

УДК 543.544:546.13:612.1

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХЛОРЭТАНОЛА В КРОВИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЖИДКОСТНО-ЖИДКОСТНОЙ МИКРОЭКСТРАКЦИИ И КАПИЛЛЯРНОЙ ГАЗО-ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

А. Н. Алексеенко^{1, 2}, О. М. Журба¹, Г.Н. Королёва²

¹*Ангарский филиал УРАМН ВСНЦ экологии человека СО РАМН – НИИ медицины труда и экологии человека, лаборатория физико-химических методов исследования
665827, г. Ангарск, 12^а м-он, д. 3
alexeenko85@mail.ru*

²*Иркутский Государственный Университет, Химический факультет, кафедра аналитической химии
664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1*

Поступила в редакцию 13 апреля 2011 г.

Разработана методика определения хлорэтанола в крови в диапазоне 0,05-10 мкг/см³. Методика основана на извлечении хлорэтанола диэтиловым эфиром с помощью жидкостно-жидкостной микроэкстракции и последующим хроматографированием на капиллярной колонке "Polyethylene Glycol Terephthalate" с использованием электронно-захватного детектирования. Относительная погрешность методики не превышает 30 %.

Ключевые слова: хлорэтанол в крови, жидкостно-жидкостная микроэкстракция, капиллярная газо-жидкостная хроматография.

Алексеенко Антон Николаевич – младший научный сотрудник ангарского Института медицины труда и экологии человека, аспирант Иркутского Государственного Университета.

Область научных интересов: газохроматографический анализ сложных объектов, методы пробоподготовки в газохроматографическом анализе, метрологический контроль качества результатов.

Автор 5 опубликованных работ.

Журба Ольга Михайловна – научный сотрудник ангарского Института медицины труда и экологии человека, кандидат биологических наук.

Область научных интересов: промышленно-санитарный контроль воздуха рабочей зоны, химико-токсикологический анализ биологических сред, метаболизм промышленных токсикантов.

Автор 20 опубликованных работ.

Королёва Галина Николаевна – доцент кафедры аналитической химии химического факультета ИГУ, кандидат химических наук.

Область научных интересов: использование метода ВЭЖХ для определения флавоноидов, алкалоидов, витаминов, пестицидов, органических и неорганических катионов и анионов.

Автор 35 опубликованных работ.

Введение

В медицине труда существует серьезная проблема – недостаточность сведений о закономерностях формирования профессиональных нейроинтоксикаций на химических предприятиях в отдалённом периоде [1]. Особенностью интоксикации нейротропными ядами является отсутствие полного восстановления здоровья,

несмотря на прекращение контакта с токсическими веществами. На ОАО "Саянскхимпласт" современное и крупнотоннажное производство – это производство винилхлорида (ВХ) и поливинилхлорида (ПВХ). Сотрудниками АФ НИИ Медицины труда и экологии человека были проведены исследования на данном предприятии [2]. Исходя из технологического регламента, ос-

новными химическими соединениями, загрязняющими воздух рабочей зоны в производстве ВХ и ПВХ, являются винилхлорид, 1,2-дихлорэтан (ДХЭ), хлороводород и ПВХ. ВХ и ДХЭ в воздухе присутствуют в виде паров, всасываются через желудочно-кишечный тракт, дыхательные пути, кожные покровы, проявляют психотропное и нейротоксическое действие [3, 4].

Одним из современных методов оценки воздействия органических веществ на организм человека является биомониторинг [5-9], в рамках которого необходимо контролировать не только содержание веществ в воздухе рабочей зоны, но и содержание веществ и их метаболитов в биологических средах организма человека (кровь, моча).

Основными метаболитами винилхлорида и 1,2-дихлорэтана являются монохлоруксусная кислота и продукт её детоксикации тиодигликолевая кислота. Монохлоруксусная кислота в организме теплокровных животных, отравленных 1,2-дихлорэтаном и винилхлоридом, может образовываться только из хлорэтанола. Это косвенно подтверждается и тем, что в моче мышей, отравленных хлорэтанолом, также обнаруживаются монохлоруксусная кислота и тиодигликолевая кислота [10]. Следовательно, есть основания полагать, что одним из основных промежуточных метаболитов винилхлорида и 1,2-дихлорэтана в организме теплокровных является хлорэтанол, который в дальнейшем метаболизируется до монохлоруксусной кислоты. Необходимо контролировать содержание хлорэтанола в крови при отравлении винилхлоридом и 1,2-дихлорэтаном, который представляет собой промежуточный метаболит этих веществ.

Среди литературных данных по определению хлорэтанола в биосредах описана лишь одна методика газохроматографического определения хлорэтанола в крови крыс, основной принцип которой заключается в жидкостной экстракции хлорэтанола диэтиловым эфиром с дальнейшей многократной очисткой экстракта. Анализ одной пробы длится 1,5 часа. Предел обнаружения составляет 0,1 мкг/см³ [10]. Подготовка проб в указанной методике очень длительная и трудоёмкая, разделение компонентов

смеси неудовлетворительное, что и послужило постановке цели настоящей работы: разработка более простой, экспрессной и чувствительной методики определения хлорэтанола в крови с использованием современных методов подготовки проб и газовой хроматографии – жидкостно-жидкостной микроэкстракции и капиллярной газо-жидкостной хроматографии [11, 12].

Аппаратура, материалы, реактивы, методика

Работу выполняли на газовом хроматографе Agilent 7890A с микроэлектронно-захватным детектором, снабжённым автоинжектором Agilent 7683, позволяющим регулировать погружения иглы хроматографического шприца в виалу.

Использовали следующие реактивы: хлорэтанол с содержанием основного вещества 98 % фирмы Fluka, хлорид натрия, эфир диэтиловый марки ч.д.а.

Анализ проводили следующим образом. В стеклянную хроматографическую виалу объёмом 2 см³ помещали 0,36 г хлорида натрия, 1 см³ пробы, 0,5 см³ диэтилового эфира, закрывали её пластмассовой завинчивающейся пробкой с тефлонированной мембраной (септой), интенсивно встряхивали на мульти-вортексе в течение 5 мин, затем ставили её в центрифугу и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин. После центрифугирования виалу помещали в автоинжектор, который отбирал 5 мкл верхнего органического эфирного слоя на определённой глубине и вводил в испаритель хроматографа. Оптимальные условия хроматографирования приведены в табл. 1.

Управление работой хроматографа и автоинжектора, а также запись и обработка хроматограммы осуществлялись с помощью программы GC ChemStation.

Для проведения количественного расчёта концентраций использовался способ абсолютной градуировки по стандартным растворам в сыворотке крови. Градуировочная характеристика, выражающая зависимость площади хроматографического пика от концентрации (мкг/см³), установлена по 5 сериям стандартных рас-

Таблица 1

Условия газохроматографического разделения

Условия	Значения
Колонка	HP-FFAP Polyethylene Glycol TP 50 м x 320 мкм, толщина фазы 0,5 мкм
Газ-носитель	Азот особой чистоты, скорость потока через колонку 2 см ³ /мин
Температурный режим	Программирование, 90 °С с выдержкой 1 мин, подъём со скоростью 5 °С/мин до 130 °С с выдержкой 1 мин
Режим ввода	160 °С, импульсный ввод 40 р.с.и. 0,75 мин; деление потока 1 : 5
Режим детектора	350 °С, скорость поддува азота 60 см ³ /мин

творов хлорэтанола в сыворотке крови. Стандартные растворы готовили методом разбавления исходного водного раствора хлорэтанола с концентрацией 116 мкг/см³ сывороткой крови.

Результаты и их обсуждение

При выборе условий хроматографирования были опробованы капиллярные колонки разной полярности: HP-5 – (5 % Phenyl)-methylpolysiloxane, HP-FFAP – Polyethylene Glycol Terephthalate; различные температурные режимы: изотермический и с программированием температуры; два вида детекторов: пламенно-ионизационный и микроэлектронно-захватный. В результате опробования установлено, что оптимальное разделение осуществляется на капиллярной колонке HP-FFAP – Polyethylene Glycol Terephthalate в режиме программирования температуры. Лучшая чувствительность и селективность достигается при электронно-захватном детектировании, чем при пламенно-ионизационном детектировании (0,05 и 0,5 мкг/мл соответственно). Для идентификации хлорэтанола приготовлены три стандартных раствора хлорэтанола в диэтиловом эфире в диапазоне 0,12-12,02 мкг/см³, проведён хроматографический анализ данных растворов и записаны хроматограммы, представленные на рис. 1, затем рассчитаны хроматографические параметры (табл. 2).

Жидкостно-жидкостная экстракция является одним из традиционных методов разделения и концентрирования [13]. Её часто используют в сочетании с дальнейшим упариванием

растворителя, что в свою очередь приводит к увеличению продолжительности анализа, использованию больших объёмов экстрагентов высокой чистоты, чаще всего дорогостоящих и токсичных, кроме того, возрастает вероятность потери определяемых веществ. Преимуществами жидкостно-жидкостной микроэкстракции (ЖЖМЭ) являются малые объёмы экстрагента от 50 мкл до 1 мл, экономия растворителей, миниатюризация воплощения процесса, совмещение отдельных стадий процесса, экспрессность.

Для совмещения отдельных стадий анализа (внесение пробы, реактивов и экстрагента, встряхивание на мульти-вортексе, центрифугирование, отбор и ввод аликвотной части экстракта в хроматограф), экономного расхода экстрагента и использования автоинжектора при вводе пробы в хроматограф нами была выбрана ёмкость – стандартная хроматографическая виала на 2 см³, снабжённая закручивающейся крышкой с уплотнителем. С учётом объёма виалы эмпирически выбраны объёмы жидкой фазы (пробы) и органической фазы (экстрагента),

Таблица 2

Основные хроматографические параметры

Параметр	Значение
Время удерживания, мин	8,8
Ширина пика, мин	0,06
Фактор удерживания	2,4
Число теоретических тарелок	2·10 ⁵
ВЭТТ, мм	0,25
Асимметрия	0,84

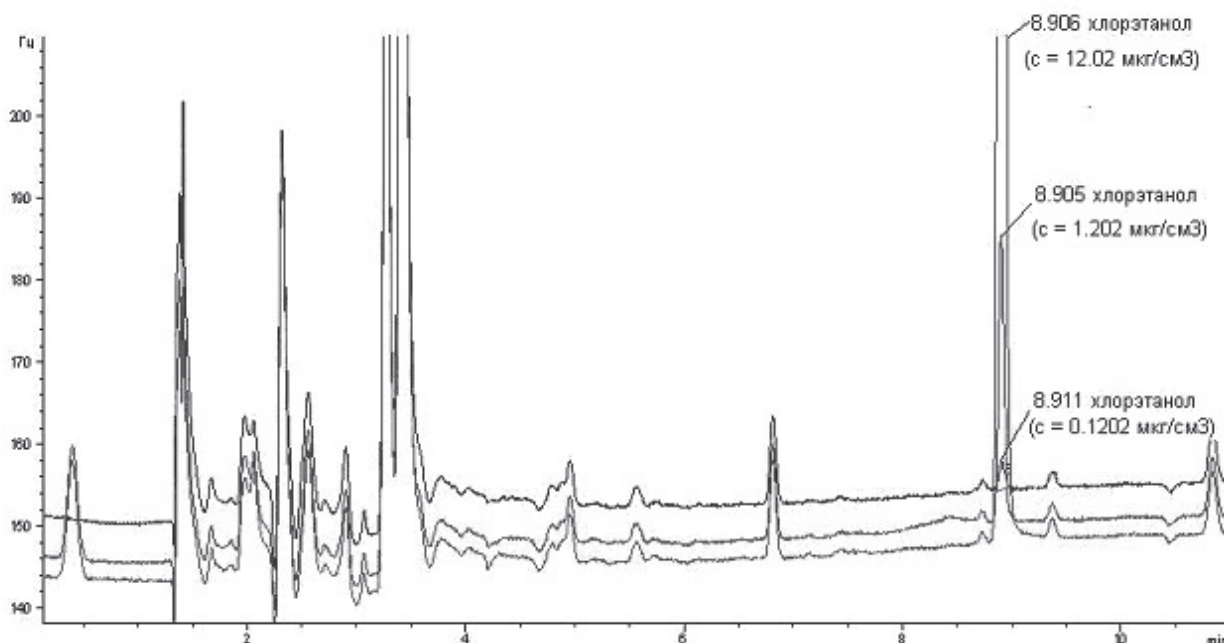


Рис. 1. Совмещённые хроматограммы растворов хлорэтанола в диэтиловом эфире с концентрациями в диапазоне 0,12- 12,02 мкг/см³

которые составили 1 и 0,5 мл соответственно. В качестве экстрагента использовался диэтиловый эфир, который хорошо извлекает неполярные и полярные соединения. Для выбора оптимальных условий ЖЖМЭ проведён анализ стандартного раствора хлорэтанола при разных количествах введенного хлорида натрия, который способствует уменьшению растворимости хлорэтанола в водной фазе, при различной продолжительности экстракции (встряхивании на мульти-вортексе). Было установлено, что максимальная площадь пика достигается при количестве хлористого натрия 0,36 г, что близко к его предельной растворимости в водной фазе, и времени встряхивания 5 мин (рис. 2, 3). Для лучшего разделения фаз после экстракции и для очистки экстракта использовали центрифугирование при 5000 об/мин в течение 7 мин.

Оценены следующие метрологические характеристики: повторяемость, внутрилабораторная прецизионность, правильность и точность [14, 15]. Повторяемость и внутрилабораторная прецизионность, характеризующие случайную составляющую погрешности, а также границы неисключённой систематической погрешности и относительной погрешности представлены в табл. 3. Результаты оценки ис-

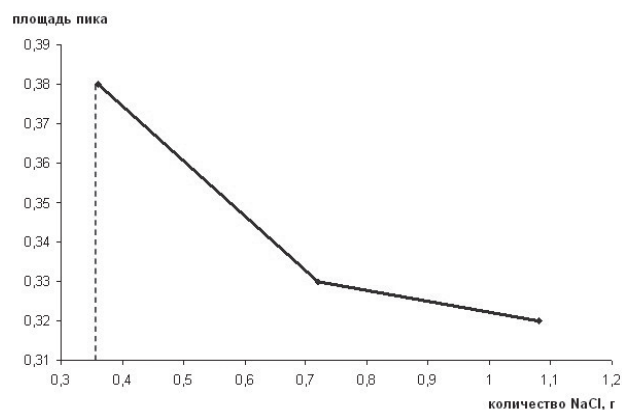


Рис. 2. Зависимость площади хроматографического пика от количества NaCl, введенного в пробу

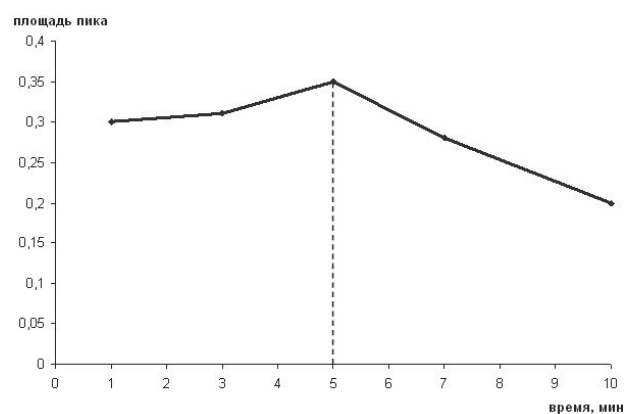


Рис. 3. Зависимость площади хроматографического пика от времени экстракции

Таблица 3

Метрологические характеристики газохроматографического определения хлорэтанола в крови

Метрологическая характеристика	Значение
Диапазон определяемых концентраций, мкг/см ³	0.05-10
Повторяемость (относительное стандартное отклонение σ_r), %	6
Внутрилабораторная прецизионность (относительное стандартное отклонение σ_{Rp}), %	11
Правильность (границы неисключённой относительной систематической погрешности δ_c), %	5
Точность (границы относительной погрешности δ_c), %	23

Таблица 4

Результаты оценки правильности (исключённой систематической погрешности) с использованием аттестованных смесей хлорэтанола в крови ($n = 70$; $P = 0.95$; $t_{таб} = 2$)

$C_{атт}$, мкг/см ³	$C_{опр}$, мкг/см ³	$t_{эксп}$
0.098	0.097 ± 0.007	0.03
0.39	$0.370 \pm 0,025$	1.06
0.70	$0,64 \pm 0.04$	1.85
2.00	2.16 ± 0.14	1.55
2.97	2.93 ± 0.20	0.30
4.65	4.7 ± 0.3	0.20
9.8	9.6 ± 0.6	0.49

ключённой систематической погрешности, проведённые с использованием аттестованных смесей хлорэтанола в крови, представлены в табл. 4. Сопоставление рассчитанных значений $t_{расч}$ с табличным показало, что расхождение носит случайный характер, т.е. исключённая систематическая погрешность незначима. Относительная погрешность (точность) определения хлорэтанола в диапазоне концентраций 0,05-10 мкг/см³ составляет 23 % и не превышает допустимую погрешность 30 %.

Заключение

В разработанной методике сочетание метода ЖЖМЭ и капиллярной газовой хроматографии позволило органично объединить стадии извлечения, концентрирования, дозирования и хроматографирования. Разработанная методика газохроматографического определения хлорэтанола в крови отличается простой пробоподготовкой, использованием типового хроматографического оборудования и малой продолжительностью анализа – 26 мин, по

сравнению с прежней методикой (продолжительность анализа более 1,5 часа), удовлетворительной чувствительностью и точностью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Антоноженко В.А. Винилхлоридная болезнь – углеводородный нейротоксикоз. Горький: Волго-Вятское кн. изд-во, 1980. 183 с.
2. Дорогова В. Б. Оценка производств винилхлорида и поливинилхлорида как источников загрязнения воздушной среды рабочих помещений и их влияние на организм работающих (обзор литературы) // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. 2008. № 1. С. 83-88.
3. The Environmental health criteria 215. Vinyl Chloride. Geneva: International programme on chemical safety, 1999. 331 p.
4. Гигиенические критерии состояния окружающей среды 62. 1,2-Дихлорэтан. Женева: Международная программа по химической безопасности, 1990. 80 с.
5. Каспаров А.А. Токсикометрия химических веществ, загрязняющих окружающую среду. М.: Центр международных проектов ГЖНТ, 1986. 428 с.
6. Ревич Б.А. Биомониторинг токсичных веществ в организме человека // Гигиена и санитария. 2004. № 6. С. 26-31.
7. Will W. Biomonitoring BASF. Ludwigshafen.: Aktiengesellschaft Arbeitsmedizin und Gesundheitsschutz, 2005. 15 s.
8. Grunder F.J. Blood as a matrix for biological monitoring // American Industrial Hygiene Association Journal. 1982. V. 43, № 4. P. 271-274.
9. Применение методов газовой и жидкостной хроматографии при изучении метаболизма органических соединений (обзор) / Н.А. Тараненко и [др.] // Гигиена и санитария. 2001. № 2. С. 75-76.
10. Какаровцева М.Г. Хлорэтанол (этиленхлоргидрин) – один из токсических метаболитов 1,2-дихлорэтана // Фармакология и токсикология. 1978. № 1. С.118-120.
11. Яшин. Я.И., Яшин Е.Я., Яшин А.Я. Газовая хроматография. М.: ТрансЛит, 2009. 528 с.
12. Крылов А.В. Сопряжение хроматографии и жидкость-жидкостной микроэкстракции: современное состояние и перспективы // “Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез”. Материалы всероссийской конференции. Краснодар, 2010. С. 65.
13. Основы аналитической химии. В 2 кн. Кн.1. / Под ред. Ю.А. Золотова. М.: Высшая школа, 2000. 351 с.
14. Смагунова А.Н., Карпукова О.М., Белых Л.И. Алгоритмы определения метрологических характеристик методик количественного химического анализа. Учебное пособие. Иркутск: Изд-во ИГУ, 2006. 98 с.
15. Представление результатов химического анализа (рекомендации IUPAC 1994 г.) // Аналитика и Контроль. 1998. № 3-4. С. 98-108.

DETERMINATION OF CHLOROETHANOL IN BLOOD USING LIQUID-LIQUID MICROEXTRACTION AND CAPILLARY GAS-LIQUID CHROMATOGRAPHY

A. N. Alexeyenko^{1, 2}, O. M. Zhurba¹, G. N. Korolyova²

¹*Institute of Occupational Health & Human Ecology, East-Siberian Scientific Center of Human Ecology, Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, Laboratory of physical-chemical methods of research*

block 12^a, 3, Angarsk, 665827, Russia

²*Irkutsk State University, Chemical faculty, Department of analytical chemistry*

K. Marx St., 1, Irkutsk, 664003, Russia

A procedure for the determination of the mass concentration of chloroethanol in blood in the range of 0.05 – 10 µg/cm³ has been developed. The procedure is based on the liquid-liquid microextraction of chloroethanol by diethyl ester following by the chromatographic analysis with capillary column “Polyethylene Glycol TP” and microelectron-capture detection. Relative error of the procedure is less than 30 %.

Key words: chloroethanol in blood, liquid-liquid microextraction, capillary gas-liquid chromatography.