

МИНИСТЕРСТВО РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ПО ОБЩЕМУ И
ПРОФЕССИОНАЛЬНОМУ ОБРАЗОВАНИЮ
КАЗАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи
УДК 543.9 + 577.15.087.4

СТОЙКОВА Екатерина Евгеньевна

ЭКСПРЕСС-ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЗАГРЯЗНИТЕЛЕЙ ОКРУЖАЮЩЕЙ
СРЕДЫ С ПОМОЩЬЮ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИХ
ТЕСТОВ

02.00.02 - Аналитическая химия

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

КАЗАНЬ - 1997

Работа выполнена на кафедре аналитической химии химического факультета Казанского государственного университета.

Научные руководители: доктор химических наук, член-корр.РАЕН
профессор Будников Г.К.,
кандидат химических наук, доцент
Евтюгин Г.А.

Официальные оппоненты: доктор химических наук, профессор
Винтер В.Г.
кандидат химических наук, доцент
Евгеньев М.И.

Ведущая организация: ГНПО "Химаналит", г.Санкт-Петербург

Защита состоится "___" _____ 1997 г. в _____ часов на заседании Специализированного ученого совета К 053.29.02. при Казанском государственном университете по адресу: 420008, г.Казань, ул. Кремлевская, 18, Казанский государственный университет, Ученый совет.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке КГУ.

Автореферат разослан "___" _____ 1997 г

Ученый секретарь
Специализированного совета К 053.29.02,
кандидат химических наук

Федотова Н.Р.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В последнее время растущее внимание уделяется вопросам контроля объектов окружающей среды на содержание остаточных количеств загрязняющих веществ, особенно таких приоритетных токсикантов, как химических средств защиты растений. Используемые в настоящее время физико-химические методы трудоемки и малопригодны для осуществления оперативного контроля, особенно в отрыве от лабораторной базы. В этой связи актуальной является задача разработки упрощенных тестовых методов определения загрязнителей окружающей среды, предназначенных для обнаружения и полуколичественной оценки содержания токсикантов. Практическое внедрение таких экспресс-тестов требует решить задачи стабилизации ферментных препаратов, а также интерпретации отклика в многокомпонентных системах, в том числе реальных объектах окружающей среды. Решение этих задач позволит за счет упрощения пробоподготовки, сокращения продолжительности анализа и повышения чувствительности существенно расширить сферу экоаналитического контроля, снизить риск загрязнения биосферы и токсического действия загрязнителей на человека.

Диссертация выполнена в рамках проводимых кафедрой аналитической химии и Лабораторией экологического контроля Казанского государственного университета совместных исследований и разработок новых экспресс-методов контроля загрязнения окружающей среды при поддержке гранта ГНТП Миннауки РФ "Новые принципы и методы получения химических веществ и материалов. Проект 08.01.13. Теоретические и практические основы изменения избирательности биоспецифических методов анализа для решения конкретных аналитических задач" и программы "Университеты России. Экология. Проект 230-6-2. Разработка теоретических и практических основ биохимических методов экспресс-диагностики состояния водных экосистем".

Целью настоящего исследования явилось создание и практическая апробация новых ферментных тестов для контроля содержания ингибиторов гидролитических ферментов различного механизма действия с использованием стабилизированных в водорастворимых полимерных пленках ферментных препаратов и колориметрических способов детектирования, а также выявление факторов, влияющих на чувствительность и селективность отклика системы на ингибиторы в многокомпонентных средах.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- разработать способы стабилизации препаратов гидролитических ферментов путем их включения в водорастворимые пленки на основе полимерных материалов, установить оптимальный состав полученных пленок и условия их хранения и использования;
- установить аналитические характеристики определения ингибиторов различного механизма действия, в том числе фосфорорганических инсектицидов, ионов тяжелых металлов, α -аминофосфонатов и гидразониевых солей диакилдитиофосфатов в различных экспериментальных условиях;
- выявить экспериментальные факторы, определяющие чувствительность и селективность определения ингибиторов, в том числе при их совместном присутствии в растворе;
- изучить влияние макрокомпонентов матрицы на аналитические характеристики определения ингибиторов в объектах окружающей среды и разработать на этой основе упрощенные способы полуколичественного определения остаточных количеств пестицидов в растительных и почвенных вытяжках.

Научная новизна и практическая значимость работы заключается в том, что она углубляет представления о закономерностях применения стабилизированных водорастворимых препаратов ферментов для определения ингибиторов методами полумикроанализа. Впервые проведено комплексное сравнительное исследование влияния экспериментальных факторов (стабилизатор фермента, условия проведения ферментативной реакции, присутствие в анализируемом растворе эффекторов ферментов) на аналитические характеристики определения ингибиторов различного механизма действия и на этой основе сформулированы подходы к направленному изменению чувствительности и селективности определения соединений с несколькими ингибирующими центрами, а также смесей ингибиторов различного механизма действия. Разработаны новые упрощенные способы полуколичественного определения остаточных количеств фосфорорганических пестицидов в растительных экстрактах и почвенных вытяжках, проведена экспериментальная проверка возможности применения разработанных ферментных тестовых методов для обобщенной характеристики загрязнения осадков сточных вод и почв загрязнителями антропогенного происхождения.

Часть экспериментальных результатов и выводы на их основе использованы в учебном процессе Казанского государственного университета при чтении общего курса

"Экологический мониторинг" и спецкурса "Методы биологического мониторинга и биоиндикации".

Апробация работы. Результаты диссертационной работы докладывались на Международной научной конференции "Сенсор-Техно-93" (Санкт-Петербург, 1993 г.), IV Всероссийской конференции по электрохимическим методам анализа ЭМА-94 (Москва, 1994 г.), на 5 Международном симпозиуме по кинетическим методам анализа (Москва, 1995 г.), Всероссийской конференции с международным участием "Химическое разоружение-96. Экология и технология. СЕМДЕТ-96" (Ижевск, 1996 г.), на Международном симпозиуме "Применение биосенсоров для прямого определения загрязнителей окружающей среды в полевых условиях" (Смоленице, Словакия, 1997 г.), Молодежном симпозиуме по химии фосфорорганических соединений "Петербургские встречи-97" (С-Петербург, 1997 г.), на научной конференции Казанского государственного университета в 1993 г.

Основные результаты изложены в 3 статьях и 6 тезисах докладов.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 169 страницах машинописного текста, включает 23 рисунка и 25 таблиц и состоит из введения, пяти глав, заключения, выводов, списка литературы (161 источник).

Во Введении обоснована актуальность работы, ее новизна и практическая значимость, сформулированы цель исследования и основные задачи. Первая глава посвящена обзору литературы по определению загрязнителей окружающей среды с помощью ферментативных методов анализа, а также особенностей определения ингибиторов холинэстераз и карбоксилэстераз. Основные результаты экспериментальных исследований и их обсуждение приведено в главах 3-5.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования. В работе были использованы препараты ферментов бутирилхолинэстеразы из сыворотки крови лошади (БуХЭ, АО"Биомед", Пермь), микробальной карбоксилэстеразы (КЭ, АО"Биотехнология", Москва) и щелочной фосфатазы, стабилизированные путем включения в водорастворимые полимерные пленки на основе N-фталилхитазана, β -декстрана и полиглюкина. Скорость ферментативной реакции измеряли по времени достижения 30-50% превращения хромогенного субстрата (времени перехода окраски) с помощью колориметрического

анализатора АКЦ-01. Оценка чувствительности тестов к ингибиторам производилась по модельным водным растворам и экстрактам из растительного материала и почв, содержащим различные ингибиторы - фосфорорганические пестициды, фториды, соли тяжелых металлов, гидразониевые соли диалкилдитиофосфатов и α -аминофосфонаты (табл.1).

Включение ферментов в пленки водорастворимых полимеров значительно повышает их устойчивость при хранении. Ферментативная активность остается практически постоянной в течение полугода при использовании полиглюкина и декстрана и более года для фталилхитазана (рис.1).

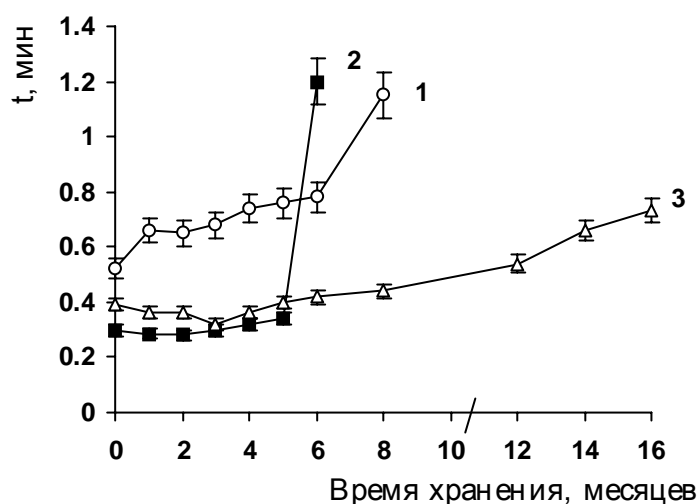
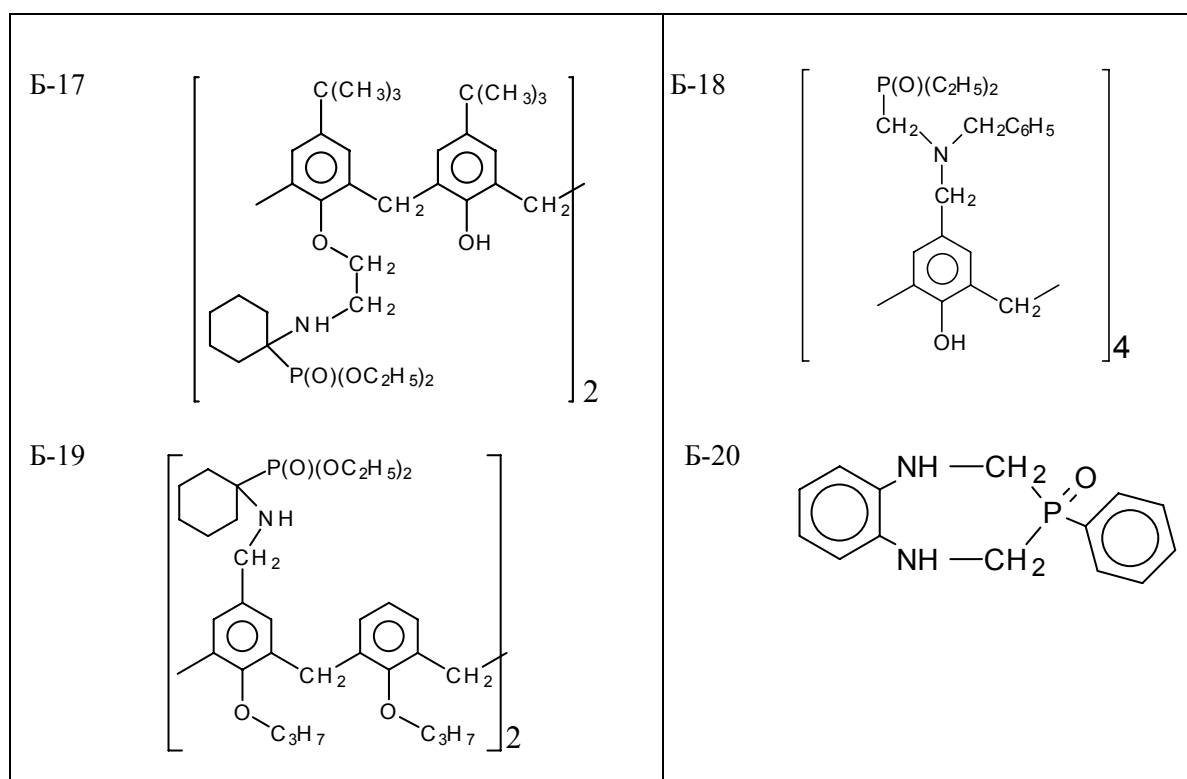


Рисунок 1. Зависимость времени (t) перехода окраски от продолжительности хранения теста. БуХЭ в присутствии 0.008% полиглюкина (1), N-фталилхитазана (2) и β -декстрана (3). Субстрат ИФА $1.7 \cdot 10^{-4}$ моль/л, pH 6.5.

Таблица 1. Химическое строение изученных гидразониевых солей диалкилдитиофосфатов (А-1 - А-8) и α -аминофосфонатов (Б-1 - Б-20)

| Шифр | Химическая формула |
|------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| А-1 | $[o\text{-NO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CH=N-N(CH}_3)_2] [(CH_3O)_2\text{PHO}]$ |
| А-2 | $[o\text{-ClC}_6\text{H}_4\text{CH=N-N(CH}_3)_2] [(CH_3O)_2\text{PHO}]$ |
| А-3 | $[m\text{-NO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CH=N-NH(CH}_3)_2]^+ [S_2\text{P(OC}_2\text{H}_5)_2]^-$ |
| А-4 | $[m\text{-NO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CH=N-NH(CH}_3)_2]^+ [S_2\text{P(OC}_3\text{H}_7)_2]^-$ |
| А-5 | $[m\text{-NO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CH=N-NH(CH}_3)_2]^+ [S_2\text{P(OC}_3\text{H}_{7-i})_2]^-$ |
| А-6 | $[o\text{-NO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CH=CHCH=N-NH(CH}_3)_2]^+ [S_2\text{P(OC}_2\text{H}_5)_2]^-$ |
| А-7 | $[o\text{-NO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CH=CHCH=N-NH(CH}_3)_2]^+ [S_2\text{P(OC}_3\text{H}_7)_2]^-$ |
| А-8 | $[o\text{-NO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CH=CHCH=N-NH(CH}_3)_2]^+ [S_2\text{P(OC}_3\text{H}_{7-i})_2]^-$ |
| Б-1 | $\text{PhCH}_2\text{NHC(CH}_3)_2\text{P(O)(OC}_2\text{H}_5)_2$ |

| | |
|------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Б-2 | $\text{PhCH}_2\text{NHCH}_2\text{P}(\text{O})(\text{OC}_2\text{H}_5)_2$ |
| Б-3 | $\text{PhCH}(\text{CH}_3)\text{NHC}(\text{CH}_3)_2\text{P}(\text{O})(\text{OC}_5\text{H}_{11})_2$ |
| Б-4 | $\text{PhCH}_2\text{NH} \begin{array}{c} \text{---C---} \\ \\ \text{Cyclopentane ring} \end{array} \text{P}(\text{O})(\text{OC}_5\text{H}_{11})_2$ |
| Б-5 | $\text{PhCHNH} \begin{array}{c} \text{---C---} \\ \\ \text{Cyclopentane ring} \end{array} \text{P}(\text{O})(\text{OC}_5\text{H}_{11})_2$ CH_3 |
| Б-6 | $\text{PhCH}_2\text{NH} \begin{array}{c} \text{---C---} \\ \\ \text{Cyclohexane ring} \end{array} \text{P}(\text{O})(\text{OC}_5\text{H}_{11})_2$ |
| Б-7 | $(\text{CH}_3)_2\text{CHNHC}(\text{CH}_3)_2\text{P}(\text{O})(\text{OC}_2\text{H}_5)_2$ |
| Б-8 | $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NHC}(\text{CH}_3)_2\text{P}(\text{O})(\text{OCH}_2\text{CH}(\text{C}_2\text{H}_5)\text{C}_4\text{H}_9)_2$ |
| Б-9 | $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NHCH}(\text{C}_4\text{H}_9)\text{P}(\text{O})(\text{OCH}_2\text{CH}(\text{C}_2\text{H}_5)\text{C}_4\text{H}_9)_2$ |
| Б-10 | $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NHCHPhP}(\text{O})(\text{OCH}_2\text{CH}(\text{C}_2\text{H}_5)\text{C}_4\text{H}_9)_2$ |
| Б-11 | $\text{PhCH}_2\text{NHC}(\text{CH}_3)_2\text{P}(\text{O})(\text{OCH}_2\text{CH}(\text{C}_2\text{H}_5)\text{C}_4\text{H}_9)_2$ |
| Б-12 | $\text{PhCH}_2\text{NH} \begin{array}{c} \text{---C---} \\ \\ \text{Cyclohexane ring} \end{array} \text{P}(\text{O})(\text{OCH}_2\text{CH}(\text{C}_2\text{H}_5)\text{C}_4\text{H}_9)_2$ |
| Б-13 | $\text{PhCH}_2\text{NH} \begin{array}{c} \text{---C---} \\ \\ \text{Cyclopentane ring} \end{array} \text{P}(\text{O})(\text{OCH}_2\text{CH}(\text{C}_2\text{H}_5)\text{C}_4\text{H}_9)_2$ |
| Б-14 | $\text{PhCH}(\text{CH}_3)\text{NHC}(\text{CH}_3)_2\text{P}(\text{O})(\text{OCH}_2\text{CH}(\text{C}_2\text{H}_5)\text{C}_4\text{H}_9)_2$ |
| Б-15 | |
| Б-16 | |



В качестве субстратов использовали бутирилхолин иодид (БХИ), индофенилацетат (ИФА) для БУХЭ, ИФА и фенилацетат (ФА) - для КЭ. Присутствие стабилизатора не влияет на скорость ферментативного гидролиза субстрата. С увеличением буферной емкости время перехода окраски увеличивается, а ошибка его измерения уменьшается.

Определение фосфорорганических пестицидов с помощью стабилизированных препаратов БУХЭ и КЭ. Для повышения чувствительности определения тионовые фосфорорганические пестициды предварительно "активировали" путем электролиза в присутствии хлорида натрия. Образующийся хлор окисляет пестицид до более токсичного фосфорильного аналога. В доказательство механизма "активации" было изучено ингибирующее действие метафоса и его кислородного аналога параоксона. Соответствующие градуировочные зависимости практически совпадают.

Метафос: $C_1 \cdot 10^6 = (0.04 \pm 0.02) + (0.62 \pm 0.08) \cdot \ln(t_i/t_0)$, C_1 , моль/л, $n=8$, $r=0.9544$

Параоксон: $C_1 \cdot 10^6 = (0.09 \pm 0.05) + (0.69 \pm 0.06) \cdot \ln(t_i/t_0)$, C_1 , моль/л, $n=8$, $r=0.9755$

Аналитические характеристики определения пестицидов приведены в табл.2,3.

Таблица 2. Аналитические характеристики определения пестицидов с помощью БуХЭ и КЭ (0.008% N-фталилхитазана, рН 7.9, инкубирование 10 мин)

| Пестицид | $C_t \cdot 10^7 = a + b \cdot \ln(t_i/t_0)$, C_t , моль/л | | | | | |
|------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|-----------|--------|-----------------|-----------|--------|
| | a | b | r | a | b | r |
| Х о л и н э с т е р а з а | | | | | | |
| | Бутирилхолин иодид | | | Индофенилацетат | | |
| Диазинон | -0.24±0.07 | 1.40±0.07 | 0.9912 | -0.03±0.01 | 0.51±0.01 | 0.9980 |
| Фозалон | -0.40±0.01 | 0.62±0.01 | 0.9965 | -0.03±0.01 | 0.84±0.02 | 0.9972 |
| Карбофос | -0.06±0.01 | 1.76±0.01 | 0.9844 | -0.53±0.05 | 1.09±0.04 | 0.9890 |
| Корал | -0.07±0.02 | 2.66±0.10 | 0.9681 | -0.54±0.10 | 1.36±0.11 | 0.9901 |
| ДДВФ | -1.50±0.13 | 18.8±0.1 | 0.9912 | -5.20±0.48 | 107±6 | 0.9849 |
| Метафос | 0.43±0.06 | 6.20±0.12 | 0.9544 | -1.44±0.48 | 6.62±0.60 | 0.9677 |
| К а р б о к с и л э с т е р а з а | | | | | | |
| | Фенилацетат | | | Индофенилацетат | | |
| Диазинон | -0.26±0.04 | 19.8±3.3 | 0.9889 | -0.29±0.05 | 11.1±0.2 | 0.9912 |
| Фозалон | -1.40±0.10 | 11.8±0.8 | 0.9933 | -0.50±0.07 | 13.6±1.1 | 0.9955 |
| Карбофос | -58.8±3.7 | 146±29 | 0.9629 | -2.40±0.10 | 26.3±2.1 | 0.9974 |
| Корал | 0.27±0.03 | 4.35±0.08 | 0.9957 | -0.13±0.01 | 7.60±0.10 | 0.9638 |
| ДДВФ | -0.11±0.01 | 4.30±0.20 | 0.9910 | -0.16±0.01 | 44.7±0.2 | 0.9920 |
| Метафос | | | | -1.46±0.66 | 9.12±1.00 | 0.9441 |

Разработанные ферментные тесты позволяют детектировать присутствие фосфорорганических пестицидов на уровне ПДК для природных вод. Исключение составляет ДДВФ, для которого предел обнаружения равен 2.5 ПДК. Совместное использование КЭ и БуХЭ может позволить идентифицировать отдельные пестициды. Так, КЭ малочувствительна к карбофосу и более чувствительна к ДДВФ по сравнению с БуХЭ. Для других ингибиторов аналитические характеристики определения с помощью КЭ несколько хуже.

Определение пестицидов в растительном материале и почвах. Предварительно было установлено, что присутствие этанола или ацетона в концентрации до 20% не влияет на чувствительность тестов к пестицидам. Это позволило разработать

упрощенный способ контроля остаточных количеств фосфорорганических пестицидов в растительности и почвах без выпаривания органического экстракта (табл.4).

Таблица 3. Пределы обнаружения (ПО) и диапазоны определяемых концентраций фосфорорганических пестицидов

| Пестицид | Субстрат | ПО, моль/л | Диапазон определяемых концентраций, моль/л |
|------------------------------------------|----------|---------------------|--------------------------------------------|
| Х о л и н э с т е р а з а | | | |
| Диазинон | БХИ | $2.1 \cdot 10^{-8}$ | $3.4 \cdot 10^{-8} - 2.0 \cdot 10^{-7}$ |
| | ИФА | $7.7 \cdot 10^{-9}$ | $8.4 \cdot 10^{-9} - 3.3 \cdot 10^{-8}$ |
| Фозалон | БХИ | $9.4 \cdot 10^{-9}$ | $1.5 \cdot 10^{-8} - 6.8 \cdot 10^{-7}$ |
| | ИФА | $1.3 \cdot 10^{-8}$ | $3.2 \cdot 10^{-8} - 3.4 \cdot 10^{-7}$ |
| Карбофос | БХИ | $2.7 \cdot 10^{-8}$ | $5.0 \cdot 10^{-8} - 3.0 \cdot 10^{-6}$ |
| | ИФА | $1.6 \cdot 10^{-8}$ | $2.2 \cdot 10^{-8} - 7.6 \cdot 10^{-8}$ |
| Корал | БХИ | $4.0 \cdot 10^{-8}$ | $5.0 \cdot 10^{-8} - 2.8 \cdot 10^{-7}$ |
| | ИФА | $2.0 \cdot 10^{-8}$ | $4.0 \cdot 10^{-8} - 1.4 \cdot 10^{-7}$ |
| ДДВФ | БХИ | $4.0 \cdot 10^{-7}$ | $5.5 \cdot 10^{-7} - 4.5 \cdot 10^{-6}$ |
| | ИФА | $1.6 \cdot 10^{-6}$ | $3.0 \cdot 10^{-6} - 4.5 \cdot 10^{-6}$ |
| Метафос | БХИ | $9.3 \cdot 10^{-8}$ | $2.0 \cdot 10^{-7} - 7.6 \cdot 10^{-7}$ |
| | ИФА | $9.9 \cdot 10^{-8}$ | $2.0 \cdot 10^{-7} - 7.6 \cdot 10^{-7}$ |
| К а р б о к с и л э с т е р а з а | | | |
| Диазинон | ФА | $3.0 \cdot 10^{-7}$ | $5.0 \cdot 10^{-7} - 7.5 \cdot 10^{-7}$ |
| | ИФА | $1.7 \cdot 10^{-7}$ | $2.5 \cdot 10^{-7} - 7.5 \cdot 10^{-7}$ |
| Фозалон | ФА | $2.1 \cdot 10^{-7}$ | $3.5 \cdot 10^{-7} - 6.8 \cdot 10^{-7}$ |
| | ИФА | $2.0 \cdot 10^{-7}$ | $3.5 \cdot 10^{-7} - 3.3 \cdot 10^{-6}$ |
| Карбофос | ФА | $2.2 \cdot 10^{-6}$ | $3.8 \cdot 10^{-6} - 1.5 \cdot 10^{-5}$ |
| | ИФА | $4.0 \cdot 10^{-7}$ | $5.5 \cdot 10^{-7} - 6.1 \cdot 10^{-6}$ |
| Корал | ФА | $7.1 \cdot 10^{-7}$ | $1.0 \cdot 10^{-6} - 2.8 \cdot 10^{-5}$ |
| | ИФА | $1.5 \cdot 10^{-8}$ | $3.5 \cdot 10^{-8} - 5.5 \cdot 10^{-7}$ |
| ДДВФ | ФА | $3.6 \cdot 10^{-6}$ | $5.5 \cdot 10^{-6} - 8.5 \cdot 10^{-5}$ |
| | ИФА | $6.7 \cdot 10^{-7}$ | $8.5 \cdot 10^{-7} - 2.3 \cdot 10^{-5}$ |
| Метафос | ИФА | $1.4 \cdot 10^{-7}$ | $2.5 \cdot 10^{-7} - 1.1 \cdot 10^{-6}$ |

Наименьшая чувствительность определения достигается для культур с наименьшим содержанием масла - ячменя и овса. Это позволяет предположить, что наблюдаемые вариации аналитических характеристик определения обусловлены различной экстрагируемостью пестицидов из растительного материала.

При определении пестицидов в почвах степень их экстракции ацетоном не превышает 60%, но и в этом случае ингибирование имеет чисто необратимый характер, т.е. соли металлов, присутствующие в почвах, на ингибирующее действие пестицидов не влияют.

Таблица 4. Аналитические характеристики определения пестицидов в растительном материале с помощью БУХЭ (фосфатный буферный раствор)

| Ингибитор | Зерно | $C_1 = a + b \ln (t_i/t_0)$, C_1 , мг/кг | | |
|-----------|---------|---------------------------------------------|------------|--------|
| | | a | b | r |
| Диазинон | Гречиха | 0.001±0.002 | 0.05±0.005 | 0.9809 |
| | Ячмень | -0.006±0.002 | 0.07±0.005 | 0.9859 |
| | Овес | -0.002±0.002 | 0.06±0.008 | 0.9819 |
| | Пшеница | -0.001±0.004 | 0.03±0.002 | 0.9927 |
| | Рожь | -0.002±0.006 | 0.03±0.005 | 0.9764 |
| | Сорго | -0.009±0.004 | 0.04±0.005 | 0.9463 |
| Фозалон | Гречиха | -0.003±0.004 | 0.03±0.004 | 0.9598 |
| | Овес | 0.003±0.006 | 0.03±0.002 | 0.9871 |
| Метафос | Гречиха | 0.005±0.002 | 0.12±0.01 | 0.9859 |

Влияние солей металлов на определение пестицидов. При определении остаточных количеств пестицидов в реальных объектах окружающей среды необходимо учитывать возможное влияние ионов металлов. С этой целью нами были изучено действие солей тяжелых металлов, являющихся обратимыми ингибиторами БУХЭ (табл.5).

При совместном присутствии ионов металлов и пестицидов необратимое ингибирующее действие последних снижается в силу "защитного эффекта", который зависит от природы металла, условий определения и частично подавляется стабилизатором, в наибольшей степени N-фталилхитазаном (табл.6).

Определение комбинированных ингибиторов. Азотсодержащие фосфорорганические соединения способны в зависимости от строения проявлять и обратимое, и необратимое ингибирующее действие за счет наличия аминогруппы и фосфорорганического фрагмента. Нами изучены два класса таких соединений - гидразониевые соли диалкилдитиофосфатов и α -аминофосфонаты (табл.1). Как оказалось, изученные соединения либо не проявляют ингибирующего действия (А-3 - А-8, Б-20), либо демонстрируют лишь слабое обратимое ингибирующее действие (А-1, А-2 - ПО $2 \cdot 10^{-5}$ моль/л, α -аминофосфонаты - ПО $(1 \div 4) \cdot 10^{-5}$ моль/л.). Можно предположить, что низкая активность изученных соединений обусловлена взаимным связыванием (ионного характера или за счет водородных связей) азот- и фосфорсодержащих фрагментов молекулы.

Таблица 5. Аналитические характеристики определения ионов металлов и фторидов с помощью БУХЭ (трис-буферный раствор, ИФА $1.7 \cdot 10^{-4}$ моль/л)

| Ингибитор | рН | $C_I \cdot 10^3 = a + b \cdot (t_i/t_0)$, C_I , моль/л | | | Диапазон определяемых концентраций, моль/л |
|--------------------------------|-----|-----------------------------------------------------------|-----------|--------|--------------------------------------------|
| | | a | b | r | |
| В отсутствие N-фталилхитазана | | | | | |
| Cu^{2+} | 6.5 | -5.04±0.12 | 4.13±0.10 | 0.9823 | $2 \cdot 10^{-4} - 2 \cdot 10^{-3}$ |
| Hg^{2+} | 5.5 | -1.54±0.04 | 1.28±0.05 | 0.9824 | $1 \cdot 10^{-5} - 5 \cdot 10^{-3}$ |
| Cd^{2+} | 6.5 | -8.83±0.19 | 9.01±0.18 | 0.9976 | $5 \cdot 10^{-3} - 3 \cdot 10^{-2}$ |
| Pb^{2+} | 6.5 | -4.7±0.17 | 6.13±0.14 | 0.9861 | $3 \cdot 10^{-4} - 5 \cdot 10^{-3}$ |
| Al^{3+} | 5.5 | -0.14±0.01 | 0.25±0.01 | 0.9993 | $5 \cdot 10^{-5} - 3.5 \cdot 10^{-4}$ |
| Fe^{2+} | 4.0 | -3.69±0.08 | 3.58±0.09 | 0.9836 | $2 \cdot 10^{-4} - 1.6 \cdot 10^{-3}$ |
| F^- | 4.0 | 0.66±0.15 | 0.68±0.08 | 0.9944 | $1 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-3}$ |
| В присутствии N-фталилхитазана | | | | | |
| Cu^{2+} | 6.5 | -16.67±1.2 | 16.67±1.0 | 0.9925 | $1.25 \cdot 10^{-3} - 3 \cdot 10^{-3}$ |
| Cd^{2+} | 6.5 | -22.2±1.2 | 18.5±0.7 | 0.9873 | $5 \cdot 10^{-3} - 3 \cdot 10^{-2}$ |
| Hg^{2+} | 5.5 | -0.70±0.02 | 0.57±0.01 | 0.9818 | $1 \cdot 10^{-5} - 5 \cdot 10^{-4}$ |
| | | 29.1±1.15 | 14.28±1.4 | 0.9622 | $5 \cdot 10^{-4} - 5 \cdot 10^{-3}$ |
| Pb^{2+} | 6.5 | -5.61±0.07 | 6.6±0.04 | 0.9967 | $3 \cdot 10^{-4} - 2 \cdot 10^{-3}$ |
| | | -1.73±0.01 | 1.79±0.07 | 0.9986 | $2 \cdot 10^{-3} - 4 \cdot 10^{-3}$ |
| Al^{3+} | 5.5 | -0.63±0.01 | 0.71±0.01 | 0.9884 | $5 \cdot 10^{-5} - 3 \cdot 10^{-4}$ |
| | | 0.21±0.07 | 0.07±0.01 | 0.9982 | $3 \cdot 10^{-4} - 5 \cdot 10^{-4}$ |

Таблица 6. Аналитические характеристики определения метафоса в присутствии солей металлов с помощью БУХЭ (трис-буферный раствор, субстрат ИФА $1.7 \cdot 10^{-4}$ моль/л)

| Эффектор | $C \cdot 10^3$, моль/л | $C_I \cdot 10^6 = a + b \cdot \ln(t_i/t_0)$, C_I , моль/л | | | | | |
|-----------------------|-------------------------|--------------------------------------------------------------|-----------|--------|---------------------------------------|------------|--------|
| | | В отсутствие N-фталилхитазана | | | В присутствии 0.008% N-фталилхитазана | | |
| | | a | b | r | a | b | r |
| - | 0 | 0.06±0.02 | 0.56±0.06 | 0.9872 | 0.02±0.003 | 0.34±0.01 | 0.9837 |
| Cu^{2+} , рН 6.5 | 0.5 | 0.09±0.01 | 0.78±0.03 | 0.9903 | 0.004±0.001 | 0.19±0.001 | 0.9903 |
| | 0.75 | 0.16±0.01 | 0.97±0.03 | 0.9544 | 0.07±0.008 | 0.26±0.01 | 0.9757 |
| | 1.0 | 0.19±0.01 | 1.15±0.02 | 0.9922 | 0.16±0.01 | 0.27±0.01 | 0.9734 |
| | 1.5 | 0.15±0.01 | 1.08±0.06 | 0.9938 | 0.12±0.009 | 0.29±0.01 | 0.9668 |
| Cd^{2+} , рН 6.5 | 10 | 0.06±0.01 | 0.84±0.07 | 0.9913 | 0.02±0.01 | 0.34±0.02 | 0.9973 |

Электрохимическая "активация" ингибиторов значительно повысила чувствительность их определения, причем и гидразоны, и фосфонаты стали демонстрировать необратимое ингибирующее действие на ферменты (табл.7-9).

Таблица 7. Аналитические характеристики определения гидразониевых солей диалкилдитиофосфатов (трис-буферный раствор, рН 4.0, субстрат ИФА $1.7 \cdot 10^{-4}$ моль/л, инкубация 10 мин.)

| Ингибитор | Диапазон определяемых концентраций, мкмоль/л | ПО, мкмоль/л | $C_I = a + b \cdot \ln(t_i/t_0)$, C_I , мкмоль/л | | |
|-----------------------------|----------------------------------------------|--------------|--------------------------------------------------------|------------|--------|
| | | | a | b | r |
| Бутирилхолинэстераза | | | | | |
| А-1 | 1.65-6.70 | 1.40 | 0.63±0.28 | 7.67±0.65 | 0.9928 |
| А-2 | 1.70-6.84 | 1.36 | 0.87±0.56 | 4.90±0.86 | 0.9593 |
| А-3 | 0.9-1.6 | 0.7 | 0.0±0.17 | 5.44±0.32 | 0.9518 |
| А-4 | 0.5-1.3 | 0.4 | -0.12±0.07 | 4.17±0.34 | 0.9958 |
| А-5 | 0.4-1.5 | 0.35 | 0.04±0.06 | 2.03±0.12 | 0.9933 |
| А-6 | 1.0-2.5 | 0.4 | 1.9±0.09 | 2.54±0.18 | 0.9922 |
| А-7 | 0.2-2.5 | 0.2 | 0.13±0.46 | 4.49±1.24 | 0.9869 |
| А-8 | 0.3-2.5 | 0.2 | -0.23±0.19 | 2.67±0.27 | 0.9743 |
| Карбоксилэстераза | | | | | |
| А-1 | 0.13-3.4 | 0.04 | 0.01±0.02 | 0.33±0.03 | 0.9851 |
| А-2 | 0.10-3.4 | 0.05 | 0.005±0.022 | 0.43±0.04 | 0.9861 |
| А-3 | 0.13-3.7 | 0.09 | 0.07±0.02 | 0.25±0.04 | 0.9613 |
| А-4 | 0.12-2.9 | 0.09 | 0.06±0.02 | 0.29±0.003 | 0.9784 |
| А-5 | 0.18-0.49 | 0.11 | 0.08±0.02 | 0.31±0.03 | 0.9850 |
| А-6 | 0.16-0.24 | 0.11 | 0.15±0.01 | 0.09±0.02 | 0.9637 |
| А-7 | 0.25-1.2 | 0.23 | 0.31±0.05 | 0.78±0.07 | 0.9766 |
| А-8 | 0.08-0.3 | 0.07 | 0.05±0.01 | 0.22±0.02 | 0.9921 |

Для гидразониевых солей ингибирование определяется строением фосфатного аниона. Для α -аминофосфонатов наибольшее влияние на ингибирующее действие оказывают радикалы при атоме фосфора, непосредственно соседствующие с аминогруппой. При использовании КЭ ингибирующее действие всех указанных соединений усиливается в кислой среде с максимумом при рН 3.5-4.0. Достигнутые в этих рабочих условиях пределы обнаружения более чем на порядок ниже полученных при использовании БуХЭ.

Таблица 8. Аналитические характеристики определения α -аминофосфонатов с помощью БуХЭ (трис-буферный раствор, pH 7.9, субстрат ИФА $1.7 \cdot 10^{-4}$ моль/л, инкубация 10 мин.)

| Ингибитор | Диапазон определяемых концентраций, мкмоль/л | ПО, мкмоль/л | $C_1 = a + b \cdot \ln(t_i/t_0)$, C_1 , мкмоль/л | | |
|-----------|----------------------------------------------|--------------|--------------------------------------------------------|-----------|--------|
| | | | a | b | r |
| Б-1 | 2.7-7.1 | 1.4 | 0.72±0.15 | 6.44±0.22 | 0.9831 |
| Б-2 | 8.1-38.8 | 3.9 | 3.0±0.87 | 51.±9 | 0.9900 |
| Б-3 | 0.4-1.3 | 0.3 | 0.20±0.02 | 1.50±0.06 | 0.9919 |
| Б-4 | 0.4-2.0 | 0.25 | 0.10±0.04 | 1.75±0.07 | 0.9894 |
| Б-5 | 0.3-2.5 | 0.2 | -0.05±0.04 | 2.05±0.06 | 0.9864 |
| Б-6 | 1.3-7.4 | 0.8 | 0.52±0.14 | 8.2±0.3 | 0.9745 |
| Б-7 | 26.8-84.4 | 19.1 | 9.55±0.48 | 115.5±1.0 | 0.9989 |
| Б-8 | 0.7-2.3 | 0.5 | 0.3±0.03 | 1.61±0.04 | 0.9898 |
| Б-9 | 0.3-2.2 | 0.2 | 0.01±0.003 | 1.76±0.01 | 0.9974 |
| Б-10 | 0.2-1.2 | 0.1 | 0.14±0.02 | 0.85±0.02 | 0.9947 |
| Б-11 | 1.1-6.1 | 0.7 | -0.06±0.07 | 7.79±0.14 | 0.9894 |
| Б-12 | 0.6-4.1 | 0.2 | 0.13±0.09 | 4.70±0.19 | 0.9560 |
| Б-13 | 0.3-3.1 | 0.2 | 0.14±0.02 | 1.46±0.02 | 0.9964 |
| Б-14 | 0.2-1.1 | 0.1 | 0.02±0.07 | 0.89±0.11 | 0.9767 |
| Б-15 | 0.08-0.8 | 0.07 | -0.03±0.05 | 0.41±0.07 | 0.9552 |
| Б-16 | 0.05-0.7 | 0.02 | -0.03±0.02 | 0.42±0.02 | 0.9792 |
| Б-17 | 0.08-0.5 | 0.03 | 0.04±0.01 | 0.25±0.01 | 0.9764 |
| Б-18 | 0.07-0.7 | 0.02 | -0.03±0.02 | 0.32±0.02 | 0.9941 |
| Б-19 | 0.1-0.9 | 0.05 | 0.09±0.01 | 0.36±0.01 | 0.9787 |

Вероятно, протонирование аминогруппы высвобождает фосфорильный ингибиторный центр. Кроме того, КЭ малочувствительна к действию ионных эффекторов, поэтому в отличие от БуХЭ не проявляется "защитный эффект" гидразониевого и аммонийного катионов.

Фосфорилированные каликсарены Б-15 - Б-19 демонстрируют практически совпадающие градуировочные графики, поэтому, возможно, их ингибирующее действие связано с процессами связывания субстрата в комплексы "гость-хозяин". В отношении щелочной фосфатазы фосфорилированные каликсарены демонстрируют слабое активирующее ($5 \cdot 10^{-7}$ - $2.2 \cdot 10^{-6}$ моль/л) и ингибирующее ($2.5 \cdot 10^{-6}$ - $4 \cdot 10^{-6}$ моль/л) действие.

Таблица 9. Аналитические характеристики определения α -аминофосфонатов с помощью КЭ (трис-буферный раствор, рН 4.0, субстрат ИФА $1.7 \cdot 10^{-4}$ моль/л, инкубация 10 мин.)

| Ингибитор | Диапазон определяемых концентраций, $C_1 \cdot 10^7$, моль/л | ПО $\cdot 10^7$, моль/л | $C_1 \cdot 10^7 = a + b \cdot \ln(t_i/t_0)$, C_1 , моль/л | | |
|-----------|---------------------------------------------------------------|--------------------------|--------------------------------------------------------------|------------|--------|
| | | | a | b | r |
| Б-1 | 0.7-3.5 | 0.4 | 0.05±0.6 | 4.07±0.11 | 0.9873 |
| Б-2 | 82.6-310 | 48.1 | 3.83±5.6 | 443.5±11 | 0.9800 |
| Б-3 | 2.8-13.8 | 1.5 | 0.86±0.09 | 6.87±0.09 | 0.9955 |
| Б-4 | 0.8-12.7 | 0.5 | -2.34±0.2 | 9.46±0.21 | 0.9939 |
| Б-5 | 2.5-25.0 | 1.8 | 0.6±0.13 | 16.0±0.17 | 0.9982 |
| Б-6 | 1.2-8.6 | 0.7 | 1.16±0.08 | 5.72±0.12 | 0.9876 |
| Б-7 | 19.6-295 | 8.0 | -15.3±3 | 233.5±5 | 0.9896 |
| Б-8 | 1.2-11.3 | 0.9 | -0.24±0.06 | 11.13±0.11 | 0.9983 |
| Б-9 | 0.5-4.3 | 0.2 | -0.01±0.04 | 2.48±0.04 | 0.9957 |
| Б-10 | 0.4-2.1 | 0.3 | 0.15±0.033 | 1.17±0.034 | 0.9948 |
| Б-11 | 4.0-11.0 | 2.1 | -0.97±0.32 | 11.31±0.04 | 0.9804 |
| Б-12 | 0.4-2.0 | 0.2 | 0.26±0.03 | 1.29±0.34 | 0.9762 |
| Б-13 | 0.4-0.8 | 0.2 | 0.15±0.02 | 0.71±0.03 | 0.9654 |
| Б-14 | 3.6-21.4 | 2.1 | 0.9±2.85 | 18.6±4.07 | 0.9630 |
| Б-15 | 1.4-8.2 | 0.9 | 0.66±0.11 | 4.09±0.1 | 0.9785 |
| Б-16 | 1.5-4.9 | 1.0 | 0.67±0.14 | 4.32±0.23 | 0.9619 |
| Б-17 | 0.6-2.0 | 0.3 | -0.36±0.03 | 6.19±0.12 | 0.9929 |
| Б-18 | 1.4-10.2 | 0.8 | -0.12±0.21 | 10.13±0.35 | 0.9645 |
| Б-19 | 0.9-4.6 | 0.3 | -0.74±0.1 | 7.12±0.26 | 0.9555 |
| Б-20 | 38.6-386 | 21.7 | -66±9 | 585±18 | 0.9867 |

Достигнутые пределы обнаружения позволяют применять ферментные тесты для контроля процессов с участием мембранных переносчиков, в технологическом контроле синтеза фосфорорганических комплексонов, в оценке чистоты антипиренов и фармацевтических препаратов.

Оценка общей загрязненности осадков сточных вод тяжелыми металлами.

Присутствие подвижных форм тяжелых металлов ограничивает возможности утилизации осадков сточных вод в агропроизводстве. Нами изучена возможность оценки общей загрязненности осадков по их ингибирующему действию на БуХЭ. Как выяснилось при моделировании загрязнения осадков известными количествами солей металлов, последующая кислотная и солевая вытяжки не позволяют полностью извлечь вносимое количество солей. По сравнению с водными растворами солей

металлов снижается чувствительность определения, в 2-10 раз увеличивается нижняя граница определяемых содержаний, причем снижение чувствительности наиболее значительно для осадков с небольшим сроком хранения, богатых органическими соединениями, способными удерживать металлы в нетоксичных комплексах.

Наблюдаемое в некоторых случаях активирующее действие водных вытяжек связано, вероятно, с соэкстракцией компонентов поглощающего комплекса и изменения буферных свойств рабочего раствора. Ацетоновые вытяжки из этих осадков проявляют обратимое ингибирующее действие, подавляемое электрохимической обработкой.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны колориметрические ферментные тесты на основе препаратов БУХЭ из сыворотки крови лошади и микробиальной КЭ, стабилизированных путем включения в твердые растворы на основе N-фталилхитазана, полиглюкина или β -декстрана, предназначенные для определения ингибиторов ферментов в водных системах. Пределы обнаружения пестицидов составляют $n \cdot (10^{-8} \div 10^{-9})$ моль/л, что позволяет детектировать присутствие загрязнителей в объектах окружающей среды на уровне ПДК. Аналитические характеристики определения обратимых и необратимых ингибиторов ферментов зависят от природы стабилизатора, субстрата и буферного раствора.
2. Электролиз в присутствии хлорида натрия позволяет повысить чувствительность определения тионовых фосфорорганических соединений и аминоксифосфонатов. Показано, что механизм "активации" состоит в окислении тиофосфатов и фосфонатов электрохимически генерированным хлором до более активных ингибиторов.
3. Присутствие обратимых ингибиторов (фториды, ионы тяжелых металлов) снижает чувствительность определения пестицидов. Подбор рабочих условий определения (состав буферных растворов, добавки N-фталилхитазана) позволяют подавить защитное действие эффлекторов.
4. Установлено, что гидразоны диалкилдитиофосфатов и α -аминоксифосфонаты являются слабыми ингибиторами ферментов вследствие взаимного связывания аминогруппы и фосфата (фосфоната). Электролиз, разрушающего связывание, приводит к

необратимому ингибирующему действию с максимумом при рН 3.5-4.0. Применение КЭ, устойчивой к действию ионных эффекторов, понижает пределы обнаружения до $n \cdot (10^{-7} \div 10^{-8})$ моль/л.

5. Разработана упрощенная методика экспресс-определения остаточных количеств фосфорорганических пестицидов в зерне и почвах без удаления органического растворителя из экстракта с пределом обнаружения пестицидов $n \cdot (10^{-1} \div 10^{-2})$ мг/кг. Изучено влияние компонентов растительной матрицы на аналитические характеристики определения пестицидов.
6. Показана возможность использования холинэстеразного теста для оценки общей загрязненности осадков сточных вод тяжелыми металлами. Наблюдаемая активация БуХЭ обусловлена изменением буферных свойств и кислотности вытяжек в процессе экстракции. Ацетоновые вытяжки из этих осадков проявляют обратимое ингибирующее действие, подавляемое электрохимической обработкой.

Основное содержание работы изложено в следующих публикациях:

1. Никольская Е.Б., Евтюгин Г.А., Искандеров Р.Р., Герасимова (Стойкова) Е.Е., Латыпова В.З. Определение присутствия фосфорорганических пестицидов в растительных продуктах с помощью сенсорных устройств на основе холинэстеразы. / Тез. докл. Межд. конф. "Сенсор-Техно-93. Сенсорные системы и компоненты." С.-Петербург, 1993.-С.278.
2. Евтюгин Г.А., Стойкова Е.Е. Повышение чувствительности ферментативного определения фосфорорганических пестицидов путем электрохимической активации пробы. / Тез. докл. IV конф. по электрохимическим методам анализа "ЭМА-94" Москва, 1994.-С.191.
3. Evtugyn G.A., Stoikova E.E., Budnikov H.C., Nikolskaya E.B. Determenation of P,N-containing organik compounds based on carboxylesterase from mold fungi. /5th Int. Symp.of Kinetics in Analytical Chemistry "КАС-95". Moscow,1995. P.45.
4. Евтюгин Г.А., Стойкова Е.Е., Искандеров Р.Р., Никольская Е.Б., Будников Г.К. Электрохимическая пробоподготовка в ферментативном определении ингибиторов холинэстеразы.//Журн.анал.химии.-1997.-Т.52.-№1.-С.6-10.

5. Евтюгин Г.А., Стойкова Е.Е., Никольская Е.Б., Будников Г.К. Влияние ионов металлов на колориметрическое определение необратимых ингибиторов холинэстеразы. // Журн. анал. химии.- 1997.-Т.52.-№2.-С.188-192.
6. Будников Г.К., Евтюгин Г.А., Никольская Е.Б., Стойкова Е.Е. Влияние макрокомпонентов на контроль следовых количеств фосфорорганических токсикантов в объектах окружающей среды. / Тез. докл. Всерос. конф. с международным участием "Химическое разоружение-96. Экология и технология". Ижевск, 1996.- С.20-21.
7. Стойкова Е.Е., Стойков И.И. Ферментативное определение гидразонов диалкилдитиофосфорных кислот и α -аминофосфонатов в водной и водно-органической средах. / Тез. докл. Молодеж. симп. По химии фосфорорганических соединений "Петербургские встречи-97". С.-Петербург, 1997.- С.20.
8. G.A.Evtugyn, E.P.Rizaeva, E.E.Stoikova, V.Z.Latipova, H.C.Budnikov The application of inhibitor biosensors in local programs of environmental monitoring./ Proc. Of NATO Advanced Research Workshop on Biosensors for the Direct Monitoring of Environmental Pollutants in Field. Smolenice, Slovakia, May 3-9, 1997.- 1997.- P.49.
9. G.A.Evtugyn, E.P.Rizaeva, E.E.Stoikova, V.Z.Latipova, H.C.Budnikov The application of cholinesterase biosensor for preliminary screening of the toxicity of waste waters.// Electroanalysis.- 1997.- V.9.- N 14.