

TEST-METHODS
AND ECOLOGY

M. I. EVGENIEV

Principles and application of test methods based on chemical and biochemical reactions and biological testing are discussed.

Рассмотрены принципы функционирования и области применения тест-методов, основанных на использовании химических, биохимических реакций и биотестирования.

ТЕСТ-МЕТОДЫ И ЭКОЛОГИЯ

М. И. ЕВГЕНЬЕВ

Казанский государственный технологический университет

Одна из важных проблем, которая возникает при попытке обеспечить безопасность среды обитания человека, при диагностике различных заболеваний, контроле в воздухе производственных помещений за содержанием взрывоопасных примесей, токсичностью вдыхаемого персоналом воздуха, — это необходимость проведения анализа большого количества проб сложного состава (воздуха, водных сред, биологических жидкостей) на содержание тех или иных компонентов. Кроме того, на практике часто случаи, когда соответствующие процедуры должны проводиться в условиях дефицита времени или в местах, когда сложное и громоздкое лабораторное оборудование недоступно. Такая ситуация возникает, например, при массовом таможенном досмотре багажа в аэропортах с целью выявления наркотических или взрывоопасных средств. Инспектор дорожного движения, выполняющий свои обязанности вдали от аналитической лаборатории, также должен принять правильное решение о состоянии опьянения водителя за считанные минуты.

Массовый характер анализов, кроме того, вызывает проблему экономическую. Химический анализ пробы (процесс установления ее состава и концентрации определенных компонентов в ней) в большинстве случаев дорогостоящая процедура. Необходимость отыскать золотую середину между массовостью анализов различных объектов как важного фактора обеспечения качества жизни человека и в то же время уменьшить экономические проблемы, связанные с этим, привела к развитию тест-методов химического анализа.

ЧТО ТАКОЕ ТЕСТ-МЕТОДЫ

Тест-методы — это экспрессные, простые и дешевые приемы обнаружения и определения вещества на месте (on site). Они, как правило, не требуют сложных приемов подготовки пробы к анализу (например, разделения и концентрирования). При их использовании резко сокращается и во многих случаях отпадает необходимость в использовании дорогостоящего и сложного лабораторного оборудования и самих аналитических лабораторий. Естественно, что при этом уменьшается потребность в высококвалифицированных специалистах, нехватка которых ощущается во всех странах.

Тест-методы в большинстве случаев служат для оценки присутствия и содержания определенных компонентов в анализируемых образцах. В идеальном случае роль этих аналитических средств должна быть такой, чтобы любая домохозяйка, используя

наборы реактивных бумажек, таблеток, ампул, трубочек, могла на собственной кухне быстро и безошибочно оценить качество водопроводной воды, наличие и содержание вредных, токсичных примесей в пищевых продуктах [1]. Примером тест-метода, нашедшего широкое применение даже в школьных лабораториях, служит универсальная индикаторная бумага для определения pH растворов, которую по традиции называют лакмусовой бумагой.

В тест-методах используются химические и биохимические реакции. В экологическом мониторинге окружающей среды большое значение приобретают методы биологического тестирования. В основу применения тест-методов положена методология скрининга (просеивания), используемая для анализа большого числа образцов с помощью тщательно отработанных методов качественного и полуквантитативного анализа. Эта методология допускает неправильные положительные результаты на присутствие анализируемого компонента. В то же время она полностью исключает неправильные отрицательные результаты. По этой причине все пробы, давшие положительную реакцию (например, на присутствие пестицида в овощах), далее изучают с помощью более информативного метода (хроматография). В свою очередь, все отрицательные результаты скрининга обычно принимают как окончательные без какой-либо дополнительной проверки. Таким образом удастся значительно сократить как объем, так и стоимость анализа. В то же время к тест-методам в соответствии с этой методологией предъявляются высокие требования по специфичности наблюдаемого при его применении отклика на присутствие определенных компонентов в анализируемых образцах.

ХИМИЧЕСКИЕ ТЕСТ-МЕТОДЫ

Общий принцип большей части химических тест-методов заключается в использовании реакций с так называемыми хромогенными (цветообразующими) реагентами. Реакции проводят в таких условиях, чтобы можно было визуально зафиксировать их результат. Этим результатом могут быть интенсивность окрашивания, цвет бумажной полоски или длина окрашенной части индикаторной трубки (см. рис. 1). Большинство используемых тест-методов служат измерительным средством однократно-го применения.

Большое распространение получили индикаторные трубки для измерения концентрации вредных и взрывоопасных веществ в воздухе рабочей зоны [2]. Индикаторная трубка — это стеклянная трубка, заполненная твердым носителем. На пористую поверхность носителя наносят хромогенные реагенты (см. рис. 1). В качестве носителей применяют порошкообразные материалы: силикагель, фарфор, стекло. Используют и химически модифицированные носители [3]. Определение токсичных

веществ (200 наименований органических и неорганических соединений) основано на измерении длины изменившейся первоначальную окраску слоя индикаторного порошка после пропускания через него определенного объема воздуха, которая пропорциональна его концентрации. Этот способ получил название линейно-колористического метода. В тех случаях, когда анализируемый воздух содержит смесь веществ с близкими химическими свойствами, определение состава и содержания токсичных компонентов можно провести после десорбции их производных с носителя методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ, см. рис. 1). Несмотря на внешнюю простоту таких тест-устройств, они обеспечивают погрешность измерения, не превышающую 25% при содержании определяемых веществ до $0,01 \text{ млн}^{-1}$. Основная трудность при их создании — это подбор специфических хромогенных реагентов. Для определения фосгена, например, в качестве реагентов используют смесь *l*-диметиламинобензальдегида и диэтиламина, сероводорода — соединения ртути (II).

Важным достижением в развитии тест-методов явилось создание индивидуальных пассивных дозиметров. Поглощение определяемых веществ слоем, содержащим хромогенные реагенты, происходит за счет свободной диффузии. Эти тест-устройства крепятся к одежде персонала, работающего в производственных помещениях в контакте с вредными веществами. Такие индикаторные устройства позволяют оценивать среднесменную дозу воздействующего на человека токсиканта по длине окрашенной зоны и представляют собой персональные дозиметры химической радиации.

Индикаторные трубки, содержащие закрепленный на носителе комплексобразующие реагенты, оказались удобными линейно-колористическими тест-методами для определения ионов тяжелых металлов. Химические тест-методы могут реализовываться и в виде полосок из бумаги или полимерного материала. Так, хлорорганические пестициды ДДТ, альдрин, хлордан, эндосульфат можно обнаруживать в овощах по появлению окрашенных пятен на индикаторной бумаге, пропитанной раствором *o*-толидина в ацетоне, после контакта ее с влажным срезом растения. Таким же образом определяют содержание нитратов в овощах. Естественно, при этом используют другой состав реагентов индикаторной бумаги.

Экспресс-тестирование наркотических веществ проводится с использованием хромогенных реакций в пробирках, на фильтровальной бумаге, специальных пластинках или полосках (стрипах), тест-ампулах промышленного изготовления. Появление специфической окраски в результате проведения нескольких независимых испытаний с помощью разных реактивов позволяет предположить наличие наркотического вещества (предположительное

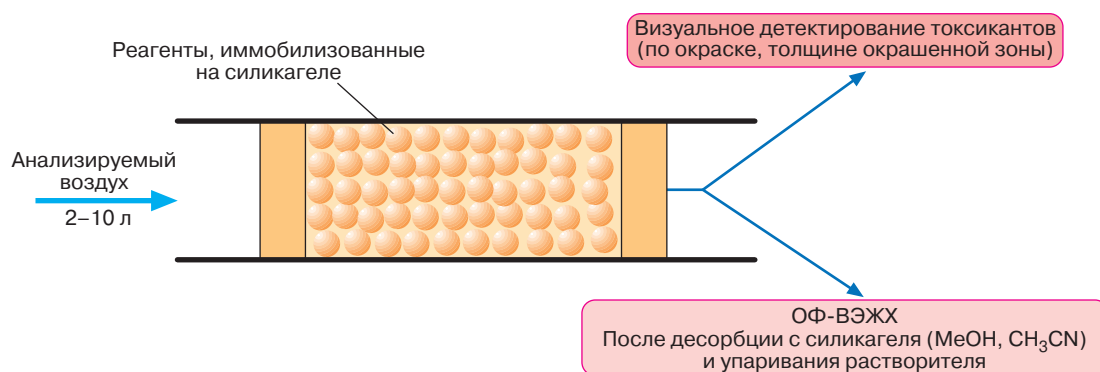
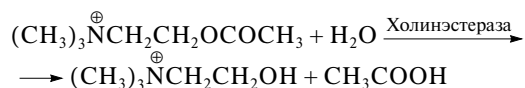


Рис. 1. Схематическое изображение индикаторной трубки для определения токсичных и взрывоопасных веществ в воздухе

доказательство). Окончательное заключение можно сделать после проведения специальных исследований. Анализ опиума в тест-методах можно провести с помощью реактива Марки (формальдегид, уксусная и серная кислота) или сульфата железа (III). Морфин, кодеин, героин обнаруживают с помощью реактива Марки и концентрированной азотной кислоты.

БИОХИМИЧЕСКИЕ (ФЕРМЕНТНЫЕ) ТЕСТ-МЕТОДЫ

В основу ферментных тест-методов положено свойство ионов металлов и органических токсикантов ингибировать (замедлять) процессы каталитического превращения веществ в присутствии биологических катализаторов-ферментов. Принцип их действия можно рассмотреть на примере тест-полоски для определения фосфорорганических веществ (ФОВ). Она представляет собой полоску фильтровальной бумаги, на один из концов которой иммобилизован фермент холинэстераза. Другой конец этой полоски содержит субстрат (ацетилхолин), скорость каталитического гидролиза которого подавляется в присутствии ФОВ:



Вместе с субстратом иммобилизовывается кислотно-основной индикатор. Определение ФОВ проводят по окраске зоны индикации тест-полоски после того, как полоска складывается для совмещения пятен, содержащих субстрат и фермент, и на нее выжимают сок анализируемого продукта. Если продукт содержит пестицид, уменьшается скорость ферментативной реакции, приводя к уменьшению количества выделившейся при этом кислоты. Это вызывает изменение окраски индикатора. По цветовой шкале на упаковке тест-полосок можно оценить экологичность продукта питания.

Тест-методы для определения боевых отравляющих веществ (зарин, зоман, иприт) выполняют в виде индикаторных трубок. При определении фосфорорганических веществ они содержат тот же состав реагентов, что и тест-полоски. Разработаны ферментные тест-методы для определения многочисленных органических и неорганических загрязнителей окружающей среды. Они различаются по составу используемых для их изготовления субстратов, ферментов, хромогенных индикаторов.

ТЕСТ-МЕТОДЫ В КЛИНИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ

Особый интерес представляет применение тест-методов в клинической химии. Это связано с тем, что основной целенаправленного и эффективного лечения пациентов является установление правильного и своевременного диагноза. В свою очередь, объективную информацию о состоянии больного врач получает на основе биохимического анализа биологических жидкостей, чаще всего сыворотки крови и мочи. Эффективность медицинской помощи во многом определяется оперативностью биохимического анализа. Тест-методы (или диагностические полоски) для клинической химии выполняют чаще в виде волокнистой полоски, на которую иммобилизованы специальные составы. Зоны индикации этих полосок после контакта с биологической жидкостью пациента (например, мочой) приобретают характерную окраску, интенсивность которой позволяет оценивать содержание тех или иных компонентов (рис. 2). Такие диагностические полоски предназначены для использования в биохимических лабораториях поликлиник и больниц, служб скорой помощи, при массовых обследованиях населения и, что очень важно, в домашних условиях. Ассортимент выпускаемых диагностических полосок достаточно многообразен и позволяет определять pH, содержание белка, аскорбиновой кислоты, билирубина, глюкозы, гемоглобина в крови, уробилиногена, кетовеществ, обнаруживать бактериурию и проводить тесты на беременность. Диагностические

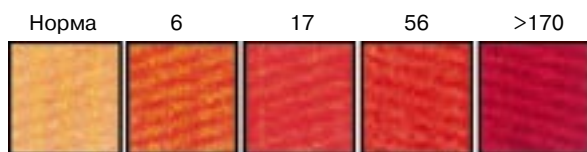


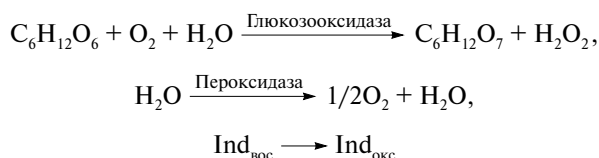
Рис. 2. Шкала окраски зоны индикации диагностической полоски для определения глюкозы в моче

полоски могут быть полифункциональными, позволяя определять одновременно 3–7 биохимических показателей. В этом случае тест-полоска содержит несколько зон индикации с разным составом реагентов, которые окрашиваются при контакте с мочой в разные цвета. Например, существуют полифункциональные полоски, позволяющие одновременно исследовать мочу на кровь, кетоны, глюкозу, белок и pH. Комбинации индикаторных составов на полифункциональных диагностических полосках составляют таким образом, чтобы получаемая при их использовании информация как можно лучше отвечала требованиям биохимических исследований при диагностике определенных заболеваний. Естественно, что применение таких диагностических полосок кроме ускорения процесса анализа позволяет существенно снизить стоимость клинических исследований.

Индикация компонентов биологических сред диагностическими полосками основана на использовании химических и биохимических реакций. В качестве реагентов в зонах индикации химических тест-методов используют буферные смеси, фосфорибонитридную кислоту, реактив Грисса, органические гидроперекиси, нитропруссид натрия и другие хромогенные вещества. Эти реагенты сочетаются при изготовлении полосок таким образом, чтобы при достижении определенного содержания анализируемого вещества в моче (или в сыворотке крови) зона индикации окрашивалась в определенный цвет. При этом интенсивность окраски этой зоны должна быть пропорциональна количеству вещества. Концентрацию биохимического параметра можно определить сопоставляя интенсивности окраски зоны индикации тест-полоски с окраской шкалы стандартов, которая нанесена на упаковке.

Принцип действия ферментных тест-методов можно рассмотреть на примере диагностической полоски для определения глюкозы в моче (см. рис. 2). Зона индикации этих полосок содержит ферменты глюкозооксидаза и пероксидаза, а также редокс-индикатор с подходящим значением стандартного потенциала E_0 . Для закрепления этих реагентов на зоне индикации используют гелеобразующие вещества, например агарозу. Совокупность реакций, протекающих при контакте диагностической полоски с глюкозой, содержащейся в моче пациента (полоска

погружается в мочу на несколько секунд), в упрощенном виде можно записать в следующем виде:



Глюкоза, содержащаяся в исследуемой моче, при контакте с ферментом глюкозооксидазой претерпевает каталитическое превращение с образованием глюконовой кислоты и перекиси водорода. Поскольку активность катализатора при этом не меняется, содержание перекиси водорода в зоне индикации будет пропорционально концентрации глюкозы в моче. Второй фермент, иммобилизованный в зоне индикации полоски (пероксидаза), каталитически превращает перекись водорода в воду. Одновременно происходит окисление редокс-индикатора (Ind), также иммобилизованного в зоне индикации. Очевидно, что соотношение концентраций окисленной ($\text{Ind}_{\text{окс}}$) и восстановленной ($\text{Ind}_{\text{вос}}$) форм индикатора будет пропорционально содержанию перекиси водорода и соответственно глюкозы в моче. Поскольку для иммобилизации на тест-полоску подбирают индикаторы (o-толидин и др.), имеющие разную окраску окисленной и восстановленной форм, итоговая окраска зоны индикации тест-метода и ее интенсивность являются критерием количественного содержания глюкозы в исследуемой моче.

Такие диагностические полоски во многих случаях помогают поддерживать нормальное состояние организма пациента. Тест-полоски на глюкозу, например, жизненно необходимы для людей, страдающих инсулинзависимой стадией сахарного диабета. Как известно, правильная дозировка нужных лекарств или очередная инъекция инсулина означают для них возможность сохранить жизнь. Концентрация глюкозы в крови и моче для них коррелирует с содержанием инсулина в организме. При гипергликемии (недостатке инсулина) содержание глюкозы начинает превышать допустимые пределы. Содержание глюкозы зависит от многих факторов (физическое состояние, наличие ран, питание), во многих случаях у пациентов наблюдается резкое понижение концентрации глюкозы в организме (гипогликемия). Этот эффект может сопровождаться потерей сознания и другими опасными последствиями. Использование диагностических полосок в таких случаях означает для пациента возможность проводить диабетический контроль без помощи врачебного персонала и целенаправленно регулировать содержание глюкозы в организме.

Как видно, простые в употреблении и дающие важную информацию о состоянии здоровья человека тест-полоски отнюдь не примитивны по принципам своего действия, в них заложены новейшие

достижения аналитической химии и смежных научных дисциплин.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ТЕСТ-МЕТОДЫ (БИОТЕСТИРОВАНИЕ)

Особую роль в оценке состояния окружающей среды играют биологические тесты. Это связано с тем, что результаты химического анализа, проводимого с помощью сложного аналитического оборудования, во многих случаях не позволяют оценить истинную опасность тех или иных загрязнителей на среду обитания, прогнозировать последствия их воздействия на живые организмы. Многообразные загрязняющие вещества, попадая в окружающую среду, могут претерпевать в ней различные превращения, усиливая при этом свое токсическое действие. По этой причине оказались необходимыми методы интегральной оценки качества среды (воды, почвы, воздуха). Огромную роль при этом играют методы биотестирования и биоиндикации [4].

Под биотестированием понимают приемы исследования, при котором о качестве среды, факторах, действующих самостоятельно или в сочетании с другими, судят по выживаемости, состоянию и поведению специально помещенных в эту среду организмов – тест-объектов. Биоиндикация – родственный биотестированию прием, использующий для этих же целей организмы, обитающие в исследуемой среде. При выборе таких организмов приходится соблюдать определенные требования, среди которых возможность фиксировать четкий, воспроизводимый и объективный отклик на воздействие внешних факторов, чувствительность этого отклика на малые содержания загрязнителей и др. Известен пример биотестирования, основанный на использовании канареек для индикации появления рудничного газа в горных выработках горняками в средние века. Поведение птицы или ее гибель оповещали шахтеров о грозящей им опасности.

Биоиндикацию можно проводить на уровне молекул, клеток, органов (систем органов), организмов, популяций и даже биоценоза. Повышение уровня организации живой природы может приводить к усложнению, неоднозначности взаимосвязи биологического отклика с антропогенными факторами исследуемой среды, поскольку на них могут накладываться и природные факторы. Поэтому в качестве биотестов выбирают наиболее чувствительные к исследуемым загрязнителям организмы.

Использование биохимических реакций (молекулярный уровень индикации) связано с тем, что они наиболее чувствительны к воздействию внешних загрязнителей. В присутствии загрязнителей окружающей среды, например, происходит уменьшение содержания хлорофилла в мембранах хлоропластов растений или понижается способность фитопланктона к продуцированию кислорода в процессе фотосинтеза. Это может служить индикаторным признаком воздействия на живую природу газопылевых выбросов предприятий или токсичных компонентов сточных вод.

торным признаком воздействия на живую природу газопылевых выбросов предприятий или токсичных компонентов сточных вод.

На фиксации морфологических отклонений растений от нормы под действием загрязнителей основана биоиндикация на тканевом уровне. Исторически именно морфологические реакции организмов на техногенные факторы вошли в практику оценки качества среды. Еще в середине XIX века бельгийские и английские ученые описывали факты повреждений растений вблизи фабрик. К морфологическим отклонениям высших растений относят изменение окраски листьев, хлороз, пожелтение, некроз (омертвление), увядание листовой и ее опадание. Разработаны специальные шкалы некрозов, позволяющие оценивать интегральную степень загрязнения данной местности. Морфологические индикаторы на основе лишайников нашли применение в системах экологического мониторинга многих стран. Хорошими примерами таких морфологических индикаторов являются обыкновенный кресс-салат и табак сорта BEL W3, который выведен специально для мониторинга содержания озона в промышленных регионах. Даже малые дозы O_3 в атмосфере вызывают на листьях этого табака некротические пятна. Для сравнения рядом с биотестом высаживают озonoустойчивый сорт табака BEL B. В свою очередь, кресс-салат, выращенный в чашках Петри, служит хорошим тестом на загрязнение почвы и воды. Биологическими параметрами являются длина проростков и корешков, общая масса растений по сравнению с контрольными. Биоиндикацию многолетнего воздействия антропогенных факторов на растительность можно провести измеряя ширину годичных колец у контрольных деревьев. Биологическим индикатором служит также прирост в длину горизонтальных ветвей взрослых деревьев. Несмотря на специфичность отклика этих факторов на воздействие загрязнителей, такой способ позволяет проводить довольно точную биоиндикацию с малыми затратами.

При проведении биологического тестирования на уровне организмов выбор биологических переменных предполагает, что отклик должен коррелировать с изменениями на экосистемном уровне. Выявить такую зависимость на практике достаточно сложно. Однако такие показатели организмов, как рост особей, их продуктивность, выживаемость, состояние органов дыхания, состава крови и плазмы удается использовать для биологического тестирования состояния среды.

При мониторинге природных и сточных вод предприятий оказались удобными фитопланктон, дафнии. Показателем при этом служит выживаемость гидробионта. Для биоиндикации состояния водоемов применяют так называемые рыбные пруды, в которых тест-объектами служат караси и аквариумные рыбы гуппи.

Чувствительность отклика биотестов на содержание биологически активных веществ в испытываемой среде можно проиллюстрировать на примерах. Некоторые микроорганизмы позволяют определять рибофлавин, никотиновую кислоту и другие вещества при их содержании 10^{-7} %. Фолиевая кислота и другие соединения обнаруживаются при более низких концентрациях – до 10^{-10} %. Многие организмы способны аккумулировать (накапливать) химические загрязнители выше их естественного содержания в воде и почве без быстро проявляющихся нарушений. Такая способность тест-организмов оказалась полезной в качестве индикаторного признака загрязнения окружающей среды и используется для аккумулятивной биоиндикации. Этот прием биотестирования применяют при исследовании процессов миграции токсичных веществ в окружающей среде. В качестве тест-организмов выбирают те из них, которые имеют высокий коэффициент биологического накопления (КН) токсикантов из окружающей среды. Фитопланктон, например, имеет значение КН по тяжелым металлам от 10^2 до 10^4 , для полихлорированных бифенилов величина КН достигает $1,7 \cdot 10^5$. Величина КН зависит от природных факторов. Бензпирен в гидробиоте Берингова моря накапливается с КН, равным $2,9 \cdot 10^3$, а в теплых водах Средиземного моря накопление возрастает в пять раз. Знание КН оказалось удобным для глобального и регионального мониторинга окружающей среды. Для оценки загрязнения природных вод кадмием можно использовать результаты анализа его содержания в водорослях, полихлорированными бифенилами Мирового океана – в жировых тканях морских млекопитающих, никелем Средиземного моря – в устрицах. Содержание ртути в почвах региона удобно отследить по накоплению токсиканта в капусте, галогенидов – по иглам сосны, лишайникам. Наконец, лучший индикатор загрязнения автострад свинцом и кадмием – подорожник, растущий вдоль них.

Перечисленные методы не исчерпывают области применения биотестов для оценки загрязнения биосферы и прогноза влияния загрязнителей на живую природу. Несмотря на сложность выявления биологического отклика на воздействие внешних факторов, озабоченность состоянием экологии, очевидно, будет стимулировать дальнейшее развитие этих биоаналитических методов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проблема установления химического состава различных объектов, содержания опасных для здоровья человека компонентов решается различными методами, однако наблюдается стремительный рост так называемых полевых аналитических технологий. Они предполагают все более возрастающее использование в аналитических процедурах биосенсоров [5], химических сенсоров [6] и тест-методов. Эта тенденция связана с необходимостью приблизить источник получения информации о составе среды непосредственно к месту события, по возможности сделать его индивидуальным и экономичным. Можно наблюдать и определенное сходство принципов работы тест-методов и био(химических) сенсоров. Во многих случаях главным отличием этих аналитических методов является то, что в тест-методах измерительным инструментарием выступает глаз человека. Можно ожидать, что потребность в диагностике объектов экологии, медицине, пищевой промышленности приведет к возрастанию роли тест-методов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Золотов Ю.А. Тест-методы // Журн. аналит. химии. 1994. Т. 49, № 2. С. 149.
2. Муравьева С.И., Буковский М.И., Прохорова Е.К. и др. Руководство по контролю вредных веществ в воздухе рабочей зоны: Справ. изд. М.: Химия, 1991. 368 с.
3. Лисичкин Г.В. Химическое модифицирование поверхности минеральных веществ // Соросовский Образовательный Журнал. 1996. № 4. С. 52.
4. Биоиндикация загрязнителей наземных экосистем / Под ред. Р. Шуберта. М.: Мир, 1988. 350 с.
5. Варфоломеев С.Д. Биосенсоры // Соросовский Образовательный Журнал. 1997. № 1. С. 45.
6. Будников Г.К. Что такое химические сенсоры // Там же. 1998. № 3. С. 72.

* * *

Михаил Иванович Евгеньев, доктор химических наук, профессор кафедры аналитической химии Казанского государственного технологического университета. Автор более 200 работ по аналитической химии органических веществ, учебных пособий, изобретений.