

АЛЕКСЕЕНКО Антон Николаевич

**РАЗРАБОТКА МЕТОДИЧЕСКОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ КОНТРОЛЯ
СОДЕРЖАНИЯ ХЛОРОРГАНИЧЕСКИХ ТОКСИКАНТОВ
ПРОИЗВОДСТВА ПОЛИВИНИЛХЛОРИДА И ИХ МЕТАБОЛИТА В
БИОЛОГИЧЕСКИХ СУБСТРАТАХ**

Специальность 02.00.02 – аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата химических наук

Иркутск-2013

Работа выполнена в Ангарском филиале ФГБУ «ВСНЦ ЭЧ» СО РАН
– Научно-исследовательский институт медицины труда и экологии человека
и федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего
профессионального образования «Иркутский государственный университет»

- Научный руководитель:** кандидат химических наук, доцент
Королёва Галина Николаевна
- Научный консультант:** доктор биологических наук, профессор,
Дорогова Варвара Борисовна
- Официальные оппоненты:** доктор химических наук, профессор
Евстафьев Сергей Николаевич
(Национальный исследовательский Иркутский
государственный технический университет, кафедра
химии и пищевой технологии, заведующий кафедрой)
- кандидат химических наук
Фёдорова Галина Афанасьевна
(Лимнологический институт СО РАН, лаборатория
хроматографии, старший научный сотрудник)
- Ведущая организация:** федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
профессионального образования «Ангарская
государственная техническая академия»

Защита состоится «27» марта 2013 г. в 10⁰⁰ часов на заседании диссертационного
совета Д 212.074.03 при Иркутском государственном университете по адресу: г.
Иркутск, ул. Лермонтова. 126, химический факультет, ауд.430

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Иркутского
государственного университета, с авторефератом – на сайте ИГУ [http:// www.isu.ru/](http://www.isu.ru/)

Отзывы на автореферат в двух экземплярах с подписью составителя, заверенные
печатью организации, просим направлять на имя учёного секретаря
диссертационного совета по адресу: 664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1, ИГУ,
химический факультет.

Автореферат разослан «__» января 2013 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
д-р хим. наук, профессор



Л.Б. Белых

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Актуальность работы. Разработка химико-аналитических методик определения высокотоксичных веществ и продуктов их трансформации (метаболитов) в биологических субстратах человека (кровь и моча) при гигиенических исследованиях является чрезвычайно актуальной задачей. Надёжные способы выявления факта воздействия токсичных веществ и оценки уровня экспозиции необходимы как компонент медицинских мероприятий для предупреждения профессиональных и производственно-обусловленных заболеваний. До настоящего времени не разработано документов, обобщающих и регламентирующих подходы к идентификации и определению токсичных соединений и продуктов их метаболизма в биологических средах.

Крупным производителем поливинилхлорида (ПВХ) в России является ОАО “Саянскимпласт”, который обеспечивает до 40 % общего объёма его выработки, и входит в число 200 крупнейших компаний страны. Винилхлорид и 1,2-дихлорэтан - основные хлорорганические соединения в воздухе рабочей зоны производства ПВХ, характеризующиеся преобладанием поражения нервной системы и паренхиматозных органов, гемодинамическими расстройствами, канцерогенезом. Конечным метаболитом винилхлорида и 1,2-дихлорэтана в процессе их биотрансформации в организме является тиодигликолевая кислота (ТДГК). Доказано, что ТДГК является биомаркёром воздействия винилхлорида и 1,2-дихлорэтана на организм, так как после воздействия данных токсикантов её доля в моче животных составляет 50 % от всех метаболитов.

Перспективным методом определения вышеуказанных органических соединений является газожидкостная хроматография (ГЖХ), которая применяется в качестве базового метода в большинстве лабораторий, специализирующихся в области аналитической токсикологии. Однако публикации, посвящённые газохроматографическому анализу биологических субстратов на содержание винилхлорида, 1,2-дихлорэтана и тиодигликолевой кислоты весьма немногочисленны, и в них не рассматриваются общеметодические вопросы.

Определение токсичных органических соединений в биологических матрицах методом ГЖХ относится к сложным аналитическим задачам, так как многокомпонентность биологических объектов и присутствие в них определяемых компонентов на следовом уровне концентраций обуславливает трудности подготовки проб и анализа. Подготовка проб включает тщательно извлечение и концентрирование этих веществ с использованием больших расходов органических растворителей, что иногда сопровождается значительными потерями определяемых компонентов. Газохроматографическое определение гидрофильной ТДГК, содержащей в молекуле две карбоксильные группы с активными атомами водорода, требует обязательного получения её летучих производных, что ещё больше усложняет процедуру подготовки проб. Кроме того, для устранения мешающего влияния органического растворителя и других сопутствующих компонентов при хроматографическом разделении

экстракта необходима разработка оптимального режима газожидкостной хроматографии. Целесообразно применять индивидуальный подход к выбору газохроматографических условий (колонки, температурного режима, способа ввода образца в колонку, детектора) для достижения компромисса между скоростью, чувствительностью и разрешением хроматографического анализа.

Цель работы.

Создание методического обеспечения химико-аналитического контроля винилхлорида и 1,2-дихлорэтана в крови, тиодигликолевой кислоты в моче. Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие **задачи**:

1. Разработать оптимальный режим газо-жидкостной хроматографии;
2. Оптимизировать процедуру подготовки проб биологических образцов;
3. Оценить метрологические характеристики методик: повторяемость, внутрिलाбораторная прецизионность, правильность и точность;
4. Апробировать разработанные методики при анализе биологических образцов лиц, занятых в производстве поливинилхлорида (ОАО Саянскхимпласт).

Научная новизна

1. Для извлечения винилхлорида и 1,2-дихлорэтана из крови предложено парофазное концентрирование вместо жидкостно-жидкостной экстракции, что даёт возможность устранить мешающее влияние органического растворителя.
2. Для повышения чувствительности определения тиодигликолевой кислоты и более полного извлечения её из пробы мочи предложено сначала проводить дериватизацию тиодигликолевой кислоты, а затем жидкостно-жидкостную микроэкстракцию деривата тиодигликолевой кислоты.
3. Для реализации жидкостно-жидкостной микроэкстракции и её совмещения с газохроматографическим анализом экстракта разработана схема пробоподготовки, основанная на выполнении всех её этапов в одной ёмкости, что позволяет уменьшить потери определяемого компонента и упростить проведение этого этапа анализа.
4. Разработаны и аттестованы методики определения содержания винилхлорида и 1,2-дихлорэтана в крови, тиодигликолевой кислоты в моче методом газожидкостной хроматографии.

Практическая значимость состоит в повышении эффективности контроля содержания токсичных веществ в биологических средах (кровь и моча) благодаря увеличению чувствительности определения и сокращению времени анализа за счёт новой пробоподготовки. Внедрение разработанных методик улучшит качество и метрологические характеристики аналитического контроля при исследовании биологических сред у лиц, работающих в контакте с винилхлоридом и 1,2-дихлорэтаном.

1. Методика определения винилхлорида и 1,2-дихлорэтана в крови методом газохроматографического анализа равновесного пара аттестована в ФГУП «УНИИМ» (Свидетельство об аттестации № 224.0036/01.00258/2010) и внесена в государственный федеральный реестр методик РФ (ФР.1.39.2012.11608).

2. Методика определения тиодигликолевой кислоты в моче методом капиллярной газожидкостной хроматографии аттестована в центре метрологии и сертификации “Сертимет” УрОРАН (Свидетельство об аттестации № 88-16374-201-01.00076-2012).

3. Методики используются в Ангарском филиале ФГБУ “ВСНЦ ЭЧ” СО РАМН – НИИ Медицины труда и экологии человека при определении винилхлорида и 1,2-дихлорэтана у лиц, работающих в производстве поливинилхлорида ОАО “Саянскхимпласт”. Проект документов методик направлен для утверждения в комиссию по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Подана заявка № 2011135103/15(052018) на получение патента “Способ количественного определения тиодигликолевой кислоты в моче” от 29 августа 2011 г.

Работа выполнена в рамках фундаментальной темы НИР – Изучение механизмов формирования поражений нервной системы при воздействии производственных нейротоксикантов разной химической природы. 2008 – 2012 гг., № государственной регистрации – 01200803591.

Положения, выносимые на защиту

1. Обоснование выбора газохроматографического анализа винилхлорида и 1,2-дихлорэтана на стандартной насадочной колонке.
2. Обоснование выбора газохроматографического анализа экстракта диметилового эфира ТДГК.
3. Способ подготовки проб крови, основанный на парофазном концентрировании.
4. Способ подготовки проб мочи, основанный на дериватизации ТДГК в моче метанолом с серной кислотой, извлечение диметилового эфира ТДГК жидкостно-жидкостной микроэкстракцией этилацетатом.

Личный вклад автора в диссертационную работу выразился в создании методики определения винилхлорида и 1,2-дихлорэтана в крови и тиодигликолевой кислоты в моче методом газо-жидкостной хроматографии. Разработка плана исследования, интерпретация и обобщение полученных результатов, подготовка публикаций по теме диссертации, формулировка выводов выполнены совместно с научным руководителем. Принадлежность указанных научных результатов лично соискателю признана всеми соавторами и научным руководителем.

Апробация работы

Основные результаты работы были представлены на следующих конференциях: ежегодная научно-теоретическая конференция аспирантов и студентов ИГУ (21 – 22 мая 2009 г, г. Иркутск); всероссийская конференция “Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез” (26 сентября – 1 октября 2010 г., Краснодар); VI международная научно-практическая конференция студентов, аспирантов и молодых учёных “Научное творчество XXI века” (30 октября 2012 г., Красноярск).

Публикации. По материалам исследований опубликовано 7 научных работ в виде статей и тезисов докладов, из них 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК.

Объём и структура работы. Диссертационная работа состоит из введения, 4 глав, заключения, списка сокращений, списка литературы (88 наименований). Работа изложена на 130 страницах машинописного текста, содержит 32 таблицы, 56 рисунков и приложение.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю к.х.н. Королёвой Г.Н. и научному консультанту д.б.н. и к.х.н. Дороговой В.Б. за постановку задачи исследования и первые навыки в области газожидкостной хроматографии, а также к.б.н. Журба О.М. за помощь при постановке и проведении эксперимента.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

В первой главе представлен обзор существующих методов анализа и способов подготовки проб сложных объектов, в том числе и биологических сред (кровь и моча) для оценки содержания органических соединений, проведён их сравнительная оценка, показаны сложности газохроматографического анализа биологических сред и их пробоподготовки. В итоге сделаны следующие выводы:

Газожидкостная хроматография благодаря своим преимуществам: высокой чувствительности, высокой разрешающей способности, малому количеству вещества, необходимого для его количественного определения лучше всего подходит для решения поставленной задачи.

Парофазное концентрирование благодаря простоте исполнения, достаточно хорошей воспроизводимости, отсутствия применения органического растворителя, отсутствия мешающего влияния неорганических и нелетучих соединений является наиболее подходящим для извлечения летучих хлорорганических соединений из биологических сред.

Дериватизацию ТДГК целесообразнее осуществлять непосредственно в биологической матрице (моче) метанолом в присутствии серной кислоты для получения летучего гидрофобного диметилового эфира ТДГК с последующим его более полного извлечения органическим экстрагентом. Жидкостно-жидкостная микроэкстракция, требующая малого количества экстрагента без необходимости его дальнейшего упаривания, является лучшим методом извлечения гидрофобных органических соединений.

Вторая глава посвящена разработке методики определения винилхлорида и 1,2-дихлорэтана в крови методом газохроматографического анализа равновесного пара.

Выбор оптимального режима газожидкостной хроматографии

На примере газохроматографического анализа равновесной паровой фазы над стандартным водным раствором ВХ и ДХЭ (1 мкг/см³) показано, что в изотермическом режиме (90 °С) с электронно-захватным детектированием на хроматограмме сначала выходит неудерживаемое вещество (вода или

кислород), а затем 1,2-дихлорэтан в виде широкого и несимметричного пика. Пик винилхлорида отсутствует (рисунок 1).

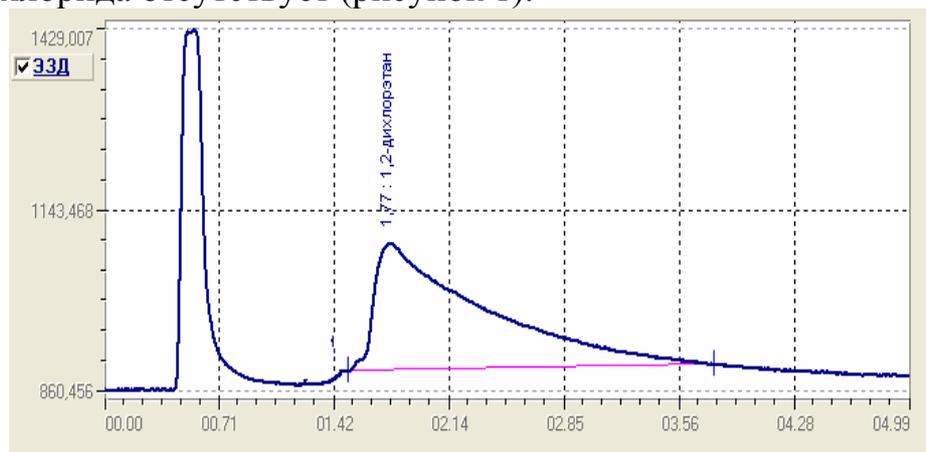


Рисунок 1 – Хроматограмма равновесного пара над стандартным раствором винилхлорида и 1,2-дихлорэтана на колонке OV-17 с ЭЗД

Отсутствие пика винилхлорида связано со слабой его интенсивностью и перекрыванием с пиком неудерживаемого вещества, что обусловлено наличием в молекуле ВХ одного атома хлора, а детектор ЭЗД обладает высокой чувствительностью к соединениям, содержащим в своей молекуле более чем два атома галогена. Асимметрия пика 1,2-дихлорэтана связана, вероятно, с плохой десорбцией 1,2-дихлорэтана с жидкой неподвижной фазы “OV-17” или химическим воздействием паров воды и воздуха на жидкую фазу “OV-17”. По этой причине осуществлялся газохроматографический анализ равновесного пара с пламенно-ионизационным детектированием, при котором в изотермическом режиме (90 °С) на колонке с НЖФ “Apiezon L” время разделения составляет 3 мин и отмечается высокая селективность нешироких и симметричных пиков винилхлорида и 1,2-дихлорэтана (рисунок 2).

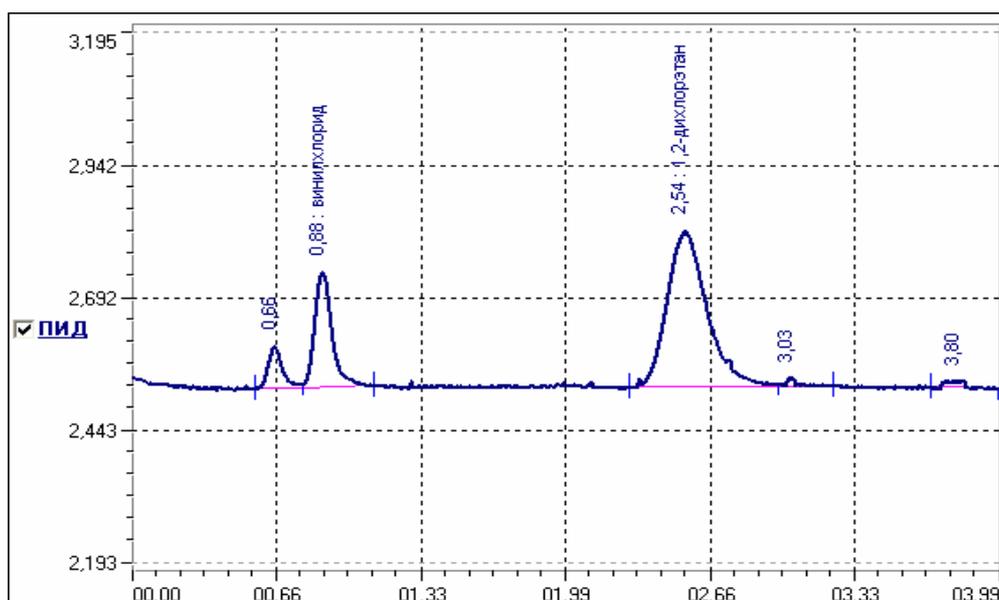


Рисунок 2 – Хроматограмма равновесного пара над стандартным раствором ВХ и ДХЭ в воде на колонке Apiezon L с ПИД

Рассчитаны следующие хроматографические параметры: фактор удерживания, эффективность колонки, фактор разделения и разрешающая способность (таблица 1).

Таблица 1 – Основные хроматографические параметры разделения ВХ и ДХЭ на колонке Ariezon L

Параметр	винилхлорид	1,2-дихлорэтан
Ширина пика на полувысоте, с	6	12
Фактор удерживания k	0.34	2.9
Фактор разделения α	3	
Эффективность колонки N, т.т	350	800
ВЭТТ, мм	5	2
Разрешающая способность R	3.5	

Низкие значения фактора удерживания ($k < 1$), эффективности колонки ($N = 350$) и соответственно большое значение ВЭТТ (5 мм) по винилхлориду говорят о том, что данное соединение очень слабо удерживается жидкой неподвижной фазой “Ariezon L” при температуре колонки 90 °С, т.е. выходит в мёртвом объёме колонки. Несмотря на это, разделение винилхлорида и 1,2-дихлорэтана характеризуется приемлемыми значениями разрешающей способности ($R > 2$) и фактора разделения ($\alpha > 1$). Слабая удерживаемость винилхлорида и высокая селективность разделения с 1,2-дихлорэтаном объясняются значительной разницей их температур кипения (-13,4 °С и 83 °С) и относительных молекулярных масс (62.5 и 99).

Оптимизация условий парофазного концентрирования

При парофазном концентрировании, которое является лимитирующей стадией в парофазном газохроматографическом анализе, для достижения высокой точности и чувствительности необходимо поддерживать постоянными следующие факторы: соотношение объемов жидкой и паровой фаз, температуру и время установления межфазового равновесия при нагревании. Для выбора последних двух факторов получены зависимости высоты пика каждого анализа от температуры и продолжительности термостатирования. при однократном отборе паровоздушной фазы.

Рост высоты пика ВХ с увеличением температуры наблюдается в интервале 20 – 60 °С, а после 60 °С происходит его спад. Резкий спад высоты пика винилхлорида обусловлен снижением содержания в паровоздушной фазе. Уменьшение содержания ВХ в паровоздушной фазе объясняется процессом его полимеризации при температуре нагревания более чем 60 °С. Увеличение высоты пика ДХЭ идёт с ростом температуры от 20 до 40 °С, после 40 °С высота пика ДХЭ не изменяется (рисунок 3).

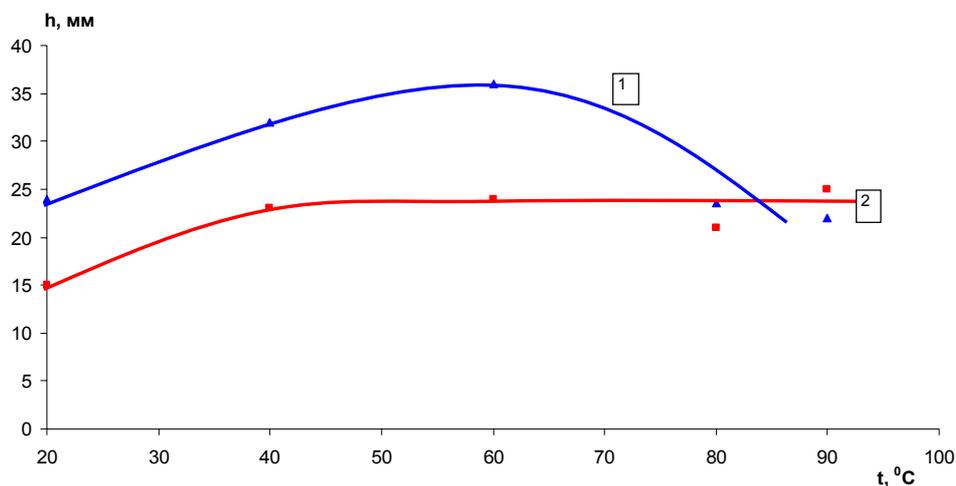


Рисунок 3 – Зависимость высоты хроматографического пика ВХ (1) и ДХЭ (2) от температуры нагревания (концентрации 1 мкг/см³)

Зависимость высоты пика от времени установления межфазового равновесия при температуре 60 °С демонстрирует рисунок 4.

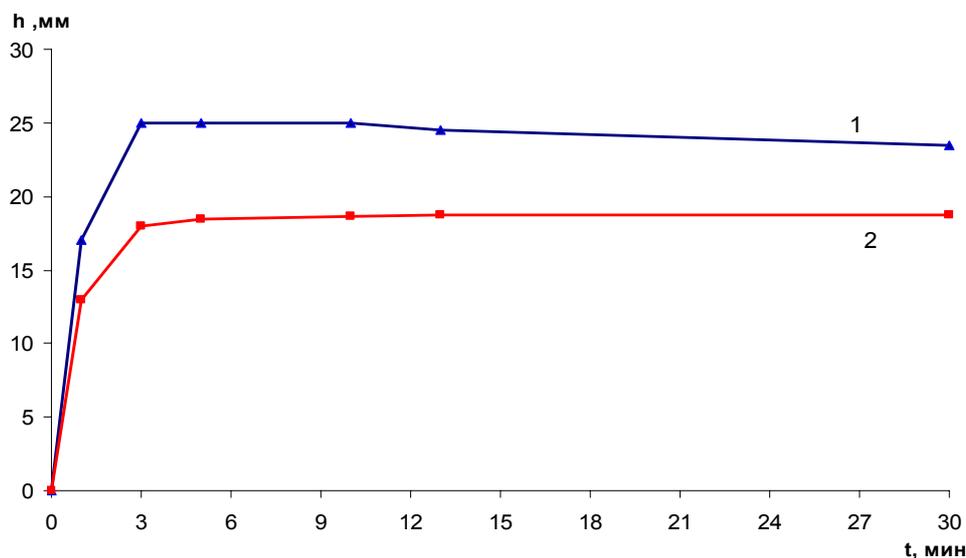


Рисунок 4 – Зависимость высоты хроматографического пика h ВХ (1) и ДХЭ (2) от продолжительности t парофазного концентрирования

Увеличение высот пиков определяемых компонентов наблюдается в интервале 1 – 3 мин, постоянство которых для ВХ и ДХЭ после 3 мин связано с достижением межфазового равновесия. Таким образом, оптимальным режимом парофазного концентрирования является нагревание образца в замкнутом объеме при температуре 60 °С в течение 3 мин.

Дисперсионный анализ погрешности парофазного анализа

Параллельные определения ВХ и ДХЭ в образцах крови можно выполнять в двух вариантах: подготовки проб двух одинаковых образцов с последующим однократным газохроматографическим анализом равновесного пара; подготовка пробы одного образца с последующим двукратным

газохроматографическим анализом равновесного пара этого образца. Был поставлен эксперимент по схеме однофакторного дисперсионного анализа, который позволяет оценить вклад погрешности паровоздушного концентрирования ($V_{пк}$) и погрешности нестабильности паровой фазы ($V_{н}$) в суммарную погрешность паровоздушного анализа ($V_{пфа}$) (таблица 2).

Таблица 2 – Результаты дисперсионного анализа

погрешность	винилхлорид	1,2-дихлорэтан
$V_{пк}, \%$	11	7.6
$V_{н}, \%$	11	17
$V_{пфа}, \%$	19.5	20

Как показали результаты дисперсионного анализа, в случае винилхлорида погрешности равны друг другу. Поэтому параллельные (единичные) измерения можно проводить, двукратно анализируя паровоздушную фазу из одного флакона.

Однако в случае с ДХЭ погрешность нестабильности превышает погрешность паровоздушного концентрирования. Превышение погрешности нестабильности объясняется тем, что концентрация 1,2-дихлорэтана в паровой фазе после первого отбора паровоздушной фазы резко изменяется. Такое резкое изменение содержания ДХЭ в паровой фазе связано с неполнотой извлечения данного соединения из жидкой фазы в паровоздушную фазу. Анализируя сказанное, можно сделать следующий вывод: параллельные измерения целесообразно проводить между двумя одинаковыми образцами с последующим однократным газохроматографическим анализом равновесного пара каждого образца.

Идентификация и количественное определение

ВХ и ДХЭ идентифицировали по абсолютным временам удерживания, характеризующиеся хорошей повторяемостью ($V_r = 1.6 \%$). Количественное определение ВХ и ДХЭ в крови осуществляли способом абсолютной градуировки по пяти аттестованным смесям (АС) компонентов в крови в диапазоне $0.05 - 2 \text{ мкг/см}^3$ для ДХЭ и $0.07 - 5 \text{ мкг/см}^3$ для ВХ.

Третья глава посвящена разработке методики определения тиодигликолевой кислоты в моче методом капиллярной газо-жидкостной хроматографии.

Разработка оптимального режима газожидкостной хроматографии для тиодигликолевой кислоты

Ввиду того, что тиодигликолевая кислота (ТДГК) хроматографируется в виде её диметилового эфира, разработку оптимального режима ГЖХ осуществляли с помощью стандартной смеси диметилового эфира ТДГК в этилацетате. Опробовали несколько комбинаций температурных режимов (изотермический режим и режим с градиентом температуры) со способами введения образца в колонку (с делением потока – “split”, импульсный ввод с делением потока, без деления потока – “splitless”) на двух капиллярных колонках различной длины и полярности. Установлено, что именно в условиях

градиента температуры и в режиме введения образца в колонку “splitless” достигаются оптимальные разделение компонентов смеси и чувствительность определения (рисунок 5).

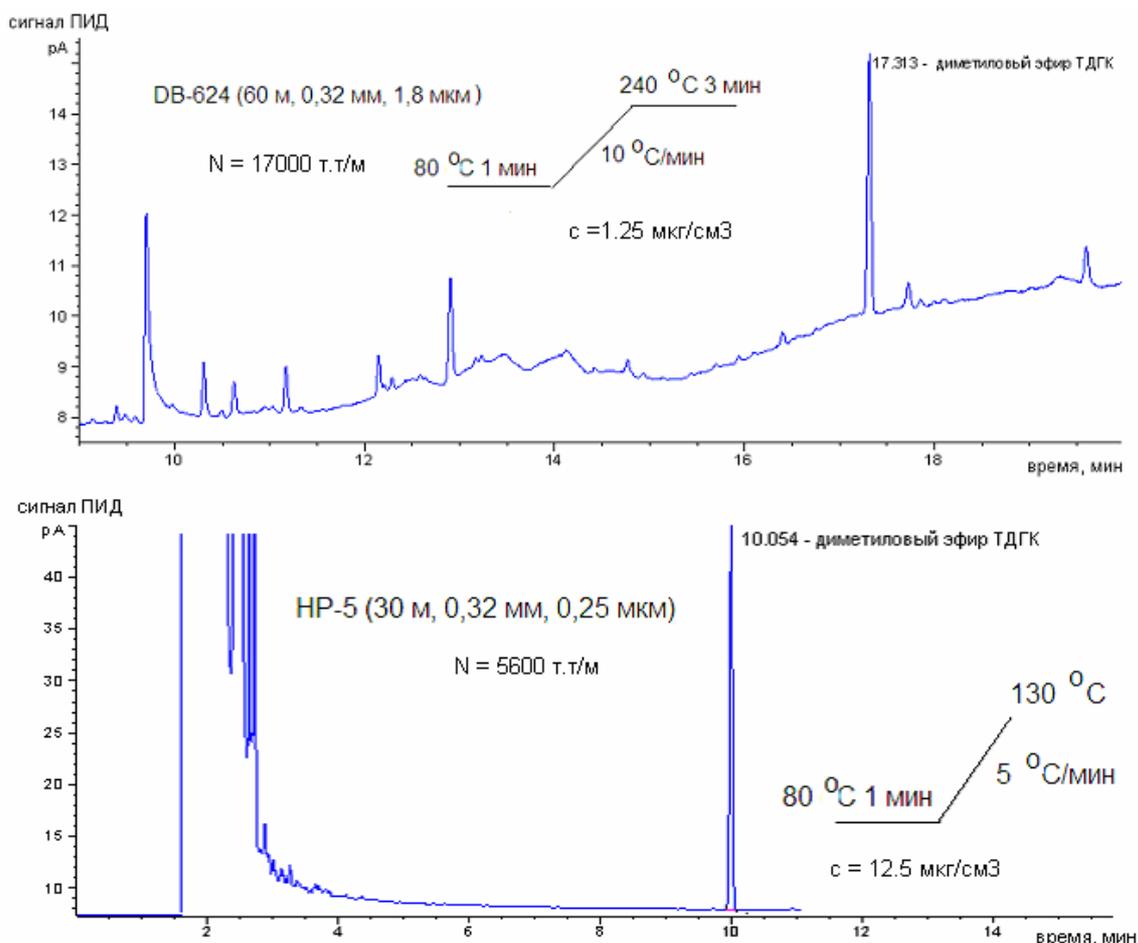


Рисунок 5 – Хроматограммы смеси диметилового эфира ТДГК в этилацетате на двух капиллярных колонках

Максимальная эффективность имеет место на колонке DB-624. Зато продолжительность анализа на колонке HP-5 в 1.6 раз меньше продолжительности анализа на колонке DB-624. Высокая эффективность колонки DB-624 и большое время анализа объясняются её длиной и толщиной плёнки НЖФ, превышающие длину колонки HP-5 в 2 раза и толщину плёнки НЖФ в 7 раз, а также более высокой полярностью колонки DB-624, из-за наличия в НЖФ функциональных групп $(\text{CH}_2)_3\text{-C}\equiv\text{N}$. При программировании температуры на капиллярной колонке DB-624 происходит подъём базовой линии за счёт постепенного уноса жидкой фазы из колонки, поэтому разделение на колонке в дальнейшем приводит к ухудшению её эффективности. Таким образом, газохроматографическое определение ТДГК в виде её более летучего производного (диметилового эфира) целесообразнее осуществлять на колонке HP-5.

Оптимизация условий пробоподготовки

Для совмещения дериватизации и микроэкстракции в одной ёмкости с минимальным расходом органических растворителей эмпирически выбраны

объёмы водной и органической фаз (экстрагента), которые соответственно составляют 1 и 0.5 см³. В качестве экстрагента использовали этилацетат, а в качестве высаливающего агента – сульфат натрия. Объёмное соотношение пробы, метанола и серной кислоты – 1:1:0.2 обеспечивает количественную и необратимую этерификацию.

Для выбора продолжительности микроэкстракции изучена зависимость степени экстракции от времени встряхивания на мультвортексе $R = f(t)$ (рисунок 6).

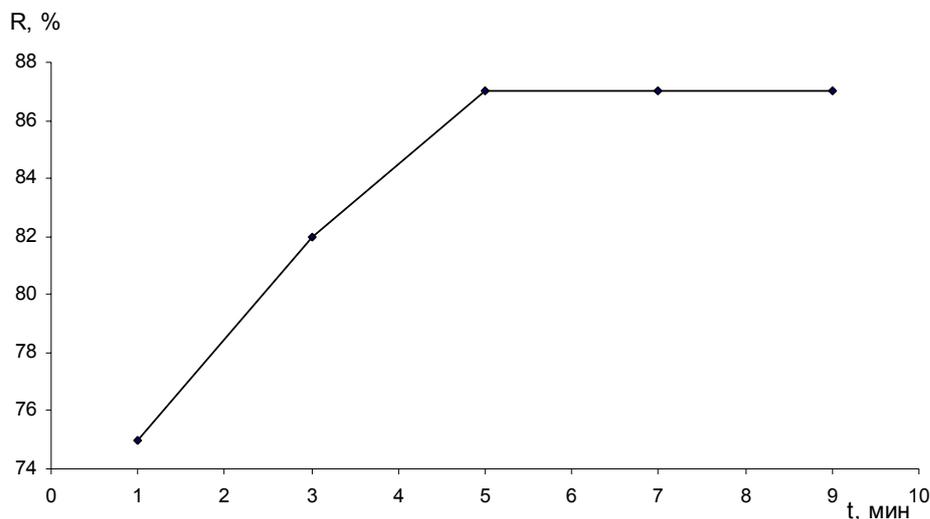


Рисунок 6 – Зависимость степени экстракции от времени

Сходимость измерения степени экстракции характеризуется коэффициентом вариации 6 %. Как видно из зависимости, степень экстракции возрастает до максимального значения 87 % в течение 5 мин, а затем остаётся неизменной. Постоянство степени экстракции в интервале 5 – 9 мин объясняется достижением полноты извлечения производного ТДГК в органическую фазу.

Для выбора оптимальных условий реакции этерификации исследована зависимость степени дериватизации от температуры и продолжительности реакции на модельном растворе ТДГК в моче с концентрацией 45 мкг/см³. Этерификацию проводили при разных температурах и разной продолжительности нагревания.

С протеканием реакции этерификации при температуре 60 °С в течение 40 мин степень дериватизации достигает 62 %, а максимального значения 94 % – при температуре 80 °С в течение 15 мин. Такая полнота протекания дериватизации, позволяет сделать вывод, что этерификацию ТДГК метанолом в присутствии серной кислоты нужно проводить при температуре 80 °С не менее 15 мин (рисунок 7). Сходимость определения степени дериватизации характеризуется коэффициентом вариации 4 %.

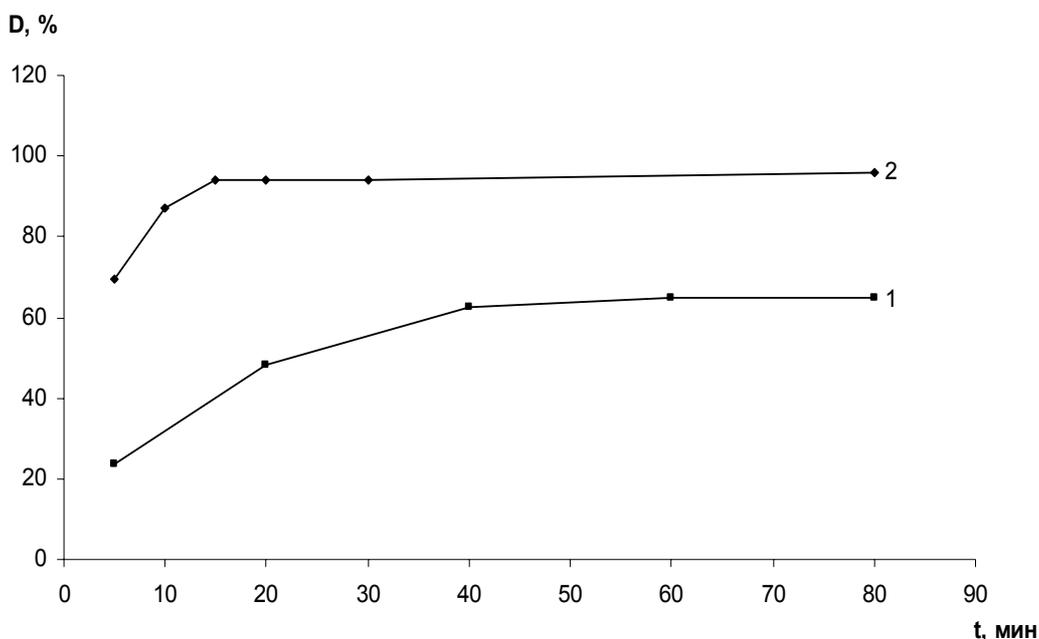


Рисунок 7 – Зависимости степени дериватизации D ТДГК от времени нагревания t при двух температурах 60 °C (1) и 80 °C (2)

Дисперсионный анализ погрешности определения ТДГК в моче

Необходимо было выбрать способ выполнения параллельных определений ТДГК в образцах мочи. Был поставлен эксперимент по схеме однофакторного дисперсионного анализа. Данный эксперимент позволяет оценить вклад погрешности подготовки проб ($V_{\text{пр}}$) и погрешности нестабильности ($V_{\text{н}}$) аналита в органической фазе в суммарную погрешность ($V_{\text{общ}}$) результатов анализа.

Как показали результаты дисперсионного анализа, погрешность подготовки проб ($V_{\text{пр}} = 5 \%$) равна погрешности нестабильности ($V_{\text{н}} = 5 \%$). Таким образом, единичные измерения можно проводить с подготовкой пробы одного образца с последующим двукратным газохроматографическим анализом органической фазы этого образца.

Идентификация и количественное определение ТДГК в моче

Идентификацию диметилового эфира ТДГК в анализируемых пробах осуществляли по абсолютному времени удерживания, которое характеризуется отличной повторяемостью ($V_r = 0.02 \%$). Но время удерживания может меняться за счёт старения колонки, из-за присутствия в анализируемой пробе труднолетучих компонентов. Поэтому в процессе анализа реальных проб необходимо проводить контроль смещения времени удерживания. Контроль смещения времени удерживания хроматографического пика диметилтиодигликолята осуществляли сравнением хроматограммы анализируемого образца с хроматограммой модельной смеси диметилового эфира ТДГК в этилацетате (рисунок 8).

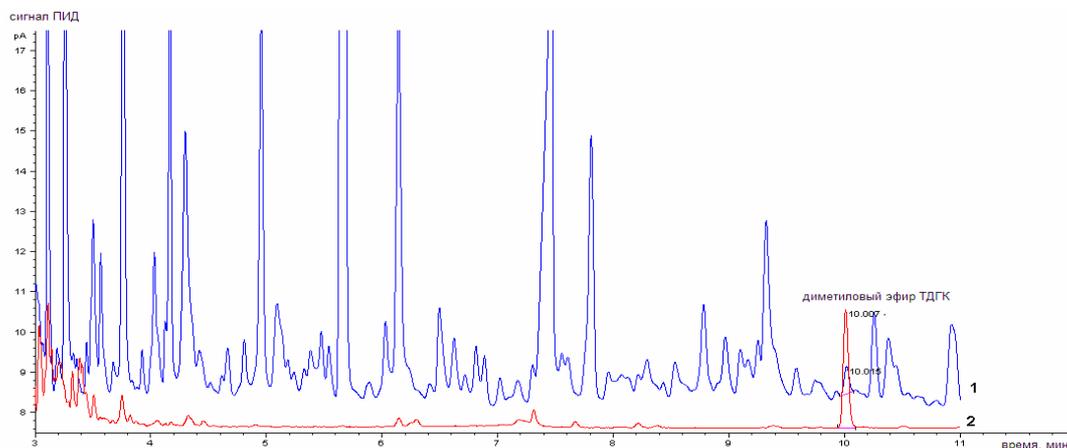


Рисунок 8 – Хроматограммы реальной пробы мочи ($C_{\text{ТДГК}} = 0.13 \text{ мкг}/0.1\text{см}^3$) (1) и модельной смеси диметилового эфира ТДГК ($C = 1.3 \text{ мкг}/\text{см}^3$) в этилацетате (2)

Как видно из наложенных хроматограмм, полное совпадение пиков диметилового эфира ТДГК по времени удерживания и ширине на полувысоте говорит об отсутствии смещения пика в реальной пробе мочи.

При контроле времени удерживания способом добавок сравнивают хроматограмму исследуемого образца с хроматограммой того же образца содержащего добавку ТДГК (величина добавки должна составлять 200 % от содержания ТДГК в пробе) (рисунок 9).

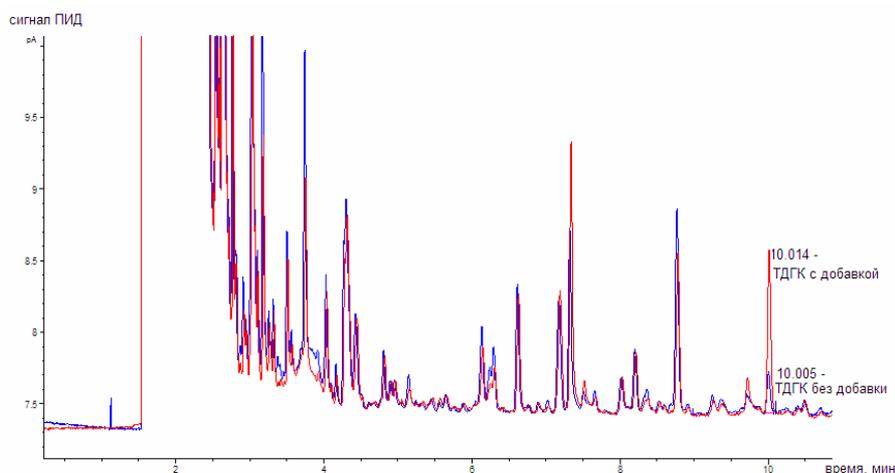


Рисунок 9 – Хроматограммы пробы мочи и пробы мочи с добавкой ТДГК

Как видно из рисунка, совпадение пиков определяемого компонента по времени удерживания и ширине на полувысоте говорит об отсутствии смещения пика в реальной пробе мочи.

Более чувствительным, информативным и достоверным способом идентификации является метод хромато-масс-спектрометрии. Для подтверждения структуры образующегося диметилового эфира ТДГК изучен его масс-спектр (Рисунок 10). Для этого исследуемое соединение анализировали методом ГХ-МС в режиме “SCAN (40 – 550 m/z)” при ионизации электронным ударом.

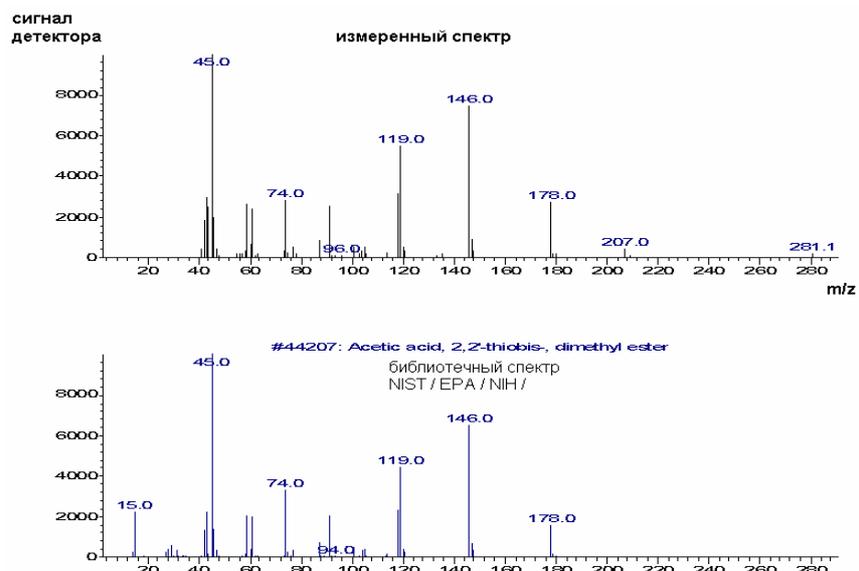


Рисунок 10 – Масс-спектр диметилового эфира ТДГК

Показано, что молекулярным ионом является пик с $m/z = 178$, который соответствует молекулярной массе диметилового эфира ТДГК. К другим более интенсивным пикам относятся следующие ионы с m/z : 146, 119. Наличие в масс-спектре данных ионов, содержащих метиленовую CH_2 и сложноэфирную COOCH_3 группы, позволяет вести определение в режиме SIM, что повышает надёжность идентификации и понижает предел обнаружения (рисунок 11).

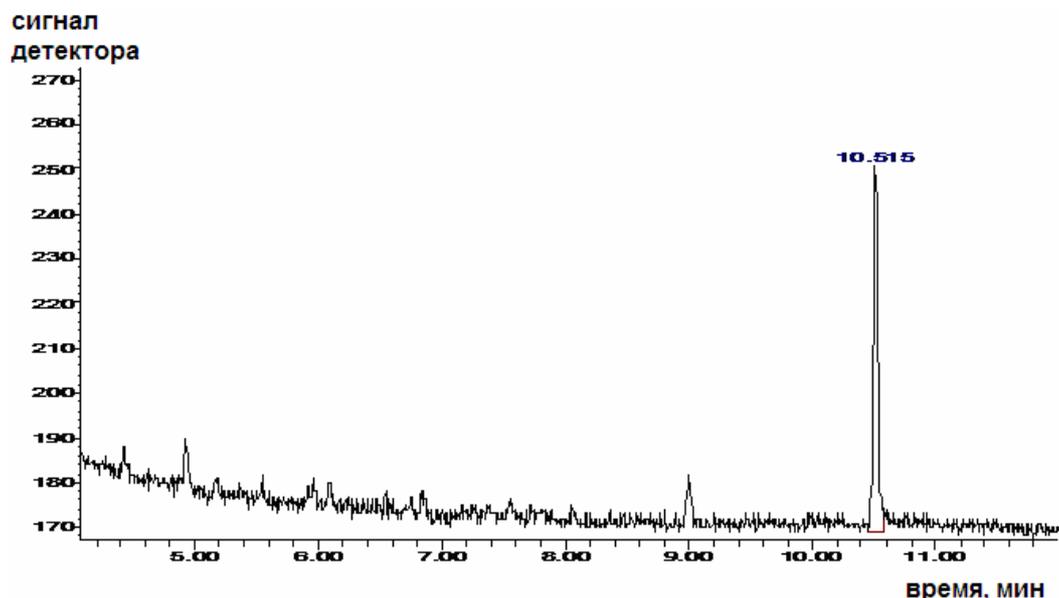
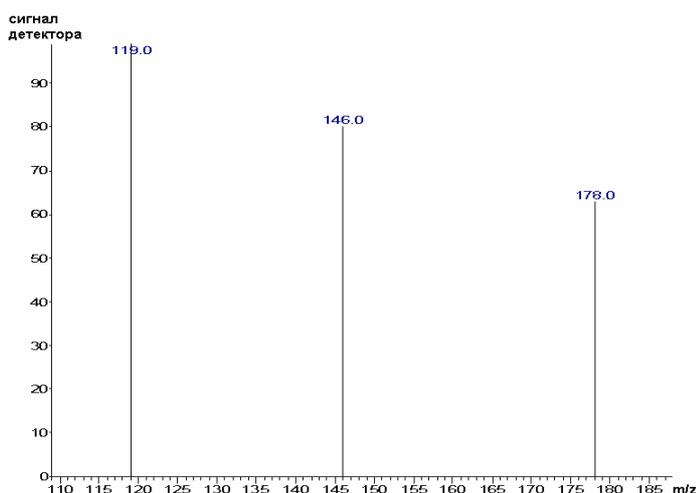


Рисунок 11 – Хроматограмма экстракта мочи на колонке НР-5ms
($c = 1 \text{ мкг/см}^3$, $S/N = 78$)

Данным способом достигаются высокая вероятность правильной идентификации, ещё больше устраняется влияние сопутствующих компонентов в экстракте исследуемого образца и повышается чувствительность

определения. Пик со временем удерживания $t_R = 10.515$ мин соответствует масс-спектр, представленный на рисунке 12.



Присутствие ионов 119, 146, 178 в данном масс-спектре позволяет сделать вывод о том, что этот пик и есть диметилвый эфир ТДГК. Несоответствие времён удерживания на хроматограммах (Рисунки 11 и 9) объясняется использованием в методе ГХ-ПИД объёмной скорости газа-носителя азота, превышающей в два раза поток гелия в методе ГХ-МС.

Рисунок 12 – Измеренный масс-спектр диметилового эфира ТДГК

Количественное определение ТДГК в моче методом абсолютной градуировки осуществляли с использованием стандартных смесей ТДГК в моче. Перед приготовлением аттестованных смесей ТДГК в моче, проводили холостой опыт – анализ образца мочи здорового человека, не содержащей ТДГК (рисунок 13).

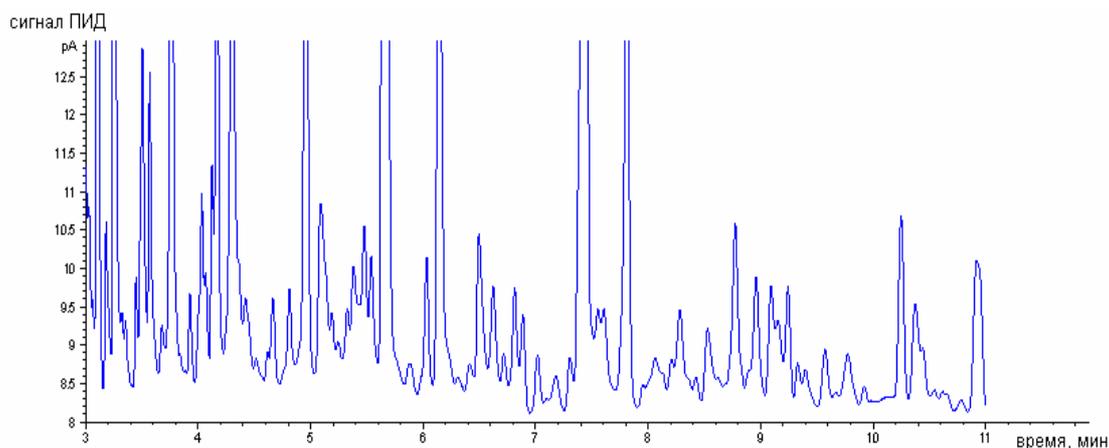


Рисунок 13 – Хроматограмма холостой пробы мочи

Хроматограмма отражает наличие в экстракте образца мочи большого числа сопутствующих компонентов. Для оценки значимости мешающего влияния сопутствующих веществ, получена градуировочная зависимость по растворам ТДГК в воде (рисунок 14).

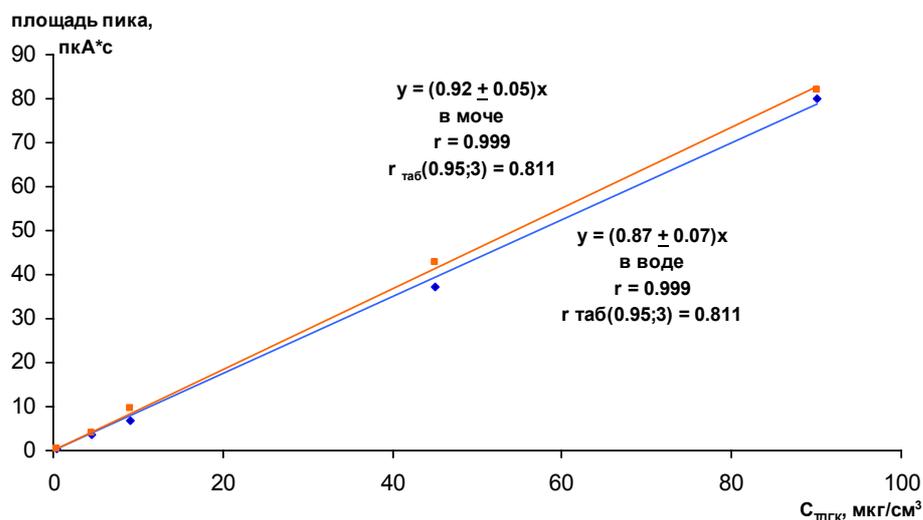


Рисунок 14 – Градуировочная характеристика площади пика от концентрации ТДГК в воде и в моче

Коэффициент чувствительности по аттестованным смесям ТДГК в моче превышает коэффициент по смесям ТДГК в воде в 1.06. Отсюда следует, что градуировочную характеристику можно получать как с использованием аттестованных смесей ТДГК в моче, так и с помощью аттестованных смесей ТДГК в воде. При применении аттестованных смесей ТДГК в воде необходимо результат анализа умножать на коэффициент 1.06. Такое различие между коэффициентами доказывает отсутствие мешающего влияния сопутствующих компонентов в анализируемой пробе.

Значения показателей повторяемости и внутрилабораторной прецизионности в виде их относительных среднеквадратических отклонений, а также значение показателя точности приведены в таблице 3.

Таблица 3 – Показатели прецизионности и точности

аналиты	Диапазон концентрации, мкг/см^3	ОСКО повторяемости и $V_{\Gamma}, \%$	ОСКО внутрилабораторной прецизионности $V_{R\lambda}, \%$	Показатель точности - границы относительной погрешности $^1 \delta_{\text{л}}, \%$
винилхлорид	0.07 – 5.0	5	7.7	17
1,2-дихлорэтан	0.05 – 0.5	14	12	27
	0.5 – 2.0	4	6	14
ТДГК	0.4 – 1	9	6.5	15
	1 – 90	4		

¹ соответствует относительной расширенной неопределенности $U_{\text{отн}}$ при $k = 2$

Правильность оценивали с использованием аттестованных смесей ВХ, ДХЭ в крови и ТДГК в моче (таблица 4).

Таблица 4 – Результаты анализа аттестованных смесей (АС)

№ АС	$C_0 \pm \Delta_0$, мкг/см ³	$X \pm \Delta$, мкг/см ³
винилхлорид		
1	0.109 ± 0.002	0.102 ± 0.017
2	0.305 ± 0.007	0.30 ± 0.05
3	0.500 ± 0.012	0.52 ± 0.09
4	0.718 ± 0.016	0.71 ± 0.12
5	1.090 ± 0.016	1.06 ± 0.18
6	1.52 ± 0.02	1.7 ± 0.3
7	2.18 ± 0.03	2.0 ± 0.3
1,2-дихлорэтан		
1	0.100 ± 0.003	0.10 ± 0.027
2	0.300 ± 0.009	0.35 ± 0.09
3	0.500 ± 0.015	0.50 ± 0.13
4	0.70 ± 0.02	0.70 ± 0.09
5	1.000 ± 0.03	1.02 ± 0.14
6	1.40 ± 0.04	1.4 ± 0.2
7	2.00 ± 0.06	2.1 ± 0.3
ТДГК		
1	0.4 ± 0.016	0.43 ± 0.065
2	1.00 ± 0.04	0.96 ± 0.14
3	2.00 ± 0.08	2.35 ± 0.35
4	5.0 ± 0.2	4.52 ± 0.7
5	11.0 ± 0.4	9.90 ± 1.5
6	18.0 ± 0.7	18.1 ± 2.7
7	90 ± 3	87 ± 13

Результаты газохроматографического анализа ($X \pm \Delta$) для винилхлорида, 1,2-дихлорэтана и ТДГК перекрываются с доверительными интервалами концентраций аналитов в АС ($C_0 \pm \Delta_0$). Это подтверждает отсутствие значимых систематических погрешностей.

Значимость систематической погрешности оценена с помощью реальных проб методом добавок (таблица 5).

Так как $K < K_{доп}$, систематическая погрешность незначима на фоне случайной погрешности.

Таблица 5 – Оценка правильности способом добавок для ТДГК

№ образца	X , мкг	$C_{д}$, мкг	$X_{д}$, мкг	K	$K_{доп}$
1	0.12	0.20	0.35	0.03	0.05
2	0.06	0.10	0.20	0.03	0.03
3	0.11	0.20	0.32	0.01	0.04
4	0.10	0.20	0.30	0.01	0.04
5	0.10	0.20	0.32	0.02	0.04
6	0.25	0.20	0.40	0.05	0.06
7	0.06	0.10	0.13	0.02	0.02
8	0.1	0.10	0.20	0.004	0.03
9	0.07	0.10	0.18	0.008	0.02
10	0.14	0.28	0.45	0.03	0.06

Глава 4 посвящена апробации разработанных методик при анализе биологических образцов лиц, работающих в производстве поливинилхлорида

Определение содержания винилхлорида и 1,2-дихлорэтана в крови

Методика определения винилхлорида и 1,2-дихлорэтана в крови апробирована на лицах мужского пола (аппаратчики, слесари-ремонтники, слесари по обслуживанию контрольно-измерительного оборудования) во время их медицинского обследования на ОАО “Саянскхимпласт” в 2009 году. Данные лица работают в условиях воздействия хлорированных углеводородов (ВХ и ДХЭ) в цехах производства поливинилхлорида. Забор крови производился в утренние часы, из локтевой вены через 12 часов после последнего приёма пищи, в процессе проведения медицинского осмотра работающих. Так как результаты определения ВХ и ДХЭ в крови работников не подчиняются нормальному распределению, то их представили в виде минимального (min), максимального (max), медианы (Me), верхнего (Q₂₅) и нижнего (Q₇₅) квартилей (таблица 6).

Таблица 6 – Результаты содержания ВХ и ДХЭ в крови лиц работающих в производстве ПВХ

Работники цехов	винилхлорид, мкг/см ³		1,2-дихлорэтан, мкг/см ³	
	min – max	Me Q _{0.25} Q _{0.75}	min – max	Me Q _{0.25} Q _{0.75}
медосмотр				
Цех 30, получение винилхлорида (n = 64)	0.07 – 4.5	0.11 0.11 0.19	0.06 – 1.2	0.43 0.32 0.51
Цех 40, получение смолы поливинилхлорида (n = 44)	0.07 – 3.3	0.12 0.11 0.15	0.07 – 0.9	0.40 0.32 0.46
стационар				
Цех 30, получение винилхлорида (n = 15)	0.07 – 0.6	0.07 0.07 0.14	не обнаружен	
Цех 40, получение смолы поливинилхлорида (n = 24)	0.07 – 0.72	0.07 0.07 0.15		

Установлено, что наибольшие концентрации 1,2-дихлорэтана обнаружены в крови у рабочих цехов получения винилхлорида (цех 30) и поливинилхлорида (цех 40), затем у работников КИПиА и меньшие концентрации были обнаружены у работников центрального электротехнического снабжения. Концентрации винилхлорида составляют 0.11 – 0.13 мкг/см³. При этом у многих работников данные вещества в крови не были обнаружены, что

возможно связано с более длительными сроками отсутствия контакта с данными веществами на работе из-за медосмотра.

В 2010 – 2011 году винилхлорид и 1,2-дихлорэтан определяли в пробах крови (плазме) лиц, находящихся на обследовании в стационаре клиники Ангарского филиала ВСНЦ экологии человека СО РАМН. Результаты исследований, проведённые у работников производства ПВХ при обследовании в клинике, позволяют констатировать менее выраженное содержание ВХ в пробах крови, чем в пробах отобранных непосредственно в процессе медосмотра, что указывает на быстрое полувыведение летучих органических соединений и их превращение в метаболиты.

Определение содержания тиодигликолевой кислоты в моче

Содержание ТДГК определяли в пробах суточной мочи 39 рабочих основных цехов производства поливинилхлорида ОАО “Саянскхимпласт”, находящихся на обследовании в стационаре клиники Ангарского филиала ВСНЦ экологии человека СО РАМН в 2010 году. Основные цеха производства винилхлорида и смолы поливинилхлорида – это цех по получению винилхлорида из 1,2-дихлорэтана (цех № 30, 15 человек) и цех по получению смолы поливинилхлорида из винилхлорида (цех № 40, 24 человека). Интервал содержания ТДГК в моче этих лиц составляет 0.4 – 5 мкг/см³. Результаты определения ТДГК в моче у этих лиц были сопоставлены с результатами определения ТДГК в моче контрольной группы (здоровых людей, не работающих на химических производствах, 25 человек). Так как результаты определения ТДГК не подчиняются закону нормального распределения, то их представили также как и результаты для ВХ и ДХЭ (рисунок 15).

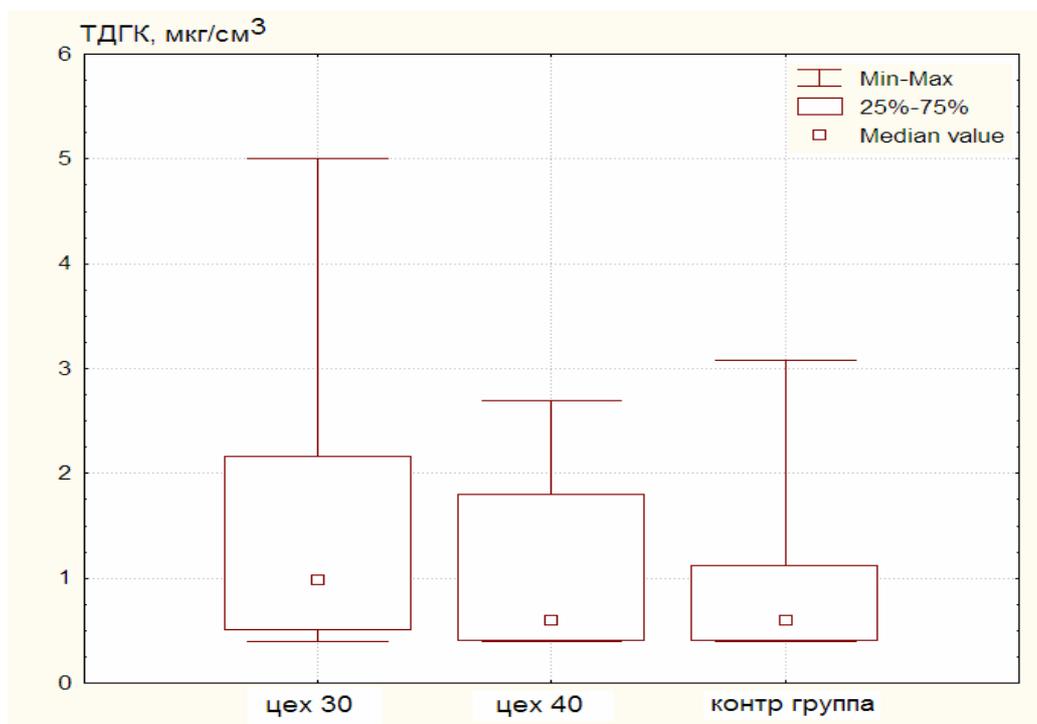


Рисунок 15 – Диаграмма размаха содержания ТДГК в моче по группам

Наибольшие концентрации ТДГК в моче отмечены у работников цеха 30, меньшие концентрации у работников цеха 40. Также установлено, что содержание ТДГК в суточной моче с увеличением времени отбора пробы уменьшается, так как ТДГК постепенно выводится из организма (Рисунок 16).

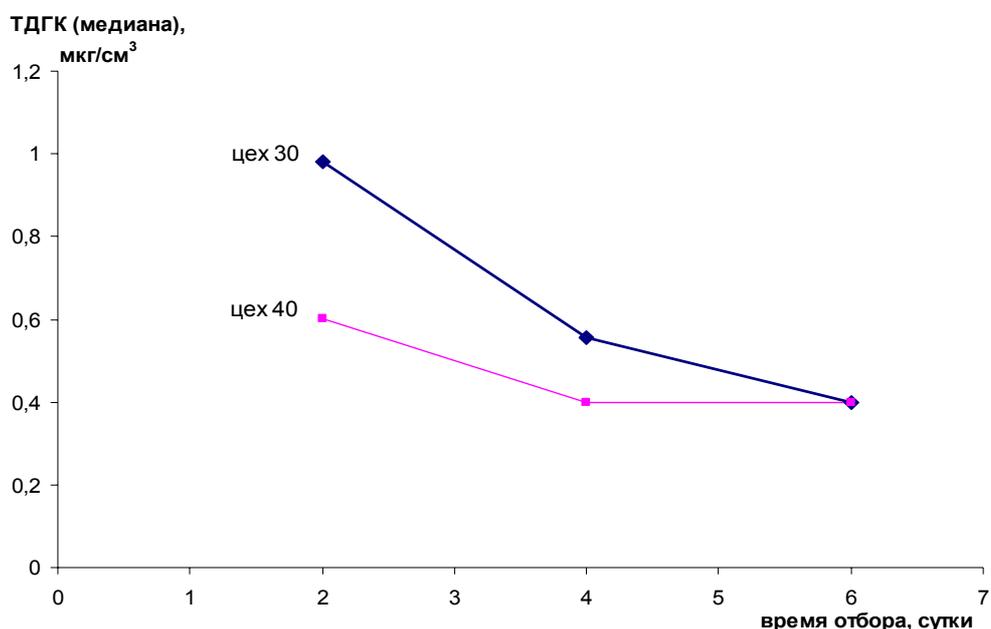


Рисунок 16 – Зависимость содержания ТДГК в суточной моче от времени отбора пробы с момента поступления в стационар клиники

Полученные результаты не противоречат литературным данным. Концентрации ТДГК в моче составляют 1 – 2 мкг/см³ при содержании ВХ в производственной среде менее 5 мг/м³, при содержании ВХ на уровне 5 мг/м³ концентрация ТДГК составляет 2.5 мкг/см³, при концентрациях ВХ выше 5 мг/м³ концентрации ТДГК составляют 3.5 – 6 мкг/см³.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработано методическое обеспечение газохроматографического анализа биологических жидкостей: методика определения винилхлорида и 1,2-дихлорэтана в крови методом газохроматографического анализа равновесного пара и методика определения тиодигликолевой кислоты в моче методом капиллярной газожидкостной хроматографии. Методики аттестованы и применимы для биомониторинга винилхлорида и 1,2-дихлорэтана в биологических матрицах рабочих производства поливинилхлорида.

Основные результаты работы сводятся к следующему:

1. При газохроматографическом анализе равновесного пара винилхлорида и 1,2-дихлорэтана с пламенно-ионизационным детектированием вместо

электронно-захватного детектирования устраняется мешающее влияние воды на винилхлорид.

2. Использование парофазного концентрирования для винилхлорида и 1,2-дихлорэтана вместо жидкостно-жидкостной экстракции позволяет сократить время анализа от 40 до 6 мин.

3. Для оптимизации условий парофазного концентрирования в ПФА получены зависимости сигнала детектора от температуры и продолжительности термостатирования для винилхлорида и 1,2-дихлорэтана. В результате интерпретации зависимостей установлено, что парофазное концентрирование следует проводить при температуре 60 °С в течение 3 мин.

4. Дисперсионный анализ погрешности парофазного газохроматографического анализа показал, что параллельные измерения целесообразнее проводить между двумя одинаковыми образцами одной пробы с последующим однократным газохроматографическим анализом равновесного пара каждого образца.

5. При определении ТДГК в моче выполнение стадий пробоподготовки (внесение пробы, реактивов, дериватизация, экстракция) в замкнутой системе позволяет избежать потерь определяемого компонента, снизить расход особо чистых растворителей, совместить пробоподготовку с отбором и введением аликвотной части экстракта в хроматограф автодозатором.

6. Проведение дериватизации ТДГК в пробе мочи с последующей жидкостно-жидкостной микроэкстракцией деривата ТДГК позволяет более полно извлекать гидрофильное соединение – ТДГК.

7. При газохроматографическом анализе производного ТДГК в условиях введения образца в режиме “splitless” и температурного градиента от 80 °С до 130 °С при скорости 5 °С/мин на стандартной капиллярной колонке “НР-5” удалось реализовать не только хорошую чувствительность (0.07 нг), но и разделение компонентов, при котором устраняются мешающие влияния органических растворителей (метанола, этилацетата) и сопутствующих компонентов в экстракте пробы.

8. Проведение дисперсионного анализа погрешности определения ТДГК в моче показало, что параллельные измерения можно проводить с подготовкой пробы одного образца с последующим двукратным газохроматографическим анализом органической фазы этого образца.

9. Проведены метрологические исследования методик: найдены пределы обнаружения определяемых компонентов, показатели повторяемости, внутрилабораторной прецизионности, правильности и точности. Методики дают возможность проводить измерение винилхлорида от 0.07 до 5 мкг/см³ с внутрилабораторной прецизионностью 7.7 %, 1,2-дихлорэтана в диапазоне 0,05 до 0,5 мкг/см³ с внутрилабораторной прецизионностью 12 %, а в диапазоне 0,7 до 2 мкг/см³ с внутрилабораторной прецизионностью 6 %; тиодигликолевой кислоты от 0.4 до 90 мкг/см³ с внутрилабораторной прецизионностью 6.5 %.

10. Присутствие хлорорганических соединений и их метаболита в биологических субстратах показало, что разработанные методики применимы к анализу реальных образцов.

Список публикаций по теме диссертации

1. **Алексеевко А.Н.** Разработка методики газохроматографического определения винилхлорида и 1,2-дихлорэтана в крови с использованием парофазного анализа / **А.Н. Алексеевко**, О.М. Журба, Н.А. Тараненко // Журнал аналитической химии. – 2010. – Т 65, № 7.– С. 756 – 759.
2. Санитарно-гигиенический мониторинг и биомониторинг винилхлорида и 1,2-дихлорэтана в воздухе рабочей зоны и в крови работающих в производстве винилхлорида и поливинилхлорида / Н.А. Тараненко, В.Б. Дорогова, **А.Н. Алексеевко**, О.М. Журба // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2010. – Т 74, № 4. – С. 54 – 58.
3. **Алексеевко А.Н.** Сравнительный анализ методов газохроматографического определения тиодигликолевой кислоты в моче для тест экспозиции винилхлорида (Обзор) / **А.Н. Алексеевко**, О.М. Журба, В.Б. Дорогова // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2010. – Т. 74, № 4. – С. 9 – 12.
4. Дорогова В. Б. Некоторые аспекты определения винилхлорида и 1,2-дихлорэтана в сыворотке крови / В.Б. Дорогова, **А.Н. Алексеевко**, О.М. Журба // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2010. – № 1. – С. 72 – 75.
5. **Алексеевко А.Н.** Определение винилхлорида и 1,2-дихлорэтана в сыворотке крови методом газовой хроматографии для биологического мониторинга в производстве поливинилхлорида / **А.Н. Алексеевко**, О.М. Журба // Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез: Материалы всероссийской конференции. Краснодар, 26 сент. – 1 окт. 2010. – С. 124.
6. **Алексеевко А.Н.** Разработка методики газохроматографического определения винилхлорида и 1,2-дихлорэтана в крови для гигиенических и токсикологических исследований // Вестник Иркутского университета, Ежегодная научно-теоретическая конференция аспирантов и студентов, Материалы. Иркутск, 2009. – С. 346 – 347.
7. Разработка методики определения тиодигликолевой кислоты в моче методом капиллярной газо-жидкостной хроматографии / **А.Н. Алексеевко**, О.М. Журба, В.Б. Дорогова, Г.Н. Королёва // Научное творчество XXI века: Сборник трудов (по итогам VI международной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых). Красноярск, 30 октября 2012. – С. 211 – 215.

Научное издание

АЛЕКСЕЕВКО Антон Николаевич
РАЗРАБОТКА МЕТОДИЧЕСКОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ КОНТРОЛЯ СОДЕРЖАНИЯ
ХЛОРОРГАНИЧЕСКИХ ТОКСИКАНТОВ ПРОИЗВОДСТВА ПОЛИВИНИЛХЛОРИДА И ИХ
МЕТАБОЛИТА В БИОЛОГИЧЕСКИХ СУБСТРАТАХ

Автореферат

Подписано в печать 28.01.2012. Формат 60х90 1/16. Усл. печ. л. 1,4. Тираж 100 экз. Заказ 4
Издательство ИГУ; 664003, Иркутск, бульвар Гагарина, 36; тел. (3952) 24–14–36

