
**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ
В МЕДИЦИНЕ И БИОЛОГИИ**

УДК 543.42.062:616-074(546.267)

А.Н. Алексеенко

**УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ГАЗОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО МЕТОДА
ОПРЕДЕЛЕНИЯ 1,2 ДИХЛОРЭТАНА В БИОСРЕДАХ**

АФ НИИ Медицины труда и экологии человека ГУ НЦ МЭ ВСНЦ СО РАМН (Ангарск)

Работ по изучению метаболизма 1,2 дихлорэтана существует мало. Метод определения 1,2 дихлорэтана должен соответствовать требованиям по точности и чувствительности. Усовершенствованный метод определения 1,2 дихлорэтана в моче основан на предварительном выделении дихлорэтана из биологического материала путем нагревания объекта и последующего газохроматографического анализа парогазовой фазы. Градуировка осуществлялась способом внутреннего стандарта. Метод удовлетворяет требованиям по чувствительности и точности.

Ключевые слова: газовая хроматография, 1,2 дихлорэтан, анализ равновесного пара, биосреды, способ абсолютной градуировки, способ внутреннего стандарта

**IMPROVING GAS CHROMATOGRAPHIC METHOD FOR DETERMINATION
1,2-DICHLOROETHANE IN BIOLOGICAL MATERIALS**

A.N. Alexeyenko

*Institute of Occupational Health and Human Ecology, Scientific Center of Medical Ecology,
East-Siberian Scientific Center, Siberian Division of the RAMS, Angarsk*

There are not many works on studying the metabolism of 1,2-dichloroethane in the literature. The method of determination 1,2-dichloroethane and its metabolites must correspond to the claims for the accuracy and sensitivity. The improved method for determination 1,2-dichloroethane in urine is based on the previous separation of dichloroethane from the biological material using the object heating and the following gas chromatographic head-space analysis. The calibration was performed using an internal standard. This method meets the claims for the sensitivity and accuracy.

Key words: gas chromatography, 1,2-dichloroethane, head-space-analysis, biological material, method for absolute calibration, method for internal standard

Одним из современных методов оценки воздействия ряда органических веществ на организм человека является биомониторинг [4, 7]. Для этого необходимо исследовать количественную связь между уровнем воздействия химических соединений и содержанием этих веществ, а также их метаболитов в биологических средах (кровь, моча), т.е. метаболизм. Наиболее изученными в этом отношении соединениями являются: бензол, толуол, стирол, метиловый спирт, метилэтилкетон, метилсернистые соединения [3]. Одними из современных методов количественного определения органических веществ являются методы газовой и жидкостной хроматографии, а также хромато-масс-спектрометрии [2, 9].

Цель настоящей работы состояла в усовершенствовании методики количественного определения 1,2 дихлорэтана в моче.

Исследования, которые необходимо было выполнить, проводились по следующим этапам: по-

иск оптимальных условий хроматографирования и способа подготовки биопробы; количественное определение 1,2 дихлорэтана способом абсолютной градуировки; количественное определение способом внутреннего стандарта; оценка основных метрологических характеристик.

При поиске оптимальных условий в основу работы положена методика газохроматографического определения 1,2 дихлорэтана в моче [8], из которой были взяты оптимальные условия разделения смеси: неподвижная фаза, газ носитель, температуры колонки, детектора, испарителя. В качестве детектора был выбран пламенно-ионизационный. Работа выполнена на японском газовом хроматографе GC-380. Оптимальные условия хроматографирования приведены в таблице 1.

Основным недостатком выбранной методики является то, что извлечение 1,2 дихлорэтана из биопробы основано на жидкостной экстракции гептаном. Это в свою очередь увеличивает длительность

анализа, требует использования дополнительных реактивов, на хроматограмме появляются мешающие пики (особенно пик органического растворителя). Поскольку 1,2-дихлорэтан легколетучее органическое соединение (температура кипения 83 °С), то для анализа можно использовать комбинированный метод – газохроматографический анализ равновесной паровой фазы [1].

Метод основан на предварительном выделении 1,2-дихлорэтана из биологического материала путем нагревания объекта и последующего газохроматографического анализа парогазовой фазы. В этом методе жидкая фаза, содержащая нелетучие и неустойчивые компоненты, вообще не анализируется. Таким образом, операции извлече-

ния вещества и его хроматографирования связаны во времени.

Количественное определение 1,2-дихлорэтана в биоматериале проводили методом абсолютной градуировки и методом внутреннего стандарта по стандартным растворам в моче.

Метод внутреннего стандарта широко используется при определении низких концентраций. В традиционном варианте этот метод предусматривает прибавление к известному количеству анализируемого образца известного количества не содержащегося в нем соединения и последующее хроматографирование исследуемой смеси.

Преимущество внутреннего стандарта состоит в том, что при его использовании сводятся к

Таблица 1

Оптимальные условия хроматографирования

Колонка	стеклянная диаметром 4 мм и длиной 6 футов
Неподвижная фаза	Apiezon L (15 %) на хроматоне
Газ-носитель	Азот особой чистоты
Температура колонки	90 °С
Температура испарителя	170 °С
Температура детектора	250 °С
Скорость газа-носителя, скорость потока водорода, скорость потока воздуха	30 см ³ /мин, 30 см ³ /мин, 300 см ³ /мин

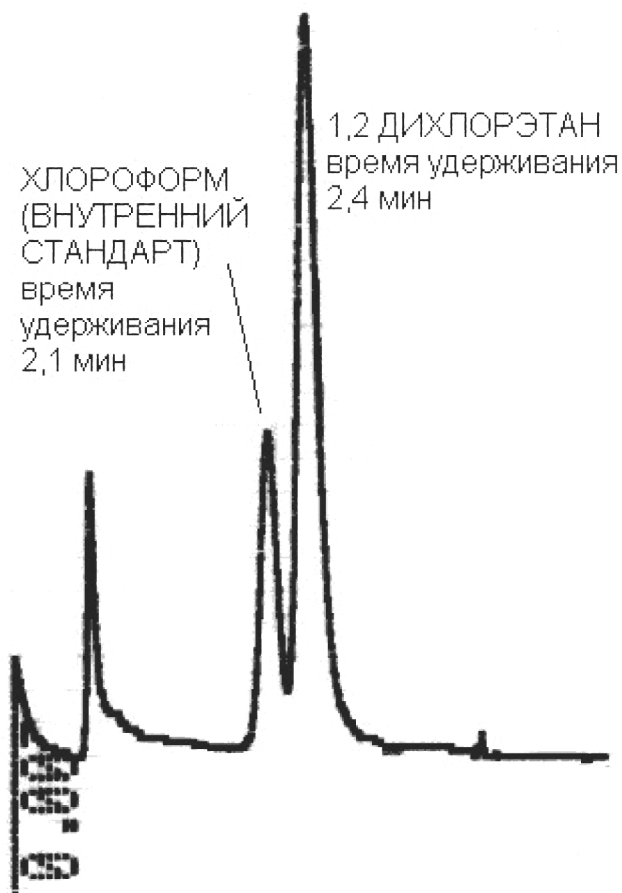


Рис. 1. Хроматограмма стандартного раствора.

минимуму погрешности в результатах, вызванные случайными изменениями основных условий анализа (приготовление растворов, подготовка пробы, условия хроматографирования), поскольку возможные отклонения от заданных условий должны равным образом влиять на количественные параметры хроматографических пиков как стандартного, так и анализируемого соединения. В качестве внутреннего стандарта использовался хлороформ. Готовили стандартные растворы 1,2 дихлорэтана в интервале 0,05 – 4,00 мкг/см³ и стандартный раствор хлороформа в воде (C = 1,19 мкг/см³).

Для анализа брали 5 мл стандартного раствора 1,2 дихлорэтана, помещали в пеницилиновый флакон, добавляли 0,01 см³ приготовленного раствора хлороформа. Флакон закрывали резиновой пробкой, уплотняли с помощью специального зажима и погружали в кипящую водяную баню при температуре 94 °С. По истечении 5 мин. отбирали стеклянным шприцем 2 мл парогазовой фазы и вводили в испаритель хроматографа.

На рисунке 1 показана хроматограмма смеси 1,2 дихлорэтана и хлороформа. Основные хроматографические параметры показаны в таблице 2. Находили значение высот пиков 1,2 дихлорэтана и хлороформа, рассчитывали их отношение и строили градуировочные графики. Градуировочные графики для определения 1,2 дихлорэтана двумя способами показаны на рисунках 2 и 3.

Проведены исследования по оценке предела обнаружения, внутрилабораторной прецизионности и правильности.

Согласно рекомендациям [8], сделано по 20 измерений сигнала фона для холостой пробы. Рассчитано стандартное отклонение фона для холостой пробы s_{ϕ} . Найдено значение $C_{\min; 0,99}$ согласно 3s критерию Кайзера, которое составляет 0,03 мкг/см³. Диапазон определяемых концентраций составляет 0,05 – 4 мкг/см³.

Для оценки внутрилабораторной прецизионности был поставлен эксперимент, позволяющий оценить погрешность приготовления стандартных растворов $V_{\text{пр}}$ и погрешность анализа равновесной

Таблица 2

Основные хроматографические параметры

Хроматографические параметры	1,2 дихлорэтан	хлороформ
Селективность	1,2	
Полуширина пика, мм	1	1
Эффективность, т.т.	798,7	554
Разрешающая способность	1,17	0,98
Асимметрия пика	1,3	1,16

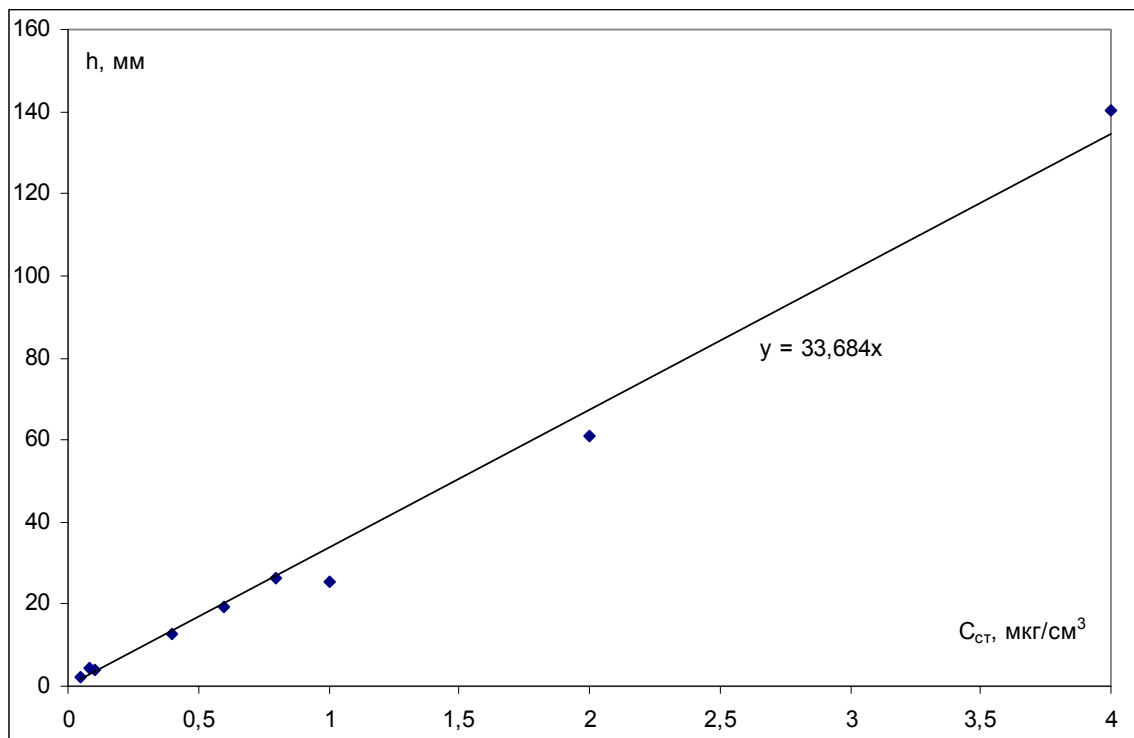


Рис. 2. Градуировочный график определения 1,2 дихлорэтана в моче методом абсолютной градуировки.

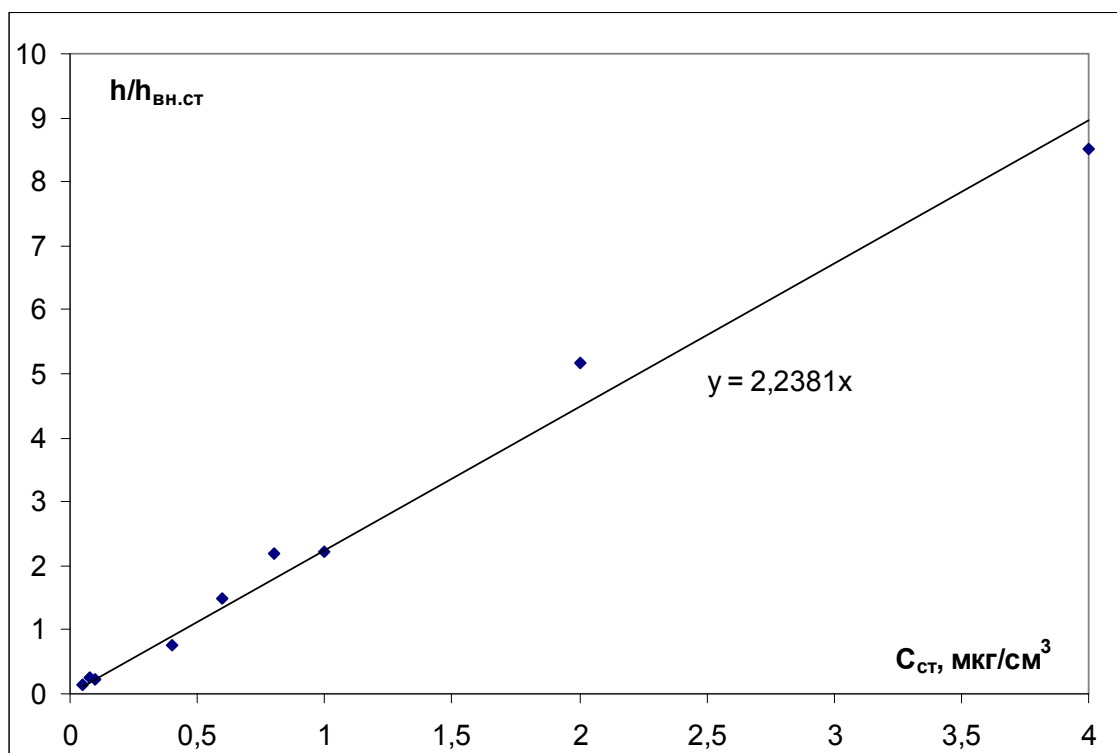


Рис. 3. Градуировочный график определения 1,2 дихлорэтана в моче методом внутреннего стандарта.

Таблица 3

Результаты оценки погрешности определения 1,2 дихлорэтана дисперсионным анализом

Погрешность	Число степеней свободы f	Метод абсолютной градуировки	Метод внутреннего стандарта
Приготовления растворов $V_{пр}$, %	8	14,6	9,2
Анализа равновесной паровой фазы V_{HSA} , %	16	9,7	15,3
Суммарная, V_{Σ} , %	24	–	17

Таблица 4

Оценка правильности методом введено–найдено

Введено, мкг/см ³	Найдено $\pm \Delta$, мкг/см ³	$t_{расч}$	Оценка ДПСП
0,05	0,06 \pm 0,01	1,9	$\bar{\delta}_{ср} = 0,09$ $S_{\delta} = 0,157$ $M = 9$ $t_{расч} = 1,80 < t_{таб}(0,05; 8) = 2,31$ ДПСП не значима
0,08	0,11 \pm 0,02	3,1	
0,10	0,10 \pm 0,02	0,1	
0,40	0,34 \pm 0,06	2,0	
0,60	0,67 \pm 0,12	1,2	
0,80	0,98 \pm 0,17	2,1	
1,00	0,99 \pm 0,17	0,1	
2,00	2,31 \pm 0,40	1,6	
4,00	3,81 \pm 0,67	0,6	

паровой фазы V_{HSA} , т.е. проведен дисперсионный анализ.

Из таблицы 3 видно, что погрешность приготовления стандартных растворов значима при способе абсолютной градуировки. Поэтому в дальнейшем целесообразно применять способ внутреннего стандарта.

Правильность оценивалась по 9 стандартным растворам (методом введено – найдено) в диапазоне 0,05 – 4 мкг/см³. Для каждого результата анализа рассчитан доверительный интервал Δ и t -критерий согласно рекомендациям [6].

Сопоставление найденного значений $t_{расч}$ с табличным $t_{таб}(0,01; 24) = 2,8$ показало, что рас-

хождение носит систематический характер только для $C_{ст} = 0,08$ мкг/см³. Также была оценена детерминированная постоянная систематическая погрешность (ДПСП) согласно рекомендациям [5]. Расчеты показали, что ДПСП незначима. Результаты представлены в таблице 4.

ВЫВОДЫ

Проведение исследования правильности по стандартным растворам не выявило значимых систематических погрешностей. Методика определения 1,2 дихлорэтана в моче была усовершенствована за счет использования газохроматографического анализа равновесной паровой фазы и метода внутреннего стандарта.

Показано, что усовершенствованная методика газохроматографического определения 1,2 дихлорэтана в моче может быть использована для определения 1,2 дихлорэтана в реальных пробах способом внутреннего стандарта.

ЛИТЕРАТУРА

1. Виттенберг А.Г. Статический парофазный газохроматографический анализ. Физико-химические основы и области применения / А.Г. Виттенберг // Жур. Рос. хим. общества им. Д.И. Менделеева. — 2003. — Т. XLVII, № 1. — С. 7–22.
2. Золотов Ю.А. Основы аналитической химии / Ю.А. Золотов, Е.Н. Дорохова, В.И. Фадеева. — В 2-х кн. — М.: Высш. шк., 2000. — 351 с.
3. 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.
4. Ревич Б.А. Биомониторинг токсичных веществ в организме человека / Б.А. Ревич // Гигиена и санитария. — 2004. — № 6. — С. 26–31.
5. Смагунова А.Н. Алгоритмы определения метрологических характеристик методик количественного химического анализа: учебное пособие / А.Н. Смагунова, О.М. Карпукова, Л.И. Белых. — Иркутск: Изд-во ИГУ, 2006. — 98 с.
6. Смагунова А.Н. Примеры применения математической теории эксперимента в рентгенофлуоресцентном анализе / А.Н. Смагунова, В.А. Козлов / Иркутск: Изд-во ИГУ, 1990. — 228 с.
7. Токсикометрия химических веществ, загрязняющих окружающую среду. МРПТХВ. Центр международных проектов ГЖНТ. — М., 1986. — С. 113–164.
8. Химико-аналитическое обеспечение социально-гигиенического мониторинга алифатических хлорированных углеводородов, фенола и алкилфенолов / Н.В. Зайцева, Е.Н. Беляев, Т.С. Уланова, Т.В. Нурисламова. — М.: Федеральный центр государственного эпидемиологического надзора Минздрава России, 2002. — 172 с.
9. Wortman A. Gaschromatographie. Praktikum physikalische und analytische Chemie. Sommersemester 2006 / A. Wortman, F. De Giacomo. — Zürich: Institut für Chemie und angewandte Biowissenschaften, 2006. — 23 s.