

КОВАЛЕНТНЫЙ КОМПЛЕКС ТРИПТОФАН-НАНОАЛМАЗ КАК ЭФФЕКТИВНЫЙ ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫЙ МАРКЕР ОБНАРУЖЕНИЯ ГАЛОГЕНУГЛЕВОДОРОДОВ В РАСТВОРАХ

В. А. Лапина*, Т. А. Павич, Ю. А. Кальвинковская

УДК 535.37:620.3:546.26-162

Институт физики НАН Беларуси,
Минск, Беларусь; e-mail: v.lapina@ifanbel.bas-net.by

(Поступила 11 апреля 2023)

Исследована реакция фототрансформации свободного триптофана (Trp) и в составе комплекса с наночастицами алмаза (НА-Trp) в присутствии галогенуглеводорода (ГУ) — хлороформа — методами стационарной спектроскопии. Установлено, что в присутствии хлороформа облучение растворов УФ-светом приводит к увеличению интенсивности флуоресценции продуктов фототрансформации триптофана (ФТТ) — кинуренина и его производных. В системе НА-Trp увеличение интенсивности интегральной флуоресценции с максимумом при ~460 нм более значительно по сравнению с системой со свободным триптофаном. Изучены оптимальные условия протекания данной реакции. Продemonстрирована применимость реакции ФТТ для обнаружения широко используемых хлорсодержащих углеводородов: арохлора 1254 (стандарт США) и прохлораза, входящего в состав комбинированного фунгицида “Замир”. Предложена новая фотометрическая тест-система для обнаружения ГУ с высокой степенью чувствительности (до 10^{-6} – 10^{-9} М) в реакции ФТТ при облучении УФ-светом.

Ключевые слова: наноразмерный алмаз, гибридный комплекс, фототрансформация триптофана, спектрально-люминесцентные свойства, галогенуглеводороды.

The reaction of phototransformation of free tryptophan (Trp) and as part of a complex with nanodiamond particles (ND-Trp) in the presence of halocarbon (HC) – chloroform was studied by stationary spectroscopy. It was found that in the presence of chloroform, irradiation of solutions with UV radiation leads to an increase in the fluorescence intensity of the phototransformation products of tryptophan (FTT) – kynurenine and its derivatives. At the same time, a more significant increase in the intensity of integral fluorescence with a maximum of ~460 nm was observed in the ND-Trp system than in the system with free tryptophan. Optimal conditions for this reaction were studied. The applicability of the FTT reaction for the detection of widely used chlorine-containing hydrocarbons has been demonstrated: arochlor 1254 (USA standard) and prochlorase, which is part of the combined fungicide “Zamir”. A new photometric test system has been proposed for the detection of a high degree of sensitivity (up to 10^{-6} – 10^{-9} M) in the FTT reaction when irradiated with UV light.

Keywords: nanoscale diamonds, hybrid complexes, tryptophan phototransformation, spectral-luminescent properties, halocarbons.

Введение. Безопасность окружающей среды, а также пищевых продуктов и сельскохозяйственного сырья — основной фактор, определяющий здоровье людей и сохранение генофонда [1–4]. В связи с этим актуальны вопросы, связанные с объективностью контроля загрязнения окружающей среды, в частности, с определением пестицидов, способных аккумулироваться в почве, воде, сырье и продуктах его переработки. Наибольшей токсичностью характеризуются хлорорганические пести-

COVALENT TRYPTOPHAN-NANODIAMOND COMPLEX AS AN EFFECTIVE FLUORESCENT MARKER FOR THE DETECTION OF HALOCARBONS IN SOLUTIONS

V. A. Lapina*, T. A. Pavich, Ju. A. Kalvinkovskaya (B. I. Stepanov Institute of Physics of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus; e-mail: v.lapina@ifanbel.bas-net.by)

циды и продукты их метаболизма, отнесенные к стойким органическим загрязнителям (СОЗ) из-за трудности их деградации [5, 6]. Объединяющим моментом для широкого ряда СОЗ различных химических составов является присутствие галогенуглеводородов (ГУ), среди которых наиболее опасный и распространенный — хлор [7].

Проблема контроля содержания пестицидов в объектах окружающей среды — сложная аналитическая задача, связанная с их низкими концентрациями и процессами взаимодействия с компонентами матрицы. Существуют различные методы их детекции. Среди инструментальных методов контроля хлорорганических пестицидов наиболее распространены хроматографические, обязательно включающие в себя сложные способы пробоподготовки методами твердофазной, жидкостной или сверхкритической флюидной экстракции [8—12]. К недостаткам известных хроматографических методов определения пестицидов следует отнести длительность анализа, необходимость тщательной очистки экстракта, не всегда удовлетворительную селективность и чувствительность, высокую стоимость оборудования и реактивов, наличие высококвалифицированного персонала [13, 14].

Иммунохимические методы анализа, характеризующиеся высокой селективностью и чувствительностью, основаны на гомогенном и гетерогенном связывании определяемого антигена с антителами, что обуславливает высокоспецифичное определение аналита в сложных матрицах. Однако эти методы достаточно сложные и дорогостоящие [15, 16] и не могут быть адаптированы для измерений на месте с целью быстрого обнаружения опасных ГУ в окружающей среде. Поэтому для постоянного контроля и динамики изменения ГУ в окружающей среде (воздухе, воде, почве) наряду с этими высокочувствительными методами используются различные тест-системы, позволяющие на месте отбора проб быстро и достаточно надежно оценить присутствие ГУ [17, 18].

Существуют различные тест-системы индикации ГУ соединений: химические, биологические, биохимические [19—21]. Метод индикации аналитического сигнала может быть как визуальным, так и инструментальным. Несмотря на простоту, эти методы часто недостаточно чувствительны, поэтому актуальны поиск и разработка новых высокочувствительных методов определения ГУ и пестицидов в окружающей среде. Особое место занимают оптические методы, среди которых флуоресцентная спектроскопия является важным инструментом в аналитических исследованиях благодаря надежности, высокой чувствительности и неинвазивности [22].

В настоящей работе поставлена задача разработки высокочувствительного оптического метода определения ГУ в водных средах с использованием нанотехнологических подходов. В основу положены полученные ранее данные об эффекте многократного усиления флуоресценции продуктов фототрансформации триптофана (ФТТ) в присутствии ГУ при облучении [23, 24]. Интенсивность данной флуоресценции при выбранных дозах освещения пропорциональна концентрации ГУ в облученной системе [25]. Влияние ГУ на увеличение флуоресценции триптофанилов подтверждено в многочисленных исследованиях (см., например, [26, 27]).

С целью повышения чувствительности метода выдвинута идея использования наночастиц алмаза (НА) в качестве темплата, на котором сконцентрированы молекулы триптофана (Тр). Частицы НА размером 2—10 нм (первичные частицы) химически стабильны, образуют агрегаты вплоть до микрон, имеют высокую адсорбционную емкость [28]. Частицы НА благодаря развитой химии поверхности и присутствию различных функциональных групп (карбоксильных, гидроксильных, эфирных, аминогрупп и др.) на их поверхности пригодны к разным типам модифицирования (ковалентному, адсорбционному) и являются эффективным стабильным сайтом для иммобилизации необходимых молекул аналита для реализации целевой реакции. Благодаря сорбции Тр на частицах НА многократно увеличивается площадь поверхности, на которой протекают целевые реакции, что способствует увеличению чувствительности метода за счет увеличения общих аналитических характеристик оптического отклика с учетом времени отклика, диапазона линейной калибровки и предела обнаружения ГУ. Межфазовое разделение продуктов реакции окисления Тр также должно способствовать стабильности свойств используемой тест-системы во времени.

Цель данной работы — разработка оптической флуоресцентной тест-системы для обнаружения ГУ в растворах при использовании реакции ФТТ в комплексе с НА.

Эксперимент. Для разработки оптической тест-системы синтезирован органо-неорганический гибридный комплекс Тр с НА (НА-Тр) [29]. Спектры поглощения растворов комплекса НА-Тр в диметилсульфоксиде (ДМСО) в присутствии хлороформа ($1.0 \cdot 10^{-3}$ М) зарегистрированы на двухлучевом спектрофотометре Varian Cary 500 (США). Измерения проведены в кварцевых кюветах толщиной 1 см. Измерения стационарных спектров флуоресценции и возбуждения флуоресценции проведены

с использованием многофункционального спектрофлуориметра Fluorolog-3 (Horiba Scientific, США-Франция-Япония). В стационарных измерениях источником возбуждения флуоресценции служило излучение непрерывной ксеноновой лампы мощностью 450 Вт, которое пропускалось через двойной монохроматор для выделения необходимой длины волны возбуждения. Спектральные измерения проведены в стандартной 90°-ной геометрии при комнатной температуре. В канале регистрации флуоресценции использован дифракционный спектрометр iHR320 (Horiba Scientific) и термоэлектрически охлаждаемый ФЭУ PPD-850 (Horiba Scientific) в качестве детектора. Спектры флуоресценции и возбуждения флуоресценции скорректированы на спектральную чувствительность прибора.

Результаты и их обсуждение. Поскольку химических соединений ГУ чрезвычайно много, тест-системы для экспресс-контроля разрабатывают обычно с классификацией их химического состава (фосфорорганические, хлорорганические, производные карбаминной кислоты и др.) или по объектам применения (гербициды, инсектициды, фунгициды и др.). Основными объектами исследования являются хлорсодержащие углеводороды как одни из самых опасных и распространенных экотоксикантов окружающей среды. В качестве хлорсодержащего углеводорода выбран хлороформ, поскольку он широко используется и входит в состав многих красителей и пестицидов.

Различные ГУ усиливают реакцию ФТТ при освещении. Роль НА в реакции ФТТ в присутствии ГУ изучена в [29]. Исследована фотохимическая трансформация свободного Тр в составе суспензии с частицами НА и в составе гибридного комплекса с ними при воздействии УФ-излучения в присутствии хлороформа. Данные стационарных и времязрешенных спектроскопических исследований показали наличие безызлучательного переноса энергии электронного возбуждения между молекулами Тр и продуктами его фотораспада для случая ковалентного комплекса НА-Тр. Показано, что при переносе энергии увеличивается интенсивность интегральной флуоресценции с максимумом при ~460 нм. Таким образом, ковалентный комплекс НА-Тр может служить эффективным флуоресцентным маркером присутствия ГУ в растворе.

На рис. 1 приведены спектры флуоресценции и возбуждения флуоресценции комплекса НА-Тр в ДМСО в присутствии хлороформа. После облучения появляется широкая интенсивная полоса в диапазоне 400—600 нм с максимумом при ~460 нм, соответствующая флуоресценции продуктов ФТТ (формилкинуруенинов, кинуруенинов и других конечных продуктов фотодегградации Тр). Очевидно, что спектр флуоресценции до облучения имеет значительно меньшую (в ~3 раза) интенсивность флуоресценции. Анализ спектров возбуждения флуоресценции до и после облучения свидетельствует о фотоиндуцированном распаде Тр и образовании новых продуктов фотораспада, облада-

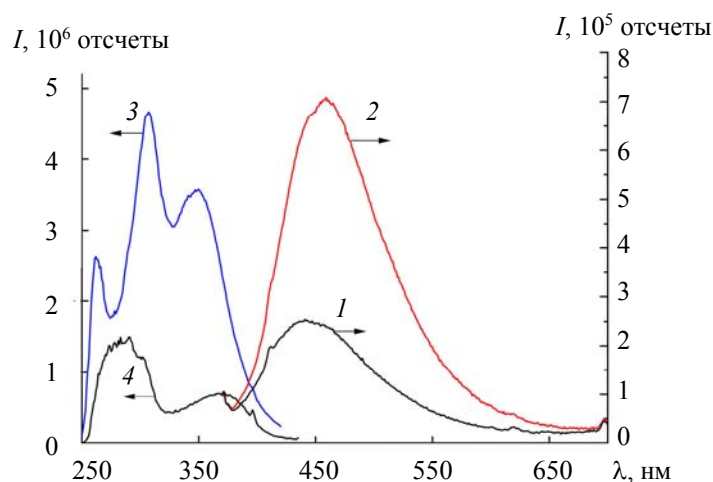


Рис. 1. Спектры флуоресценции ($\lambda_{\text{возб}} = 365$ нм) комплекса НА-Тр в ДМСО в присутствии хлороформа ($1.0 \cdot 10^{-3}$ М) до (1) и после облучения (2); спектры возбуждения флуоресценции ($\lambda_{\text{рег}} = 450$ нм) продуктов ФТТ после облучения в ДМСО в присутствии хлороформа ($1.0 \cdot 10^{-3}$ М) (3) и комплекса НА-Тр в ДМСО до облучения (4)

ющих флуоресценцией вблизи ~ 450 нм. После облучения в спектре возбуждения проявляются три отчетливых максимума: при ~ 265 , 306 и 350 нм. Максимум 306 нм соответствует поглощению Тр в составе комплекса с НА, который после облучения полностью не деградирует. Полосы в спектре возбуждения с максимумами при ~ 265 и ~ 350 нм соответствуют поглощению одного из продуктов фотораспада Тр — кинуренина. При возбуждении вблизи 365 нм проявляется его спектр флуоресценции с максимумом при ~ 460 нм. Наличие в спектре возбуждения достаточно интенсивного максимума при 300 нм, соответствующего поглощению Тр, при регистрации на 450 нм, где флуоресценция Тр незначительна, может служить показателем фотоиндуцированного распада Тр и получения в результате этого возбужденных продуктов фотораспада, обладающих длинноволновой флуоресценцией вблизи ~ 450 нм и выше, либо свидетельствует о переносе энергии возбуждения с молекул Тр на молекулы продуктов его фотораспада.

На рис. 2 представлена зависимость интенсивности флуоресценции продуктов ФТТ на $\lambda = 460$ нм после облучения от времени облучения для растворов Тр и комплекса НА-Тр в ДМСО. Спектральная ширина щели на выходе монохроматора 1.5 нм. Результаты свидетельствуют о том, что реакция ФТТ при облучении тест-системы на основе органо-неорганического гибридного комплекса НА-Тр работает эффективнее (интенсивность флуоресценции возрастает в 2.5 раза), чем с чистым Тр, и протекает в основном до 10 мин. После 10 мин облучения накопление продуктов ФТТ замедляется, аппроксимационная кривая выходит на насыщение. Исходя из полученных данных, накопление продуктов ФТТ, инициированное галогенорганическими соединениями, может регистрироваться по сигналу их флуоресценции при $\lambda = 460$ нм после облучения на $\lambda = 280$ нм при плотности мощности облучения ~ 8 мВт/см². Оптимальное время УФ-облучения 10 мин, что соответствует дозе УФ-излучения 1.4 Дж/см². Для практического использования предлагаемой оптической тест-системы индикации хлорорганики исследована ее стабильность во времени.

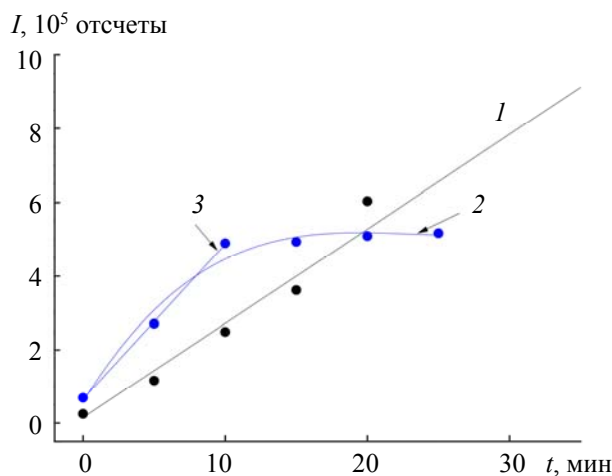


Рис. 2. Зависимость интенсивности флуоресценции продуктов ФТТ на $\lambda = 460$ нм после облучения от времени облучения для растворов Тр (1) и комплекса НА-Тр в ДМСО (2, 3) в присутствии хлороформа ($1.0 \cdot 10^{-3}$ М); 2 — аппроксимация, 3 — линейная аппроксимация возрастающего участка по методу наименьших квадратов

На рис. 3 и 4 приведены спектры поглощения и флуоресценции комплекса НА-Тр в ДМСО через разные временные промежутки до и после воздействия УФ-светом спустя 1, 3, 24 ч и 1 сут. Все образцы хранились в темноте. Исследуемая тест-система на основе гибридного комплекса НА-Тр стабильна, не изменяет своих свойств, проста, удобна в эксплуатации и позволяет проводить измерения по крайней мере в течение 1 сут.

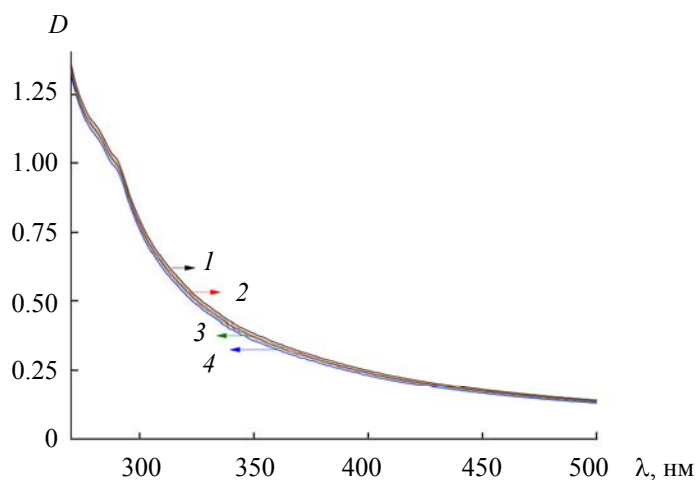


Рис. 3. Спектры поглощения раствора комплекса НА-Тр в ДМСО в присутствии хлороформа ($1.0 \cdot 10^{-3}$ М) до облучения (1) и спустя 1 (2), 3 (3) и 24 ч (4) после приготовления образцов

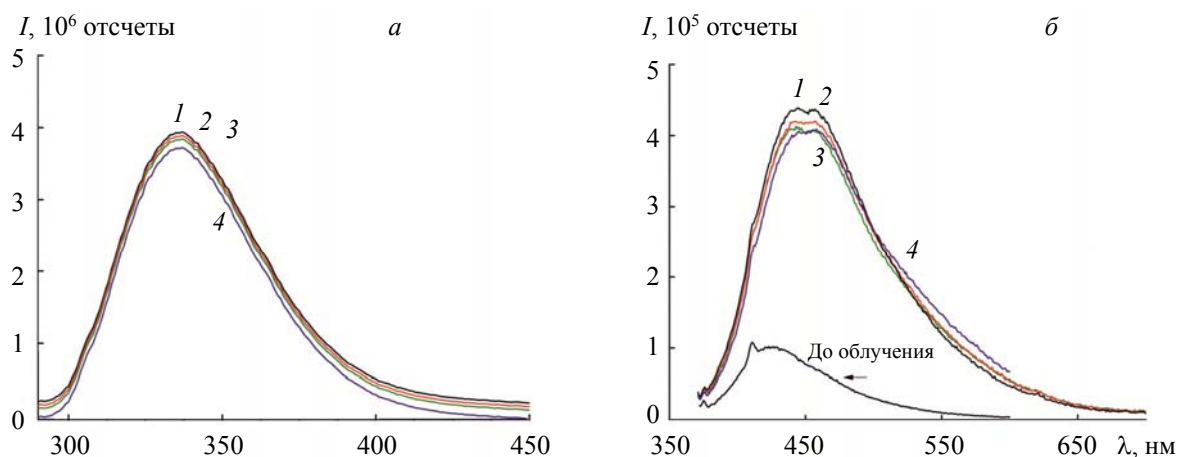


Рис. 4. Спектры флуоресценции раствора комплекса НА-Тр в ДМСО в присутствии хлороформа ($1.0 \cdot 10^{-3}$ М): а — до облучения, $\lambda_{\text{возб}} = 280$ нм; б — после облучения, $\lambda_{\text{возб}} = 365$ нм; 1 — исходный раствор, спустя 1 (2), 3 (3) и 24 ч (4) после приготовления образцов

Применимость данной реакции ФТТ для обнаружения хлорсодержащих углеводов протестирована на арохлоре 1254 (рис. 5), содержащем 54 % хлора со средним числом атомов хлора в его молекуле 4,9, средней молекулярной массой 324, применяющемся в качестве стандарта при определении полихлорированных бифенилов или дифенилов (стандарт США), и прохлоразе, который входит в состав комбинированного фунгицида “Замир” (применяется против широкого спектра заболеваний, повреждающих фрукты, овощи и полевые культуры). Среди СОЗ полихлорированные бифенилы — одни из самых распространенных и по определению UNEP (United Nations Environmental Project) входят в “грязную дюжину”, запрещенную Стокгольмской конвенцией 2002 года, контроль которых в окружающей среде чрезвычайно актуален [30, 31]. Исследована флуоресценция растворов комплекса НА-Тр в ДМСО, содержащих арохлор 1254 концентраций $0.3 \cdot 10^{-3}$ — $2.0 \cdot 10^{-6}$ М, до и после облучения. Видно, что реакция высокочувствительна к присутствию арохлора 1254 в системе. Так, после облучения значительно увеличивается флуоресценция с максимумом при 460 нм, что указывает на накопление продуктов ФТТ. Достаточно высокая интенсивность флуоресценции продуктов ФТТ в присутствии арохлора 1254 при концентрации $2.0 \cdot 10^{-6}$ М свидетельствует о том, что тест-систему можно использовать для индикации еще более низких концентраций арохлора 1254.

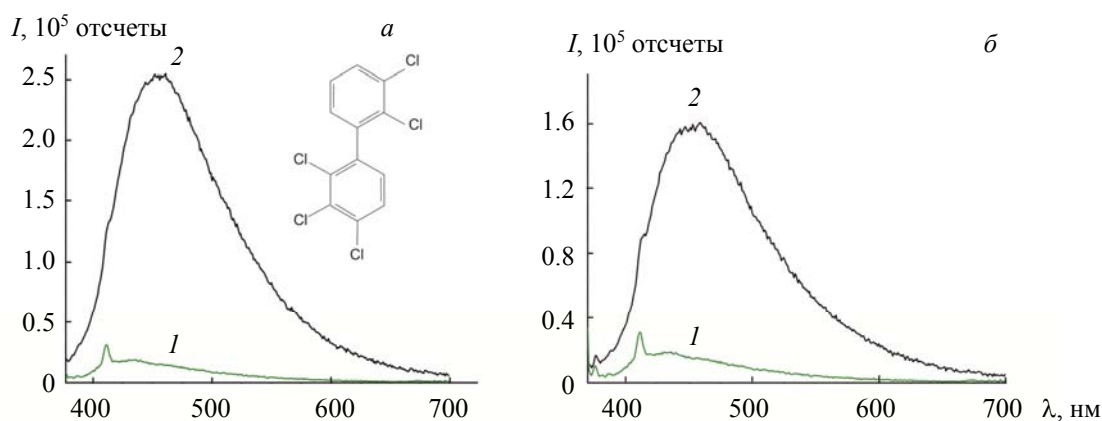


Рис. 5. Спектры флуоресценции растворов комплекса НА-Тр в ДМСО, содержащих арохлор 1254 концентраций $0.3 \cdot 10^{-3}$ (а) и $2.0 \cdot 10^{-6}$ М (б), до облучения (1) и после облучения (2); $\lambda_{\text{возб}} = 365$ нм

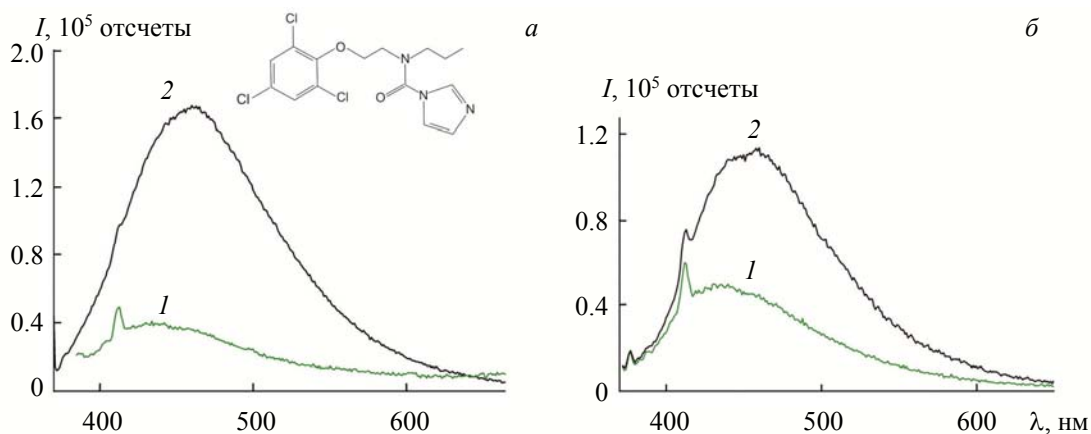


Рис. 6. Спектры флуоресценции растворов комплекса НА-Тр в ДМСО, содержащих прохлораз концентраций $0.5 \cdot 10^{-3}$ (а) и $1.3 \cdot 10^{-6}$ М (б), до облучения (1) и после облучения (2); $\lambda_{\text{возб}} = 365$ нм

На рис. 6 приведены спектры флуоресценции растворов комплекса НА-Тр в ДМСО в присутствии прохлоразы концентраций $0.5 \cdot 10^{-3}$ и $1.3 \cdot 10^{-6}$ М. Для тест-системы, содержащей прохлораз, после облучения УФ-светом также появлялась широкая интенсивная полоса флуоресценции в диапазоне 400—600 нм с максимумом при 460 нм, соответствующая продуктам ФТТ. Высокая интенсивность флуоресценции продуктов ФТТ для раствора комплекса НА-Тр в ДМСО, содержащего прохлораз концентрации $\sim 1.3 \cdot 10^{-6}$ М, свидетельствует о том, что данную тест-систему на основе гибридного комплекса можно использовать для индикации еще более низких концентраций хлорорганического загрязнителя — прохлоразы. Следует отметить, что арохлор 1254 и прохлораз не обладают способностью к флуоресценции, о чем свидетельствуют их спектры возбуждения и испускания флуоресценции, которые идентичны и имеют низкую интенсивность до и после облучения.

Закключение. Продемонстрирована эффективность обнаружения галогенуглеводородов с высокой степенью чувствительности (до 10^{-6} моль/л и ниже) в реакции фототрансформации триптофана в составе наноалмазного комплекса при облучении УФ-светом. Разработанная тест-система представляет собой раствор, состоящий из растворителя (ДМСО), органо-неорганического ковалентного наноконплекса триптофан—алмазные наночастицы, источника УФ-облучения (светодиода), анализируемого галогенуглеводорода. Система проста, эффективна, позволяет определять наличие галогенуглеводородов с высокой чувствительностью и быстротой, не требует специальной пробоподготовки, длительного времени проведения анализа, дорогостоящего оборудования и реактивов. Предлагается простой, эффективный оптический метод индикации аналитического сигнала с высоким пределом

чувствительности для оценки содержания галогенуглеводородов. Реализация данного метода основана на новом инновационном нанотехнологическом подходе с использованием алмазных наночастиц. Предложенные тест-системы могут применяться для экспресс-контроля тестируемых органических соединений в различных объектах окружающей среды. Разработанная оптическая тест-система обнаружения галогенуглеводородов является инновационной, может быть легко освоена в местах контроля и мониторинга галогенсодержащих загрязнителей окружающей среды.

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № Ф20ГРМГ-003).

- [1] **М. И. Лунев.** Рос. хим. журн., № 3 (2005) 64—70
- [2] **А. Н. Панин.** Рос. хим. журн., № 3 (2005) 71—82
- [3] **Н. Н. Мельников, Г. М. Мельникова.** Сорос. образ. журн., № 4 (1997) 33—37
- [4] **P.-Y. Liu, M.-H. Zheng, X.-B. Xu.** Chemosphere, **46** (2002) 1191—1193
- [5] **Н. А. Ключев.** Диоксины и супертоксиканты XXI века, **3**, Москва, Ин-т науч. и тех. информации (2001) 64—70
- [6] <http://caresd.net/site.html>
- [7] <https://silur.prom.ua/ua/p5215485-hloroform-pet.html>
- [8] **M. Lopez-Mesas.** Analysis, **28** (2000) 159—162
- [9] **A. L. Lohninger, M. Linhart, D. Landau.** J. Anal. Chem., **133** (1989) 83—96
- [10] **V. Andreu, Y. Pico.** Trends Anal. Chem., **23** (2004) 772—789
- [11] **T. Sun, J. Jia, D. Zhong, Y. Wang.** Anal. Sci., **22** (2006) 293—298
- [12] **A. B. Vega, A. G. Frenich, J. L. Martinez Vidal.** Anal. Chim. Acta, **538** (2005) 117—127
- [13] **W. A. Heidman.** Chromatographia, **71** (1986) 363—372
- [14] EPA Method 1668. Chlorinated Biphenyls Congeners in Water, Soil, Sediment, and Tissue by HRGC/HRMS (1999) 100—133
- [15] **M. M. Colum, Ch. S. Henry.** Analyst, **131** (2006) 1091—1093
- [16] **S. A. Eremin, D. S. Smith.** Comb. Chem. High Throughput Screen., **6** (2006) 79—99
- [17] **В. Н. Майстренко, Н. А. Ключев.** Эколого-аналитический мониторинг стойких органических загрязнителей, Москва, БИНОМ, Лаборатория знаний (2004) 150—178
- [18] **Ю. А. Золотов.** Вестн. РАН, **67**, № 6 (1997) 508—513
- [19] **Ю. А. Золотов, В. М. Иванов, В. Г. Амелин.** Химические тест-методы анализа, Москва, Едиториал УРСС (2006) 51—59
- [20] **В. В. Зырянов, М. Д. Гольдфейн.** Эколог. химия, № 11 (2002) 45—53
- [21] **U. S. Rathore, S. R. Sharma, S. Mital.** Water, Air, Soil Poll., **97** (1997) 431—441
- [22] **J. R. Lakowicz.** Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3rd ed., Springer, Berlin-Heidelberg (2006) 63—94
- [23] **A. V. Vorobey, Ye. A. Chernitskii, S. V. Konev.** Biophysics, **371** (1992) 743—745
- [24] **С. В. Пинчук, А. В. Воробей.** Журн. прикл. спектр., **70** (2003) 53—56 [**S. V. Pinchuk, A. V. Vorobey.** J. Appl. Spectr., **70** (2003) 53—56]
- [25] **J. C. Merlin, S. Turrell, J. P. Huvenne.** Spectroscopy of Biological Molecules, Springer, Dordrecht (1995) 609—610
- [26] **Norio Ogata.** Biochemistry, **46** (2007) 4898—4911
- [27] **C. L. Ladner, K. Tran, M. La.** Photochem. Photobiol., **90** (2014) 1027—1033
- [28] **V. A. Lapina, T. M. Gubarevich, G. S. Akhremkova, Yu. Schreiber.** Russ. J. Phys. Chem. A, **84**, N 2 (2010) 267—271
- [29] **Ю. А. Кальвинковская, Т. А. Павич, А. А. Романенко, С. Б. Бушук, А. Н. Собчук, В. А. Лапина.** Опт. и спектр., **130**, № 11 (2022) 1646—1652 [**Ju. A. Kalvinkovskaya, T. A. Pavich, A. A. Ramanenka, S. B. Bushuk, A. N. Sobchuk, V. A. Lapina.** Opt. and Spectrosc., **130**, N 11 (2022) 1386—1391]
- [30] **Н. А. Ключев, Е. С. Бродский.** Инф. вып. ВИНТИ, Москва, № 5 (2007) 31—63
- [31] **R. H. Boyle, J. H. Highland.** Environment, **21**, N 5 (1979) 6—8