

УДК 623.459.8.006.014+574

Пути совершенствования методического обеспечения производственного экологического мониторинга на объектах по уничтожению химического оружия

А. М. Антохин, Э. Т. Гайнуллина, К. В. Кондратьев, С. И. 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

Объекты по уничтожению химического оружия (ХО) относятся к категории опасных производственных объектов. На этих объектах, где хранятся, транспортируются, перерабатываются и уничтожаются высокотоксичные вещества, должны соблюдаться особые требования по обеспечению безопасности работ. В связи с тем, что не исключается возможность поступления в воздух рабочей зоны вредных веществ, согласно общим санитарно-гигиеническим требованиям [1], на объектах по уничтожению ХО должен быть обеспечен непрерывный контроль с сигнализацией о превышении предельно допустимой концентрации (ПДК). Кроме того, ряд специальных нормативных документов [2, 3] предусматривает проведение аналитического контроля за содержанием токсичных химикатов в пределах санитарно-защитной зоны и зоны защитных мероприятий. Для выполнения требований в рамках действующей нормативной документации на объектах по уничтожению ХО организуется и функционирует система производственного экологического мониторинга, представляющая собой комплексную систему слежения, прогноза и оценки состояния окружающей среды и предупреждения о возникающих критических ситуациях, опасных для жизни и здоровья людей [4].

В круг задач, решаемых с помощью данной системы мониторинга, входят

— обеспечение санитарно-гигиенических норм труда рабочего персонала объекта, контроль воздуха в рабочей и промышленной зонах на уровне ПДК_{р.з.};

— контроль предельно допустимых концентраций отравляющих веществ и продуктов их деструкции в воздухе санитарно-защитной зоны и зоны защитных мероприятий с целью оценки соответствия объекта нормативным требованиям (на уровне норматива для населенных мест — ПДК_{н.м.});

— оценка воздействия объекта на окружающую среду по результатам определения продуктов деструк-

ции отравляющих веществ и общепромышленных загрязняющих веществ, поступающих в окружающую среду, предупреждение о превышении предельно допустимых выбросов (ПДВ).

Решение указанных задач требует проведения химико-аналитического контроля, являющегося основой мониторинга. Система химико-аналитического контроля обеспечивает определение отравляющих веществ, токсичных продуктов их деструкции, а также общепромышленных загрязнителей в контролируемых зонах — в рабочей зоне, на территориях промышленной зоны, санитарно-защитной зоны и зоны защитных мероприятий.

Аналитический контроль токсичных химикатов на уровне санитарно-гигиенических нормативов осуществляется непрерывным и периодическим способами. Непрерывный способ реализуется посредством аналитических приборов, он обеспечивает контроль токсичных химикатов на уровне ПДК в воздухе рабочей зоны и в вентиляционных выбросах. С помощью периодического способа осуществляется контроль воздуха в рабочей и промышленной зонах, а также количественное определение токсичных химикатов и других токсичных загрязнителей на территориях санитарно-защитной зоны и зоны защитных мероприятий. Периодический способ реализуется путем регламентированного отбора проб с последующим их анализом в химико-аналитической лаборатории.

Наиболее сложной при создании систем промышленного экологического мониторинга на объектах по уничтожению фосфорорганических отравляющих веществ представляется задача контроля их содержания на уровне санитарно-гигиенических нормативов. Это связано с тем, что значения ПДК для отравляющих веществ лежат на очень низком уровне, приближающемся к пределу чувствительности современных аналитических методов (табл. 1).

В практике анализа для определения веществ в

Таблица 1

Санитарно-гигиенические нормативы для фосфорорганических отравляющих веществ [1]

Отравляющее вещество	ПДК в воздухе рабочей зоны, мг/м ³	ПДК (ОБУВ) в атмосферном воздухе населенных мест, мг/м ³	ПДК в воде водоемов, мг/л
Зарин	$2 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^{-7}$	$5 \cdot 10^{-5}$
Зоман	$1 \cdot 10^{-5}$	$5 \cdot 10^{-7}$	$5 \cdot 10^{-6}$
Вещество типа Vx	$5 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-8}$	$2 \cdot 10^{-6}$

таких малых количествах используют хроматографический, хромато-масс-спектрометрический и биохимический методы. Однако даже в этом случае возникает необходимость в специальных процедурах пробоподготовки и концентрирования.

Следует отметить, что в настоящее время отсутствуют достаточно обоснованные научно-методические подходы к созданию сенсорного устройства, способного определять контролируемые соединения в воздухе санитарно-защитной зоны и зоны защитных мероприятий на уровне ПДК в непрерывном режиме. Актуальной задачей остается поиск направлений повышения чувствительности аналитических методов.

Еще одной достаточно сложной задачей является повышение экспрессности анализа и достоверности его результатов. Согласно ГОСТ 12.1.005-88 [2], в течение рабочей смены и (или) на отдельных этапах технологического процесса на каждом рабочем месте должно быть последовательно отобрано не менее трех проб воздуха. Учитывая общее число рабочих мест на объектах по уничтожению ХО, можно заключить, что количество проб будет значительным. Существующее методическое обеспечение количественного анализа проб, базирующееся в основном на хроматографическом и хромато-масс-спектрометрическом методах, сопряжено со следующими недостатками. Прежде всего, это необходимость проведения достаточно сложной процедуры пробоподготовки, включающей концентрирование целевого вещества, что вызывает затруднения на последующей стадии анализа при наличии большого количества мешающих примесей. Кроме того, это большая продолжительность одного цикла анализа (от 40 мин до 1 ч). Следовательно, при существующей организации химико-аналитического контроля трудно получить результаты анализа в режиме реального времени, что приводит к значительному снижению их достоверности.

Одно из направлений усовершенствования методического подхода к анализу высокотоксичных веществ связано с наиболее рациональной организацией химико-аналитического контроля. На действующих объектах по уничтожению ХО система производственного экологического мониторинга строится по двухуровневому принципу: сначала проводится анализ по маркерам (нижний уровень), а затем в случае превышения фонового уровня загрязнения — количественное определение соединений, соответствующих данному маркеру (верхний уровень). Для ведения мониторинга на нижнем уровне целесообразно использование экспресс-методик качественного химического анализа, позволяющих обнаруживать наличие типичных маркеров в объектах окружающей среды с чувствительностью не ниже заданного предела. В случае отрицательных результатов предварительного анализа делается вывод об отсутствии целевых веществ в пробе. Если качественный анализ показал наличие контролируемых соединений, проба отправляется на количественный анализ.

Соотнесение требований к чувствительности и времени аналитического отклика методов определения высокотоксичных веществ и возможностей существующих методов позволяет сделать заключение о перспективности решения задачи совершенствования методического обеспечения аналитического контроля

на объектах по уничтожению фосфорорганических отравляющих веществ в рамках биохимического метода. Обоснованность такого подхода следует из механизма токсического действия фосфорорганических отравляющих веществ, заключающегося в подавлении биокаталитической активности синаптической ацетилхолинэстеразы к медиатору ацетилхолину. В результате ингибирования ацетилхолинэстеразы нервный импульс через синаптическую щель от пресинаптической мембраны к постсинаптической мембране нервных клеток (или от мембраны нервной клетки к скелетным мышцам) не прерывается, наступает нервное перенапряжение, что и приводит к летальному исходу. Высокая скорость ингибирования ацетилхолинэстеразы фосфорорганическими отравляющими веществами (так, константа скорости ингибирования холинэстеразы крови человека *O*-изопропилметилфторфосфонатом составляет $22000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ [5]) в сочетании с высокой биокаталитической активностью этого фермента к субстрату ацетилхолину позволили разработать чувствительный и специфичный биохимический метод определения фосфорорганических ингибиторов.

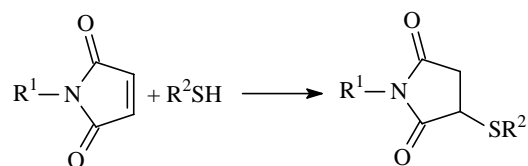
Биохимический метод анализа основан на измерении активности холинэстеразы по отношению к субстрату до и после добавления исследуемой пробы. Разработано несколько модификаций биохимического метода, различающихся способами измерения активности холинэстеразы и используемыми холиновыми субстратами.

Наибольшее распространение получил фотометрический метод Элмана. В этом методе в качестве субстрата применяют ацетилтиохолин, а активность фермента определяют по концентрации продукта гидролиза — тиохолина, которую находят по изменению окраски индикатора 5,5'-дитио-бис(2-нитробензойной кислоты), вступающего в реакцию тиольного обмена с тиохолином. Фотометрический метод определения имеет порог чувствительности по *O*-изопропилметилфторфосфонату $5 \cdot 10^{-7}$ мг/мл [6].

Можно ожидать, что при использовании альтернативного колориметрическому, но более чувствительного метода регистрации аналитического эффекта, в частности флуоресцентного, чувствительность биохимического метода повысится.

При флуоресцентной регистрации аналитического эффекта сущность метода не изменяется. Аналитический сигнал обусловлен не изменением окраски индикаторной системы, а приобретением ею свойства люминесценции.

Для этого метода наиболее пригодными в качестве флуорогенного индикатора оказались малеинимиды, взаимодействующие с тиохолином с образованием флуоресцирующего эфира по следующей схеме [7]:



Для практических целей при выборе индикатора должны учитываться следующие основные условия:

Таблица 2

Результаты анализа параоксона методом Элмана и методом с флуоресцентной регистрацией аналитического эффекта

Заданная концентрация параоксона в эталонном растворе, нМ	Концентрация параоксона, нМ	
	метод Элмана	флуоресцентный метод
0,02	Не обнаружен	0,02 ± 0,002
1,00	То же	1,12 ± 0,11
10,00	—	9,10 ± 1,01
100,00	95,00 ± 10,23	101,0 ± 9,05

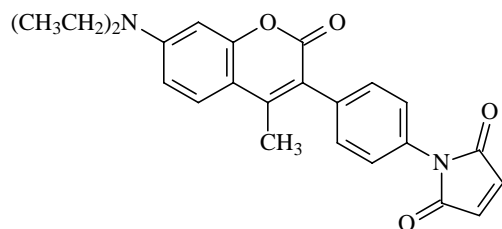
— отсутствие ингибирующей способности по отношению к холинэстеразе;

— значения оптических характеристик (длины волн возбуждения и флуоресценции) индикатора должны лежать в видимой области спектра, при этом разность между длинами волн возбуждения и флуоресценции должна составлять не менее 80 нм;

— отсутствие влияния температуры на величину аналитического эффекта в интервале 10—40 °С;

— хорошая растворимость в воде и водных средах в интервале рН = 7,4—8,6.

Наиболее полно указанным требованиям удовлетворяет флуороген 7-диэтиламино-3-(4-малеинимидофенил)-4-метилкумарин



образующий с тиохолином интенсивно флуоресцирующее соединение [8]. На основе этого флуорогена с использованием аналитической фермент-субстратной системы бутирилхолинэстераза-бутирилтиохолин и была разработана методика определения ингибиторов холинэстеразы [9]. Чувствительность определения параоксона (О,О'-диэтил-О-(*n*-нитро)фенилфосфат, модельное соединение фосфорорганических отравляющих веществ) флуоресцентным биохимическим методом составляет $2 \cdot 10^{-11}$ мг/мл [10].

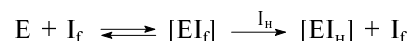
Сравнительный анализ результатов, полученных по методу Элмана и предлагаемому методу, показал, что при использовании флуоресцентной регистрации аналитического эффекта чувствительность определения фосфорорганического ингибитора примерно на 2,5—3 порядка выше (табл. 2).

Таким образом, на основе предлагаемого флуоресцентного метода может быть создана методика, позволяющая проводить анализ фосфорорганического отравляющего вещества на уровне ПДК_{н.м.}.

Еще одну возможность повышения экспрессности и достоверности аналитического контроля дает бессубстратная модификация биохимического метода. По этой модификации в качестве индикатора используется флуоресцирующее соединение, обратимо взаимодействующее с холинэстеразой, — обратимый ингиби-

тор. При связывании в комплекс количество свободного индикатора уменьшается, что ведет к снижению интенсивности флуоресценции. Если в анализируемой пробе присутствует необратимый ингибитор, в частности фосфорорганическое отравляющее вещество, то, связываясь с ферментом, он вытесняет индикатор из его комплекса с холинэстеразой, в результате чего интенсивность флуоресценции повышается.

Описанные процессы могут быть охарактеризованы с помощью следующего уравнения:



где E — фермент; I_f — обратимый ингибитор (флуорофор-индикатор); I_n — необратимый ингибитор, например, фосфорорганическое отравляющее вещество.

Известно, что большинство обратимых ингибиторов холинэстеразы содержат четвертичный атом азота [5]. Из подобных соединений наиболее пригодными в качестве индикаторов являются производные акридина и хинолина, в частности флуорофор акридиновый оранжевый.

Акридиновый оранжевый имеет максимум флуоресценции в области $\lambda_{\text{макс}} = 525$ нм ($\lambda_{\text{возб}} = 467$ нм) [11]. При добавлении к раствору акридинового оранжевого бутирилхолинэстеразы, выделенной из сыворотки крови лошади, интенсивность флуоресценции уменьшается пропорционально активности фермента в интервале от 0,1 до 1,4 Е*/мл. При добавлении фосфорорганического ингибитора, например параоксона, интенсивность флуоресценции возрастает [11]. Чувствительность метода сопоставима с чувствительностью колориметрического метода Элмана, однако продолжительность одного анализа предлагаемым методом составляет всего 1—2 мин.

Таким образом, бессубстратная модификация биохимического метода с использованием акридинового оранжевого может быть предложена в качестве экспрессного метода для экологического мониторинга на нижнем уровне (анализ по маркерам).

* Активность препаратов холинэстеразы в международных единицах активности Е. Активностью, равной одной международной единице, обладает такое количество фермента, которое катализирует превращение 1 мкмоль субстрата в продукт за 1 мин в стандартных (обычно оптимальных) условиях. На коммерческих препаратах ацетилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы, как правило, указывают удельную активность — число единиц активности на 1 мг белка препарата фермента.

Реализация предлагаемых методических подходов, безусловно, позволит улучшить по показателям чувствительности и экспрессности качество аналитического контроля, как в рабочей и промышленной зонах объектов по уничтожению химического оружия, так и на территории санитарно-защитной зоны и зоны защитных мероприятий, где требования по чувствительности контроля намного выше.

ЛИТЕРАТУРА

1. ГОСТ 12.1.005-88 «Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны». М.: Госстандарт, 1988.
2. Общие правила эксплуатации объектов по уничтожению химического оружия на основе фосфорорганических отравляющих веществ. ПОТ Р 0-005-2006.
3. Общие правила эксплуатации для объекта по уничтожению химического оружия на основе кожно-нарывных отравляющих веществ в г. Камбарка Удмуртской республики. Москва, 2005.
4. *Капашин В.П.* Химическое разоружение. Производственный экологический мониторинг. Саратов: СГУ, 2000.
5. *Millard C.B., Lockridge O., Broomfield C.A.* Biochem., 1995, v. 34, p. 15925—15931.
6. Руководство по работе в автомобильной радиометрической и химической лаборатории АЛ-4М. М: Военное издательство, 1988.
7. Handbook of Fluorescent Probes and Research Products. 8 Ed. Ed. P. Richard. Haugland, 2001.
8. *Власкин Д.Н., Гайнуллина Э.Т., Дружинин А.А., Рыбальченко И.В., Цехмистер В.И.* Форум «Медико-биологические проблемы противолучевой и противохимической защиты». Тез. докл. Санкт-Петербург, 2004.
9. *Гайнуллина Э.Т., Кондратьев К.В., Рыжиков С.Б., Таранченко В.Ф.* Бюл. эксперим. биол. и мед., 2006, № 12, с. 710-711.
10. *Коваленко И.В., Комиссаров А.Н., Кондратьев К.В., Гайнуллина Э.Т.* Проблемы уничтожения и утилизации ОМП. 2006. М. с. 40.
11. *Gainullina E.T., Kondratjev K.V., Ryzhikov S.B., Taranchenko V.F.* Book of Abstracts. Int. Congr. on Analytical Sciences (ICAS-2006), v. 1, p. 121.