

Борисевич С.Н. Хроматографические и иммунохимические методы определения диоксинов / Здоровье и окружающая среда: сб. науч. тр., 2005. – Вып. 5 / Мин-во здравоохранения РБ, Респ. науч.-практ. центр гигиены. - с. 61-65.

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ И ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДИОКСИНОВ

Борисевич С.Н.

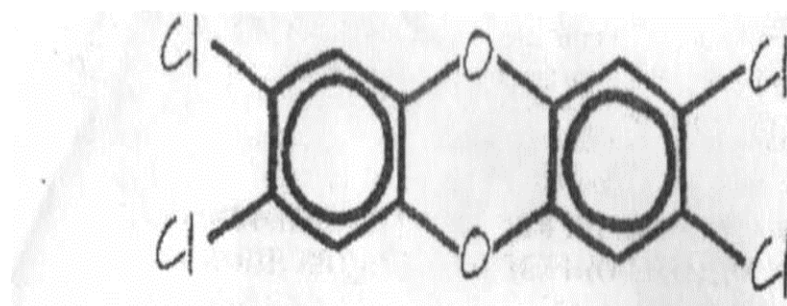
Белорусский государственный университет, Минск

Диоксины - токсичные техногенные вещества. Их появление в окружающей среде обусловлено развитием разнообразных технологий, главным образом в послевоенный период, и связано с производством, использованием и утилизацией хлорорганических соединений в целлюлозно-бумажной, химической, металлургической промышленности. Диоксины образуются при сжигании муниципальных отходов, содержатся в выхлопных газах автомобилей. Источником диоксинов является также аграрный сектор, высокие концентрации этих токсикантов обнаружены в местах применения гербицидов и дефолиантов. Мощным источником диоксиновых загрязнений явилось уничтожение в 60-х годах химического оружия первого поколения (хлорсодержащие иприт и люизит) путем затопления в морях и сжигания. Не менее мощный источник – старты твердотопливных ракет. Диоксины привлекают внимание экологов и специалистов на протяжении последних десятилетий, особенно после взрыва на химическом предприятии в городе Севезо в Италии, когда облако с большой концентрацией диоксинов распространилось на территории 16 кв. км и вызвало массовое отравление людей и животных [1,2].

Диоксины относятся к гетероциклическим полихлорированным соединениям, в структуре которых два ароматических кольца связаны между собой двумя кислородными мостиками. По данным агентства по охране окружающей среды США идентифицировано 75 диоксинов.

Аналогичные им дибензофураны содержат один атом кислорода (идентифицировано 135 соединений). В родственных полихлорированных бифенилах два ароматических кольца связаны обычной химической связью (идентифицировано 209 соединений).

Диоксины – бесцветные кристаллические вещества (температура плавления 200-400°C), обладающие высокой липофильностью, т.е. способностью растворяться в органических растворителях и удерживаться в жироподобных матрицах, а также высокой адгезией к частицам почвы, золы, донным отложениям, что способствует накоплению их в поверхностных водах. Диоксины стабильны к сильнощелочным и сильнокислым средам. Период разложения их в почве – от 10 до 20 лет, в воде – до 2 лет.



loilR cMorfNES, A COUPlE cogens, ANd 2 bEWENE Ri«qs MAKE A
dioXJN MoTeCuTe

Диоксины обладают высокой кумулятивной токсичностью, они сохраняются в организме человека до 8 лет. Токсическое действие диоксинов зависит от числа атомов хлора и их положения в молекуле. Наибольшей токсичностью обладает 2,3,7,8-тетрахлордibenзодидоксин (ТХДД) и 1,2,3,7,8-пентахлордibenзодидоксин (ПХДД). Попадая в организм человека и животного в основном через пищевые продукты, диоксины вызывают аномалии в работе генетического аппарата. Первичные эффекты воздействия связывают с их высокой специфичностью к цитозольному Ah-рецептору, контролирующему активацию генов на 15-й хромосоме человека и накоплению неспецифических ферментов P-450A1 и P-450A2, подавлением гена на 16-й хромосоме человека и

др. Т.е. попадая в организм человека, диоксины выступают как индукторы длительных ложных биоответов. Вторичные эффекты этих токсинов приводят к мутагенезу, биодegradации гормонов, витаминов, липидов, разрушению биомембран и комплексов жизненноважных металлов с органическими лигандами, определяющими работу клетки. При хроническом отравлении наблюдается снижение иммунитета и обучаемости, импотенция, появляется заболевание кожи – хлоракне. Диоксин повышает частоту возникновения опухолей, т.е. обладает канцерогенным действием [3-5].

В настоящее время признано недопустимым присутствие диоксинов в продуктах питания, в воздухе и питьевой воде. Достичь же этого практически невозможно. Полагают, что в основном диоксины поступают в организм человека с пищевыми продуктами, прежде всего содержащими животные жиры (мясо, молоко) В среднем житель США ежедневно поглощает около 119 пг этих веществ. Такая оценка для Беларуси находится в стадии изучения.

В связи с опасностью накопления диоксинов в организме детей через молоко и молочные продукты ВОЗ в 1987 году разработана международная программа исследований по этой глобальной проблеме. В настоящее время в России аккредитовано 5 лабораторий мониторинга суперэкоотоксикантов этого класса в объектах окружающей среды. В Беларуси проводится подготовка к аккредитации по определению диоксинов в пищевых продуктах и природных средах одной из лабораторий отдела физико-химических исследований ГУ "РНПЦГ".

Описанные в литературе методы анализа диоксинов [1,6,7] охватывают все важные матрицы: почву, газовые среды, воду, промышленные изделия и отходы, а также биообразцы растительного и животного происхождения. Выбор конкретных методов зависит от задач, стоящих перед исследователем.

Первым из опубликованных методов исследования ТХДД был кожный тест на кроликах [Adams et al., 1941]. Предложен ряд спектроскопических методов, но их использование ограничено. Данные рентгенографического анализа, ИК- и УФ-спектров, ЯМР, ЭПР и масс-спектров получены Rohland и Yang (1972),

Vaughman (1974), Slonecker (1983). В начале 70-х годов для количественного определения ТХДД стали использоваться газохроматографические методы, уровень определяемых концентраций при этом находился в диапазоне мкг/г и методики не являлись специфичными для изомеров. Ruhagc (1964) решил проблему путем сочетания хроматографа и масс-спектрометра, что позволило разработать в конце 70-х годов изомерспецифичные и стандартизированные методики анализа (предел обнаружения 1 пг/г).

Первоначально при определении ПХДД использовалась хроматография низкого разрешения на набивных колонках с последующей масс-спектрометрией, она требовала многоступенчатой очистки экстрактов для исследования. В настоящее время для разделения отдельных изомеров в смесях диоксинов в очищенных экстрактах применяется хроматография высокого разрешения. Применение капиллярных колонок с привитыми фазами позволило заметно снизить требования к очистке экстрактов. Разделение изомеров диоксинов проводится с помощью программирования температуры на капиллярных колонках. В качестве неподвижной фазы применяют как сильнополярные (Silar IOC, SP-2330, SP-2340 и др.), так и низкополярные (DB-5, DB-17, DB-225) и ряд других фаз (SE-54, OV-17, OV-101). Универсальных фаз пока не создано.

Масс-спектрометрическое окончание занимает принципиальное место в определении следовых количеств диоксинов. Ионизация электронным ударом осуществляется в ионных источниках. При соударении электронов, испускаемых катодом, с молекулами образца последние ионизируются. Положительно заряженные молекулярный и осколочный ионы выводятся из ионизационной камеры, ускоряются и разделяются в анализаторе. Используются одно- (selective ion monitoring, SIM) и многоионные (MID) детекторы. Полный масс-спектр требует 0,1-1 нг вещества.

Один из эффективных подходов к масс-спектрометрическому определению следовых количеств ПХДД в сложных смесях - комбинирование двух масс-спектрометров (танDEMная масс-спектрометрия, метод MS-MS). Первый

используется для генерирования и разделения ионов, второй служит для их обнаружения и определения. С помощью этого метода определяют ТХДД в полевых условиях с минимальной очисткой образцов почвы. Метод позволяет получить достоверные результаты (предел обнаружения порядка 350 фг), но не обеспечивает пределов обнаружения, достигаемых с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения с SIM (10 фг).

Проведение анализов, связанных с определением ПХДД и родственных соединений, требует использования специальных помещений, оборудованных с учетом очень жестких требований техники безопасности. Из-за высокой токсичности диоксинов приборы для их анализа не применяются для иных целей.

Развиваются новые подходы к анализу диоксинов. Разработаны иммунные методы определения и оперативного тестирования образцов. Для биотестирования предложено использовать несколько биологических субстратов, способных к специфической чувствительной реакции на высокотоксичные диоксины (эмбрионы птиц, некоторые клетки крыс, овец и т.д.). Для биотестирования может быть использовано также избирательное поглощение ПХДД из окружающей среды некоторыми представителями флоры (листвой, еловыми иглами).

Особенно перспективным является использование для иммуноопределения диоксинов моноклональных антител, обеспечивающих по сравнению с поликлональными устойчивую специфичность и возможность значительного снижения предела обнаружения (0,5 нг с перспективой снижения до пикограммного уровня). Это направление анализа может обеспечить резкое снижение денежных и временных затрат на определение диоксинов в образцах различных типов.

Литература

1. Федоров Л.А. Диоксины как экологическая опасность: ретроспектива и перспективы. – М. : Наука, 1993. - 266 с.

2. Новиков Ю В., Минин Г.Д., Сайфутдинов М.М. Проблема диоксинов в окружающей среде. Токс. вестник, 1994, № 1, с.2 – 6.
3. Забродский П.Ф. Влияние полихлорированных дибензо-*n*-диоксинов на систему иммунитета. Токс. вестник, 1998. № 2, с. 20 – 23.
4. Косарев В.В., Жестков А.В., Лотков В. С. Влияние диоксинов на иммунную систему человека. Экология человека, 1999, № 2, с. 30 – 32.
5. Журков В.С., Катосова Л. Д., Платонова В.И. , Ревазова Ю. А. , Ревич Б.А. Анализ хромосомных аббераций в лимфоцитах крови женщин, контактирующих с диоксинами. Токс. вестник, 2000, № 2, с. 2 – 6.
6. Полихлорированные дибензо-*n*-диоксины и дибензофураны. Международная программа по химической безопасности и гигиенические критерии состояния окружающей среды. ВОЗ (Женева), 1993.
7. Ключев Н.А. Скрининговый метод обнаружения диоксинов и родственных соединений в окружающей среде. ЖАХ, 1996, Т.5, № 2, с. 163 – 172.

CHROMATOGRAPHIC AND IMMUNOCHEMICAL METHODS OF DETERMINATION OF DIOXINES

Borisevitch S. N.

Belorussian State University, Minsk

It is obviously that dioxines are superecotoxikants and they can be in many environmental objects. Article is a review "state - of - the art" of physical - chemical and biological methods of investigation of this xenobiotics group. Sensitivity and selectivity of these methods are compared.