



Журба О.М., Алексеенко А.Н., Шаяхметов С.Ф.

Оптимизация условий этерификации тиодиуксусной кислоты в моче с помощью математического планирования для проведения биологического мониторинга

ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований», 665827, Ангарск, Россия

Введение. Для оценки воздействия токсикантов винилхлорида (ВХ) и 1,2-дихлорэтана (ДХЭ) на человека наибольшее значение имеет персонализированный биомониторинг тиодиуксусной кислоты (ТДУК). Определение ТДУК в моче проводили с помощью метода газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС).

Материалы и методы. Пробоподготовка заключается в этерификации аналита в биологической матрице метиловым спиртом (с 10% трифторида бора), извлечении производного жидкостной экстракцией этилацетатом. В работе использовали газовый хроматограф Agilent 7890A с капиллярной колонкой HP-5MS и масс-селективным детектором. Идентифицировали ТДУК в виде сложного диметилового эфира на масс-хроматограмме по времени удерживания и соотношению интенсивностей регистрируемых ионов.

Результаты. С целью определения рациональных параметров процесса пробоподготовки для определения ТДУК в моче были проведены исследования в соответствии с методом планирования эксперимента, позволяющим получить наиболее точное математическое описание процессов. Оптимизацию условий этерификации ТДУК осуществляли с помощью математического планирования, варьируя температуру, время процесса, природу катализатора (BF_3 и H_2SO_4). Матрица планирования включала в себя восемь опытов, в качестве параметра оптимизации служила степень конверсии ТДУК. Интерпретация модели показала, что температура вносит больший вклад в формирование степени конверсии, чем время процесса, а природа катализатора не оказывает влияние на степень конверсии.

Заключение. Разработана математическая модель оптимизации условий пробоподготовки биомаркера экспозиции ВХ (ТДУК) в моче, показывающая вклад 3 факторов (температуру реакции, время реакции, природу катализатора) в степень конверсии, из которых наибольший вклад в выборе оптимальных условий этерификации вносит температура реакции. Природа катализатора (BF_3 и H_2SO_4) не оказывает влияние на степень конверсии.

Ключевые слова: винилхлорид; производство поливинилхлорида; метаболиты; тиодиуксусная кислота; биологические среды; газовая хромато-масс-спектрометрия; математическое планирование; оптимальные условия

Для цитирования: Журба О.М., Алексеенко А.Н., Шаяхметов С.Ф. Оптимизация условий этерификации тиодиуксусной кислоты в моче с помощью математического планирования для проведения биологического мониторинга. *Гигиена и санитария*. 2021; 100 (8): 869–874. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2021-100-8-869-874>

Для корреспонденции: Алексеенко Антон Николаевич, канд. хим. наук, ст. науч. сотр. лаб. аналитической экотоксикологии и биомониторинга, ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований», 665827, Ангарск. E-mail: alexeenko85@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов в связи с публикацией данной статьи.

Финансирование. Работа выполнена в рамках средств, выделяемых для выполнения государственного задания ФГБНУ ВСИМЭИ.

Участие авторов: Журба О.М. – концепция и дизайн исследования, написание текста, проведение исследований с применением газовой хромато-масс-спектрометрии, утверждение окончательного варианта статьи; Алексеенко А.Н. – редактирование, обсуждение результатов, проведение аналитических исследований с применением газовой хромато-масс-спектрометрии, написание текста; Шаяхметов С.Ф. – организация исследований, обоснование программы исследований, редактирование, ответственность за целостность всех частей статьи.

Поступила 27.05.2021 / Принята к печати 09.07.2021 / Опубликована 31.08.2021

Olga M. Zhurba, Anton N. Alekseenko, Salim F. Shayakhmetov

Optimization of conditions for esterification of thiodiacetic acid in urine using mathematical planning for biological monitoring

East-Siberian Institute of Medical and Ecological Research, Angarsk, 665827, Russian Federation

Introduction. To assess the impact of the toxicants vinyl chloride (VC) and 1,2-dichloroethane (DCE) on humans, personalized biomonitoring of thiodiacetic acid (TDAA) is of most significant importance. Determination of TDAA in urine was carried out using the method of gas chromatography-mass spectrometry GC-MS.

Materials and methods. Sample preparation consists of the analyte's esterification in a biological matrix with methyl alcohol (with 10% boron trifluoride), extraction of the derivative by liquid extraction with ethyl acetate. We used an Agilent 7890A gas chromatograph with an HP-5MS capillary column and a mass-selective detector. TDAA was identified in the form of a dimethyl ester on a mass chromatogram according to the retention time and the ratio of the intensities of the registered ions.

Results. To determine the rational parameters of the sample preparation process for the determination of TDAA in urine studies were carried out under the method of planning the experiment, which makes it possible to obtain the most accurate mathematical description of the processes. Optimization of the conditions for esterification of TDAA was carried out using mathematical planning, varying the temperature, process time, and the nature of the catalyst (BF_3 or H_2SO_4). The scheduling matrix included eight experiments; the degree of conversion of TDAA served as an optimization parameter. Interpretation of the model showed that temperature makes more contribution to the formation of the degree of conversion than the processing time. The nature of the catalyst does not affect the degree of conversion.

Conclusion. A mathematical model developed for optimizing the conditions for sample preparation of the biomarker of exposure to VC (TDAA) in urine, showed the contribution of three factors (reaction temperature, reaction time, catalyst nature) to the conversion rate, of which the reaction temperature makes the greatest contribution to the choice of optimal esterification conditions. The nature of the catalyst (BF_3 or H_2SO_4) does not affect the conversion rate.

Keywords: vinyl chloride; PVC production; metabolites; thiodiacetic acid; biological fluids; gas chromatography-mass spectrometry; mathematical planning; optimal conditions

For citation: Zhurba O.M., Alekseenko A.N., Shayakhmetov S.F. Optimization of conditions for esterification of thiodiacetic acid in urine using mathematical planning. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian Journal)*. 2021; 100 (8): 869–874. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2021-100-8-869-874> (In Russ.)

For correspondence: Anton N. Alekseenko, MD, PhD, senior research fellow, Laboratory of analytical ecotoxicology and biomonitoring of the East-Siberian Institute of Medical and Ecological Research, Angarsk, 665827, Russian Federation. E-mail: alexeenko85@mail.ru

Information about the authors:

Zhurba O.M., <https://orcid.org/0000-0002-9961-6408> Alekseenko A.N., <https://orcid.org/0000-0003-4980-5304> Shayakhmetov S.F., <https://orcid.org/0000-0001-8740-3133>

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgement. Financing of the work was carried out at the expense of funds allocated for the state assignment of the East-Siberian Institute of Medical and Ecological Research.

Contribution: Zhurba O.M. – the concept and design of the study, writing a text, approval of the final version of the article, analytical studies using gas chromatography-mass spectrometry; Alekseenko A.N. – editing, discussion of the results, analytical studies using gas chromatography-mass spectrometry; writing a text; Shayakhmetov S.F. – organization of research, justification of the research program, editing, responsibility for the integrity of all parts of the article.

Received: May 27, 2021 / Accepted: July 9, 2021 / Published: August 31, 2021

Введение

Устойчивое развитие химикоёмких отраслей промышленности определило порядка 120 веществ и материалов, приоритетных для экономики России и представляющих опасность для здоровья трудоспособного населения, куда входят и хлорорганические углеводороды [1, 2]. В производственную среду предприятий хлорорганического профиля наибольший вклад вносит загрязнение воздуха рабочей зоны преимущественно винилхлоридом (ВХ) и 1,2-дихлорэтаном (ДХЭ) [3]. Среди органов-мишеней при воздействии данных хлорированных углеводородов выделяют печень, лёгкие, нервную и кровеносную системы [4–6], отмечают увеличение частоты некоторых форм злокачественных новообразований (ЗН) у работников при воздействии ВХ и поливинилхлорида (ПВХ) [7, 8]. Опубликованные исследования показывают, что вопросы метаболизма ВХ и ДХЭ недостаточно изучены, и только некоторые продукты биотрансформации были идентифицированы в биосредах с прогрессом развития методических приёмов, внедрением методов аналитической химии в экспериментальных исследованиях, что позволило уточнить ранее полученные результаты [9]. При поступлении ВХ в организм происходит его трансформация за счёт цитохрома P450, в результате чего образуется промежуточный реактивный метаболит – хлорэтиленоксид, который в свою очередь достаточно быстро метаболизируется до монохлоруксусной (МХУК) и тиодиксусной кислот (ТДУК) [10]. ТДУК (НООС-СН₂-S-СН₂-СООН) является конечным метаболитом мономера винилхлорида (ВХ) и была предложена исследователями в качестве биомаркера воздействия летучих хлорорганических поллютантов, таких как ВХ и ДХЭ, в условиях биомониторинга [11, 12]. Одним из актуальных направлений исследований в последнее время является разработка хромато-масс-спектрометрических методов определения, характеризующихся низкими пределами определения и высокой селективностью [13]. Остаются актуальными работы по поиску новых высокохарактеристичных биологических маркеров [14]. Хромато-масс-спектрометрическому определению ТДУК предшествует трудоёмкая дериватизация, а именно перевод в более летучее и малополярное производное. Многокомпонентный матричный состав мочи и присутствие в ней аналита на следовом уровне концентраций обуславливают трудности выбора оптимального способа пробоподготовки. Пробоподготовка должна обеспечивать количественную дериватизацию аналита. Основные требования, предъявляемые к дериватизирующему реагенту: низкая токсичность, малая летучесть, коммерческая доступность. Наиболее распространённые виды дериватизации для аналитов, содержащих карбоксильные группы, это этерификация и силилирование [15].

При ГХ-МС анализе ТДУК в моче подготовка проб заключается в жидкостной экстракции аналита из биологической матрицы, концентрировании (упаривании органического экстракта в токе инертного газа) и процедуры дериватизации силилирующим реагентом или диазометаном. Существующие методики по определению ТДУК

в моче продолжительны по времени, а также обладают недостаточной чувствительностью при определении аналита у лиц, не подвергающихся воздействию винилхлорида и дихлорэтана [16].

Так как вначале осуществляется экстракция ТДУК из пробы мочи, а далее дериватизация, возникает проблема, связанная с неполнотой извлечения аналита, что в свою очередь сказывается на пределе обнаружения ГХ-МС определения. Этерификацию ТДУК в отличие от силилирования можно осуществлять не только в сухом остатке, но и в водно-солевой матрице перед процедурой экстракции. Экстракция алкильного производного аналита полярным гидрофобным растворителем, например, этилацетатом уже будет протекать количественно. Тем не менее этерификация ТДУК в водно-солевой матрице (моча) может протекать обратимо вследствие гидролиза. Для устранения этой помехи необходимо подобрать оптимальное соотношение проба : этерифицирующий реагент, температуру и продолжительность процесса.

Предметом изучения в данном исследовании являлось повышение чувствительности и точности определения за счёт осуществления этерификации ТДУК непосредственно в пробе мочи и выбора оптимальных условий с помощью математического планирования.

Цель исследования – выбор оптимальных условий процедуры пробоподготовки – этерификации ТДУК в пробах мочи с использованием математического планирования.

Материалы и методы

Хромато-масс-спектрометрический анализ экстрактов биообразцов проводился в режиме селективного ионного мониторинга (SIM) на ГХ Agilent 7890А, оснащённом масс-селективным детектором Agilent 5975С и колонкой HP-5MS (30 м, 0,25 мм, 0,25 мкм). Поток газа-носителя гелия через колонку 1 мл/мин. Масс-спектрометр работал в режиме ионизации электронного удара при 70 эВ. Применяли автоматический пробоотборник для жидких образцов.

Вспомогательное оборудование: блочный термостат Stuart (диапазон температур 30–130 °С), вибросмеситель, центрифуга 5804 Eppendorf. **Реактивы:** тиодиксусная кислота (98%), диметиловый эфир ТДУК, трифторид бора (10%) в метаноле, серная кислота (10% масс.) в метаноле, этилацетат, сульфат натрия, вода дистиллированная.

Приготовление модельных растворов. Растворы ТДУК в моче 0,1–10 мкг/мл готовили из исходного раствора ТДУК в дистиллированной воде 250 мкг/мл. Растворы производного ТДУК (диметилового эфира) в этилацетате 0,01–1 мкг/мл готовили из его исходного раствора 125 мкг/мл.

Метод анализа. В стеклянный флакон вместимостью 2 мл помещали 0,1 мл образца, далее осуществляли процесс по схеме (рис. 1). ГХ-МС анализ осуществляли на капиллярной колонке HP-5MS с температурным градиентом от 80 °С (1 мин) до 130 °С (2 мин) со скоростью 5 °С/мин. Идентификацию ТДУК (диметилового эфира) проводили по абсолютному времени удерживания ($t_R = 10,814$ мин) и соотношению интенсивностей ионов (146, 178). Примеры масс-хроматограмм по m/z 146 представлены на рис. 2.

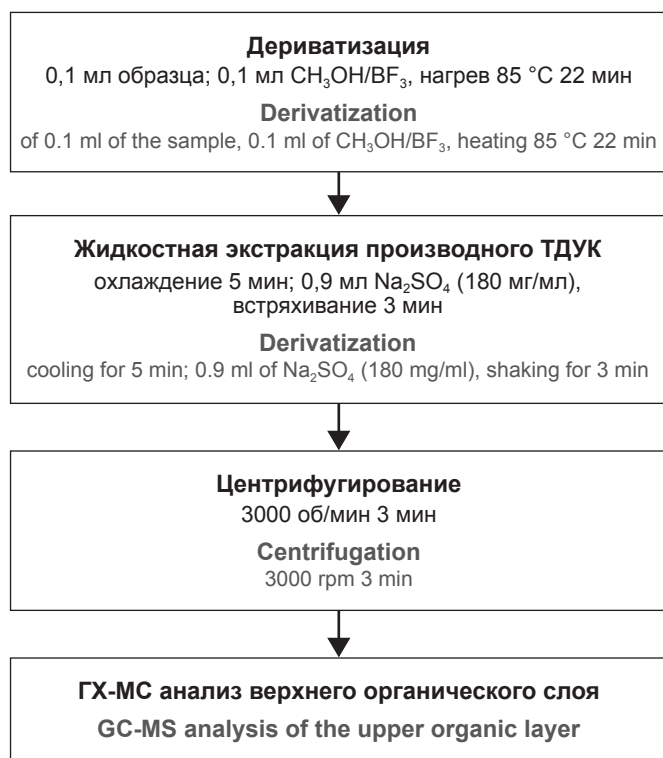


Рис. 1. Алгоритм определения ТДУК в моче.

Fig. 1. Algorithm for determination of TDAA in urine.

Количественное определение в модельном образце пробы мочи с концентрацией 10 мкг/мл ТДУК проводили методом абсолютной градуировки по растворам диметилового эфира ТДУК в диапазоне от 0,01 до 1 мкг/мл без пробоподготовки. Градуировочный график строили как зависимость площади пика производного ТДУК от его концентрации в этилацетате (мкг/мл).

Определение в образцах мочи осуществляли по модельным растворам ТДУК в моче от 0,1 до 10 мкг/мл. Поиск оптимальных условий этерификации ТДУК с помощью математического планирования проходил следующие этапы: выбор подобласти факторного пространства, получение матрицы планирования, определение коэффициентов математической модели, статистическая обработка опытных данных с использованием программы Microsoft Excel, оценка адекватности математической модели, интерпретация модели, расчёт мысленных опытов [17, 18].

Результаты

На процесс этерификации ТДУК в моче влияют различные факторы, такие как соотношение объёмов пробы, реагента, температура и продолжительность реакции. В качестве алкилирующего реагента выбрали метанол, содержащий в одном случае 10% серной кислотой и во втором случае 10% трифторида бора. Для того чтобы этерификация протекала количественно и необратимо, выбрано следующее соотношение объёмов биологической пробы и реагента – 1:1. С помощью математического планирования использовали следующие количественные факторы, дающие количественный выход не менее 80%: температура, время реакции, природа катализатора H_2SO_4 или BF_3 (табл. 1).

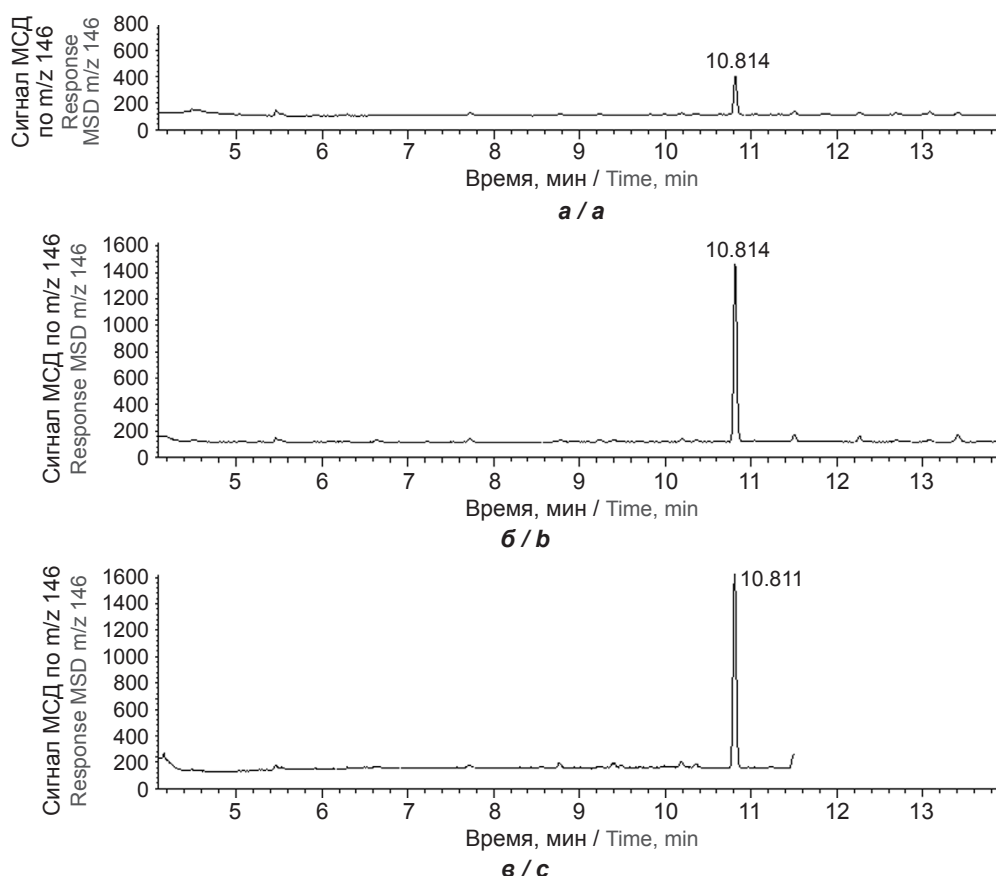


Рис. 2. Масс-хроматограммы образцов ТДУК в моче:

a – контрольный образец; *b* – образец с добавкой ТДУК 0,5 мкг/мл; *в* – образец мочи работника ПВХ с концентрацией 0,7 мкг/мл.

Fig. 2. Mass-chromatograms of samples TDAA in urine:

a – blank sample; *b* – sample with spike TDAA 0.5 µg/ml; *c* – sample urine of worker PVC with content 0.7 µg/ml.

Таблица 1 / Table 1

Условия планирования эксперимента
Experiment planning conditions

| Фактор Factor | Нулевой уровень x_0 Zero level x_0 | Интервал варьирования J Variation interval J | Уровень фактора Factor level | |
|--|--|--|---|------------------|
| | | | нижний lower | верхний upper |
| | | | x_1 – температура реакции, °C x_1 – reaction temperature, °C | 80 |
| x_2 – время реакции, мин x_2 – reaction time, min | 22 | 4 | 18 | 26 |
| x_3 – катализатор x_3 – catalyst | – | – | H ₂ SO ₄ | BF ₃ |

Одновременно варьируя 3 факторами по заданному плану, осуществили постановку эксперимента (табл. 2). В качестве параметра оптимизации y служила степень конверсии аналита. Опытным образцом служил раствор ТДУК в моче с концентрацией 10 мкг/мл. Степень конверсии – полнота превращения (y), % рассчитывали по формуле (1):

$$y = \frac{C_d \cdot V_{\text{экск}}}{C_{\text{ТДУК}} \cdot V_{\text{пробы}}} \cdot 100, \quad (1)$$

где C_d – измеренная концентрация производного ТДУК (диметилвый эфир ТДУК) в этилацетате, мкг/мл; $V_{\text{экск}}$ – объём экстракта, мл; $C_{\text{ТДУК}}$ – концентрация ТДУК в моче, мкг/мл; $V_{\text{пробы}}$ – объём пробы мочи взятой на анализ, мл.

Рассчитали коэффициенты (a) математической модели. Оценили их значимость (табл. 3).

Получили уравнение математической модели (2):

$$y = 89 + 6,6x_1 + 5x_2 - 3x_1x_2 \quad (2).$$

Провели оценку адекватности данной модели (табл. 4).

Вывод напрашивается следующий: математическая модель (2) адекватно описывает процесс этерификации ТДУК в моче метанолом в присутствии BF₃ или H₂SO₄. Степень конверсии возрастает при увеличении температуры и времени нагрева. С ростом температуры реакции влияние продолжительности нагрева на степень конверсии уменьшается. Природа катализатора не вносит значимого вклада в процесс этерификации ТДУК в моче метанолом. На основании полученных результатов для подготовки проб этерификацию

Таблица 2 / Table 2

Матрица планирования 3-факторного эксперимента этерификации ТДУК

Matrix for planning 3-factor experiment of esterification of TDAА

| № опыта Experience No | Факторы Factors | | | | | | Степень конверсии, y_j Conversion power, y_j $n = 3$ |
|--------------------------|------------------------|-------|--------------------------------|-----------------------|-------|-------|---|
| | натуральные natural | | | кодированные coded | | | |
| | x_1 | x_2 | x_3 | x_1 | x_2 | x_3 | |
| 1 | 75 | 18 | H ₂ SO ₄ | – | – | – | 75.8 |
| 2 | 85 | 18 | H ₂ SO ₄ | + | – | – | 94.8 |
| 3 | 75 | 26 | H ₂ SO ₄ | – | + | – | 89.7 |
| 4 | 85 | 26 | H ₂ SO ₄ | + | + | – | 98.3 |
| 5 | 75 | 18 | BF ₃ | – | – | + | 72.8 |
| 6 | 85 | 18 | BF ₃ | + | – | + | 92.7 |
| 7 | 75 | 26 | BF ₃ | – | + | + | 92.2 |
| 8 | 85 | 26 | BF ₃ | + | + | + | 97.8 |

Таблица 3 / Table 3

Расчёт и оценка значимости коэффициентов математической модели

Calculation and assessment of the significance of the coefficients of the mathematical model

| Коэффициенты математической модели Coefficients of the mathematical model | Вывод Conclusion |
|--|---|
| $a_0 = (y_1 + y_2 + y_3 + y_4 + y_5 + y_6 + y_7 + y_8) = 89$ | Значим ($ a > \Delta a$) Meaningful ($ a > \Delta a$) |
| $a_1 = (-y_1 + y_2 - y_3 + y_4 - y_5 + y_6 - y_7 + y_8) = 6.6$ | Значим ($ a > \Delta a$) Meaningful ($ a > \Delta a$) |
| $a_2 = (-y_1 - y_2 + y_3 + y_4 - y_5 - y_6 + y_7 + y_8) = 5.0$ | Значим ($ a > \Delta a$) Meaningful ($ a > \Delta a$) |
| $a_3 = (-y_1 - y_2 - y_3 - y_4 + y_5 + y_6 + y_7 + y_8) = -0.4$ | Незначим ($ a < \Delta a$) Insignificant ($ a < \Delta a$) |
| $a_{1,2} = (y_1 - y_2 - y_3 + y_4 + y_5 - y_6 - y_7 + y_8) = -3$ | Значим ($ a > \Delta a$) Meaningful ($ a > \Delta a$) |
| $a_{1,3} = (y_1 - y_2 + y_3 - y_4 - y_5 + y_6 - y_7 + y_8) = -0.3$ | Незначим ($ a < \Delta a$) Insignificant ($ a < \Delta a$) |
| $a_{2,3} = (y_1 + y_2 - y_3 - y_4 - y_5 - y_6 + y_7 + y_8) = 0.9$ | Незначим ($ a < \Delta a$) Insignificant ($ a < \Delta a$) |
| $a_{1,2,3} = (-y_1 + y_2 + y_3 - y_4 + y_5 - y_6 - y_7 + y_8) = -0.5$ | Незначим ($ a < \Delta a$) Insignificant ($ a < \Delta a$) |

ТДУК в моче метанолом можно осуществлять в присутствии H₂SO₄ или BF₃. Так как температура вносит большой вклад в степень конверсии, время реакции зафиксировали на нулевом уровне, чтобы не увеличивать продолжительность анализа. Теоретические значения степени конверсии рассчитаны из кодированных значений температуры по уравнению математической модели. Результаты расчётов наглядно демонстрируют то, что даже при температуре 81 °C степень конверсии более 90% (табл. 5). Это говорит о том, что этерификация протекает количественно.

Как видно из табл. 5, теоретические значения степени конверсии попадают в доверительный интервал экспериментальных значений. Максимального значения степень конверсии достигает при температуре 85 °C.

Таким образом, математическое планирование при одновременном варьировании данных 3 факторов дало возможность статистическим путём получить математическое уравнение (2), в результате чего нами выбраны оптимальные условия этерификации ТДУК в моче метанолом в присутствии BF₃ и нагрева при температуре 85 °C 22 мин.

Таблица 4 / Table 4

Оценка адекватности математической модели

Assessment of the adequacy of the mathematical model

| № опыта Experience No | x_0 | x_1 | x_2 | x_1x_2 | y_s | y_t | $S^2_{\text{Ад}}$ | $S^2_{\text{в}}$ | Вывод Conclusion |
|--------------------------|-------|-------|-------|----------|-------|-------|-------------------|------------------|------------------------------------|
| 1 | + | – | – | + | 75.83 | 74.4 | 8.36 | 33.02 | $S^2_{\text{Ад}} < S^2_{\text{в}}$ |
| 2 | + | + | – | – | 94.83 | 93.60 | 8.36 | 33.02 | $S^2_{\text{Ад}} < S^2_{\text{в}}$ |
| 3 | + | – | + | – | 89.67 | 90.40 | 8.36 | 33.02 | $S^2_{\text{Ад}} < S^2_{\text{в}}$ |
| 4 | + | + | + | + | 98.33 | 97.60 | 8.36 | 33.02 | $S^2_{\text{Ад}} < S^2_{\text{в}}$ |
| 5 | + | – | – | + | 72.83 | 74.40 | 8.36 | 33.02 | $S^2_{\text{Ад}} < S^2_{\text{в}}$ |
| 6 | + | + | – | – | 92.67 | 93.60 | 8.36 | 33.02 | $S^2_{\text{Ад}} < S^2_{\text{в}}$ |
| 7 | + | – | + | – | 92.17 | 90.40 | 8.36 | 33.02 | $S^2_{\text{Ад}} < S^2_{\text{в}}$ |
| 8 | + | + | + | + | 97.83 | 97.60 | 8.36 | 33.02 | $S^2_{\text{Ад}} < S^2_{\text{в}}$ |

Таблица 5 / Table 5

Условия постановки опытов и результаты круглого восхождения
Conditions for setting up experiments and results of steep ascent

| № опыта Experience No | Значения уровней фактора x_1 Factor level values x_1 | | Значение степени конверсии у Conversion rate y value | |
|--------------------------|---|-----------------------|---|-----------------------------------|
| | натуральные natural | кодированные coded | теоретическое theoretical | экспериментальное experimental |
| 9 | 81 | 0.2 | 90.3 | 91 ± 2 |
| 10 | 82 | 0.4 | 91.6 | — |
| 11 | 83 | 0.6 | 93.0 | — |
| 12 | 84 | 0.8 | 94.3 | — |
| 13 | 85 | 1.0 | 95.6 | 94 ± 2 |

Обсуждение

В настоящее время химическая безопасность — одна из актуальных проблем профилактической медицины [19], и существует нацеленность на неинвазивные методы в области метабомики и медико-экологических исследованиях, а также на методы, пригодные для применения в биомониторинге и персонализированной медицине, как, например, газовая хроматография с масс-спектрометрией (ГХ-МС) и высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), особенно в проводимых научных исследованиях [20–22], где газовая хроматография наиболее широко используется не только для определения токсикантов, но и для идентификации продуктов трансформации соединений в биологических матрицах из-за доступности аппаратуры и наличия обширных библиотек масс-спектров.

Известные методики сочетания газовой хроматографии (ГХ) с вариантами масс-спектрометрического детектирования (ГХ-МС) определения продукта биотрансформации ВХ — ТДУК в моче обладают следующими недостатками: использование канцерогенного и взрывоопасного диазометана как метилирующего реагента, низкие степени извлечения в процессе пробоподготовки, большой расход особо чистых растворителей — метанола, диэтилового эфира, этилацетата. Ещё одним существенным недостатком вышеупомянутых методик является невозможность определения ТДУК в моче лиц, не подвергающихся воздействию ВХ и ДХЭ.

В классическом варианте процедуры дериватизации в ходе пробоподготовки должны предшествовать процедуры извлечения аналита из матрицы, очистки пробы от мешающих примесей и концентрирования. Совмещение этих процедур позволяет существенно упростить подготовку проб к газохроматографическому анализу [23].

Предложенный нами вариант пробоподготовки, основанный на сочетании процессов этерификации в водной солевой фазе и жидкостной экстракции деривата ТДУК

этилацетатом в одной ёмкости и малым расходом органических растворителей, позволил достичь предела обнаружения 0,01 мкг/мл. Линейность градуировочного графика в диапазоне от 0,1 до 10 мкг/мл, характеризуемая коэффициентом корреляции r , составила 0,998. Оценка метрологических характеристик [24] показала, что СКО воспроизводимости не превышает 2%, показатель точности в виде суммарной погрешности не выше 25%. Предложенная методическая разработка была использована при изучении тиодинксусной кислоты в моче у работников производства ВХ и ПВХ в Восточной Сибири и у лиц контрольной группы ($n = 34$), не имеющих в профессиональном маршруте контакта с хлоруглеводородами [25].

Уровни содержания тиодинксусной кислоты в моче работников производства ПВХ в 4–24 раза выше, чем в контрольной группе. Сравнение результатов между работниками разных производственных цехов показало, что наиболее высокий уровень содержания ТДУК в моче обнаружен у работников цеха получения смолы ПВХ по сравнению с работниками цеха производства ВХ. Фоновые уровни ТДУК в моче у лиц контрольной группы составили $0,24 \pm 0,05$ мкг/мл, что в 24 раза выше предела обнаружения 0,01 мкг/мл. Таким образом, предел обнаружения аналита в моче 0,01 мкг/мл по предложенной методике вполне удовлетворительный, так как позволяет обнаружить уровни концентрации ТДУК в моче у лиц, не контактирующих с ВХ и ДХЭ. Опубликованные литературные данные [11] подтверждают предположение, по которому показатель ТДУК в моче может использоваться в качестве биомаркера воздействия ВХ и у проживающего населения в условиях техногенной нагрузки, и для оценки состояния здоровья, но необходимо учитывать фоновый уровень аналита в моче.

Заключение

Теоретическое и практическое значение имеет установленное точное уравнение, описывающее процесс этерификации (метилирования) ТДУК в моче математическим путём. Полученные результаты математического планирования позволили выбрать оптимальные условия проведения этерификации ТДУК в моче: температура, время реакции, природа катализатора (H_2SO_4 или BF_3), дающие количественный выход дериватизации ТДУК.

Установлены следующие оптимальные условия этерификации ТДУК в биологической пробе: температура 85 °С и время реакции 22 мин, реагент $CH_3OH \cdot BF_3$. Выбор оптимальных условий этерификации ТДУК с помощью математического планирования эксперимента дал осуществить процесс этерификации ТДУК со степенью конверсии 96%, что в свою очередь позволило разработать методику определения данного аналита в моче методом ГХ-МС для целей биомониторинга с пределом обнаружения 0,01 мкг/мл не только у работников производства винилхлорида и ПВХ, но и у лиц контрольной группы (не подвергающихся воздействию ВХ и ДХЭ).

Литература

(п.п. 5–11, 15, 16, 20, 21 см. References)

- Малышева А.Г., Козлова Н.Ю., Юдин С.М. Неучтённая химическая опасность процессов трансформации веществ в окружающей среде при оценке эффективности применения технологий. *Гигиена и санитария*. 2018; 97(6): 490–7. <https://doi.org/10.18821/0016-9900-2018-97-6-490-97>
- Попова А.Ю., Зайцева Н.В., Онищенко Г.Г., Клейн С.В., Глухих М.В., Камалтдинов М.Р. Санитарно-эпидемиологические детерминанты и ассоциированный с ними потенциал роста ожидаемой продолжительности жизни населения Российской Федерации. *Анализ риска здоровью*. 2020; (1): 1–17. <https://doi.org/10.21668/health.risk/2020.1.01>
- Мешакова Н.М., Лемешевская Е.П., Шаяхметов С.Ф., Журба О.М. Гигиенический мониторинг основных неблагоприятных факторов в производстве винилхлорида и поливинилхлорида в Восточной Сибири. *Медицина труда и промышленная экология*. 2017; (10): 42–7.
- Катаманова Е.В., Ещина И.М., Кудяева И.В., Маснавиева Л.Б., Дьякович М.П. Состояние биохимических показателей в зависимости от экспозиционной нагрузки винилхлоридом. *Гигиена и санитария*. 2018; 97(10): 910–4. <https://doi.org/10.18821/0016-9900-2018-97-10-910-914>
- Шаяхметов С.Ф., Журба О.М., Алексеенко А.Н., Меринов А.В., Дорогова В.Б. Биологический мониторинг хлорорганических углеводородов в производстве винилхлорида и поливинилхлорида. *Медицина труда и промышленная экология*. 2017; (1): 39–42.
- Карцова, Л.А., Соловьёва С.А. Применение хроматографических и электрофоретических методов в метаболических исследованиях. *Журнал аналитической химии*. 2019; 74(4): 243–53. <https://doi.org/10.1134/S0044450219040054>

14. Плющенко И.В., Шахматов Д.Г., Родин И.А. Алгоритм сочетания хромато-масс-спектрометрического ненаправленного профилирования и многомерного анализа для выявления веществ-маркеров в образцах сложного состава. *Заводская лаборатория. Диагностика материалов*. 2020; 86(7): 12–9. <https://doi.org/10.26896/1028-6861-2020-86-7-12-19>
17. Вершинин В.И., Перцев Н.В. *Планирование и математическая обработка результатов химического эксперимента*. Омск; 2005.
18. Смагунова А.Н., Пашкова Г.В., Белых Л.И. *Математическое планирование эксперимента в методических исследованиях в аналитической химии*. Иркутск; 2015.
19. Малышева А.Г., Юдин С.М. Трансформация химических веществ в окружающей среде как неучтенный фактор опасности для здоровья населения. *Химическая безопасность*. 2019; 3(2): 45–66. <https://doi.org/10.25514/CHS.2019.2.16005>
22. Зайцева Н.В., Землянова М.А., Чашин В.П., Гудков А.Б. Научные принципы применения биомаркеров в медико-экологических исследованиях (обзор литературы). *Экология человека*. 2019; (9): 4–14. <https://doi.org/10.33396/1728-0869-2019-9-4-14>
23. Рыбальченко И.В., Байгильдиев Т.М., Родин И.А. Хромато-масс-спектрометрические методы определения маркеров и биомаркеров отравляющих веществ. *Журнал аналитической химии*. 2021; 76(1): 32–50. <https://doi.org/10.31857/S0044450221010114>
24. Смагунова А.Н., Карпукова О.М. *Методы математической статистики в аналитической химии*. Ростов-на-Дону: Феникс; 2012.
25. Шаяхметов С.Ф., Журба О.М., Алексеенко А.Н., Меринов А.В. Применение хромато-масс-спектрометрических методов определения маркеров экспозиции в биомониторинговых исследованиях у работников производств поливинилхлорида и алюминия. *Гигиена и санитария*. 2020; 99(10): 1159–64. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2020-99-10-1159-1164>

References

1. Malysheva A.G., Kozlova N.Yu., Yudin S.M. The unaccounted hazard of processes of substances transformation in the environment in the assessment of the effectiveness of the application of technologies. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2018; 97(6): 490–7. <https://doi.org/10.18821/0016-9900-2018-97-6-490-97> (in Russian)
2. Popova A.Yu., Zaitseva N.V., Onishchenko G.G., Kleyn S.V., Glukhikh M.V., Kamalidinov M.R. Social and epidemiologic determinants and potential for growth in life expectancy of the population in the Russian Federation taking into account regional differentiation. *Analiz riska zdorov'yu (Health Risk Analysis)*. 2020; (1): 1–17. <https://doi.org/10.21668/health.risk/2020.1.01> (in Russian)
3. Meshchakova N.M., Lemeshevskaya E.P., Shayakhmetov S.F., Zhurba O.M. Hygienic monitoring of the main unfavorable factors in the production of vinylchloride and polyvinylchloride in Eastern Siberia. *Meditsina truda i promyshlennaya ekologiya*. 2017; (10): 42–7. (in Russian)
4. Katamanova E.V., Eshchina I.M., Kudaeva I.V., Masnavieva L.B., Dyakovich M.P. Change of some biochemical indices depending on exposure load in staff workers in contact with vinyl chloride. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2018; 97(10): 910–4. <https://doi.org/10.18821/0016-9900-2018-97-10-910-914> (in Russian)
5. Lang A.L., Beier J.I. Interaction of volatile organic compounds and underlying liver diseases: a new paradigm for risk. *Biol. Chem.* 2018; 399(11): 1237–48. <https://doi.org/10.1515/hsz-2017-0324>
6. Navrátil T., Kohlíková E., Petr M., Pelclová D., Heyrovský M., Pristoupilová K. Supplemented creatine induces changes in human metabolism of thio-compounds and one- and two-carbon units. *Physiol. Res.* 2010; 59(3): 431–42. <https://doi.org/10.33549/physiolres.931588>
7. Mundt K.A., Dell L.D., Crawford L., Gallagher A.E. Quantitative estimated exposure to vinyl chloride and risk of angiosarcoma of the liver and hepatocellular cancer in the US industry-wide vinyl chloride cohort: mortality update through 2013. *Occup. Environ. Med.* 2017; 74(10): 709–16. <https://doi.org/10.1136/oemed-2016-104051>
8. Erkekoglu P., Oral D., Chao M.W., Kocer-Gumusel B. Hepatocellular carcinoma and possible chemical and biological causes: A review. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 2017; 36(2): 171–90. <https://doi.org/10.1615/JEnvironPatholToxicolOncol.2017020927>
9. Fazeul H. Molecular modeling analysis of the metabolism of vinyl chloride. *J. Pharmacol. Toxicol.* 2006; 4(1): 299–316.
10. Cheng T.J., Huang Y.F., Ma Y.C. Urinary thiodiglycolic acid levels for vinyl chloride monomer exposed polyvinyl chloride workers. *J. Occup. Environ. Med.* 2001; 43(11): 934–8. <https://doi.org/10.1097/00043764-200111000-00002>
11. Chen C.W., Hsieh D., Sung F.C., Tsai S.P. Feasibility of using urinary TDGA as a biomarker for VCM exposures. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2018; 97: 82–7. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2018.06.008>
12. Shayakhmetov S.F., Zhurba O.M., Alekseenko A.N., Merinov A.V., Dorogova V.B. Biologic monitoring of chlorine organic hydrocarbons in vinyl chloride and polyvinyl chloride production. *Meditsina truda i promyshlennaya ekologiya*. 2017; (1): 39–42. (in Russian)
13. Kartsova L.A., Solov'eva S.A. Application of chromatographic and electrophoretic techniques to metabolomic studies. *Zhurnal analiticheskoi khimii*. 2019; 74(4): 243–53. <https://doi.org/10.1134/S0044450219040054> (in Russian)
14. Plyushchenko I.V., Shakhmatov D.G., Rodin I.A. Algorithm of combining chromatography mass spectrometry-untargeted profiling and multivariate analysis for identification of marker-substances in samples of complex composition. *Zavodskaya laboratoriya. Diagnostika materialov*. 2020; 86(7): 12–9. <https://doi.org/10.26896/1028-6861-2020-86-7-12-19> (in Russian)
15. Halket J.M., Zaikin V.G. Derivatization in mass spectrometry - 3. Alkylation (Arylation). *Eur. J. Mass Spectrom. (Chichester)*. 2004; 10(1): 1–19. <https://doi.org/10.1255/ejms.619>
16. Draminski W., Trojanowska B. Chromatographic determination of thiodiglycolic acid – a metabolite of vinyl chloride. *Arch. Toxicol.* 1981; 48(4): 289–92. <https://doi.org/10.1007/BF00319657>
17. Vershinin V.I., Pertsev N.V. *Planning and Mathematical Processing of the Results of a Chemical Experiment [Planirovanie i matematicheskaya obrabotka rezul'tatov khimicheskogo eksperimenta]*. Омск; 2005. (in Russian)
18. Смагунова А.Н., Пашкова Г.В., Бельих Л.И. *Mathematical Planning of an Experiment in Methodological Research of Analytical Chemistry [Matematicheskoe planirovanie eksperimenta v metodicheskikh issledovaniyakh analiticheskoy khimii]*. Иркутск; 2015. (in Russian)
19. Malysheva A.G., Yudin S.M. Transformation of chemicals in the environment as an overlooked hazard factor for public health. *Khimicheskaya bezopasnost'*. 2019; 3(2): 45–66. <https://doi.org/10.25514/CHS.2019.2.16005> (in Russian)
20. Majeed B., Linder D., Eissenberg T., Tarasenko Y., Smith D., Ashley D. View cluster analysis of urinary tobacco biomarkers among U.S. adults: Population Assessment of Tobacco and Health (PATH) biomarker study (2013–2014). *Prev. Med.* 2020; 140: 106218. <https://doi.org/10.1016/j.ypmed.2020.106218>
21. Villaret-Cazadamont J., Poupin N., Tournadre A., Batut A., Gales L., Zalko D., et al. An optimized dual extraction method for the simultaneous and accurate analysis of polar metabolites and lipids carried out on single biological samples. *Metabolites*. 2020; 10(9): 338. <https://doi.org/10.3390/metabo10090338>
22. Zaytseva N.V., Zemlyanova M.A., Chashchin V.P., Gudkov A.B. Scientific principles of use of biomarkers in medico-ecological studies (Review). *Ekologiya cheloveka*. 2019; (9): 4–14. <https://doi.org/10.33396/1728-0869-2019-9-4-14>
23. Rybal'chenko I.V., Baigil'diev T.M., Rodin I.A. Chromato-mass spectrometric methods for the determination of markers and biomarkers of toxic substances. *Zhurnal analiticheskoi khimii*. 2021; 76(1): 32–50. <https://doi.org/10.31857/S0044450221010114> (in Russian)
24. Смагунова А.Н., Карпукова О.М. *Methods of Mathematical Statistics in Analytical Chemistry [Metody matematicheskoy statistiki v analiticheskoy khimii]*. Ростов-на-Дону: Феникс; 2012. (in Russian)
25. Shayakhmetov S.F., Zhurba O.M., Alekseenko A.N., Merinov A.V. Application of chromato-mass-spectrometric methods of determination of exposure markers in biomonitoring researches in workers of productions of polyvinyl chloride and aluminum. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2020; 99(10): 1159–64. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2020-99-10-1159-1164> (in Russian)