

## Проблемы определения фосфорорганических отравляющих веществ биохимическими методами на объектах уничтожения химического оружия

© 2011. Д. С. Прокофьева, к.б.н., с.н.с., В. И. Шмурак, м.н.с., С. В. Садовников, к.х.н., с.н.с., Н. В. Гончаров, д.б.н., зав. лабораторией, Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека Федерального медико-биологического агентства, e-mail: gpech@fmbamail.ru; niigpech@rihophe.ru

Процесс уничтожения химического оружия, в том числе фосфорорганических отравляющих веществ, требует проведения непрерывного мониторинга остаточных количеств обезвреживаемых химических соединений в различных растворах и матрицах. На сегодняшний день разработано большое количество как химических, так и биохимических методик для обеспечения эффективности и безопасности процесса уничтожения. Однако процесс совершенствования существующих методик и замены одних биохимических методик на другие не прекращается. В ходе исследований влияния аналитов, продуктов их обезвреживания и посторонних примесей на результаты биохимического анализа иногда получают данные, требующие пересмотра существующих методов анализа и разработки новых, более чувствительных и специфичных.

The process of chemical weapon destruction including decommission of warfare organophosphates requires permanent monitoring of various solutions and matrices of residual quantities of the chemical compounds being destroyed. There are many chemical and biochemical methods of providing efficacy and safety of the process of destruction. Nevertheless, there is a need in improving existing technical approaches and biochemical methods. Sometimes, investigation of analytes, their neutralization derivatives and extraneous admixtures brings new data that trigger revision of the existing methods and elaboration of more sensitive and specific ones.

**Ключевые слова:** фосфорорганические отравляющие вещества, уничтожение химического оружия, биохимический анализ

**Key words:** organophosphorous toxic compounds, chemical weapon destruction, biochemical analysis

На сегодняшний день в Российской Федерации (РФ) остаются большие запасы химического оружия, главным образом фосфорорганических отравляющих веществ (ФОВ). Согласно Конвенции по химическому разоружению 1993 г. [1] (вступившей в силу в апреле 1997 г.) в РФ ведётся непрерывная работа по их обезвреживанию на объектах уничтожения химического оружия (УХО). Для предотвращения загрязнения различными ФОВ в штатных и аварийных ситуациях рабочих поверхностей технологического оборудования объектов УХО, строительных конструкций объекта, средств индивидуальной защиты персонала используют дегазирующие растворы, состав которых варьирует в зависимости от типа ФОВ и вида обрабатываемой поверхности. Для контроля эффективности процесса обезвреживания необходимо вести непрерывный мониторинг остаточных количеств ФОВ на поверхностях технологического оборудования, внутренних поверх-

ностях объекта УХО и в производственных сточных водах.

Государственная система санитарно-эпидемиологического нормирования РФ включает в себя перечень методик выполнения измерения (МВИ) ФОВ в различных средах для обеспечения контроля химических факторов при ликвидации деятельности объектов УХО [2]. Перечень МВИ можно разделить на две большие группы: химические и биохимические (табл.). Химические методики отличаются высокой специфичностью, поскольку позволяют с высокой долей вероятности определить, какой именно ФОВ находится в исследуемой пробе. Идентификация ФОВ проводится либо по индексам удерживания, либо по относительным откликам различных детекторов. Биохимические методики менее специфичны, поскольку в их основе лежит эффект ингибирования холинэстераз (ХЭ) различными ФОВ, то есть с помощью биохимического метода нельзя отве-

Таблица

Сравнительная характеристика методов определения фосфорсодержащих отравляющих веществ

Характеристики метода	Методы	
	Биохимические	Химические
Специфичность	низкая	высокая
Чувствительность	высокая	низкая
Производительность	высокая	низкая
Стоимость анализа	низкая	высокая
Скорость анализа	средняя	средняя
Высококвалифицированный персонал	нет	да
Высокопрецизионное оборудование	нет	да

тить на вопрос, какое ФОВ находится в пробе: зоман, зарин или вещество типа Vx. Ответ на этот вопрос можно получить только с помощью химического анализа данной пробы. Однако для проведения химического анализа необходимо, чтобы концентрация ФОВ в пробе была достаточно высокой, поскольку чувствительность химических методик на два-три порядка ниже чувствительности биохимических методик. Кроме того, в отличие от химических методов биохимические методы могут однозначно определить антихолинэстеразную активность пробы. При анализе смывов с рабочих поверхностей и производственных сточных вод на объектах УХО токсичность проб, в частности, их антихолинэстеразная активность выходит на первый план, поскольку исследуемую поверхность за время эксплуатации объекта могли обрабатывать различными реагентами для дегазации различных веществ, и трудно заранее предсказать, какой из продуктов деструкции окажется токсичным. Эти продукты могут оказаться соединениями с неизвестными параметрами токсичности. Следовательно, необходимо проводить скрининговый анализ проб именно биохимическими методами, которые просты в исполнении, не требуют дорогого высокопрецизионного оборудования и оценивают антихолинэстеразную активность пробы. Если по результатам биохимического анализа исследуемая проба повлияла на активность фермента, следует провести её химический анализ для установления того соединения, присутствие которого в растворе вызвало ингибирование фермента. Это необходимо для контролирования завершения процесса гидролиза ФОВ, поскольку известно, что некоторые продукты деградации ФОВ в больших концентрациях также могут вызвать ингибирование ХЭ [3], равно как и некоторые примеси [4, 5]. В число основных примесей входят компоненты дегазационных растворов (сульфонол, перекись водорода, гипохлорит натрия, моноэ-

таноламин), минеральные соли и масла, органические растворители. Однако сопоставление данных химического и биохимического анализа не предусмотрено на объектах УХО и возможно только в рамках научных исследований.

До недавнего времени для биохимического определения уровня загрязнения зоманом, заринном и веществом типа Vx поверхностей технологического оборудования использовали аттестованные методики выполнения измерений: МВИ № 031-04-217-06, МВИ № 031-04-176-05 и МВИ № 031-04-157-05 соответственно. Все три методики основаны на методе Элмана [6], принцип которого заключается в определении ферментативной активности ацетилхолинэстеразы (АХЭ) по наработке продукта ферментативной реакции тиохолина, образующегося в ходе гидролиза субстрата ацетилтиохолина. Количество тиохолина определяют фотометрически по окраске, образующейся при реакции тиол-дисульфидного обмена тиохолина и 5,5'-дитио-бис(2-нитробензойной кислоты).

Химические соединения, влияющие на ход определения степени ингибирования АХЭ вследствие контакта фермента с ФОВ по методу Элмана, можно условно разделить на две группы: вещества, влияющие на активность самого фермента, и вещества, взаимодействующие с остальными компонентами реакционной смеси. К первой группе относятся некоторые продукты гидролиза ФОВ, а также вещества, вызывающие денатурацию белка и как следствие потерю его биохимических свойств. Ко второй группе относятся вещества, вызывающие ускоренный гидролиз субстрата (ложноотрицательный результат) или реагирующие с реагентом Элмана с повышением или понижением образования жёлтого аниона (восстановители или окислители, обуславливающие ложноотрицательный или ложноположительный результат соответственно). Использование

дополнительных контрольных проб при анализе образцов по методу Элмана с возможным содержанием в них вышеперечисленных веществ может помочь только в случае восстановителей, то есть позволяет устранять только ложноотрицательные результаты [7]. Если в исследуемой пробе находятся окислители, то постановка дополнительных контрольных проб в лучшем случае будет свидетельствовать об их наличии, но не сможет помочь количественному определению ФОВ в образце.

Во всех трёх аттестованных МВИ практически отсутствует описание процедуры устранения воздействия возможных примесей на результат анализа. Для вещества типа Vx прописан способ устранения влияния окислителей, определение которых проводят с помощью йодкрахмальной бумаги, использование которой не является количественным методом. Кроме того, чувствительность данного метода явно недостаточна и зависит от субъективного восприятия. В МВИ для зомана и зарина подобный пункт об устранении влияния окислителей по непонятным причинам отсутствует вовсе. Кроме того, в текстах трёх МВИ нет ни слова об устранении влияния других примесей. Ранее нами было показано, что ложноположительное воздействие перекиси водорода на результаты анализа по методу Элмана начинается с концентрации 0,0001% [4, 8]. Принимая во внимание тот факт, что концентрация перекиси водорода в дегазирующих растворах должна быть не ниже 1%, такое влияние перекиси делает метод Элмана малоприменимым для применения в упомянутых выше условиях, даже если учесть проводимую обработку поверхностей оборудования водой. В качестве альтернативы для определения уровня загрязнения ФОВ поверхности технологического оборудования нами был предложен метод Хестрина, обладающий достаточной чувствительностью и протяжённостью линейного диапазона для проведения анализа. В методе Хестрина [9] используется принципиально иной способ визуализации реакции, позволяющий существенно снизить влияние на результат анализа сильных окислителей, восстановителей, тиолов и дисульфидов [5]. Метод Хестрина основан на определении неизрасходованного в ходе ферментативного гидролиза ацетилхолина с помощью двух последовательных химических реакций. При взаимодействии негидролизованного ацетилхолинэстеразой ацетилхолина с щелочным раствором гидроксиламин гидрохлорида образуется ацетилгидроксамовая кислота, ко-

торая в кислом растворе даёт с хлорным железом цветную реакцию.

В Федеральном реестре аттестованных методик выполнения измерений содержания отравляющих веществ (ОВ) и токсичных химикатов, указанных в списках Конвенции о запрещении химического оружия [2], отсутствуют биохимические методики измерения массовой концентрации вещества типа Vx, зарина и зомана в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования. Единственной утверждённой методикой по измерению массовой концентрации ФОВ в воде водных объектов является МУК 4.1.66-2004, предложенная сборником инструктивно-методических документов по проблеме уничтожения химического оружия [10]. Методика разработана и предназначена для оценки соответствия гигиеническому нормативу содержания вещества типа Vx в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования при проведении санитарно-химического контроля в районах расположения объектов уничтожения химического оружия. Данная биохимическая методика является визуально-колориметрическим методом, основанным на реакции ферментативного гидролиза ацетилхолина с образованием уксусной кислоты и изменением цвета реакционной смеси в присутствии индикатора – бромтимолового синего. Визуальная индикация привносит значительную долю субъективизма в оценку активности фермента, что обуславливает большую ошибку методики. Ещё один недостаток МВИ заключается в строгом контроле pH пробы, от которого напрямую зависит время достижения эталонной окраски, поэтому данный метод имеет весьма плохие метрологические характеристики: предел повторяемости составляет 39%, а критический диапазон – 48%. Срок действия свидетельства об аттестации методики истёк в июне 2009 г., таким образом, на сегодняшний день не существует ни одной аттестованной методики определения ФОВ в воде водных объектов. Учитывая перечисленные недостатки МУК 4.1.66-2004, основу новой методики должен составить другой метод. На наш взгляд, для этого подходит метод Элмана, поскольку в воде водоёмов, как правило, отсутствуют соединения, способные оказывать влияние на результаты, получаемые биохимическими методами. Если в исследуемой пробе нет посторонних примесей, использование метода Элмана является более предпочтительным, поскольку он отличается бы-

стротой и простотой анализа по сравнению с методом Хестрина.

Традиционные биохимические методы позволяют в короткие сроки провести анализ лишь ограниченного количества проб. С появлением в конце прошлого века новой модификации спектрофотометров, способных измерять абсорбцию в лунках 96-луночных планшетов, а также многоканальных дозаторов переменного объема, стало возможным осуществлять определение активности ферментов планшетными модификациями биохимических методов, что позволило сократить количество используемого оборудования, снизить стоимость анализа, снизить объем тестируемых проб, а также повысить производительность методов.

Разработка и аттестация новых методик выполнения измерений (МВИ) позволит повысить производительность биохимического анализа и сократить количество ложноположительных и ложноотрицательных результатов, получаемых биохимическими методами при анализе проб сложного состава, в частности проб с объектов УХО. В рамках составной части НИР «Модуль Ч» совместно с ОАО ФНТЦ «Инверсия» нами были разработаны и аттестованы МВИ по определению вещества типа Vx, зарина и зомана в смывах с поверхностей технологического оборудования, основанные на методе Хестрина. Методики внесены в отдельный раздел «1-ХО» Федерального реестра методик измерений.

Указанные методики прошли процедуры метрологической экспертизы и аттестации в аккредитованном Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии органе – ОАО ФНТЦ «Инверсия», что подтверждается тремя свидетельствами об аттестации и внесении методик в подраздел «1-ХО» Федерального реестра методик выполнения измерений.

### Литература

1. Конвенция о запрещении разработки, производства, накопления и применения химического оружия и об его уничтожении, русская версия // Технический

Секретариат Организации по Запрещению Химического Оружия. 2005. 181 с.

2. Аттестованные методики выполнения измерений содержания отравляющих веществ, токсичных химикатов, указанных в списках Конвенции о запрещении химического оружия // Отдельный раздел «1-ХО» федерального реестра МВИ. 2007. 241 с.

3. Munro N.B., Talmage S.S., Griffin G.D., Waters L.C., Watson A.P., King J.F., Hauschild V. The sources, fate, and toxicity of chemical warfare agent degradation products // Environ Health Perspect. 1999. V. 107. № 12. P. 933–974.

4. Prokofieva D.S., Voitenko N.G., Gustyleva L.K., Babakov V.N., Savelieva E.I., Jenkins R.O., Goncharov N.V. Microplate spectroscopic methods for determination of the organophosphate soman // Journal of Environmental Monitoring. 2010. V. 12. P. 1349–1354.

5. Прокофьева Д.С. Модификация биохимических методов оценки содержания фосфорорганических соединений в пробах сложного состава: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Пущино: Институт биофизики клетки РАН. 2010. 24 с.

6. Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V.Jr., Featherstone R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity // Biochem. Pharmacol. 1961. V. 7. P. 88–95.

7. Прокофьева Д.С., Густылева Л.К., Курдюков И.Д., Гончаров Н.В. Способы устранения ложных результатов биохимического определения количества фосфорорганических отравляющих веществ в пробах сложного состава // Научно-технические аспекты обеспечения безопасности при уничтожении, хранении и транспортировке химического оружия: Тезисы докладов 5-й научно-практической конференции. М. 2010. С. 160–162.

8. Прокофьева Д.С. Разработка и сравнительный анализ микропланшетных биохимических методов определения фосфорорганических отравляющих веществ на примере зомана // Токсикологический вестник. 2009. № 6. С. 39–46.

9. Hestrin S. The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine, and its analytical application // J. Biol. Chem. 1949. V. 180. № 1. P. 249–261.

10. Уйба В.В., Киселёв М.Ф., Романов В.В., Рогожников В.А., Рембовский В.Р., Филатов Б.Н. Сборник инструктивно-методических документов по проблеме уничтожения химического оружия. Часть II: Фосфорорганические отравляющие вещества. Т. III. М. 2004. 212 с.