

НОВЫЙ ПОДХОД К КАЧЕСТВЕННОМУ И КОЛИЧЕСТВЕННОМУ ОПРЕДЕЛЕНИЮ ДИОКСИНОВ

© 2014 Г.И. Гумерова¹, Э.В. Гоголь¹, А.В. Васильев²

¹Казанский национальный исследовательский технический университет
им. А.Н. Туполева – КАИ (КНИТУ-КАИ)

²Самарский государственный технический университет

Поступила в редакцию 13.01.2014

В данной статье рассмотрены основные проблемы, связанные с количественным определением диоксинов, предложен новый ферментный метод экспресс-анализа диоксиноподобных соединений и биосенсор для его реализации.

Ключевые слова: диоксины, ферментные методы анализа, биосенсор, вольтамперометрия, цитохром P450.

За последнее время наблюдается значительный рост загрязнений окружающей среды [1-3, 10, 11]. Одним из наиболее опасных является загрязнение диоксинами.

Диоксины – это собирательный термин для галогенированных шестичленных ароматических углеводородов, содержащие в своем составе два атома кислорода. Наибольшую опасность из этого класса соединений представляют полихлорированные дибензодиоксины (ПХДД), такие как 2,3,7,8-тетрахлордибензо-*p*-диоксин, полихлорированные дибензофураны (ПХДФ) и полихлорированные бифенилы (ПХБ). Диоксины присутствуют в окружающей среде в виде сложных смесей [4]. Все они имеют разную токсичность и поэтому очень трудно определить общую токсичность любой смеси. Токсичность любой смеси определяется ДЭ (диоксиновым эквивалентом) и рассчитывается сложением сумм факторов токсической эквивалентности (ФТЭ), умноженных на концентрацию того или иного диоксиноподобного соединения, выражается в общей концентрации, в нг/кг:

$$\text{ДЭ} = \sum (\text{ТХДД}_i * \text{ФТЭ}_i) + \sum (\text{ТХДФ}_i * \text{ФТЭ}_i) + \sum (\text{ПХБ}_i * \text{ФТЭ}_i) \quad (1)$$

По определению, чтобы рассчитать общий ТЭ необходимо знать концентрацию каждого диок-

Гумерова Гузель Ильдаровна, старший преподаватель кафедры общей химии и экологии. E-mail: geri6872@mail.ru
Гоголь Элина Владимировна, кандидат химических наук, доцент кафедры общей химии и экологии. E-mail: ellinagol@bk.ru

Васильев Андрей Витальевич, доктор технических наук, профессор, заведующий кафедрой "Химическая технология и промышленная экология". E-mail: ecology@samgtu.ru

синоподобного компонента в смеси. Отсюда возникает необходимость в точных и надежных количественных анализах [5].

Аналитические требования по определению диоксинов являются уникальными по сравнению с определением других химических веществ, так как эти работы весьма трудоемки из-за аномально низких уровней определяемых концентраций.

В основе количественного контроля диоксинов лежат гибридные методы физико-химического анализа – сочетание хроматографии и масс-спектрометрии. Такое сочетание обеспечивает высокую чувствительность и точность определения. К недостаткам относятся дороговизна из-за использования дорогостоящих стандартов, химических реактивов, приборов с высокой стоимостью технического обслуживания, необходимость хорошо обученного персонала, низкая пропускная способность, невозможность определения некоторых диоксиноподобных соединений, таких как бром-хлор-диоксинов, полибромированных диоксинов [6]. Отбираемые пробы, как правило, имеют очень сложный и неоднородный состав и включают в себя большое количество химических веществ, которые могут стать помехой при определении диоксинов. По этой причине анализируемые образцы должны быть подвергнуты предварительной пробоподготовке и очистке от посторонних включений. В свою очередь, проведение эффективной пробоподготовки невозможно без дополнительного лабораторного оборудования.

Из-за сложной подготовки образца, селективности и сверхнизких пределов обнаружения, стоимость анализа диоксинов намного выше, чем любые другие аналитические методы.

Кроме того, среди проблем контроля объек-

тов природной среды есть такие, решить которые затруднительно даже с помощью вышеуказанных методов: аварийные поступления загрязнений от предприятий, арбитражная практика, когда подтвердить аналитическую информации, полученную методами ГХ/МС или ВЭЖХ/МС, необходимо результатами, полученными совершенно иным методом контроля (электрохимическим, биохимическим и пр.).

Развитие количественных методов определения диоксинов предполагает снижение стоимости, повышение скорости, селективности, уменьшение пределов обнаружения анализа, что позволит увеличить число аналитов в одном анализе. На сегодняшний день возникает необходимость проведения таких анализов в реальном масштабе времени и приспособление к полевым условиям аналитического оборудования, которое не уступало бы своими возможностями лабораторному.

В этой связи разработка ферментных методов определения полигалогенированных дибензо-*n*-диоксинов и родственных им соединений является актуальной.

Предлагаемый метод может использоваться для комбинированного или предварительного экспресс-анализа проб объектов природной среды, предположительно содержащих ксенобиотики, обладающие опасными и/или токсичными свойствами для экологической системы. Метод предполагает сочетание физико-химического датчика (сенсора) и биообъекта. Подобное сочетание называют биосенсором.

Биосенсоры на основе ферментов наиболее просты в изготовлении и эксплуатации и имеют перспективы широкого применения [7]. Недостатком их является то, что фермент часто денатурирует (изменяет структуру своего белка) под действием химических реагентов, используемых при обработке проб. Решение этой проблемы лежит в области модификации либо структуры самого белка, либо поверхности датчика.

Электрохимические биосенсоры – это электроды, поверхность которых сформирована с использованием полимерных пленок, на которые иммобилизован селективный к определяемому токсиканту фермент [8]. Такие электроды реализуют одновременно принципы твердофазной экстракции (на ферментсодержащей мембране) и биохимическое «узнавание» целевой молекулы. Поэтому выбор фермента при конструировании биосенсора является ключевой задачей.

Для проявления токсического эффекта на живой организм большинству ксенобиотиков

требуется активация с образованием электрофильной формы, которая в результате выдает молекулу, способную необратимо реагировать с нуклеофилами живой ткани. Известно, что такая биохимическая активация катализируется почти всеми ферментами, участвующими в биотрансформации ксенобиотиков.

Цитохромы Р450 млекопитающих представляют собой структурно и функционально различные изоферменты, которые кодируются суперсемейством генов. Одним из важнейших свойств компонентов монооксигеназной системы, в частности цитохрома Р-450, является способность к индукции под действием внешнего стимула, в роли которого могут выступать ксенобиотики. Экзогенные вещества индуцируют ферменты, что является побочным действием метаболизма. Феномен индукции цитохромов Р450 является важнейшей составляющей адаптивного ответа на чужеродные соединения, попадающие в клетку. Это приводит к усилению детоксификационной функции организма с последующим выведением ксенобиотика [9].

Для подтверждения отсутствия острой токсичности диоксиноподобных соединений и невозможность их определения скрининг – анализом на живых системах было проведено биотестирование подготовленных модельных проб. Результаты биотестирования показали, что для ксенобиотиков типа диоксина, которые не обладают острой токсичностью, а являются канцерогенами и мутагенами, данный метод контроля не информативен. Опасными, соединения такого типа, становятся только при попадании в организм и вступлении в метаболизм под действием ферментов.

Изоформа цитохрома 1А1 присутствуют в организме как человека, так и млекопитающих и типичным субстратом для нее являются диоксины. Это и послужило основанием для выбора данной изоформы цитохрома в качестве биорецептора разрабатываемого биосенсора.

Принцип работы предлагаемого биосенсора заключается в том, что при проведении анализа в электрохимической ячейке определяемый компонент диффундирует в тонкий слой биологического материала датчика, где протекает реакция с образованием продуктов, на которые реагирует электрод.

Так как изоформа фермента цитохром Р4501А1 проявляет свою активность только в отношении диоксинов, другие ионы, присутствующие в буферном растворе, не мешают протеканию химической реакции. Для конструирования

такого биосенсора необходимо было подобрать составляющие его материалы и условия изготовления так, чтобы сигнал был воспроизводимым и стабильным, время функционирования биосенсора увеличилось и фермент, иммобилизованный на его поверхности, имел хорошую активность и не денатурировал.

Так как биодegradации диоксинов приводит к образованию фенола, который является электроактивным соединением, было принято решение использовать электрохимические методы анализа для определения его концентрации, а именно инверсионную вольтамперометрию. Этот метод широко используется в области химического анализа веществ, присутствующих в микроконцентрациях.

Исходя из свойств материалов, возможных для использования при конструировании электрода, была предложена конструкция биосенсора, за основу которого взят электрод из стеклоглеродного материала с иммобилизованным на его поверхность биологически чувствительного элемента (изоформы фермента цитохрома P4501A1).

Если селективность биохимического распознавания определяется в основном биологическим компонентом, то характеристики регистрации этого распознавания зависят, прежде всего, от способа включения биологического компонента в состав биосенсора, т.е. совокупностью факторов, определяющих контакт преобразователя и биокомпонента и способ регистрации сигнала.

Из за своей белковой природы ферменты неустойчивы при хранении, а также чувствительны к тепловым воздействиям. Решить эти проблемы помогает создание иммобилизованных ферментов. Необходимость иммобилизации ферментов объясняется, так же, экономической выгодой. При прямом введении фермента в реакцию, по окончании процесса он, вместе с продуктом реакции, выводится из рабочей зоны и утрачивается. Следовательно, подлежит использованию только однократно. Исходя из этого, необходимо задерживать фермент в зоне реакции с целью его многократного использования.

Во избежание проблем, возникающих при различных способах иммобилизации, нами была разработана модифицированная методика, сочетающая приемы, использованные при изготовлении накладных мембран и описанные для одноразовых биосенсоров на основе планарных электродов.

Соблюдение единообразия при конструировании биосенсора по предлагаемой методике по-

зволяют получать хорошую воспроизводимость результатов и стабильность отклика при многократном использовании.

Биосенсоры показали хорошую воспроизводимость как фонового тока, так и отклика на низкие концентрации диоксинов в пределах 10^{-9} – 10^{-12} М.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Васильев А.В.* Обеспечение экологической безопасности в условиях городского округа Тольятти: учебное пособие. Самара: Изд-во Самарского научного центра РАН, 2012. 201 с., ил.
2. *Васильев А.В., Перешивайлов Л.А.* Глобальный экологический кризис и стратегии его предотвращения. Региональные аспекты защиты окружающей среды. Учеб. пособие для студентов вузов, обучающихся по экологическим специальностям. Федеральное агентство по образованию, Тольяттинский гос. ун-т. Тольятти, 2005.
3. *Заболотских В.В., Васильев А.В.* Мониторинг токсического воздействия на окружающую среду с использованием методов биоиндикации и биотестирования: монография. Самара, 2012.
4. *Ившин В.П.* Диоксины и диоксиноподобные соединения: пути образования, свойства, способы деструкции. Йошкар-Ола: Изд-во Марийского государственного университета, 2005. 320 с.
5. *Safe S.* Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzop-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), and related compounds: Environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs) // *CRC Crit. Rev. Toxicol.* 1990. № 21. P. 51-88.
6. An enlightened approach to screening for dioxins/ Environews. Forum // *Environmental Health Perspectives.* 1997. Vol.105, №11. P.1176-1177
7. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification./ Thévenot DR, Toth K, Durst RA, Wilson GS.// *Biosens Bioelectron.* 2001, № 16(1-2). P. 121-31.
8. *Дзядевич С.В.* Амперометрические биосенсоры. Основные принципы работы и особенности датчиков разных генераций.// *Біополімери і клітина.* 2002. Т. 18, № 1. С. 13-25
9. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, and nomenclature / *Nelson, D.R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J. J., Feyereisen, R., Waxman, D. J., Waterman, M. R., Gotoh, O., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Gunsalus, I. C., and Nebert, D. W.* // *Pharmacogenetics.* 1996, № 6. P. 1–42.
10. *Vasilyev A.V., Khamidullova L.R., Podurueva V.V., Solovyov S.G.* Investigation of toxicity of waste water of "AVTOVAZ" company by using biological testing methods // *Safety of Technogenic Environment.* 2012. № 2. С. 72-75.

11. *Vasilyev A.V., Gusarova D.V.* Analysis of lubricating cooling liquids negative influence to the human's health and the ways of it reduction // *Safety of Technogenic Environment*. 2013. № 4. С. 37-41.

**A NEW APPROACH TO THE QUALITATIVE
AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF DIOXINS**

© 2014 G.I. Gumerova¹, E.V. Gogol¹, A.V. Vasilyev²

¹Kazan National Research Technical University named after A.N. Tupolev (KNRTU n.a.A.N. Tupolev)

²Samara State Technical University

This article describes the main problems associated with the quantification of dioxin, we propose a new method for rapid enzyme analysis of dioxin-like compounds and biosensor for its implementation.

Keywords: dioxins, enzymatic methods of analysis, biosensor, voltamperometry, cytochrome P450.

Guzel Gumerova, Senior Lecturer at the Chemistry and Ecology Department. E-mail: geri6872@mail.ru

Ellina Gogol, Candidate of Chemical Sciences, Associate Professor at the Chemistry and Ecology Department.

E-mail: ellinagogol@bk.ru

Andrey Vasilyev, Doctor of Technical Science, Professor, Head at the of Chemical Technology and Industrial Ecology Department. Email: ecology@samgtu.ru