы с флуорогеном, интенсивно флуоресцирующим в составе комплекса с этим ферментом. Известен ряд таких флуорогенов, например пропидиум, тиофлавин Т и др. [11]. Так, интенсивность флуоресценции тиофлавина Т в присутствии ацетилхолинэстеразы увеличивается более чем в 1000 раз, а при воздействии фосфорорганического ингибитора на комплексе этого флуорогена с ферментом интенсивность флуоресценции падает пропорционально концентрации [11].

Максимальной чувствительности следует ожидать от биосенсора, в котором реализуется модификация биохимического метода, предусматривающая совмещение биокатализа гидролиза специфичного субстрата с флуоресцентным откликом. На основе данной модификации разработана методика определения ингибиторов холинэстеразы с использованием в качестве субстрата бутирилтиохолина — ближайшего аналога природного субстрата (скорость его ферментативного гидролиза выше скорости ферментативного гидролиза

специфичного субстрата бутирилхолина), а в качестве флуорогена на тиольную группу применяется N-4-(7-диэтиламино-4-метилкумарин-3-ил)фенилмалеимид [12]. На примере ингибитора гидрохлорида 9-амино-1,2,3,4-тетрагидроакридина (такрина) показано, что чувствительность определения ингибитора холинэстеразы по данной флуоресцентной методике возрастает более чем на два порядка по сравнению с методикой Элмана [12].

К настоящему времени предложено значительное число флуорогенов, образующих с тиольной группой интенсивно флуоресцирующее соединение [13]. Очевидно, среди них можно найти флуороген, образующий с тиохолином соединение с еще большим квантовым выходом, что позволит предложить методику, превосходящую по чувствительности флуоресцентную.

При конструировании биосенсоров следует учитывать количественные соотношения между степенью ингибирования фермента, временем инкубации и концентрацией ингибитора [14].

Колориметрическая модификация биохимического метода, использующая в качестве субстрата ацетилтиохолин, реализована в газосигнализаторе ГСБ «Ветерок». Можно полагать, что наиболее эффективным путем модификации биосенсора с целью повышения чувствительности к фосфорорганическим токсикантам и достижения высокой скорости аналитического отклика могла бы быть замена колориметрической регистрации аналитического эффекта на флуоресцентный, что не потребует значительных изменений в конструкции газосигнализатора.

Таким образом, открывается перспектива создания оптического биосенсора, отвечающего современным требованиям по чувствительности определения фосфорорганических токсикантов и скорости аналитического отклика в интересах санитарно-гигиенического контроля на объектах по уничтожению ХО.

#### ЛИТЕРАТУРА

- ГОСТ 12.1.005-88 «Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны», Госстандарт России, М., 1988.
- Газосигнализатор ГСБ «Ветерок». Руководство по эксплуатации.
- Научно-технический отчет «Приборы контроля отравляющих веществ в воздушной среде — испытания». Саратов, СВИ РХБЗ, 2004.
- Войсковая индикация. Под ред. О.В. Чеботарева. М., ВАХЗ, 1973.
- Makower A., Halamek J., Skladal P., Kernchen F., Scheller F.W. Biosens. Bioelectron., 2003, v. 18, № 11, p. 1329—1337.
- US Patent H 1344, 1994, C12Q 1/46.
- Rogers K.R., Cao C.J., Valdes J.J., Eldefrawi A.T., Eldefrawi M.E. Fund. Appl. Toxicol., 1991, v. 16, p. 810—820.
- Патент РФ № 2198394, 2003.
- Патент РФ № 2165458, 1999.
- Gainullina E.T., Kondratjev K.V., Ryzhikov S.B., Taranenko V.F. Int. Congr. on Analytical Sciences (ICAS-2006). Book of Abstracts, v. 1. p. 121.
- De Ferrari G.V., Mallender W.D., Inestrosa N.C., Rosenberry T.L. J. Biol. Chem., 2001, v. 276, p. 23282—23287.
- Гайнуллина Э.Т., Кондратьев К.В., Рыжиков С.Б., Таранченко В.Ф. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 2006, № 12, с. 710—711.
- Richard P. Haugland. Eighth Edition Handbook of Fluorescent Probes and Research Products. 2001.
- Zhang S., Zhao H., John R. Biosens. Bioelectron., 2001, v. 16, p. 1119—1126.

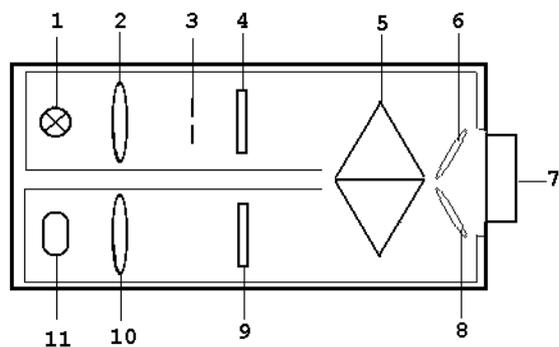


Схема оптического биосенсора [9]:

1 — источник света; 2 — сферическая линза; 3 — диафрагма; 4 — фильтр; 5 — призма; 6, 8, 10 — фокусирующие линзы; 7 — активный элемент; 9 — фильтр; 11 — фотодиод или фотомножитель