



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2011126753/15, 29.06.2011

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
29.06.2011

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 29.06.2011

(45) Опубликовано: 10.06.2012 Бюл. № 16

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2110794 C1, 10.05.1998. SU 1422143 A1, 07.09.1988. SU 1270658 A1, 15.11.1986. SU 1493938 A1, 15.07.1989. RU 2112978 C1, 10.06.1998. ТЕРЕНТЬЕВ А.П. и др. Журнал аналитической химии, 1956, т.11, в.3, с.23-26.

Адрес для переписки:

614045, г.Пермь, ул. Орджоникидзе, 82,
ФБУН "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),
Бакулина Ульяна Степановна (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 АКРИЛОНИТРИЛА В КРОВИ
МЕТОДОМ ГАЗОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО АНАЛИЗА**

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицинских токсикологических исследований, в частности к санитарной токсикологии. При осуществлении способа берут 2 см³ цельной крови, содержащей акрилонитрил, подкисляют ее 0,5 см³ 1% раствором серной кислоты до pH 2-3, проводят экстракцию 2 см³ диэтилового эфира в течение 1-2 мин, далее для удаления белков осуществляют центрифугирование пробы при 6000 об/мин в течение 10 мин и проводят количественное определение акрилонитрила в подготовленных

пробах газохроматографическим методом по калибровочному графику с использованием аппаратно-программного комплекса на базе газового хроматографа "Кристалл-5000" с термоионным детектором на капиллярной колонке DB-624-30m*0,32mm*0,25µm при температурном режиме: колонка - 50°C-200°C, испаритель - 200°C; детектор - 250°C; расход газа-носителя 1 (азот) - 1,4 см³/мин; расход газа-носителя 2 (азот) - 20 см³/мин. Достигается повышение точности, чувствительности и упрощение анализа. 3 з.п. ф-лы, 1 прим., 4 табл.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION(21)(22) Application: **2011126753/15, 29.06.2011**(24) Effective date for property rights:
29.06.2011

Priority:

(22) Date of filing: **29.06.2011**(45) Date of publication: **10.06.2012 Bull. 16**

Mail address:

**614045, g.Perm', ul. Ordzhonikidze, 82, FBUN
"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),
Bakulina Ul'jana Stepanovna (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 OF ACRYLONITRILE EVALUATION BY GAS CHROMATOGRAPHY ANALYSIS

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: method is implemented by taking whole blood 2 cm³ containing acrylonitrile, acidifying 0.5 cm³ with 1% sulphuric acid to pH 2-3, extracting diethyl ester 2 cm for 1-2 min., centrifuging the sample at 6000 rpm for 10 min to remove proteins and evaluating acrylonitrile in the prepared samples as provided by gas chromatography analysis according to a calibration diagram with using a soft hardware complex of the gas

chromatograph Crystall-5000 equipped with a thermoionic detector in a capillary column DB-624-30m*0,32mm*0,25µm at temperature mode: the column - from 50°C-200°C, the vaporising apparatus - 200°C; the detector - 250°C; carrier 1 gas consumption (nitrogen) - 1.4 cm³/min; carrier 2 gas consumption (nitrogen) - 20 cm³/min.

EFFECT: higher accuracy, sensitivity and simplification of the analysis.

4 cl, 1 ex, 4 tbl

Изобретение относится к области медицинских токсикологических исследований, в частности к санитарной токсикологии, и может быть использовано для количественного определения акрилонитрила в цельной крови.

Известен метод определения акрилонитрила в воде [1] путем обработки анализируемой пробы раствором перманганата калия, удаления избытка последнего восстановителем, добавлением бромной воды и удалением избытка брома тем же восстановителем с последующим определением образующегося бромциана, при этом в качестве восстановителя используют 0,2-0,3%-ный раствор нитрита натрия, образующийся бромциан перед определением высаливают, экстрагируют толуолом и определение ведут путем газохроматографического анализа экстракта. Способ заключается в следующем: к 1 см³ воды добавляют 1 см³ щелочного раствора перманганата калия (3,5 см³ 0,1 н раствор КМnO₄ доводят до 100 см³ 0,1 н раствором NaOH). Избыток КМnO₄ удаляют добавлением 0,2 см³ 0,3% водного раствора NaNO₂ и подкисляют 0,5 см³ 2 н раствора HCl. Раствор при этом обесцвечивается. Затем к смеси добавляют 0,1-0,2 см³ насыщенной бромной воды до образования ярко желтого окрашивания, перемешивают и избыток брома связывают добавлением 1,5 г NaCl и экстрагируют образовавшийся BrCN 2 см³ толуола энергичным встряхиванием в течение 3 мин. Аликвотную часть (3 мкл) толуольного слоя анализируют на хроматографе с ДЭЗ, используя стеклянную колонку длиной 2 м и внутренним диаметром 4 мм, заполненную силанизированным хроматоном, покрытым 15% полиэтиленгликоля 1500. Количественный анализ проводят методом абсолютной калибровки по высотам пиков. Чувствительность определения акрилонитрила 0,1 мкг/см³.

Также известен способ количественного определения акрилонитрила в воде [2]. Известный способ осуществляют обработкой пробы воды объемом 1 см³ щелочным раствором перманганата калия объемом 1 см³ (1,9 см³ 0,1 н раствора перманганата калия доводят до 100 см³ 0,05 н гидроксидом натрия) с последующим удалением его избытка и бромированием пробы 1-2 капли 10-40%-ной HBr, избыток которой удаляют 0,1 см³ 3%-ным раствором салицилата натрия до обесцвечивания жидкости. Далее раствор экстрагируют 2 см³ толуола в течение 3 мин и экстракт (3 мкл) анализируют газохроматографическим методом с электронно-захватным детектором. Количественный анализ проводят методом абсолютной калибровки по высоте пиков. Чувствительность определения 0,001 мкг/см³. Однако для определения акрилонитрила в крови данный известный способ не применим в виду использования сильного окислителя, который оказывает влияние на точность анализа. Это объясняется тем, что перманганат-ион обладает высокой окислительной способностью и легко окисляет органические соединения, содержащиеся в пробе крови, в том числе и акрилонитрил. В результате этого процесса возможно образование других более сложных органических соединений, что может затруднить экстракцию и определение изучаемого соединения в пробе крови.

Наиболее близким к предлагаемому способу по технической сущности является способ определения акрилонитрила в его аддуктах с белками крови [3]. Способ включает взятие крови, очищение глобина по Остерману-Голкару, подготовку образцов к количественному определению, количественное определение акрилонитрила с использованием газовой хроматографии и масс-спектрометрии. Новым в способе является то, что подготовку образцов к количественному

определению осуществляют путем окисления атома серы в алкилированных белках до сульфоксидной формы с помощью перекиси водорода с последующим освобождением акрилонитрила из сульфоксидной формы при температуре $250 \pm 5^\circ\text{C}$ в инъекционной камере газового хроматографа. При этом очищение глобина производилось по методу Остермана-Голкара [4].

Недостатком известного способа является сложность подготовки образцов к количественному определению, которую осуществляют путем окисления атома серы в алкилированных белках до сульфоксидной формы перекисью водорода с последующим освобождением акрилонитрила из сульфоксидной формы при $(250 \pm 50)^\circ\text{C}$ в инъекционной камере газового хроматографа. Еще одним недостатком известного способа является недостаточная чувствительность и точность.

Технический результат, достигаемый предлагаемым изобретением, заключается в повышении чувствительности и точности определения акрилонитрила в цельной крови при одновременном упрощении способа.

Указанный технический результат достигается предлагаемым способом количественного определения акрилонитрила в крови методом газохроматографического анализа, включающим отбор пробы крови, подготовку ее к анализу и количественное определение акрилонитрила методом газохроматографического анализа, отличающийся тем, что подготовку пробы крови к анализу производят путем подкисления ее 1%-ным водным раствором серной кислоты до pH 2-3, последующего осуществления экстракции акрилонитрила диэтиловым эфиром, объем которого соотносится с объемом пробы крови как 1:1, и центрифугирования при 6000 об/мин в течение 10 мин для отделения белков от экстракта, далее, с помощью метода газохроматографического анализа, используя градуировочный график, производят определение в полученном экстракте количественного содержания акрилонитрила.

Экстракцию акрилонитрила диэтиловым эфиром производят в течение 1-2 мин.

Подкисление пробы 1%-ным водным раствором серной кислотой производят в объемном соотношении с пробой как 1:4.

Газохроматографическое определение акрилонитрила в крови осуществляют с использованием газового хроматографа "Кристалл-5000" с термоионным детектором на капиллярной колонке DB-624-30m*0,32mm*0,25 μm при температурном режиме: колонка - 50°C - 200°C , испаритель - 200°C ; детектор - 250°C ; расход газа-носителя 1 (азот) - $1,4 \text{ см}^3/\text{мин}$; расход газа-носителя 2 (азот) - $20 \text{ см}^3/\text{мин}$.

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

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

Пример. Согласно заявляемому способу берут 2 см^3 цельной крови, содержащей акрилонитрил, подкисляют ее $0,5 \text{ см}^3$ 1% раствором серной кислоты до pH 2-3, проводят экстракцию 2 см^3 диэтилового эфира в течение 1-2 мин, далее для удаления белков осуществляют центрифугирование пробы при 6000 об/мин в течение 10 мин и проводят количественное определение акрилонитрила в подготовленных пробах газохроматографическим методом по калибровочному графику с использованием аппаратно-программного комплекса на базе газового хроматографа "Кристалл-5000" с термоионным детектором на капиллярной колонке DB-624-30m*0,32mm*0,25 μm при

температурном режиме: колонка - 50°C-200°C, испаритель - 200°C; детектор - 250°C; расход газа-носителя 1 (азот) - 1,4 см³/мин; расход газа-носителя 2 (азот) - 20 см³/мин.

Для построения калибровочного графика использовали следующую методику.

Градуировка проводится с целью получения градуировочной зависимости, которая характеризует зависимость между величиной отклика детектора (площадь пика на хроматограмме мм²) и концентрации (мкг/см³) акрилонитрила в пробе и строится по 7 сериям рабочих стандартных растворов. Каждую серию, состоящую из 5 стандартных растворов, готовят в мерных пробирках объемом 5 см³. Для этого в каждую пробирку, содержащую 2 см³ крови, вводят акрилонитрил в соответствии с таблицей 1.

Таблица 1								
Стандартные растворы для установления градуировочной характеристики при определении в крови акрилонитрила в диапазоне концентраций 0,0159-0,8 мкг/см ³								
Номер смеси	1	2	3	4	5	6	7	8
Акрилонитрил Объем исходного стандартного раствора, мм ³	0,2	0,5	1	2	4	6	8	10
Концентрация акрилонитрила , мкг/см ³	0,0159	0,039	0,0795	0,159	0,319	0,477	0,636	0,795

Для построения градуировочного графика используют цельную кровь, не содержащую исследуемый компонент - акрилонитрил. В пробирки помещают по 2 см³ крови со стандартной смесью, содержащей акрилонитрил, подкисляют 0,5 см³ 1% раствором серной кислоты до pH 2-3, экстрагируют 2 см³ диэтилового эфира в течение 1-2 мин. Для денатурации белков экстракты центрифугируют при 6000 об/мин в течение 10 мин и переносят в бюкс и проводят количественное определение акрилонитрила в подготовленных пробах газохроматографическим методом.

Полученные экстракты - стандартные растворы хроматографируют на хроматографе «Кристалл-5000» с термоионным детектором. В хроматографическую колонку через испаритель вводят по 1 мм³ экстракта каждого градуировочного раствора и анализируют в условиях:

температура термостата колонок 50-200°C при скорости нагревания 10°C/мин; расход газа-носителя (азот) - 30 см³/мин; деление потока 1:10. Время удерживания: акрилонитрила - 4 мин 05 с. Для получения достоверных результатов анализ каждой градуировочной смеси проводят не менее 2-х раз,

Отработка оптимальных газохроматографических параметров для определения акрилонитрила в крови на фоне других азотсодержащих соединений осуществлялась с использованием аппаратно-программного комплекса на базе газового хроматографа "Кристалл-5000" с термоионным детектором (ТИД). Высокая эффективность метода определения акрилонитрила в крови достигнута путем подбора оптимальных условий газохроматографического анализа: термоионный детектор (ТИД), капиллярная колонка DB-624 -30 м*0,32 мм*0,25µm, температурный режим колонка - от 50°C-200°C; испаритель - 200°C; детектор - 250°C; расход газа-носителя 1 (азот) - 1,4 см³/мин; расход газа-носителя 2 (азот) - 20 см³/мин.

При проведении исследований была изучена эффективность извлечения акрилонитрила из крови путем применения ряда различных экстрагентов: хлористый метилен, диэтиловый эфир, гептан. Средние значения полноты экстракции

акрилонитрила из крови для ряда экстрагентов и параметров аналитического процесса представлены в таблице 2.

5

Таблица 2

Средние значения полноты экстракции акрилонитрила из крови			
Экстрагент	Концентрация акрилонитрила в пробе крови, мкг/см ³		Полнота экстракции, %
	Введено	Найдено	
1. Хлористый метилен	0,159±0,013	0,227±0,021	14
2. Гептан	0,159±0,015	0,260±0,025	16,5
3. Диэтиловый эфир	0,159±0,014	0,149±0,011	94,0

10

Установлено, что наибольшее извлечение акрилонитрила из крови достигается экстракцией его диэтиловым эфиром - 94%.

15 В процессе исследований также изучена зависимость степени экстракции акрилонитрила от типа неорганических кислот и природы органических растворителей. Полученные данные приведены в таблице 3.

20

Таблица 3

Средние значения полноты экстракции акрилонитрила из пробы крови в зависимости от природы органических растворителей и типа неорганических кислот			
Экстрагент	Тип неорганической кислоты		
	1% р-р H ₂ SO ₄	1% р-р HCl	1% р-р H ₃ PO ₄
	Полнота экстракции, %		
1. Хлористый метилен	28,0	10,0	8,0
2. Гептан	10,0	6,5	7,9
3. Диэтиловый эфир	94,7	33,0	35,0

25

30 Наибольшая степень экстракции (94,7%) при подобранных оптимальных условиях газохроматографического анализа и типа неорганических кислот была достигнута в предлагаемом способе при использовании диэтилового эфира и серной кислоты.

35 При проведении исследований также проводили анализы пробы крови у детей, проживающих в условиях экологического неблагополучия с возможным влиянием акрилонитрила на организм ребенка. Пробы крови обрабатывали предлагаемым способом и по калибровочному графику определяли содержание компонента в пробах. Полученные результаты приведены в таблице 4.

40

Таблица 4

Содержание акрилонитрила в крови детей группы обследования	
№ пробы ребенка	Содержание акрилонитрила, мкг/см ³
1	0,0102
2	0,014
3	0,0128
4	0,0107
5	0,011

45

50 В результате проведенного эксперимента установлено, что чувствительность определения для акрилонитрила в пробе цельной крови составила 0,01 мкг/см³. При этом исследовании погрешность определения составила для акрилонитрила 25,0%.

Испытания показали, что возможно определение акрилонитрила в количестве 0,00001 мкг в анализируемом объеме пробы. Это следует из следующего

расчета: 0,01 мкг в 1 см³ или в 1000 мм³ крови. В хроматограф мы вкалываем 1 мм³, который является анализируемым объемом пробы. Таким образом, 0,01 мкг разделить на 1000 мм³, и получаем чувствительность 0,00001 мкг в анализируемом объеме пробы.

5 Таким образом, применение предлагаемого способа позволяет повысить чувствительность определения, а именно: степень экстракции акрилонитрила из крови при оптимально подобранных газохроматографических условиях и заявляемых операциях подготовки пробы к анализу составила 94,7%. В то время как известный способ определения акрилонитрила в его аддуктах с белками крови по прототипу (патент РФ №2110794) позволяет определять только 27% от дозы 25-28 мг/кг (при уровне дозы акрилонитрила 25-28 мг/кг, количество акрилонитрила, связанного с гемоглобином и измеренного как S-(2-карбоксиэтил)цистеин, составляет примерно 27% от соответствующей величины).

15 Наряду с указанным, у заявляемого способа значительно сокращен период подготовки образцов к исследованию, а именно с 30 мин у известного способа до 19 мин у предлагаемого способа, что приводит к его упрощению. Доказательством этому служит расчет времени подготовки образцов к исследованию и газохроматографический анализ:

20 - 2 см³ цельной крови, содержащей акрилонитрил, подкисляют ее 0,5 см³ 1% раствором серной кислоты до pH 2-3, проводят экстракцию 2 см³ диэтилового эфира в течение 1-2 мин - общее затраченное время 4 мин;

- для удаления белков осуществляют центрифугирование пробы при 6000 об/мин в течение 10 мин - общее время 11 мин;

25 - количественное определение акрилонитрила в подготовленных пробах газохроматографическим методом - время выхода акрилонитрила составляет 4 мин; - итого общее время - 19 мин.

Список использованной литературы

30 1. А.с. СССР №1059507. Способ количественного определения акрилонитрила, кл. G01N 31/08, 1982.

2. А.с. СССР №1493948. Способ количественного определения акрилонитрила, кл. G01N 31/00, 1987.

35 3. Патент РФ №2110794. Способ определения акрилонитрила в его аддуктах с белками крови, кл. G01N 33/48, 1992.

4. Osterman - GolKar S., Ehrenberg L., Segerback D., Mutal. Res., 1976, vol. 34, p.1-10.

Формула изобретения

40 1. Способ количественного определения акрилонитрила в крови методом газохроматографического анализа, включающий отбор пробы крови, подготовку ее к анализу и количественное определение акрилонитрила методом газохроматографического анализа, отличающийся тем, что подготовку пробы крови к анализу производят путем подкисления ее 1%-ным водным раствором серной кислоты до pH 2-3, последующего осуществления экстракции акрилонитрила диэтиловым эфиром, объем которого соотносится с объемом пробы крови как 1:1, и центрифугирования при 6000 об/мин в течение 10 мин для отделения белков от экстракта, далее с помощью метода газохроматографического анализа, используя градуировочный график, производят определение в полученном экстракте 45 количественного содержания акрилонитрила.

50 2. Способ по п.1, отличающийся тем, что экстракцию акрилонитрила диэтиловым эфиром производят в течение 1-2 мин.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что подкисление пробы 1%-ным водным раствором серной кислотой производят в объемном соотношении с пробой как 1:4.

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что газохроматографическое определение акрилонитрила в крови осуществляют с использованием газового хроматографа "Кристалл-5000" с термоионным детектором на капиллярной колонке DB-624-30m*0,32mm*0,25μm при температурном режиме: колонка - от 50-200°C, испаритель - 200°C; детектор - 250°C; расход газа-носителя 1 (азот) - 1,4 см³/мин; расход газа-носителя 2 (азот) - 20 см³/мин.

10

15

20

25

30

35

40

45

50