

УДК 543.062: 632.078.39

## ЗАСТОСУВАННЯ РЕАКЦІЇ ШЕНЕМАННА ЯК ІНДИКАТОРНОЇ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ФОСФОРОРГАНІЧНИХ ОТРУЙНИХ СПОЛУК ФЕРМЕНТНИМ МЕТОДОМ

© 2003 М.Є. Блажеєвський\*, В.В.Дядченко\*\*

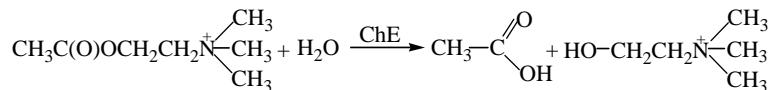
Запропоновано здійснювати визначення фосфорорганічних сполук кінетичним методом за ефектом інгібування реакції гідролізу ацетилхоліну в присутності ферменту холінестерази із застосуванням реакції Шенеманна як індикаторної. Розроблені вибіркові високочутливі методики кількісного визначення пестицидів (метафосу, трихлорметафосу, хлорофосу, карбофосу, фталофосу, метилнітрофосу) та аналогів бойових токсичних хімічних речовин (ГД-7) у присутності лужних та кислотних добавок. При визначенні 0,03-5 мкг/ мл фосфорорганічних сполук відносне стандартне відхилення  $S_f$  не перевищує 13 %.

Створення нових високочутливих методик виявлення та кількісного визначення фосфорорганічних сполук антихолінестеразної дії (ФОС) залишається велими актуальним питанням. Згадані речовини широко застосовуються у народному господарстві як пестициди та інсектициди, а у військовій справі — як бойові токсичні хімічні речовини. Останні за військовою класифікацією належать до фосфорорганічних отруйних речовин (ФОР).

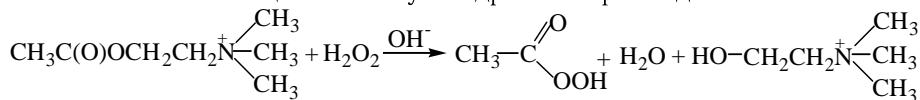
Для кількісного визначення ФОС найчастіше використовують ферментний метод, який базується на здатності ФОС пригнічувати каталітичну активність ферmentu холінестерази (ChE) у реакції гідролізу холінових естерів [1]. Визначення активності ферmentu здійснюють за швидкістю ферментного розщеплення субстрату (кінетичний метод) або шляхом визначення кінцевих продуктів чи невитраченого у реакції субстрату [2-14]. Однак, незважаючи на високу специфічну чутливість ферментного методу, методики визначення активності холінестерази за кількістю утвореної оцтової кислоти мають суттєві обмеження у селективності. Так, при контролі вмісту ФОР у повітрі за допомогою індикаторних трубок короткочасної дії типу ИТ-44 та ИТ-51 у присутності речовин кислотного та основного характеру часто одержуються псевдопозитивні результати [11].

Нами досліджена можливість кількісного визначення ФОС ферментним методом у кінетичному варіанті із застосуванням окисно-відновної реакції Шенеманна як індикаторної на невитрачений субстрат. Крім того, у реакції Шенеманна нами застосований неканцерогенний реагент — 3,3',5,5'-тетраметилбензидин, замість традиційно використовуваних в даній реакції як індикаторних висококанцерогенних речовин — бензидину та його похідних [17,18].

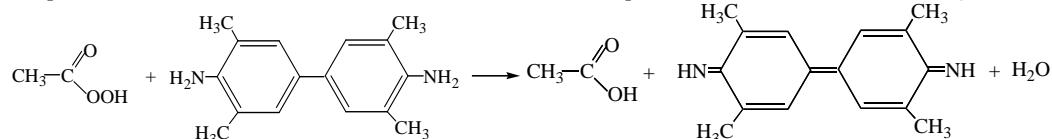
Нагадаємо, що ферментна реакція гідролізу ацетилхоліну перебігає за наступною схемою:



Ступень інгібування ферменту холінестерази у реакції гідролізу ацетилхоліну нами пропонується визначати за швидкістю реакції окиснення окисно-відновного індикатора 3,3',5,5'-тетраметилбензидину (ТМБ) пероксиетановою кислотою, яка утворюється у реакції непрореагованої кількості ацетилхоліну з гідроген пероксидом:



Пероксиетанова кислота окиснює 3,3',5,5'-тетраметилбензидин за наступною схемою:

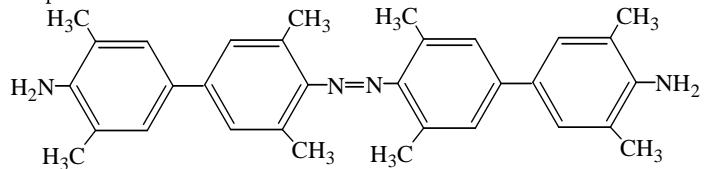


\* Національний Фармацевтичний Університет, к.х.н., доцент.

\*\* Харківський інститут танкових військ НТУ "ХПІ", ст. викладач.

## Застосування реакції Шенеманна як індикаторної для визначення фосфорорганічних отруйних сполук ферментним методом

Дві молекули 3,3',5,5'-тетраметилдифенохіондіміну, що утворилися, конденсуються з утворенням азометинового барвника — біс(2,5,7,10-тетраметил-6-аміно)-азобіфенілу, забарвленого у жовтий колір:



Результати експериментів дозволили опрацювати нову методику кількісного визначення інгібіторів холінестераз у водних розчинах за принципом: “Концентрація інгібітора — швидкість утворення забарвленого продукту”.

### Експериментальна частина

Світлопоглинання вимірювали на СФ-26 (422 нм,  $l = 1$  см). Швидкість реакцій характеризували тангенсом кута нахилу лінійної ділянки кінетичної залежності  $A - t$ . Вимірювання здійснювали при  $37^{\circ}\text{C}$ , температуру реакційної суміші забезпечували водяним терmostатуванням, pH розчинів контролювали за допомогою скляного електроду ЭСЛ-43-07 на лабораторному іономірі “И-130”.

У роботі використовували 3,3',5,5'-тетраметилбензидин дигідрохлорид моногідрат, х.ч. Ацетилхоліну хлорид — ампули по 0,02 г, х.ч. Досліди виконували при концентрації ацетилхоліну  $3,3 \cdot 10^{-4}\text{M}$  у робочих розчинах. Препарат холінестерази VI клас, активністю 28 AO/ mg, фасована по 80 mg із комплекту реактивів автомобільної радіометричної та хімічної лабораторії АЛ-4М. Решта реактивів були кваліфікації ч.д.а. Концентрацію гідроген пероксиду встановлювали перманганатометрично [15]. Усі розчини готували безпосередньо перед використанням на двічі дистильованій воді. У роботі використовували інгібітори ферменту: стандартні зразки розчинів пестицидів в ацетоні з масовою концентрацією 0,100 mg/ cm<sup>3</sup> розфасовані у скляні ампули по 3 ml виробництва Спеціального конструкторсько-технологічного бюро з дослідним виробництвом Фізико-хімічного інституту ім. Богатського НАН України. Робочі розчини готували розведенням стандартних зразків з використанням двічі дистильованої води. Використовували фосфатні буферні розчини, виготовлені за прописом [15]. Спирт етиловий ректифікований вищого очищення 96% .

### Результати та їх обговорення

Вивчали оптимальні умови перебігу ферментної реакції: порядок змішування, концентрації, час витримування реагентів ( $\tau_{\text{в}}$ ), pH середовища, вплив природи буферного розчину.

Згідно [16] оптимальними для перебігу реакції гідролізу ацетилхоліну холінестеразою є: pH 7,5 — 8,5, температура  $37\text{-}39^{\circ}\text{C}$ .

Швидкість реакції ацетилхоліну з  $\text{H}_2\text{O}_2$  від pH середовища досліджували методом тангенсів. Як видно з рис.1 , найвища швидкість реакції досягається при pH 8,3.

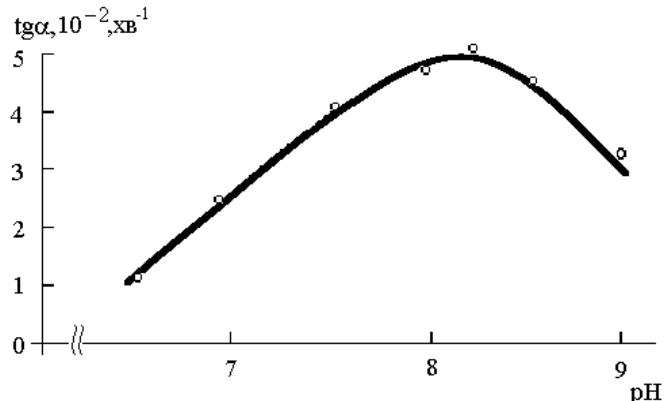


Рис.1. Залежність швидкості пергідролізу ацетилхоліну від pH.  $\text{C}_{\text{H}_2\text{O}_2} = 2\%$ ,  $\text{C}_{\text{тмб}} = 6 \cdot 10^{-4}\text{M}$ ,  $T = 37^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{C}_{\text{ax}} = 3,3 \cdot 10^{-4}\text{ моль/л}$

На рис.2 показана швидкість ферментної реакції від концентрації холінестерази. Лінійна залежність швидкості реакції від концентрації ферменту спостерігається в інтервалі концентрацій 0,12—0,36 мг/ мл. Тому досліди виконували при концентрації холінестерази 0,24 мг/ мл.

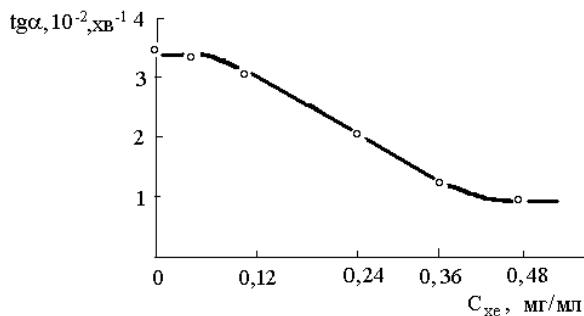


Рис. 2. Вплив концентрації холінестерази на швидкість ферментної реакції.  $C_{\text{ax}} = 2,4 \cdot 10^{-4} \text{M}$ ,  $C_{\text{H}_2\text{O}_2} = 2\%$ ,  $C_{\text{TMB}} = 6 \cdot 10^{-4} \text{M}$ ,  $T = 37^{\circ}\text{C}$ , pH 8,3

На рис.3 показана залежність швидкості реакції від часу витримування розчину непрореагованого ацетилхоліну з гідроген пероксидом ( $\tau_b$ ) перед додавання ТМБ.

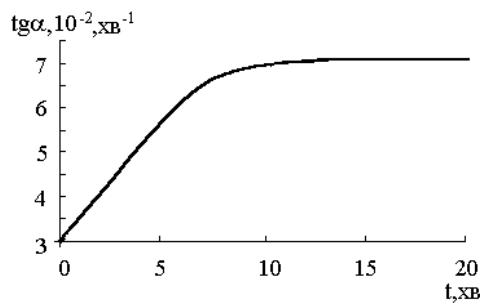


Рис. 3. Залежність швидкості реакції від  $\tau_b$  перед додаванням ТМБ.  $C_{\text{ax}} = 3,3 \cdot 10^{-4} \text{моль/л}$ ,  $C_{\text{H}_2\text{O}_2} = 2\%$ ,  $C_{\text{TMB}} = 6 \cdot 10^{-4} \text{M}$ ,  $T = 37^{\circ}\text{C}$ , pH 8,3

Найбільша швидкість реакції окиснення ТМБ досягалася при  $\tau_b \geq 10$  хв. Тому подальші досліди проводили при 10-хвилинній інкубації розчину непрореагованого ацетилхоліну з гідроген пероксидом.

**Методика визначення.** У пробірку вносили 2,0 мл 0,2M фосфатного буферного розчину, аліквоту розчину інгібітора, додавали води із розрахунку 16,6-х мл (де x — сума об'ємів реагентів), 0,5 мл 4 мг/ мл розчину холінестерази, вмикали секундомір, перемішували перевертанням пробірку і термостатували при  $37^{\circ}\text{C}$  10 хв. Потім до одержаної суміші додавали 1 мл  $5,4 \cdot 10^{-3} \text{M}$  розчину ацетилхоліну і знову термостатували при  $37^{\circ}\text{C}$  ще 10 хв. Після цього вносили 3,2 мл 10% гідроген пероксиду і термостатували при  $37^{\circ}\text{C}$ . На 30-й хвилині до розчину додавали 3 мл спирту етилового і як найшвидше приливали 0,5 мл  $2 \cdot 10^{-2} \text{M}$  розчину ТМБ. Суміш перемішували протягом 20 с і переносили у кювету спектрофотометра. Починаючи з 1 хвилини, кожні наступні 2 хвилини впродовж 20 хвилин вимірювали значення світло-поглинання A.

Визначення здійснювали за 5-6 концентраціями інгібітора із розрахунку, щоб мінімальна концентрація викликала 20%, а максимальна — 80% зниження активності холінестерази. Будували експериментальні кінетичні криві у координатах A-t, за прямолінійними ділянками розраховували тангенси кутів нахилу для побудови градуювального графіка.

Паралельно виконували так звану “фонову реакцію” — при відсутності інгібітора: у пробірку вносили 2,0 мл 0,2M фосфатного буферного розчину, 0,5 мл 4 мг/ мл розчину холінестерази, додавали води із розрахунку 16,6-х мл (де x — сума об'ємів реагентів) і 1 мл  $5,4 \cdot 10^{-3} \text{M}$  розчину ацетилхоліну, вмикали секундомір, розчин перемішували шляхом перевертання пробірки і термостатували при  $37^{\circ}\text{C}$  протягом 10 хв. Після цього до розчину додавали 3,2 мл 10% гідроген пероксиду і знову термостатували. На 20-й хвилині до суміші приливали 3 мл спирту етилового і як найшвидше 0,5 мл  $2 \cdot 10^{-2} \text{M}$  розчину ТМБ.

## Застосування реакції Шенеманна як індикаторної для визначення фосфорорганічних отруйних сполук ферментним методом

Одержану суміш перемішували протягом 20 с і переносили у кювету. Починаючи з 1 хвилини кожні наступні 2 хвилини впродовж 20 хвилин вимірювали значення світлопоглинання.

Ступінь інгібування ( $\Delta U$ ) обчислювали за формулою:

$$\Delta U = \frac{\operatorname{tg} \alpha_{C_i} - \operatorname{tg} \alpha_{\text{фон}}}{\operatorname{tg} \alpha_{V_{\max}} - \operatorname{tg} \alpha_{\text{фон}}} \cdot 100\%,$$

де  $\operatorname{tg} \alpha_{C_i}$  — швидкість реакції при  $C_i$  концентрації інгібітора;

$\operatorname{tg} \alpha_{V_{\max}}$  — швидкість реакції окиснення ТМБ перокситетановою кислотою, яка утворюється у реакції невитраченого ацетилхоліну з гідроген пероксидом при відсутності інгібітора;

$\operatorname{tg} \alpha_{\text{фон}}$  — швидкість реакції при відсутності інгібітора.

Значення  $\operatorname{tg} \alpha_{V_{\max}}$  визначали наступним чином: у пробірку вносили 2,0 мл 0,2M фосфатного буферного розчину, 1 мл  $5,4 \cdot 10^{-3}$ M водного розчину ацетилхоліну, додавали води із розрахунку 16,6-х мл (де  $x$  — сума об'ємів реагентів), 3,2 мл 10% гідроген пероксиду, вмикали секундомір, перемішували пробірку шляхом перевертання і термостатували при  $37^{\circ}\text{C}$  10 хв. Після цього додавали 3 мл спирту етилового і як найвидішше 0,5 мл  $2 \cdot 10^{-2}$ M розчину ТМБ. Суміш перемішували протягом 20 с і переносили у кювету. Починаючи з 1 хвилини кожні наступні 2 хвилини впродовж 20 хвилин вимірювали значення світлопоглинання.

На рис. 4 наведено приклад кінетичних кривих утворення продукту реакції окиснення ТМБ у присутності різних концентрацій ГД-7:

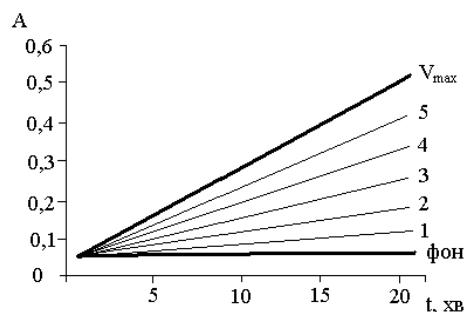


Рис. 4. Залежності швидкості ферментної реакції від концентрації ГД-7, мкг/мл: 1-0,03; 2-0,15; 3-0,6; 4-0,75; 5-1.  $C_{\text{хе}}=0,24$  мг/мл,  $C_{\text{H}_2\text{O}_2}=2\%$ ,  $C_{\text{ТМБ}}=6 \cdot 10^{-4}$  М,  $C_{\text{ax}}=3,3 \cdot 10^{-4}$  моль/л,  $T=37^{\circ}\text{C}$ , pH 8,3

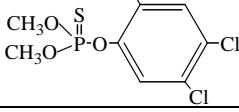
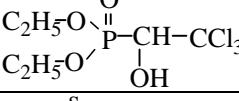
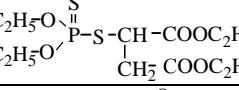
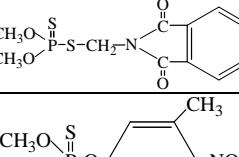
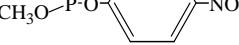
Лінійний характер кінетичних кривих утворення забарвлених продуктів на початковій стадії дозволяє скористатися методом тангенсів при обробці результатів експерименту.

У табл. 1 наведено характеристики методик кількісного визначення фосфорорганічних сполук антихолінестеразної дії за реакцією Шенеманна.

**Таблиця 1.** Характеристики методик кількісного визначення фосфорорганічних сполук антихолінестеразної дії за реакцією Шенеманна

| Назва   | Формула  | Інтервал визначуваних концентрацій (мкг/мл), (рівняння градуювального графіку) | Концентрація, що викликає 20% інгібування (мкг/мл) |
|---------|--|--|--|
| ГД-7    | $\text{C}_2\text{H}_5\overset{\text{O}}{\underset{\text{CH}_3}{\text{P}}}(\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{SC}_2\text{H}_5)$ | 0,03-1<br>$y=0,0022x+0,0066$ ( $r = 0,99$ )                                    | 0,03   |
| Метафос | $\text{CH}_3\overset{\text{S}}{\underset{\text{CH}_3}{\text{O}}}\text{P}(\text{O})_2\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_2$     | 0,9-10<br>$y=0,0011x+0,0034$ ( $r = 0,99$ )                                    | 0,9  |

Таблиця 1. Продовження.

|                |   |   |       |
|----------------|---|---|-------|
| Трихлорметафос |  | 0,1-1<br>$y=0,0034x \ (r = 0,99)$             | 0,1   |
| Хлорофос       |  | 0,085-0,83<br>$y=0,0031x+0,0025 \ (r = 0,99)$ | 0,085 |
| Карбофос       |  | 0,73-5<br>$y=0,0029x+0,0020 \ (r = 0,99)$     | 0,73  |
| Фталофос       |  | 0,06-0,6<br>$y=0,0034x+0,0008 \ (r = 0,99)$   | 0,06  |
| Метилнітрофос  |  | 0,03-0,12<br>$y=0,0030x+0,0033 \ (r = 0,99)$  | 0,03  |

Правильність результатів аналізу перевірена за методом “уведено— знайдено” при аналізі штучно виготовлених модельних сумішей.

Статистична обробка результатів експерименту наведена у табл. 2. Як видно з таблиці, наявність у розчині домішок кислотного (**HCl**) та основного (**NH<sub>3</sub>**, **NaHCO<sub>3</sub>**) характеру не впливає на правильність результатів. В цьому перевага запропонованого індикаторного методу у порівнянні з методом визначення активності холінестерази за кількістю утворення оцтової кислоти.

Таблиця 2. Статистична обробка результатів аналізу інгібіторів холінестераз біохімічним методом з використанням реакції Шенеманна  
( $P = 0,95$ ,  $n = 5$ ,  $t_a (P,f) = 2,78$ )

| з/ п | Визначувана сполука | Уведено,<br>мкг/ мл | Знайдено<br>$\bar{x} \pm \Delta x$ , мкг/ мл | $S_r$ , % | $\delta$ , % |
|------|---------------------|---------------------|--|-----------|--------------|
| 1.   | ГД-7*               | 0,6                 | 0,59 $\pm 0,06$                              | 7,6       | -2,5         |
| 2.   | Метафос*            | 5                   | 4,9 $\pm 0,6$                                | 9,6       | -2,0         |
| 3.   | Трихлорметафос*     | 0,2                 | 0,19 $\pm 0,02$                              | 10,3      | -2,5         |
| 4.   | Хлорофос            | 0,17                | 0,16 $\pm 0,02$                              | 10,7      | -1,7         |
| 5.   | Карбофос**          | 2,2                 | 2,0 $\pm 0,3$                                | 13,2      | -8,1         |
| 6.   | Фталофос**          | 0,24                | 0,20 $\pm 0,03$                              | 8,1       | -4,2         |
| 7.   | Метилнітрофос       | 0,06                | 0,06 $\pm 0,01$                              | 6,9       | +6,7         |

\* В присутності  $1 \cdot 10^{-3}$ — $5 \cdot 10^{-3}$ М хлористоводневої кислоти.

\*\* В присутності  $1 \cdot 10^{-3}$ — $5 \cdot 10^{-3}$ М аміаку,  $1 \cdot 10^{-3}$ — $10^{-1}$ М натрію гідрокарбонату.

При визначенні 0,06 – 0,6 мкг/ мл різних за будовою ФОС відносне стандартне відхилення  $S_r$  не перевищує 13 %.

Правильність визначення характеризує відносне відхилення результатів аналізу від уведеній кількості ( $\delta$ ), воно складає від – 8,1% до +6,7%.

### Висновки

1. Розроблені високочутливі вибіркові методики кількісного визначення фосфорорганічних сполук біохімічним методом з використанням реакції Шенеманна як індикаторної в присутності лужних та кислотних домішок.

2. Показана можливість застосування неканцерогенного реагенту 3,3',5,5'-тетраметилбензидину в біохімічному методі визначення інгібіторів холінестераз.

3. При визначенні 0,06 – 0,6 мкг/ мл різних за будовою ФОС відносне стандартне відхилення  $S_r$  не перевищує 13 %. Відносне відхилення результатів аналізу від уведеного кількості (правильність) б складає від – 8,1% до +6,7%.

### Література

1. Франке З., Франц П., Варнке В. Химия отравляющих веществ. В 2-х томах.- М.:Химия. 1973. Т.2. С.160-163.
2. Крамаренко В.Ф., Туркевич Н.М. Анализ ядохимикатов.-М.:Химия, 1978. С.107.
3. Жуковский Ю.Г., Фельд В.Э. О фотометрическом определении тиоспиртов с помощью реактива Эллмана при измерениях каталитической активности ХЭ. Анализ объектов окружающей среды: Тез. докл. 3 Всерос. конф. "ЭКОАНАЛИТИКА-98" с международным участием, Краснодар, 20-25 сент. 1998. Краснодар. 1998. С.247-248.
4. Стойкова Е.Е., Белякова С.В., Будников Г.К., Евстюгин Г.А. Ферментные тест-системы для определения остаточных количеств фосфорорганических пестицидов в растительном материале. Всероссийская конф. "Химия аналитических веществ и материалов", Москва 16-21 апреля 2000: Тез. докл. М. 2000. С.128-129.
5. Simonian A.L., Efremenko E.N., Wild J.R. Anal. Chim. Acta. 2001. Vol.444. №2. Р. 179-186.
6. Doong R., Tsai H. Sol-gel based fiber-optical acetylcholinesterase biosensor for the detection of organophosphorus pesticides. The Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy "Science to 21-th Century", New Orleans, La, March 12-17, 2000: PITTCOM 2000, Book Abstr. 2000. P. 1679.
7. Archipova V., Dzyadovych S., Soldotrin A., El'skaya A., Jaffrezic-Renault N., Jaffrezic H., Martelet C. Development of multibiosensor based on enzyme inhibition analysis for selective determination of different toxic substances. 1-st Black Sea Basin Conference on Analytical Chemistry, Odessa, 11-15 Sept., 2001. Programmer and Book Abstract. (Odessa). 2001. P.30.
8. Pogačnik Lea, Franko Mladen Talanta. 2001. V.54. №4. Р. 631-634.
9. Медянцева Э.П., Кужирева М.П., Фахреева Э.Р. Использование иммунохимических реакций с вольтамперометрическим контролем определения производных сим-1,3,5-триазина. Анализ объектов окружающей среды: Тез. докл. 3 Всерос. конф. "ЭКОАНАЛИТИКА-98" с международным участием, Краснодар, 20-25 сент., 1998. Краснодар, 1998. С.322.
10. Teststreifen furden immunchemischen Stoffnachwies.: Пат. 19830405 Германия МПК<sup>7</sup> G 01 № 33.543. Formica P., Polzins R., Manns A.; Drager Sicherheitstechnik GmbH. – № 19830405; Заявл. 08.07.1988. Опубл. 27.01.2000.
11. Баталов А.И., Болотов В.В., Блажеевский Н.Е. и др. Боевые токсические химические вещества.-Учебное пособие. Х.:ХВУ, 1998. 105с.
12. Lee Hye-Sung, Kim Young-Ah, Chung Duck Hwa, Lee Young Tae Int. J. Food Sci and Thechnol. 2001. V.36. №3. Р. 263-269.
13. Альников Р.С., Калмыкова Е.Н., Ермолаева Т.Н. Пьезокварцевый биосенсор на основе холінестерази для определения ФОС в воздухе. Соврем. пробл. теор. и экспер. химии: Тез. доклад 2-й Всерос. конф. мол. ученых. Саратов, 2-4 сент., 1999г. Саратов. гос. ун-т. – Саратов. 1999. – С. 106.
14. Altouta L., Katz E., Willner I. Anal. Chem. 2000. V.72. № 5. Р. 927-935.
15. Лурье Ю.Ю. Справочник по аналитической химии. 5-е изд., перер. и доп. М.: Химия, 1979. 480с.
16. Яковлев В.В. Ферментативный катализ. М.: Наука, 1977. 234 с.
17. Альберт А. Избирательная токсичность. Т.2.–М.: Медицина, 1989.432 с.
18. Holland V.R., Saunders B.C. A safer substitute for benzidine in the detection of blood.Tetrahedron.1974.V.30.P.3299-3302.

Поступила в редакцию 14 сентября 2003 г.

Kharkov University Bulletin. 2003. №596. Chemical Series. Issue 10(33). M.Ye. Blazheyevskiy, V.V.Dyadchenko. The application of Schonemann reaction as indicator one for the determination of organophosphorus compounds by enzymatic method.

A kinetic method has been suggested for the determination of organophosphorus compounds based on the effect of inhibition of hydrolyze reaction of acetylcholine in the presence of cholinesterase using the Schonemann reaction as indicator one. Highly sensitive and selective methods have been developed for the quantitative analysis of pesticides (metaphos, trichlormetaphos, chlorophos, carbophos, phtalophos, methylnitrophos) and analogues of nervous gases (ГД-7) in the presence of the alkaline and acid additives. In the range 0.03 to 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of organophosphorus compounds the relative standard deviation does not exceed 13 %.