



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2013112991/15, 22.03.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
22.03.2013

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 22.03.2013

(45) Опубликовано: 27.06.2014 Бюл. № 18

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **Методические указания по определению трихлорметафоса-3 и его метаболитов в биологическом материале методом газожидкостной хроматографией. Утверждены Минздравом СССР 28 декабря 1982 г. N 2647-82. RU 2142627 C1, 10.12.1999. RU 2190854 C1, 10.10.2002. RU 2475737 C1, 20.02.2013. SU 346653 A1, 28.07.1972**

Адрес для переписки:

614045, г.Пермь, ул. Орджоникидзе, 82, ФГУП
"ФНЦ медико-профилактических технологий
управления рисками здоровью населения",
директору Н.В. Зайцевой

(72) Автор(ы):

ЗАЙЦЕВА Нина Владимировна (RU),
УЛАНОВА Татьяна Сергеевна (RU),
НУРИСЛАМОВА Татьяна Валентиновна
(RU),
ПОПОВА Нина Анатольевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

**Федеральное бюджетное учреждение науки
"Федеральный научный центр медико-
профилактических технологий управления
рисками здоровью населения" (ФБУН "ФНЦ
медико-профилактических технологий
управления рисками здоровью населения")
(RU)**

(54) СПОСОБ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ 2,4-ДИХЛОРФЕНОЛА В КРОВИ МЕТОДОМ ГАЗОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицинским токсикологическим исследованиям, в частности к санитарной токсикологии, и может быть использовано для количественного определения 2,4-дихлорфенола в крови. Способ включает отбор пробы крови, экстракцию органическим экстрагентом из указанной пробы 2,4-дихлорфенола и определение его количества методом газохроматографического анализа с использованием градуировочного графика, причем перед экстракцией пробу крови подкисляют раствором щавелевой кислоты до рН 2-3, при экстракции в качестве органического экстрагента используют толуол, далее к полученному экстракту добавляют бромлирующий реагент и разбавленную водой серную кислоту в объемном соотношении вода :

концентрированная серная кислота как 3:1 соответственно, проводят бромирование экстракта в течение 5 минут, после завершения которого избыток брома нейтрализуют раствором сернистокислого натрия, затем полученный бромированный экстракт центрифугируют для отделения толуола и проводят его ацетилирование трифторуксусным ангидридом в среде пиридина в течение 5 минут, при этом пробу крови, органический экстрагент - толуол, бромлирующий реагент, трифторуксусный ангидрид и пиридин берут в следующем объемном соотношении 1:0,5:0,4:0,02:0,02 соответственно. Способ обеспечивает упрощение стадии пробоподготовки при одновременном повышении чувствительности. 4 з.п. ф-лы, 6 табл., 1 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
G01N 33/50 (2006.01)
G01N 30/02 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: 2013112991/15, 22.03.2013

(24) Effective date for property rights:
22.03.2013

Priority:

(22) Date of filing: 22.03.2013

(45) Date of publication: 27.06.2014 Bull. № 18

Mail address:

614045, g.Perm', ul. Ordzhonikidze, 82, FGUP "FNTs
mediko-profilakticheskikh tekhnologij upravlenija
riskami zdorov'ju naselenija", direktoru N.V.
Zajtsevoj

(72) Inventor(s):

ZAJTsEVA Nina Vladimirovna (RU),
ULANOVA Tat'jana Sergeevna (RU),
NURISLAMOVA Tat'jana Valentinovna (RU),
POPOVA Nina Anatol'evna (RU)

(73) Proprietor(s):

Federal'noe bjudzhetnoe uchrezhdenie nauki
"Federal'nyj nauchnyj tsentr mediko-
profilakticheskikh tekhnologij upravlenija
riskami zdorov'ju naselenija" (FBUN "FNTs
mediko-profilakticheskikh tekhnologij
upravlenija riskami zdorov'ju naselenija") (RU)

(54) **METHOD FOR MEASURING BLOOD 2,4-DICHLORPHENOL BY GAS CHROMATOGRAPHY ANALYSIS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: method involves blood sampling, 2,4-dichlorophenol extraction by an organic extractant from the above sample and measurement by gas chromatography analysis with using a calibration curve; before extraction, the blood sample is acidified with an oxalic acid solution to pH 2-3; the organic extractant for the extraction is presented by toluene; further, the prepared extract is added with a bromating agent and a water-thinned sulphuric acid in volume ratio of water : concentrated sulphuric acid as 3:1 respectively; the extract is brominated for 5 minutes that is followed by

neutralising a bromine excess with sodium sulphite; the prepared brominated extract is centrifuged to separate toluene, and acetylated with trifluoroacetic anhydride in the pyridine medium for 5 minutes; the blood sample, the organic extractant toluene, the bromating agent, trifluoroacetic anhydride and pyridine are taken in the following volume ratio of 1:0.5:0.4:0.02:0.02 respectively.

EFFECT: simplifying the sample preparation stage in a combination with higher sensitivity.

5 cl, 6 tbl, 1 ex

RU 2 521 277 C1

RU 2 521 277 C1

Изобретение относится к медицинским токсикологическим исследованиям, в частности к санитарной токсикологии, и может быть использовано для количественного определения 2,4-дихлорфенола в крови.

Из уровня техники известен ряд методов определения хлорфенолов в биосредах. Так, например, в статье «Simultaneous determination by gas chromatography of phenol, 2-chlorophenol, 2,4- and 2,6-dichlorophenol, 2,4,6-trichlorophenol, and 2,3,5,6-tetrachlorophenol in the Urine of Industrially Exposed Workers» (P. B. Roosmalen, A. L. Klein and I. Drummond] (International Archives of Occupational and Environmental Health January 1980, Volume 45, Issue 1, pp. 57-62) описывается метод, в котором методом газовой хроматографии проводят одновременное определение фенола, 2-хлорфенола, 2,4- и 2,6-дихлорфенола, 2,4,6-трихлорфенола и 2,3,5,6-тетрахлорфенола в моче рабочих, подвергшихся экспозиции. Фенолы разделяются методом перегонки водяным паром и затем экстрагируются изопропиловым эфиром. Образцы анализировались без использования метода дериватизации, на газовом хроматографе с использованием стеклянной колонки (180 см×2 мм внутренний диаметр), заполненной 60/80 фракции Tenax GC (ENKA NV, Нидерланды) с детектором ионизации в пламени. Пределы обнаружения в моче составили для фенола 0,1 мг/л мочи и 1 мг/л для ди- и трихлорфенолов.

Однако указанный выше способ характеризуется следующими недостатками:

- большими затратами времени на исследования ввиду сложности выполнения пробоподготовки;
- высокой трудоемкостью выделения хлорфенолов из биосреды.

Также известен способ «Методические указания по идентификации гамма-ГХЦГ, его изомеров (альфа, бета и дельта-ГХЦГ) и метаболитов (полихлорированных фенолов) в биологических жидкостях (кровь), органах, тканях и субклеточных фракциях печени теплокровных животных методом тонкослойной хроматографии», утверждены Минздравом СССР 3 января 1985 г., № 3194-85. Известный способ основан на тонкослойном хроматографическом определении гамма-гексахлорциклогексана, его альфа-, бета- и дельта-изомеров и метаболитов при совместном присутствии в биологическом материале теплокровных с пределом обнаружения 0,01 мг/л.

При реализации этого известного метода цельную кровь (1-5 мл) помещают в мерную пробирку на шлифе, приливают 3-5 мл органического экстрагента - н-гексана, перемешивают и далее экстрагируют на аппарате для встряхивания со средней интенсивностью в течение 5-7 мин. После разделения слоев гексановый экстракт (верхний слой) отделяют с помощью пипетки, соединенной с резиновой грушей, и фильтруют через слой безводного сульфата натрия, помещенного в коническую воронку с подложкой из обезжиренной ваты. Экстракцию повторяют, экстракты объединяют. Если образуется устойчивая эмульсия и фазы разделить трудно, в пробирку вносят несколько капель этанола или 0,1-0,2 г (на кончике скальпеля) хлорида натрия. Затем проводят хроматографирование в тонком слое сорбента. Аликвотную часть (0,1 мл) экстракта с помощью микропипетки (микрошприца) наносят на хроматографическую пластинку "Силуфол" или "Кизельгель 60" F. Рядом с пробой наносят различные количества стандартных растворов изомеров гексахлорциклогексан (ГХЦГ), хлорированных фенолов (по 0,2; 1; 2; 5 мкг каждого компонента). Пластинку помещают в камеру для хроматографирования, содержащую смесь н-гексана с ацетоном в соотношении 4:1 ("Силуфол") или 6:1 ("Кизельгель 60" F). Время насыщения камеры 30 мин. После хроматографирования (длина пробега растворителя 15-17 см) пластинку проветривают в горизонтальном положении, а затем обрабатывают одним из проявляющих реагентов с помощью пульверизатора, подключенного к воздушному

компрессору. Зоны локализации гамма-, альфа-, бета- и дельта-ГХЦГ, пентахлорфенола, 2,3,4,6-тетрахлорфенола, 2,4,6- и 2,4,5-трихлорфенола, 2,4-дихлорфенола, 4-хлорфенола обнаруживаются на хроматограммах после облучения УФ-светом в виде бурых пятен. Количественную оценку содержания изомеров ГХЦГ и полихлорированных фенолов в пробе проводят визуально или денситометрически на приборе типа "Оптон".

Недостатками указанного известного метода являются:

- сложность подготовки образцов крови к количественному определению, которую осуществляют путем длительной экстракции и перемешивания;
- недостаточная чувствительность, т.к. количественный анализ в тонкослойной хроматографии характеризуется только как полуколичественный.

Также известен Способ определения моноклорфенолов в водных средах (Патент РФ №2142627), согласно которому проводят химическую модификацию, экстракционное концентрирование и газохроматографическое детектирование электрозахватным детектором (ДЭЗ), при этом в качестве модифицирующего реагента применяется молекулярный бром в количестве 0,05-0,25% к массе пробы, при содержании моноклорфенолов в воде 0,1-10 мг/дм³. Однако указанный известный способ неприменим для определения моноклорфенолов в крови.

Наиболее близким к предлагаемому изобретению является способ определения трихлорметафоса-3 и его метаболитов в биологическом материале методом газожидкостной хроматографии, который включает извлечение остатков трихлорметафоса-3 и хлорфенолов из проб биоматериала (печень, почки, головной мозг, мышцы, кровь, кал, моча) смесью органических растворителей - хлористого метилена и гексана (2:1) с добавлением этилового спирта; концентрировании экстракта и последующем определении на газовом хроматографе с ДЭЗ (детектор электронного захвата) или ДПР (детектор постоянной скорости рекомбинации) (МУК. Методические указания по определению трихлорметафоса-3 и его метаболитов в биологическом материале методом газожидкостной хроматографией. Утверждены Минздравом СССР 28 декабря 1982 г., № 2647-82). При указанном определении готовят 10-процентный гомогенат ткани (печени, почек, головного мозга, мышц, крови) в 0,25 М растворе сахарозы. Для анализа берут 1 мл гомогената, который переносят в делительную воронку на 50 или 100 мл, прибавляют 1 мл этилового спирта и экстрагируют 4 мл смеси растворителей - хлористого метилена с гексаном (2:1) трижды, каждый раз отстаивая смесь в течение 10-15 мин. Экстракты объединяют, сушат в течение 1 ч безводным сульфатом натрия и сливают в чистые пробирки. Отработанный сульфат натрия три раза ополаскивают свежими порциями растворителя по 3-5 мл и присоединяют растворитель к основному экстракту. Экстракт упаривают при комнатной температуре досуха, на что уходит обычно 3-4 дня, или отгоняют на ротационном испарителе. Остаток в колбе смывают 1 мл гексана в пробирку. При естественном упаривании к сухому остатку в пробирке прибавляют 1 мл гексана, обмывая стенки пробирки, и количественно определяют на хроматографе. Нижний предел определения трихлорметафоса-3 0,3 мг/кг, хлорфенолов 0,1 мг/кг, минимально детектируемое количество трихлорметафоса-3 0,2 нг, хлорфенолов 0,1 нг.

Недостатком указанного известного способа является высокая трудоемкость выделения хлорфенолов из биосреды, сложность пробоподготовки.

Технический результат, достигаемый предлагаемым способом, заключается в упрощении стадии пробоподготовки при одновременном повышении чувствительности.

Указанный технический результат достигается предлагаемым способом количественного определения 2,4-дихлорфенола в крови методом

газохроматографического анализа, включающим отбор пробы крови, экстракцию органическим экстрагентом из указанной пробы 2,4-дихлорфенола и определение его количества методом газохроматографического анализа с использованием градуировочного графика, при этом новым является то, что перед экстракцией пробу крови подкисляют раствором щавелевой кислоты до pH 2-3, при экстракции в качестве органического экстрагента используют толуол, далее к полученному экстракту добавляют бромлирующий реагент и разбавленную водой серную кислоту в объемном соотношении вода: концентрированная серная кислота как 3:1 соответственно, проводят бромирование экстракта в течение 5 минут, после завершения которого избыток брома нейтрализуют раствором сернистокислого натрия, затем полученный бромированный экстракт центрифугируют для отделения толуола, и проводят его ацетилирование трифторуксусным ангидридом в среде пиридина в течение 5 минут, при этом пробу крови, органический экстрагент - толуол, бромлирующий реагент, трифторуксусный ангидрид и пиридин берут в следующем объемном соотношении 1:0,5:0,4:0,02:0,02 соответственно.

Центрифугирование бромированного экстракта производят в течение 2-3 минут при 8000 об/мин.

В качестве бромлирующего реагента используют бромную воду.

В качестве раствора щавелевой кислоты используют 10%-ный водный раствор.

Газохроматографическое определение 2,4-дихлорфенола в пробе крови осуществляют с использованием газового хроматографа с детектором электронного захвата на капиллярной колонке DB-XLB-30 м*0,32 мм*0,5 мкм, при температурном режиме: капиллярная колонка - 135°C-250°C; испаритель - 260°C; детектор - 280°C; расход газ-носителя - азота - 20 см³/мин, скорость газа 3-30,0 см/с.

Поставленный технический результат достигается за счет следующего.

Экспериментальным путем обнаружено, что указанный технический результат обеспечивается именно совокупностью предложенных признаков, при реализации которых и достигается высокая чувствительность определения 2,4-дихлорфенола в пробе крови, а также упрощается способ.

При реализации предлагаемого способа подготовку пробы крови к газохроматографическому анализу проводят путем химической модификации 2,4-дихлорфенола, которая включает три этапа.

На первом этапе проводят экстракционное концентрирование 2,4-дихлорфенола из пробы крови методом жидкостной экстракции органическим экстрагентом в кислой среде. Эта стадия предназначена для перевода 2,4-дихлорфенола в более удобную для последующего газохроматографического анализа органическую фазу, для повышения его концентрации в экстракте и для отделения мешающих компонентов из биологической матрицы.

На втором этапе проводят бромирование полученного экстракта, содержащего 2,4-дихлорфенол, молекулярным бромом. При бромировании атомы брома замещают атомы водорода в ароматическом ядре 2,4-дихлорфенола в положении 6 и происходит образование бромпроизводного 6-Бром 2,4-дихлорфенола. При комнатной температуре (20±5°C) реакция бромирования 2,4-дихлорфенола завершается в течение 1 мин с количественным образованием 6-бром 2,4-дихлорфенола.

На третьем этапе проводят этерификацию в среде органического растворителя. При этом превращение 6-бром 2,4-дихлорфенола в эфиры осуществляется путем ацетилирования трифторуксусным ангидридом, реакция катализируется пиридином. Ацетилирование улучшает газохроматографические характеристики бромпроизводных:

уменьшает полярность соединений, понижает температуры кипения, нейтрализует активный атом водорода ОН-группы, осложняющий газохроматографический анализ.

Таким образом, пробоподготовка в предлагаемом способе является значительно более простой, чем в прототипе, как по времени, так и по трудоемкости.

5 Благодаря тому, что эфирные производные 6-бром 2,4-дихлорфенола анализируют методом капиллярной газовой хроматографии с детектором электронного захвата, обеспечивает максимально возможное по чувствительности газохроматографическое определение 6-бром 2,4-дихлорфенола.

10 В лабораторных условиях был проведен ряд опытов для установления существенности признаков, положенных в основу предлагаемого способа.

Пример. Согласно заявляемому способу, берут анализируемую пробу крови объемом 5 см³, помещают ее в пробирку вместимостью 13,0 см³, приливают 3,0 см³ бидистиллированной воды, 1 см³ 10% раствора щавелевой кислоты до рН 2-3 и 2,5 см³ органического экстрагента - толуола и проводят экстракционное концентрирование в течение 5 мин.

20 Затем к полученному экстракту добавляют бромлирующий реагент - бромную воду объемом 2 см³ и 0,4 см³ разбавленной серной кислоты (1:3) и бромлюют в течение 5 мин. После завершения бромирования избыток брома нейтрализуют 0,6 см³ раствора сернистоокислого натрия.

Для отделения органического экстрагента - толуола экстракт центрифугируют в течение 2-3 мин при 8000 об/мин и затем сушат сульфатом натрия массой 0,5 г.

25 Затем проводят превращение вышеуказанного бромированного экстракта в простые эфиры путем ацетилирования с помощью трифторуксусного ангидрида (объем 0,1 см³) в среде пиридина (объем 0,1 см³) в течение 5 минут.

30 Полученный эфир (трифторацетата 2,4-дихлорфенол) в объеме 1 мм³ анализируют газохроматографическим методом с использованием детектора электронного захвата на аппаратно-программном комплексе "Кристалл 5000" на капиллярной колонке серии ДВ-ХЛВ-30 м*0,32 мм*0,5 мкм, при температурном режиме: колонка 135°С-250°С; испаритель 260°С; детектор 280°С; расход газа-носителя - азота 20 см³/мин, скорость газа 3-30,0 см/с, (высокая эффективность метода определения 2,4-дихлорфенола в крови достигнута путем подбора оптимальных условий газохроматографического анализа) и проводят количественное определение анализируемого соединения в подготовленной пробе по градуировочному графику, который строится посредством использования стандартных растворов 2,4-дихлорфенола.

40 Для построения калибровочного графика использовали следующую методику. Градуировочные характеристики устанавливали на градуировочных растворах 2,4-дихлорфенола методом абсолютной градуировки. Приготовленные растворы хроматографировали на капиллярной колонке не менее 5 раз. На полученной хроматограмме определяли площади пиков определяемых компонентов, и по средним результатам измерений по 5 концентрациям для градуировки строили градуировочную характеристику. Она выражает зависимость площади пика исследуемых веществ на хроматограмме (мВ - при автоматическом обсчете с использованием программно-аппаратного комплекса) от содержания (мкг/см³).

45 В пробирки, куда предварительно было введено 5,0 см³ бидистиллированной воды, вводят микрошприцем различные объемы рабочих растворов 2,4-дихлорфенола для

градуировки, согласно таблице 1. Каждая серия состоит из 5 растворов для градуировки.

Номер рабочего раствора для градуировки	1	2	3	4	5
Объем исходного раствора (с=0,25 мг/см ³), мм	1	2	4	8	16
Массовая концентрация 2,4-дихлорфенола, мкг/см ³	0,05	0,1	0,2	0,4	0,8

Затем добавляют 2,5 см³ толуола и проводят экстракционное концентрирование в течение 5 мин. К полученному экстракту добавляют бромлирующий реагент объемом 2 см³ и 0,4 см³ разбавленной серной кислоты (1:3) и бромлюют в течение 5 мин. После завершения бромирования избыток брома нейтрализуют 0,6 см³ раствора сернистокислого натрия. Для отделения толуола экстракт центрифугируют в течение 2-3 мин при 8000 об/мин, и затем сушат сульфатом натрия массой 0,5 г. Добавляют трифторуксусный ангидрид (V=0,1 см³) и пиридин (V=0,1 см³) и проводят реакцию ацетилирования (этерификации) в течение 5 минут. Полученный эфир (трифторацетата 2,4-дихлорфенол) в объеме 1 мм³ анализируют газохроматографическим методом. Процедуру повторяют аналогично для каждого градуировочного раствора. На полученной хроматограмме определяют площади пиков определяемых компонентов, и по средним результатам из 5 серий строят градуировочный график. Для получения достоверных результатов анализ каждой градуировочной смеси проводят не менее 2-х раз. Процедуру повторяют аналогично для каждого градуировочного раствора.

При проведении исследований была изучена эффективность извлечения 2,4-дихлорфенола из крови путем применения ряда органических экстрагентов: хлористый метилен, диэтиловый эфир, хлористый метилен + гексан, гексан, толуол. Средние значения полноты экстракции 2,4-дихлорфенола из крови представлены в таблице 2.

Органический экстрагент	2,4-хлорфенол		Степень экстракции, %
	Введено	Найдено	
1. Хлористый метилен	0,18	0,002±0,0004	1,1
2. Диэтиловый эфир		0,011±0,0021	6,1
3. Хлористый метилен + гексан (1:1)		0,0002±0,000015	0,11
4. Гексан	9,25	3,57±0,35	38,6
5. Толуол		5,96±0,43	64

p - число серий опытов; p - вероятность

Установлено, что наибольшее извлечение 2,4-дихлорфенола из крови достигается экстракцией его толуолом - 64%.

Определение 2,4-дихлорфенола в крови включает экстракционное концентрирование его из проб крови толуолом при pH=2-3 и последующем определении на газовом хроматографе с детектором электронного захвата. Наибольшая степень экстракции при подобранных оптимальных условиях газохроматографического анализа и органического растворителя была достигнута при использовании толуола и 10% раствора щавелевой кислоты при pH=2-3.

В процессе исследований установлены оптимальные условия бромирования 2,4-хлорфенола: исходная концентрация брома в растворе, pH среды, продолжительность бромирования. С этой целью к 2 см³ пробы крови (без 2,4-дихлорфенола) добавляют 5 мм³ исходного стандартного раствора (концентрация 2,4-дихлорфенола 4,6 мкг/см³),

затем добавляют 3 см³ бидистиллированной воды, подкисляют 10% раствором щавелевой кислоты до pH=2-3 и экстрагируют 2 см³ толуолом в течение 5 минут. Полученный экстракт центрифугируют при 8000 об/мин в течение 2-3 минут и сливают

5 в пробирку объемом 10 см³.

Затем устанавливают время бромирования. Для этого проводят бромирование 2,4-дихлорфенола в полученном органическом экстракте в кислой среде. К указанному экстракту добавляют бромлирующий реагент в объеме 2 см³ и 0,4 см³ разбавленной серной кислоты, и при pH=2-3 и бромруют образец в течение 1, 3 и 5 минут.

10 Избыток брома удаляют из органического экстракта раствором сернистокислового натрия объемом 0,4 см³ и пробирку энергично встряхивают в течение 3 мин. Затем центрифугируют образец при 8000 об/мин, в течение 2-3 минут до разделения водной и органической фракций. После разделения слоев 1 мм³ органического экстракта анализируют газохроматографическим методом.

15 Для идентификации 2,4-дихлорфенола в крови применяют реакцию взаимодействия хлорпроизводного фенола с молекулярным бромом. В процессе исследований было установлено, что в кислой среде при избытке молекулярного брома (~10³-кратный молярный избыток по сравнению с расчетным стехиометрическим соотношением)

20 бромпроизводное 2,4-дихлорфенола образуется в течение 5 минут с количественным выходом, после чего происходит снижение его концентрации, вызванное окислением (таблица 3).

25 Таблица 3
Полнота экстракции 2,4-дихлорфенола из крови в зависимости от времени бромирования

Время бромирования, мин	Концентрация, мкг/см ³		Полнота экстракции, %
	Введено	Найдено	
1,0	1,11	0,19±0,032	17,1
3,0	1,11	0,45±0,071	40,5
5,0	1,11	0,98±0,054	88,3

30 В ходе экспериментальных работ по выбору органического экстрагента изучали зависимость полноты экстракции 2,4-дихлорфенола различными экстрагентами в кислой среде с последующим бромированием в течение 5 минут органического экстракта бромной водой (таблица 4).

35 Таблица 4
Полнота экстракции 2,4-дихлорфенола из крови (бромирование органического экстракта бромной водой)

Органический экстрагент	Концентрация 2,4-дихлорфенола, мкг/см ³		Полнота экстракции, %
	Введено	Найдено	
Гексан	9,25	4,98±0,44	53,8
Толуол	9,25	7,1±0,42	76,8

40 Наибольшая степень экстракции при подобранных оптимальных условиях бромирования 2,4-дихлорфенола и органического растворителя была достигнута при использовании толуола для экстракционного концентрирования в кислой среде при pH=2-3, времени бромирования в течение 5 мин и составила для 2,4-дихлорфенола -

45 76,8%.

Изучена зависимость полноты экстракции 2,4-дихлорфенола из крови от применения органического экстрагента, бромирования органического экстракта в течение 5 мин в избытке молекулярного брома, ацетилирующего реагента - трифторуксусного ангидрида,

реакция катализируется пиридином (таблица 5).

Органический экстрагент	Концентрация 2,4-дихлорфенола, мкг/см ³		Полнота экстракции, %
	Введено	Найдено	
Гексан	9,25	6,12±0,58	66,2
Толуол	9,25	8,2±0,39	88,8

Оптимальный эффект полноты экстракции изучаемых соединений из пробы крови наблюдался при использовании в качестве органического экстрагента - толуола, ацетилирующего реагента - трифторуксусного ангидрида, катализатора - пиридина, при объемных соотношениях проба крови, толуол, бромлирующий реагент, трифторуксусный ангидрид и пиридин как 1:0,5:0,4:0,02:0,02 соответственно. При изменении этого соотношения в большую или меньшую стороны полнота экстракции снижалась.

Основные стадии получения производных 2,4-дихлорфенола и полнота экстракции из крови органическим экстрагентом - гексаном при реализации предлагаемого способа представлены в таблице 6.

Стадии пробоподготовки	2,4-дихлорфенол, мкг/см ³		Полнота экстракции, %
	Введено	Найдено	
1. Экстракция гексаном	9,25	3,57	38,6
3. Экстракция гексаном + бромирование		4,98	53,8
4. Экстракция гексаном + бромирование + трифторуксусный ангидрид и пиридин		6,12	66,2

Таким образом, при реализации предлагаемого способа на различных этапах происходит следующее: в экстракционной системе толуол - проба крови извлекается до 64% 2,4-дихлорфенола (таблица 2), бромпроизводных 2,4-дихлорфенола - 76,8% (таблица 4), для их эфирных бромпроизводных степень извлечения увеличивается и достигает для 2,4-дихлорфенола - 88,8% (таблица 5). Нижний предел обнаружения 2,4-дихлорфенола в анализируемом объеме образца крови составляет 0,00005 мкг или 0,05 нг. Предлагаемый способ позволяет увеличить чувствительность определения 2,4-дихлорфенола в крови по сравнению с прототипом в 10 раз.

Формула изобретения

1. Способ количественного определения 2,4-дихлорфенола в крови методом газохроматографического анализа, включающий отбор пробы крови, экстракцию органическим экстрагентом из указанной пробы 2,4-дихлорфенола и определение его количества методом газохроматографического анализа с использованием градуировочного графика, отличающийся тем, что перед экстракцией пробу крови подкисляют раствором щавелевой кислоты до pH 2-3, при экстракции в качестве органического экстрагента используют толуол, далее к полученному экстракту добавляют бромлирующий реагент и разбавленную водой серную кислоту в объемном соотношении вода : концентрированная серная кислота как 3:1 соответственно, проводят бромирование экстракта в течение 5 минут, после завершения которого избыток брома нейтрализуют раствором сернистокислого натрия, затем полученный бромированный экстракт центрифугируют для отделения толуола, и проводят его ацетилирование трифторуксусным ангидридом в среде пиридина в течение 5 минут, при этом пробу

крови, органический экстрагент - толуол, бромлирующий реагент, трифторуксусный ангидрид и пиридин берут в следующем объемном соотношении 1:0,5:0,4:0,02:0,02 соответственно.

5 2. Способ по п.1, отличающийся тем, что центрифугирование бромированного экстракта производят в течение 2-3 минут при 8000 об/мин.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве бромирующего реагента используют бромную воду.

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве раствора щавелевой кислоты используют 10%-ный водный раствор.

10 5. Способ по п.1, отличающийся тем, что газохроматографическое определение 2,4-дихлорфенола в пробе крови осуществляют с использованием газового хроматографа с детектором электронного захвата на капиллярной колонке DB-XLB-30 м*0,32 мм*0,5 мкм, при температурном режиме: капиллярная колонка - 135°C-250°C; испаритель - 260°C; детектор - 280°C; расход газа-носителя - азота - 20 см³/мин, скорость газа 3-30,0
15 см/с.

20

25

30

35

40

45