

2. Силкин К. Ю. Геоинформационная система Golden Software Surfer 8: Учебно-методическое пособие для вузов. Воронеж: Изд. Воронежского университета, 2008. 66 с.

3. ДеМаре Майкл Н. Географические информационные системы. Основы: Пер. с англ. М: «Дата+», 1999. 287 с.

4. Сердюцкая Л. Ф., Яцишин А. В. Техногенная экология: Математико-картографическое моделирование М: Книжный дом «Либроком». 2009. 232 с.

5. Ашихмина Т. Я. Комплексный экологический мониторинг объектов хранения и уничтожения химического оружия. Киров: Вятка, 2002. 544 с.

УДК 579.222

Определение ди-(2-этилгексил)фталата в поливинилхлоридных пластиках масс-спектрометрическим и биосенсорным методами

© 2015. Т. Н. Кувичкина¹, к.б.н., н.с., Д. В. Будина², аспирант, А. С. Олькова², к.б.н., доцент, А. Н. Решетиллов¹, д.х.н., зав. лабораторией, Т. Я. Ашихмина^{2,3}, д.т.н., зав. кафедрой, зав. лабораторией,

¹ Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН,

² Вятский государственный гуманитарный университет,

³ Институт биологии Коми научного центра УрО РАН,
e-mail: kuv@ibpm.puschino.ru

Для изготовления поливинилхлоридных (ПВХ) пластиков в качестве пластификатора используют диэфиры орто-фталевой кислоты, например, ди-(2-этилгексил)фталат (ДЭГФ). Ранее нами было показано, что пластификатор может мигрировать из изделий в водные контактирующие среды и угнетать жизнеспособность и плодовитость *Daphnia magna*. В данной работе определяли содержание ДЭГФ масс-спектрометрическим методом и разрабатывали биосенсорный амперометрический метод в качестве недорогой альтернативы. Анализировали водные экстракты из трёх образцов пластиков - высокопластифицированного, среднепластифицированного и низкопластифицированного. Масс-спектрометрическим методом анализа в экстрактах выявлено наличие ди-(2-этилгексил)фталата. При реализации амперометрического подхода биорецептором служили иммобилизованные актинобактерии *Rhodococcus wratislaviensis* VKM Ac-2631 D. Была построена градуировочная зависимость ответов биосенсора от концентрации динатриевой соли орто-фталевой кислоты. В течение 3 суток ответ сенсора оставался стабильным. Разработанный метод позволил количественно определить долю пластификатора, мигрировавшего из образцов.

For the production of polyvinylchloride (PVC) plasticized using a plasticizer as diesters of ortho-phthalic acid such as di(2-ethylhexyl)phthalate. We have previously shown that the plasticizer can migrate from the product in an aqueous medium and contacting inhibit the viability and fertility of *Daphnia magna*. In this paper, the content of di(2-ethylhexyl)phthalate is determined by mass-spectrometry, and develop a biosensor an amperometric method as an inexpensive alternative. Aqueous extracts were analyzed three samples of flexible PVC. Mass-spectrometry analysis of the extracts revealed the presence of di-(2-ethylhexyl)phthalate. The amperometric approach bioreceptors were immobilized actinobacteria *Rhodococcus wratislaviensis* VKM Ac-2631 D. It was built the calibration dependence on the concentration of the responses of the biosensor disodium salt of ortho-phthalic acid. Within 3 days of the sensor response was stable. The developed method has allowed to quantify the proportion of plasticizer to migrate from samples.

Ключевые слова: поливинилхлоридные пластикаты, ди-(2-этилгексил)фталат, масс-спектрометрия, орто-фталевая кислота, *Rhodococcus wratislaviensis*, амперометрический биосенсор

Keywords: polyvinylchloride compound, di-(2-ethylhexyl)phthalate, mass-spectrometry, ortho-phthalic acid, *Rhodococcus wratislaviensis*, amperometric biosensor.

Пластикаты представляют собой мягкие продукты на основе поливинилхлорида (ПВХ), которые обладают высокой эластичностью в широком диапазоне температур. ПВХ пластикаты используются в качестве изоля-

ционных материалов, защитных оболочек кабелей, химически стойких прокладочных или герметизирующих материалов, отделочных материалов, а также для изготовления водопроводных труб, детских игрушек, тары для

пищевых продуктов и др. Пластификаторами для них служат диэфиры орто-фталевой кислоты. Наиболее целесообразным представителем этого класса является ди-(2-этилгексил) фталат (ДЭГФ), поскольку он обладает лучшими пластифицирующими свойствами и оптимален по цене [1]. Содержание ДЭГФ в ПВХ достигает 20–40% по массе. Данный компонент в процессе полимеризации не подвергается химическому связыванию с молекулами полимера, а удерживается внутри образовавшегося пластика вандерваальсовыми электростатическими силами. Поэтому при определённых условиях пластификатор может мигрировать из пластика в окружающую среду. В этом случае даже небольшие дозы фталатов, попадающие в организм человека, могут приводить к изменению гормонального фона, нарушению работы печени и почек [2]. В объектах окружающей среды фталаты определяют методами газовой хроматографии с пламенно-ионизационным, электронно-захватным или масс-спектрометрическим детекторами, а также методом высокоэффективной жидкостной хроматографии [3]. Перечисленные физико-химические методы анализа позволяют с высокой точностью и селективностью определять орто-фталевую кислоту и её фталаты, однако эти методы требуют использования дорогостоящего оборудования. В качестве альтернативы может быть использован биосенсорный подход. Этим методом отмечена принципиальная возможность использования показателя дыхательной активности микроорганизмов в качестве тест-реакции при биотестировании продукции бытового назначения [4].

Деструкция ДЭГФ может осуществляться как в процессе гидролитического, так и микробного разложения. Метаболические пути разложения ДЭГФ сочетают два процесса – первичная биodeградация ДЭГФ до моноэфира фталата и последующее его разложение до орто-фталевой кислоты, являющейся ключевым интермедиатом. Штамм актинобактерий *Rhodococcus wratislaviensis* ВКМ Ас-2631Д осуществляет разложение орто-фталевой кислоты (до 8 г/л 46 ммоль/л) через 3,4-дигидроксифталевую кислоту [5]. Поскольку в молекуле 3,4-дигидроксифталевой кислоты появляется два атома кислорода, можно предположить, что микробное ферментативное окисление происходит с потреблением молекулярного кислорода. Для изучения этого процесса можно использовать биосенсорный, а именно амперометрический метод.

В работе показано, что водные экстракты из ПВХ пластикатов угнетают трофическую активность *Daphnia magna*, их способность к размножению и повышают смертность особей [6].

Цель данной работы – определение пластификатора ди-(2-этилгексил)фталата в ПВХ пластикатах масс-спектрометрическим и биосенсорным амперометрическим методами, используя в качестве биорецептора иммобилизованные клетки штамма актинобактерий *Rhodococcus wratislaviensis* ВКМ Ас-2631 Д.

Методика приготовления пластифицированных ПВХ образцов. Образцы пластифицированного ПВХ готовились путём поэтапного смешивания семи компонентов (табл. 1) в лабораторных условиях на диссольвере. Дис-

Таблица 1

Состав ПВХ-пластикатов

Наименование компонента	Класс опасности	Доля компонента в образце, %		
		НПЛ	СПЛ	ВПЛ
ПВХ-полимер эмульсионный пастообразующий, K=70*	3	–	62	55
ПВХ-полимер микросуспензионный пастообразующий, K=70*	3	57	–	–
ПВХ-полимер суспензионный экстендер	3	10	–	–
Пластификатор ДЭГФ	2	27	34	39
Регулятор вязкости (смесь непредельных углеводов)	3	2,5	2,5	1,6
Эпоксидированное растительное масло	–	1,5	1,2	2,8
Комбинированная смазка (смесь сложноэфирных соединений)	–	1	0,5	0,7
Mg-Zn-термостабилизатор	–	0,8	0,5	0,6
Неорганические железистые пигменты, двуокись титана, хромофталы	2	0,2	0,3	0,3

Примечание: * – K – константа Финкентчера, характеризующая молекулярную массу полимера; ВПЛ – высокопластифицированный образец, СПЛ – среднепластифицированный образец, НПЛ – низкопластифицированный образец.

сольвер предназначен для диспергирования сухих компонентов в жидких средах для получения смесей с высоким уровнем дисперсии. При этом контролировались следующие параметры: порядок ввода компонентов, влажность рабочей зоны, температура смеси, время смешивания, условная вязкость полученной пасты.

Приготовленные для исследования образцы ПВХ-пластиков принципиально отличались ПВХ-полимерной основой и количеством пластификатора ДЭГФ, от доли которого зависит эластичность изделий. Из высокопластифицированного образца (ВПЛ) изготавливают полужёсткие изделия, из среднепластифицированного (СПЛ) – среднежёсткие, из низкопластифицированного (НПЛ) – мягкие. Для определения степени токсичности изготовленных образцов их измельчали и готовили водные вытяжки. Соблюдалось соотношение твёрдой и жидкой фаз 1:10, что рекомендовано аттестованными методиками биотестирования для исследования твёрдых отходов [7–10]. Одновременно моделировали и изучали воздействие экстрактов, полученных холодным (20 °С) и горячим способами (70 °С) на гидробактерии [6]. В качестве контроля, а также экстрагирующей жидкости использовали дистиллированную воду.

Масс-спектрометрия. Анализ водных вытяжек НПЛ, СПЛ, ВПЛ был сделан на масс-спектрометре LCQ Advantage MAX («Thermo Finnigan»). Измерения выполняли, используя одноканальный шприцевой насос для прямой инфузии образца в область ионизации. Условия проведения масс-спектрометрии: химическая ионизация при атмосферном давлении (APCI). Условия работы источника ионов: скорость высушивающего газа 65 мл/мин, температура капилляра 170 °С. Нормализованная энергия столкновений 20–40%. Сбор и обработку масс-спектрометрических данных делали с помощью программного обеспечения Xcalibur, проводили детекцию положительных ионов. Масс-спектры ионов получали, используя в качестве ионов-предшественников протонированные молекулы [M+H]⁺.

Методика подготовки биорецептора для биосенсорного анализа. В работе использовали штамм актинобактерий *Rhodococcus wratislaviensis* ВКМ Ас-2631 Д, хранящийся во Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ). В качестве субстрата использовали динатриевую соль орто-фталевой кислоты. Штамм поддерживали на агаризован-

ной минеральной среде с орто-фталатом в качестве источника углерода. Затем его выращивали на глюкозо-картофельном агаре в течение 4 суток. Выросшие клетки штамма смывали 50 ммоль/л калий-фосфатным буфером (рН 7,5). Полученную суспензию центрифугировали при 10000 g в течение 3 мин, дважды промывали тем же буфером. Клетки ресуспендировали в том же буфере и иммобилизовали на носителе. Иммобилизацию клеток штамма осуществляли методом физической адсорбции. Для этого клеточную суспензию, содержащую 10 мкл соответствующего калий-фосфатного буфера с 2 мг сырой биомассы, наносили на полоску носителя хроматографическую бумагу GF/A, формируя пятно диаметром 5 мм. Пятно подсушивали при комнатной температуре в течение 20 мин. Биорецептор с иммобилизованными клетками (ИМК) фиксировали на измерительной поверхности кислородного электрода типа Кларка (ООО «Кронас», Россия) с помощью нейлоновой сетки.

Условия измерений. Измерения проводили в открытой кювете объёмом 2 мл с 50 ммоль/л калий-фосфатным буфером (рН 7,5), насыщенным кислородом при комнатной температуре. Регистрируемым параметром являлась максимальная скорость изменения выходного сигнала dI/dt (нА/с), связанная пропорциональной зависимостью со скоростью изменения концентрации потреблённого кислорода в приэлектродном пространстве. После установления постоянного уровня тока в кювету микропипеткой вводили 100 мкл пробы субстрата. Между каждыми измерениями троекратно промывали кювету и электрод буферным раствором.

Результаты и их обсуждение

Масс-спектрометрические исследования. Образец ВПЛ отличался от образцов СПЛ и НПЛ отсутствием примесей и образованием одного молекулярного иона (391). МС/МС спектр (391) данного молекулярного иона давал серию фрагментов с массами 149, 167, 261 и 279, что хорошо согласуется со структурой ДЭГФ. Наличие фрагмента 261 может указывать в ВПЛ на разветвление алкильной цепи. В образцах СПЛ и НПЛ кроме ДЭГФ присутствует ион с массой 163, причём в НПЛ его в 2 раза больше, чем в образце СПЛ. Снят его МС/МС спектр, указывающий на наличие бензильного, возможно, и бензоильного производного. На рисунках 1 и 2 приведены масс-спектры ВПЛ и НПЛ образцов.

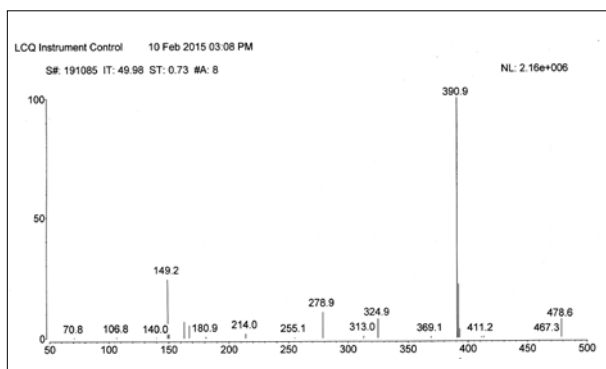


Рис. 1. Масс-спектр образца ВПЛ

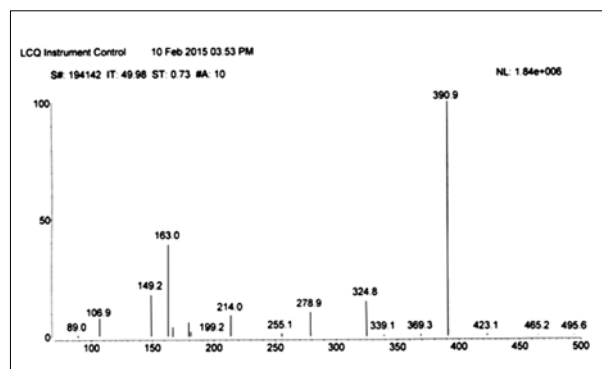


Рис. 2. Масс-спектр образца НПЛ

Таблица 2

Амперометрический анализ водных экстрактов из ПВХ пластикатов

№ п/п	Варианты опыта / доля ди(2-этилгексил)фталата в образце, %	Ответы биосенсора (нА/мин) при различной температуре экстракции пробы	
		20 °С	70 °С
1	Низкопластифицированный образец / 27	0,17±0,004	0,31±0,004
2	Среднепластифицированный образец / 34	0,27±0,009	0,43±0,005
3	Высокопластифицированный образец / 39	0,18±0,006	0,24±0,007
4	Орто-фталевая кислота*	0,24±0,004	2,10±0,04

Примечание: * – раствор орто-фталевой кислоты (1 мг/дм³) использовался для сравнения и калибровки.

Биосенсорный (амперометрический) метод. Для изучения взаимосвязи концентраций орто-фталата натрия от потребления кислорода концентрации субстрата изменяли от 0,5 до 5,0 ммоль/л. На рисунке 3 представлена градуировочная зависимость ответа биосенсора от концентрации орто-фталата натрия.

Ответы сенсора увеличивались по мере повышения концентрации орто-фталата натрия. Операционная стабильность является одной из важнейших характеристик биосенсора, для её

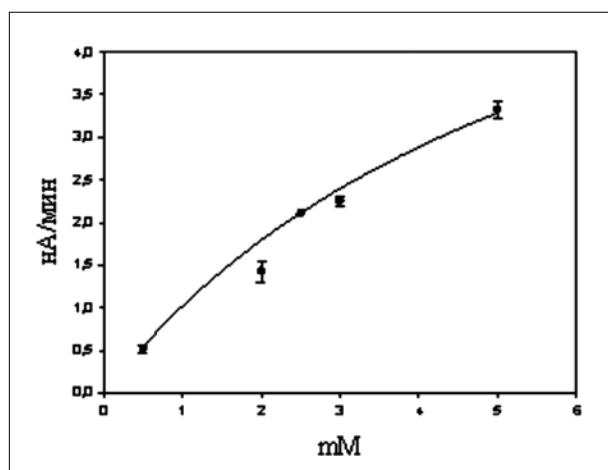


Рис. 3. Градуировочная зависимость ответов биосенсора от концентрации динатриевой соли орто-фталевой кислоты

определения проводили 5 последовательных измерений отклика биосенсора на введение 3 ммоль/л орто-фталата. Получено среднее значение ответов сенсора 2,1 нА/мин (относительное стандартное отклонение составило 1,4 %, что является хорошим показателем для амперометрических сенсоров с иммобилизованными клетками микроорганизмов). Для выявления долговременной стабильности полученного биорецептора проводили измерения ответа сенсора на одно и то же количество орто-фталата (3 mM). В течение 3 суток ответ сенсора оставался стабильным.

Как показано масс-спектрометрически (рис. 1, 2), имеет место экстракция пластификатора ДЭГФ в водные экстракты. В таблице 2 приведены ответы биосенсора на введение в кювету аликвоты ВПЛ, СПЛ, НПЛ образцов.

По данным таблицы 2 следует, что ответы биосенсора на введение в кювету аликвоты образцов на порядок ниже по сравнению с ответами орто-фталевой кислоты при 70 °С. Это согласуется с данными о скорости деградации ДЭГФ, которая меньше скорости деградации орто-фталевой кислоты [11]. Различия в деградации фталатов, вероятно, обусловлено стерическим эффектом боковой цепи эфира, который тормозит связывание микробных гидролитических ферментов фталатами, и по-

этому ингибирует процесс их гидролиза. Растворимость в воде ди-(2-этилгексил)фталата составляет 0,023–100 мг/л [2].

Из таблицы 2 видно, что для всех исследуемых вариантов, полученных при 70 °С, ответы биосенсора выше по сравнению с вариантами экстрактов, полученных при 20 °С. При этом водный экстракт из высокопластифицированного образца, приготовленный как холодным, так и горячим способами, дал почти соизмеримые при 20 °С и более низкие значения ответов по сравнению со средне- и низкопластифицированными образцами при 70 °С. Это согласуется с данными, полученными при изучении влияния водных экстрактов на гидробионтов инфузории *Paramecium caudatum*, *Ceriodaphnia affinis*, *Daphnia magna* [6]. Вероятно, это объясняется тем, что высокопластифицированные пластикаты являются более термостабильными по сравнению с их средне- и низкопластифицированными образцами. Контакт полимерных соединений с холодной и горячей водой в быту распространен. В то же время многие полимеры не рекомендуется использовать для приготовления и хранения горячих продуктов и жидкостей. В нашем эксперименте показано, что высокая температура является фактором увеличения ответа биосенсора на содержание ДЭГФ в ПВХ образцах, то есть большей экстракции ДЭГФ в СПЛ и НПЛ. Вероятно, это связано с возрастанием скорости физико-химических процессов в полимерных соединениях при повышении температуры и, как следствие, миграцией некоторых компонентов в виде пластификаторов из ПВХ в раствор.

Заключение

Масс-спектрометрическим методом доказано присутствие пластификатора ди-(2-этилгексил)фталата в водных экстрактах из ПВХ пластикатов. Получены ответы микробного биосенсора на основе штамма актинобактерий *Rhodococcus wratislaviensis* ВКМ Ас-2631 Д на водные экстракты пластикатов. Биосенсорным амперометрическим методом установлено, что повышение температуры создает условия для экстракции из пластикатов большего количества пластификатора.

Авторы выражают благодарность Б. П. Баскунову за снятие и интерпретацию масс-спектров.

Литература

1. Sharpe M. Phthalates: a ban too far // J. Environmental Monitoring. 2000. № 1. P. 4–7.
2. Furtmann K. Phthalate in der aquatischen Umwelt. Dusseldorf: Landesamt fur Wasserund Abfall Nordrhein-Westfalen. LWA-Materialien. 1993. № 6. 177 p.
3. Барам Г.И., Азарова И.Н., Горшков А.Г., Верещагин А.Л., Ланг Б., Кирюхина Е.Д. Определение бис-(2-этилгексил)фталата в воде методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с прямым концентрированием на хроматографической колонке // Ж. аналит. химии. 2000. Т. 55. № 8. С. 834–839.
4. Понаморёва О.Н., Чепкова И.Ф., Ануфриев М.А., Алферов В.А., Щеглова В.А., Музафаров Е.Н. Микробный биосенсор как инструмент биотестирования: оценка токсичности товаров народного потребления // Вестник биотехнологии. 2011. Т. 7. № 2. С. 17–23.
5. Егорова Д.О., Корсакова Е.С., Демаков В.А., Плотникова Е.Г. Деструкция ароматических углеводородов штаммом *Rhodococcus wratislaviensis* КТ112-7, выделенным из отходов соледобывающего предприятия // Прикладная биохим. и микробиол. 2013. Т. 49. № 3. С. 267–278.
6. Олькова А.С., Будина Д.В., Ярмоленко А.С. Оценка токсичности поливинилхлоридных пластикатов методами биотестирования // Токсикологический вестник. 2015. № 5 (134). С. 46–51.
7. ФР.1.39.2007.03221. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости цериодафний. М.: Акварос, 2007.
8. ФР.1.39.2007.03222. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости дафний. М.: Акварос, 2007.
9. ФР.1.31.2005.01882 (ред. 2010). Методика определения токсичности проб почв, донных отложений и осадков сточных вод экспресс-методом с применением прибора «Биотестер». С.-Пб.: ООО «СПЕКТР-М»; 2010.
10. ПНД ФТ 14.1:2:3:4.11-04; 16.1:2:3:3.8-04. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению интенсивности бактериальной биолюминесценции тест-системой «Эколюм». 2010.
11. Chang B.V., Yang C.M., Cheng C.H., Yuan S.Y. Biodegradation of phthalate esters by two bacteria strains // Chemosphere. 2004. V. 55. P. 533–538.
12. Гигиенические нормативы ГН 2.1.5.1315-07 «Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования». Дополнения и изменения №1 к ГН 2.1.5.1315-03.