

Министерство здравоохранения Республики Беларусь
ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «РЕСПУБЛИКАНСКИЙ ЦЕНТР ГИГИЕНЫ,
ЭПИДЕМИОЛОГИИ И ОБЩЕСТВЕННОГО ЗДОРОВЬЯ»
(РЦГЭиОЗ)
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ГИГИЕНЫ, ТОКСИКОЛОГИИ,
ЭПИДЕМИОЛОГИИ, ВИРУСОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ

УДК 543.6:661.741.143-049.5
Рег. № НИОКТР 2024

УТВЕРЖДАЮ
Директор научно-исследовательского
института гигиены, токсикологии,
эпидемиологии, вирусологии и
микробиологии государственного
учреждения «Республиканский центр
гигиены, эпидемиологии и общественного
здоровья»

С. И. Сычик
«__» ноября 2024 г.

ОТЧЕТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕЖДУНАРОДНОГО ОПЫТА ВЫПОЛНЕНИЯ ИЗМЕРЕНИЙ
В ОБЛАСТИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МАССОВОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ
ГЕКСАМЕТИЛЕНДИАМИНА В ВОЗДУШНОЙ СРЕДЕ И РАЗРАБОТКА НА
ЭТОЙ ОСНОВЕ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ МИГРАЦИИ,
ВЫРАЖЕННОГО В ЕДИНИЦАХ МАССОВОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ, В
ВОЗДУШНУЮ СРЕДУ ГЕКСАМЕТИЛЕНДИАМИНА, СОДЕРЖАЩЕГОСЯ В
ИЗДЕЛИЯХ ИЗ ПОЛИАМИДОВ, В ЦЕЛЯХ ПРИМЕНЕНИЯ И ИСПОЛНЕНИЯ
ТРЕБОВАНИЙ ТЕХНИЧЕСКИХ РЕГЛАМЕНТОВ ЕВРАЗИЙСКОГО
ЭКОНОМИЧЕСКОГО СОЮЗА И ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ОЦЕНКИ
СООТВЕТСТВИЯ ОБЪЕКТОВ ТЕХНИЧЕСКОГО РЕГУЛИРОВАНИЯ
ТРЕБОВАНИЯМ, УСТАНОВЛЕННЫМ
В ОТНОШЕНИИ ДАННОГО ПОКАЗАТЕЛЯ В СООТВЕТСТВУЮЩИХ
ТЕХНИЧЕСКИХ РЕГЛАМЕНТАХ
(промежуточный, этап 1)
Договор № Н-16/303

Заместитель директора по научной работе
канд. мед. наук, доцент

Е. В. Дроздова
«__» ноября 2024 г.

Руководитель НИР,
директор
канд. мед. наук, доцент

С. И. Сычик
«__» ноября 2024 г.

Заведующий лабораторией
хроматографических исследований

Т. П. Крымская
«__» ноября 2024 г.

Минск 2024

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель НИР,
директор
канд. мед. наук, доцент

подпись, дата

С. И. Сычик
(введение,
разделы 1, заключение)

Ответственный исполнитель,
заведующий лабораторией
хроматографических
исследований

подпись, дата

Т. П. Крымская
(разделы 1, 4, 5,
заключение)

Исполнители:

Научный сотрудник
лаборатории
хроматографических
исследований

подпись, дата

Е. Я. Рута-Жуковская
(раздел 4)

Младший научный сотрудник
лаборатории
хроматографических
исследований

подпись, дата

Д. В. Чеботкова
(раздел 3, 4, приложение А)

Младший научный сотрудник
лаборатории
хроматографических
исследований

подпись, дата

К. С. Лебединская
(раздел 1, 2, приложение Б)

Химик лаборатории
хроматографических
исследований

подпись, дата

Д. Л. Гук
(раздел 1)

Нормоконтроль

подпись, дата

Н. С. Иванова

РЕФЕРАТ

Отчет 88 с., 1 кн., 37 рис., 9 табл., 58 источн., 2 прил.

ГЕКСАМЕТИЛЕНДИАМИН, ВОЗДУШНЫЕ ВЫТЯЖКИ, ТОВАРЫ НАРОДНОГО ПОТРЕБЛЕНИЯ, МЕТОДИКА ИЗМЕРЕНИЙ, ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ, МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ ДЕТЕКТОР, ФЛУОРИМЕТРИЧЕСКИЙ ДЕТЕКТОР

Объекты исследований — базы данных патентов Республики Беларусь, Российской федерации, Евразийской патентно-информационной системы, Европейского патентного ведомства, база данных «Orbit», интернет-источников «elibrary.ru», «sciencedirect.com», <https://link.springer.com>; <https://www.elsevier.com>; <https://www.scopus.com>; <http://www.normacs.ru>; <https://files.stroyinf.ru>. «PubChem», «Toxnet», «EUR-LextoEuropeanUnionlaw».

Цель НИР – разработка методики определения уровня миграции, выраженного в единицах массовой концентрации, в воздушную среду гексаметилендиамина, содержащегося в изделиях из полиамидов, на основе применяемых в мировой практике методов и методик определения массовой концентрации гексаметилендиамина в воздушной среде.

Проведен анализ международного опыта, научно-информационных источников и результатов теоретических и экспериментальных исследований в части применяемых методов и методик определения массовой концентрации гексаметилендиамина, содержащегося в изделиях из полиамидов, в воздушной среде. Временные границы анализируемого периода составили 40 лет (с 1984 г. по 2024 г.).

Показано, что основные методы определения гексаметилендиамина основаны на газовой и высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением масс-спектрометрического детектора.

Приведено описание методов пробоподготовки для приготовления воздушных вытяжек из товаров народного потребления.

На основании проведенных исследований разработан проект технического задания на разработку методики определения гексаметилендиамина, содержащегося в изделиях из полиамидов в воздушной среде, предложено для разработки методики использовать метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением флуориметрическим или масс-спектрометрическим детектором.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
1 Физико-химические свойства и токсичность гексаметилендиамина	9
2 Способы приготовления воздушных вытяжек из товаров народного потребления для определения миграции гексаметилендиамина.....	18
3 Историография по исследуемой проблематике определения уровня миграции, выраженного в единицах массовой концентрации, в воздушную среду гексаметилендиамина, содержащегося в изделиях из полиамидов, на основе применяемых в мировой практике методов и методик определения массовой концентрации гексаметилендиамина в воздушной среде	23
4 Анализ международных стандартов (правил, директив, рекомендаций и иных документов, принятых международными организациями по стандартизации), региональных документов (регламентов, директив, решений, стандартов, правил и иных документов), а также законодательства экономически развитых государств (США, Великобритания, Германия, Китай, Япония), научно-информационных источников и результатов теоретических и экспериментальных исследований в части применяемых методов и методик определения массовой концентрации, в водных и воздушных средах, биологическом материале, содержащегося в изделиях из полиамидов, и результатов теоретических и экспериментальных исследований в указанной области.....	25
5 Проект технического задания для проведения исследований по разработке методики определения гексаметилендиамина в воздушной среде из изделий из полиамидов	72
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	73
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	74
ПРИЛОЖЕНИЕ А Методы определения гексаметилендиамина в водных и воздушных средах, биологическом материале	81
ПРИЛОЖЕНИЕ Б Техническое задание на разработку методики измерений «Массовая концентрация гексаметилендиамина, выделяемого из изделий из полиамидов, в воздушной среде. Методика измерений методом высокоэффективной жидкостной хроматографии»	87

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

В настоящем отчете о НИР применяют следующие сокращения и обозначения:

АТФ – аденозинтрифосфорная кислота

АДФ – аденозиндифосфат

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГОСТ – межгосударственный стандарт

ГХ – газовая хроматография

ГФМК – гептафтормасляная кислота

ГФМА – гептафтормасляный ангидрид

ДБА – ди-н-бутиламина

ДЭЗ – детектор электронного захвата

ЖХ – жидкостная хроматография

ЛОС – летучие органические соединения

МС – масс-спектрометр

МУК, МУ – методические указания

ПГМГ – полигексагуанидин

ПИД – пламенно-ионизационный детектор

ПДК – предельно допустимая концентрация

ПФПА – пентафторпропионовый ангидрид

ПО – предел обнаружения

ПКО – предел количественного определения

ТР ТС – технический регламент Таможенного союза

ТФК – трифторуксусная кислота

ТФЭ – твердофазная микроэкстракция

ТИД – термоионный детектор

ЭСП-МС – масс-спектрометрический детектор с электроспреем

УФ-детектор – ультрафиолетовый детектор

ФМОХ – 9-флуоренилметилхлорформиат

ВВЕДЕНИЕ

Гексаметилендиамин – это чистый алифатический диамин, представляет собой бесцветные кристаллы с характерным аминным запахом.

Вещество обладает умеренной токсичностью, однако, как и другие основные амины, он способен вызывать сильные раздражения и ожоги кожи, дерматиты.

С органическими и неорганическими кислотами гексаметилендиамин образует соли, которые при нагревании с органическими кислотами переходят в амиды соответствующих кислот. Этот переход используется для получения на основе гексаметилендиамина ценных полимерных продуктов – полиамидов (самый распространенный тип синтетического полимера – нейлон-66 (полиамид-66), получаемый путем поликонденсации гексаметилендиамина и адипиновой кислоты). Другие применения гексаметилендиамина включают высокоэффективные полиуретановые краски, отвердители эпоксидных смол, нефтехимические добавки, лакокрасочные материалы. Он также применяется в качестве ингибитора коррозии и солеотложений при водоочистке и водоподготовке.

Полиамид-66 известен своей высокой механической прочностью и жесткостью, что делает его устойчивым к высоким нагрузкам. Полиамид выдерживает высокие температуры, сохраняя свои свойства. Полиамид-66 обладает хорошей устойчивостью к многим химическим веществам, включая масла, растворители и многие виды топлива. Однако, в сравнении с другими полиамидами, полиамид-66 может быть менее устойчив к влаге и имеет более высокую стоимость.

Данный материал используется в различных промышленных и потребительских отраслях (автомобильная промышленность – при изготовлении компонентов двигателя, крепежных элементов, разъемов и других деталей; электротехническая – при производстве изоляторов и компонентов, где требуется диэлектрическая прочность и устойчивость к высоким температурам; машинная – при производстве подшипников, шестерен и других механических нагруженных деталей; потребительская – при производстве различных товаров народного потребления (упаковка, игрушки, легкая промышленность, товары для детей и подростков и т.д.)).

Существенным недостатком полимеров гексаметилендиамина является их термоокислительная деструкция под воздействием нагревания, ведущая к снижению прочностных характеристик: при выдерживании на воздухе при температуре от 100 до 200 °С предел прочности снижается в 5–10 раз.

Уровень миграции вредных химических веществ, в том числе гексаметилендиамина, должен соответствовать требованиям гигиенической безопасности. Указанное делает особо

актуальной задачу лабораторного контроля уровней миграции мономера из изделий из полиамида в воздушную среду.

По степени воздействия на организм человека гексаметилендиамин относится к второму классу опасности и его содержание в воздушных вытяжках из полиамидов регламентируется рядом технических регламентов Таможенного Союза.

Вместе с тем, перечни стандартов к техническим регламентам «О безопасности упаковки», «О безопасности продукции, предназначенной для детей и подростков», «О безопасности игрушек», «О безопасности продукции легкой промышленности», «О безопасности средств индивидуальной защиты», «О безопасности мебельной продукции», «О безопасности оборудования для детских игровых площадок», в которых нормируется содержание гексаметилендиамина, в настоящее время не содержат стандартов или аттестованных методик, позволяющих провести исследования по определению уровня миграции в воздушную среду гексаметилендиамина, содержащегося в изделиях из полиамидов. Таким образом, в целях применения и исполнения требований вышеуказанных технических регламентов и достоверной оценки соответствия объектов технического регулирования является актуальной разработка методики определения уровня миграции, выраженного в единицах массовой концентрации, в воздушную среду гексаметилендиамина, содержащегося в изделиях из полиамидов.

Целью первого этапа работы являлся анализ международного опыта, научно-информационных источников и результатов теоретических и экспериментальных исследований в части применяемых методов и методик определения массовой концентрации гексаметилендиамина в воздушной среде, в том числе выделяемого из изделий из полиамидов.

Задачи работы:

- подготовить историографию по исследуемой проблематике определения уровня миграции, выраженного в единицах массовой концентрации, в воздушную среду гексаметилендиамина, содержащегося в изделиях из полиамидов, на основе применяемых в мировой практике методов и методик определения массовой концентрации гексаметилендиамина в воздушной среде;

- провести анализ международных стандартов (правил, директив, рекомендаций и иных документов, принятых международными организациями по стандартизации), региональных документов (регламентов, директив, решений, стандартов, правил и иных документов), а также законодательства экономически развитых государств (США, Великобритания, Германия, Китай, Япония), научно-информационных источников и результатов теоретических и экспериментальных исследований в части применяемых

методов и методик определения массовой концентрации, в воздушную среду гексаметилендиамина, содержащегося в изделиях из полиамидов, и результатов теоретических и экспериментальных исследований в указанной области;

- подготовить проект технического задания для проведения исследований по разработке методики определения гексаметилендиамина в воздушной среде из изделий из полиамидов.

1 Физико-химические свойства и токсичность гексаметилендиамина

Гексаметилендиамин относится к первичным алифатическим аминам. В его состав входят две аминогруппы. Строение данного вещества отображено на рисунке 1.

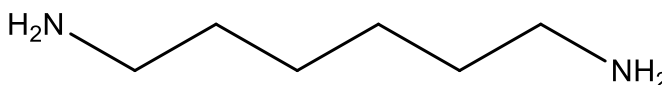


Рисунок 1 – Структурная формула гексаметилендиамина

Гексаметилендиамин представляет собой бесцветные блестящие кристаллы в виде крупных пластинок с аммиачным запахом, характерным для представителей высших алифатических аминов. Дымит на влажном воздухе и возгоняется в виде длинных игл [1]. Структура соединения включает в себя гексаметиленовый фрагмент с двумя аминогруппами – в начале и в конце цепи. Гексаметилдиамин растворим в воде и обычных органических растворителях, а его пары тяжелее воздуха. Физико-химические свойства ГМДА приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Физико-химические свойства гексаметилендиамина [2]

Систематическое наименование	гексан-1,6-диамин
Традиционное название	гексаметилендиамин
Молекулярная формула	$C_6H_{16}N_2$
Молярная масса	116,20 г/моль
Относительная плотность (вода = 1)	0,93
Точка кипения	199-205 °C
Точка плавления	23-42 °C
Температура вспышки	85 °C
Температура самовоспламенения	305 °C
Давление пара (при 50 °C)	200 Па (1,5 мм рт. ст.)

Химические свойства гексаметилендиамина определяются главным образом наличием аминогрупп. Они обладают слабовыраженными электроноакцепторными свойствами, в результате чего атомы водорода гексаметиленового фрагмента неактивны. Исходя из этого реакции замещения в углеродной цепи для ГМДА не характерны. Наличие неподеленных электронных пар на атомах азота, в свою очередь, обуславливает слабоосновные свойства гексаметилендиамина. При взаимодействии с кислотами он легко образует соли, представляющие собой кристаллические вещества хорошо растворимые в воде.

Наиболее важной в практическом применении является соль ГМДА с адипиновой кислотой (1/1, моль/моль) – гексаметилендиаммоний адипинат. Ее обычно называют АГ-солью и используют для производства нейлона-6,6 [3]. Предполагаемая структура АГ-соли приведена на рисунке 2.

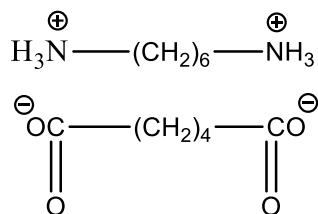


Рисунок 2 – Структурная формула гексаметилендиаммоний адипината

Гексаметилендиамин, как и другие представители класса амины вступает в реакции с карбонильными соединениями с образованием непрочных шиффовых оснований, которые далее подвергаются гидрированию для получения конечных продуктов. При взаимодействии с альдегидами образуются имины, а с кетонами – амиды. Также ГМДА вступает в реакции дезаминирования, окисления, взаимодействует с ненасыщенными, галогенсодержащими, серосодержащими и фосфорсодержащими веществами. Все эти реакции применяются в органическом синтезе для получения ряда соединений [1].

Наиболее значимым свойством гексаметилендиамина является его способность вступать в реакции с карбоновыми кислотами с образованием полиамидов (рисунок 3). Одним из важнейших представителей данной группы соединений является нейлон-6,6, который получают конденсацией адипиновой кислоты и гексаметилендиамина [3]:

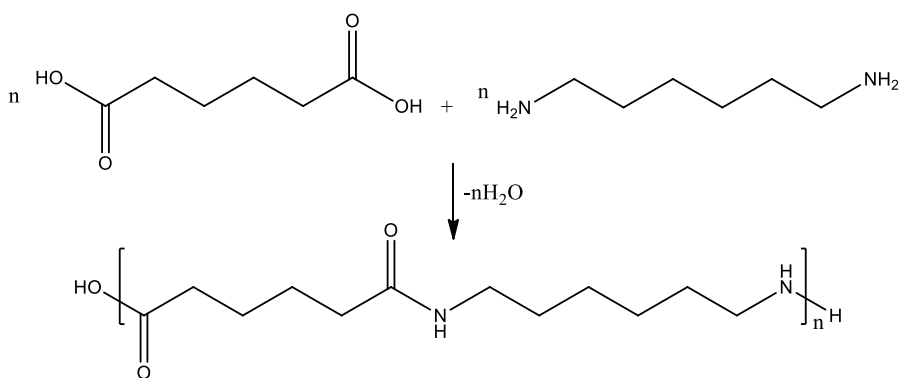


Рисунок 3 – Реакция взаимодействия гексаметилендиамина с карбоновыми кислотами

Процесс поликонденсации осуществляется в несколько стадий. Первая включает в себя смешивание мономеров при повышенных температурах (200–280 °С). Затем происходит непосредственно взаимодействие веществ с образованием амидных связей. Также в процессе выделяется вода, которую удаляют на третьей стадии для эффективного

повышения выхода итогового продукта. Готовый полиамид перерабатывают в нити путем экструзии. Процесс включает в себя продавливание полимера через фильеру для формирования волокон и термическую обработку для улучшения их механических свойств. При поликонденсации гексаметилендиамина с себаценовой кислотой получают нейлон-6,10.

Наличие линейной и кристаллической структур приводят к высокой прочности и жесткости полимера, а способность амидных групп образовывать водородные связи с соседними молекулами усиливает взаимодействие между цепями и, как следствие, улучшает механические свойства. Благодаря таким уникальным характеристикам материал из нейлона-6,6 имеет широкий спектр применения [4]. Его используют в текстильной промышленности для изготовления волокон при производстве одежды, а также тканей, обладающих высокой прочностью и устойчивостью к воздействиям окружающей среды (огнестойкая спецодежда). Часто используют для изготовления ковров. Полиамидная текстильная нить наиболее широко используется для изготовления чулочно-носочных изделий, а также бельевых и платьевых тканей. Некоторые медицинские изделия, такие как хирургические швы, катетеры и протезы, также могут быть изготовлены из нейлоновых материалов.

В автомобильной промышленности данный полимер используют для производства различных деталей (уплотнители, панели, элементы крепления). Его свето- и термостойкость делают его наиболее подходящим выбором для работы в жестких условиях. Также находит применение в военной промышленности для изготовления парашютов, бронежилетов и шин [4]. Широко применяется в производстве ручек для инструментов и других компонентов, которые требуют прочности и легкости. Кроме того, нейлон-6,6 является диэлектриком и используется как компонент основы полиамидных эмальлаков, образующих механически прочные эластичные эмалевые изоляционные покрытия на проводах [3].

Вторым по значимости направлением промышленной переработки гексаметилендиамина является синтез полиуретанов. Высокая механическая прочность, химическая стойкость и термостабильность позволяют использовать их для получения синтетических волокон, пластмасс, клеев, пленок и покрытий.

Перед производством полиуретанов гексаметилендиамин перерабатывают в гексаметилендиизоцианат с помощью фосгенирования. В промышленности распространен жидкофазный процесс фосгенирования соли, образующейся при действии двуокиси углерода на гексаметилендиамин [5]. Процесс осуществляют в несколько стадий.

Сначала при нагревании до 80–90 °С в раствор гексаметилендамина при перемешивании вводят твердую двуокись углерода. В результате гексаметилендиамин абсорбирует CO₂ с образованием соли (рисунок 4):

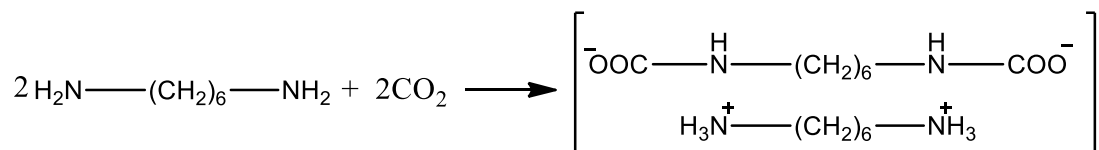


Рисунок 4 – Образование соли гексаметилендамина с CO₂

Затем в охлажденную примерно до 0 °С полученную суспензию подают фосген. В результате образуется хлорангидрид (рисунок 5):

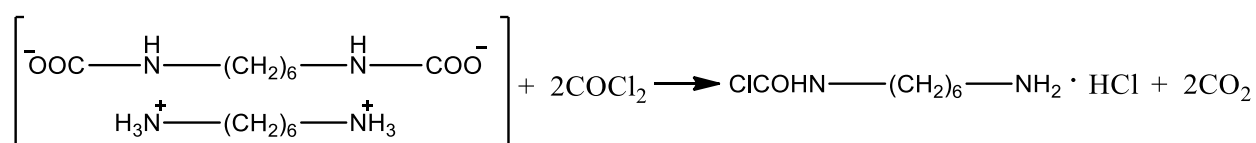


Рисунок 5 – Реакция взаимодействия соли гексаметилендамина с фосгеном с образованием хлорангидрита

Фосгенирование продолжают, постепенно повышая температуру до 150–160 °С, до получения прозрачного раствора гексаметилендиизоцианата (рисунок 6):

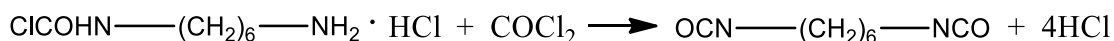


Рисунок 6 – Получение гексаметилендиизоцианата по реакции фосгенирования при температуре 150–160 °С

Для дальнейшего получения полиуретановых материалов гексаметилендиизоцианат должен обладать исключительно высокой степенью чистоты. Она достигается очисткой технического продукта многократной вакуумной перегонкой.

Полимеризацию осуществляют следующим способом. Диизоцианат и гликоль, взятые в мольном соотношении 1 : 1, загружают в реактор и нагревают до 200 °С для гомогенизации смеси. Полученный расплав полиуретана выдавливают из реактора в виде ленты, щетины или моноволокна.

Наибольшее промышленное значение из полиуретанов, изготовленных из гексаметилендиизоцианата, имеет его полимер с бутандиолом-1,4. Такое волокно используют для изготовления фильтровальных и защитных тканей, приводных ремней и канатов (рисунок 7):

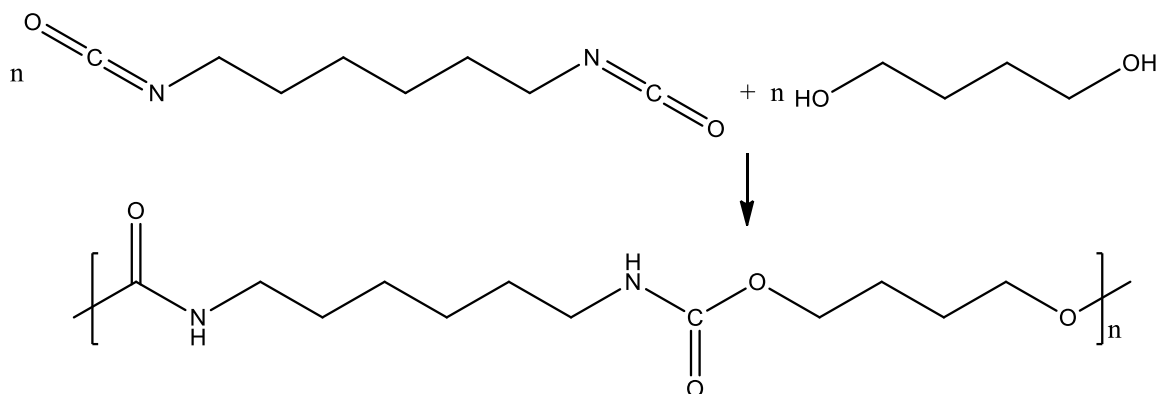


Рисунок 7 – Реакция взаимодействия гексаметилендиизоцианата с бутандиолом-1,4

Помимо производства полиамидов и полиуретанов гексаметилендиамин применяют в качестве аминного отвердителя эпоксидных смол, что обеспечивает улучшение их физико-химических свойств [6]. Также используют для вулканизации каучуков, синтеза ионообменных смол, ингибирования коррозии, очистки газовых смесей от двуокиси углерода, изготовления покрытий для воздушных фильтров [1].

Существует несколько методов получения гексаметилендиамина. По одному из них его получают из адипиновой кислоты, которую, в свою очередь, получают окислением циклогексана (рисунок 8) [8]. Смесь паров адипиновой кислоты и аммиака пропускают над дегидратирующим катализатором при температуре 300–375 °. Образующийся адиподинитрил затем гидрируют до получения гексаметилендиамина. Процесс осуществляют на кобальтовом или медном катализаторе при давлении 60-65 МПа и температуре 100–135 °С. Селективность процесса 90–95% [8]:

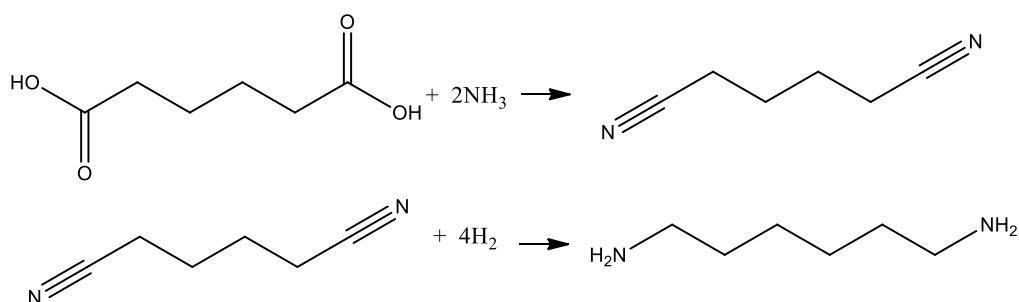


Рисунок 8 – Получение гексаметилендиамина из адипиновой кислоты

Основным побочным продуктом является диимин, образующийся в результате неполного гидрирования адиподинитрила (рисунок 9):

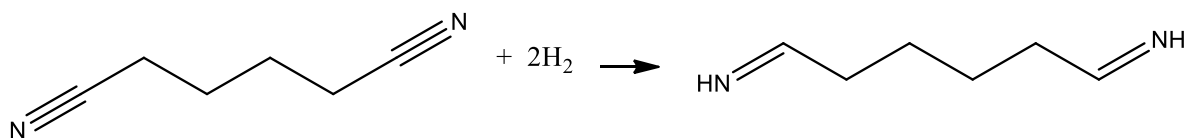


Рисунок 9 – Образование побочного продукта при получении гексаметилендиамина из адипиновой кислоты

Такой способ получения гексаметилендиамина широко применяется в промышленности, но необходимость использования дефицитного ароматического сырья (адипиновую кислоту получают исходя из бензола и фенола) явились причиной поисков более дешевых способов синтеза адипонитрила на основе более доступного сырья [1]. Определенный интерес представляют схемы получения адипонитрила, основанные на переработке нитрила акриловой кислоты.

Акрилонитрил, полученный из пропилена, растворяется в водном растворе тетраэтиламмоний-*n*-толуолсульфоната в электролитической ванне [8]. Димеризация осуществляется в результате протекания восстановительных реакций на катоде (рисунок 10):

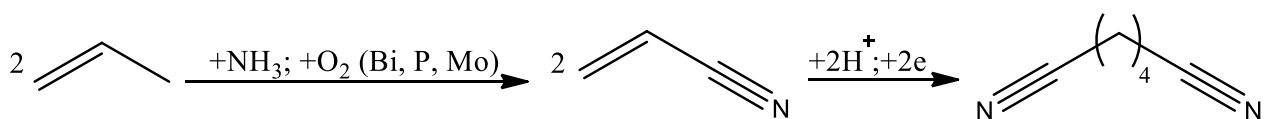


Рисунок 10 – Получение адипонитрила из акрилонитрила в результате протекания восстановительных реакций на катоде

Полученный адипонитрил гидрируют до гексаметилендиамина.

Существует трехстадийный процесс получения гексаметилендиамина через промежуточное образование гександиола-1,6 [8]. Сначала циклогексан окисляют при 150 °С и давлении 3,3 МПа для получения смеси адипиновой и гидроксикапроновой кислот. Далее эту смесь этерифицируют предварительно полученным гександиолом. На второй стадии проводят гидрогенолиз эфира с получением гександиола-1,6, который подвергают очистке. На третьей стадии диол аминируют аммиаком на катализаторе Ni Ренея при 150 °С и 23,0 МПа. Гексаметилендиамин получают с выходом 90 %. Побочными продуктами являются гексаметиленимин и 6-аминогексан. Недостатками данного способа получения являются многостадийность и низкое качество образующегося амина.

Гексаметилендиамин можно также получать из хлористого винила, из акрилонитрила через 1,2-дицианоциклобутан, однако они мало распространены и основным способом производства остается гидрирование адиподинитрила.

Гексаметилендиамин относится к аминосоединениям жирного ряда. Умеренно токсичен, однако, как и другие основные амины он способен вызывать ожоги и сильные раздражения кожи (дерматиты). Устойчив на воздухе. При попадании в глаза вызывает серьезные повреждения. Обладает кумулятивными свойствами.

Диамин относится к высокотоксичным продуктам. В виде паров (в концентрациях выше 1 мг/м^3) вызывает изменения в составе периферической крови (уменьшение содержания гемоглобина, числа эритроцитов, лейкоцитов), снижение уровня кровяного давления, нарушение проницаемости сосудов. Обладает резко выраженным местным действием, проявляющимся в виде сухого или влажного некроза. Попадание в глаза вызывает серьезные повреждения. Проникает в организм через органы дыхания и неповрежденную кожу [9].

Токсическое действие у белых крыс протекает при вдыхании $0,2\text{--}2,5 \text{ мг/дм}^3$ – раздражение верхних дыхательных путей и глаз, истощение, уменьшение содержания гемоглобина и числа эритроцитов. У работающих с гексаметилендиамином наблюдаются сдвиги со стороны крови а также нарушения сосудисто-вегетативной регуляции. Поражения кожи наступали через 2 или 3 недели после начала работы с гексаметилендиамином. [10]

Воздействие паров гексаметилендиамина в производственных условиях на человека возможно при операциях, требующих нагревания или перемешивания водных растворов.

Профессиональное воздействие могут быть через вдыхание (высокоскоростные операции, генерирующие в первую очередь аэрозоли) и через кожный контакт на рабочих местах, где производится или используется гексаметилендиамин. Химическое вещество является умеренно токсичным при большинстве путей введения. При пероральном введение летальные дозы для крыс варьируются от 750 до 1500 мг/кг. Возможен отек при попадании на кожу с образованием многочисленных пузырьков или волдырей с дальнейшим некрозом. Также наблюдается сильное раздражение глаз с переходом в конъюнктивит после контакта с гексаметилендиамином [11].

В работе Ракитского В. Н. (2012) и др. установлено алергизирующее действие химических примесей, мигрирующих в окружающую среду из полимерсодержащих материалов, например, дибутилфталат, диоктилфталат, эпихлорхидрин, гексаметилендиамин. Данные соединения при ингаляционном воздействии оказывают слабый сенсibiliзирующий эффект на организм [12].

В исследованиях И. М. Трахтенберга и В. А. Тычинина (2003) показано, что воздействие гексаметилендиамина приводит к снижению активности тканевого дыхания и одновременному усилению анаэробного гликолиза в миокарде, снижению энергетического потенциала сердечной мышцы, уменьшению уровня АТФ, отношения АТФ/АДФ и энергетического заряда [13].

По химической структуре гексаметилендиамин близок к таким ядам, как путресцин и кадаверин, образующимся при гниении белков. Из опубликованных данных следует, что гексаметилендиамин обладает общим резорбтивным действием, сопровождающимся нарушением проницаемости мелких кровеносных сосудов, понижением артериального давления, изменением морфологии крови, дистрофическими и дегенеративными сдвигами во внутренних органах (печени, легких, почках, селезенке, головном мозгу и др.). Кроме того, гексаметилендиамин оказывает угнетающее действие на центральную нервную систему [14].

При вдыхании гексаметилендиамин вызывает сильные головные боли. В малых концентрациях это вещество может сенсibilизировать организм чувствительных людей и вызывать дерматиты и экземы.

В основе механизма токсического действия гексаметилендиамина лежит способность моно- и диаминов освобождать связанный гистамин, а возможно, и другие биологически активные вещества.

В работе [14] для изучения рефлекторного действия на функциональное состояние центральной нервной системы пороговых и подпороговых концентраций гексаметилендиамина по запаху применяли метод определения световой чувствительности глаза в условиях адаптации к темноте. Наблюдения проводили по методике на адаптометре «АДМ» с привлечением 3 исследуемых в возрасте 22–26 лет. Порог изменения световой чувствительности глаза у наиболее чувствительных лиц находился на уровне $0,0027 \text{ мг/м}^3$

Предельно допустимая концентрация (ПДК) гексаметилендиамина составляет:

- в атмосферном воздухе ПДК максимально разовая – 1 мкг/м^3 , класс опасности – 2 (высокоопасное) [15];
- в воздухе рабочей зоны ПДК максимально разовая – $0,1 \text{ мг/м}^3$, класс опасности – 1 (вещество чрезвычайно опасное) [15];
- в воздушной среде из упаковки – $0,001 \text{ мг/м}^3$, класс опасности – 2; [16];
- в воздушных средах из продукции, предназначенной для детей и подростков и игрушек – $0,001 \text{ мг/м}^3$ [17, 18].
- в воздушной среде из продукции легкой промышленности – $0,001 \text{ мг/м}^3$ [19];
- в воздушной среде из средств индивидуальной защиты – $0,001 \text{ мг/м}^3$ [20];

- в воздушной среде из мебельной продукции – 0,001 мг/м³ [21];
- в воздушной среде из оборудования для детских игровых площадок – 0,001 мг/м³ [22].

2 Способы приготовления воздушных вытяжек из товаров народного потребления для определения миграции гексаметилендиамина

При анализе миграции вредных веществ в воздушную среду проведение пробоподготовки является одним из основных факторов, которые влияют на погрешность и достоверность полученных результатов.

Пробоподготовка продукции на соответствие ТР ТС 005/2011 «О безопасности упаковки» проводится в соответствии с [23].

В соответствии с Приложением 1 ТР ТС 005/2011 исследование миграции вредных веществ в воздушную модельную среду проводятся в отношении продукции с влажностью менее 15 %.

Согласно [23] образцы посуды, тары и т.д. моют с помощью марли теплой водопроводной, а затем дистиллированной водой. При приготовлении воздушных вытяжек упаковочные материалы, предназначенные для затаривания пищевых продуктов, помещают в стеклянную емкость (эксикатор), имеющую две отводные трубки, одну – доходящую до дна, вторую – оканчивающуюся под пробкой с таким расчетом, чтобы при взятии пробы протягиваемый воздух проходил через всю емкость. Отводные трубки закрывают заглушками. Соотношение общей площади всех поверхностей образца упаковки к фактической вместимости эксикатора должно составлять $1 \text{ см}^2 : 2,5 \text{ см}^3$. Для испытания используют две параллельные пробы упаковки, которые помещены в разные эксикаторы.

После соответствующей экспозиции открывают заглушки и через емкость с образцом протягивают воздух. Воздушные вытяжки пропускают через поглотительный раствор или через фильтр в зависимости от анализируемого вещества. Количество протягиваемого воздуха должно быть в 3 раза больше фактической вместимости эксикатора.

Пробоподготовка продукции на соответствие ТР ТС 007/2011 «О безопасности продукции, предназначенной для детей и подростков» и ТР ТС 008/2011 «О безопасности игрушек» проводится согласно [24, 25].

Исследование миграции вредных химических веществ в воздушную среду проводится в статическом или, при необходимости, динамическом режиме.

При изучении миграции вредных химических веществ в воздушную среду из игр и игрушек, паст для лепки, красок, принадлежностей канцелярских или школьных, изделий галантерейных, изделий санитарно-гигиенических из полимерных материалов, из резины формовых или неформовых для ухода за детьми и других аналогичны изделий, в статическом режиме исследуемый образец помещают в тщательно вымытые герметически закрытые емкости (эксикатор), выдерживают в них в течение 24 часов при температуре

37 °С. При отборе проб воздуха через поглотители протягивают трехкратный объем воздуха эксикатора, содержащего образец.

Соотношение веса образца к объёму воздушной среды эксикатора составляет 100 : 1 г/м³. Если образец не помещается в камеру-термостат или эксикатор, допускается разборка его на составные части (из мягконабивной игрушки выделяется элемент с наполнителем при его наличии). Параллельно готовится «холостая проба»: отбирается проба воздуха на содержание того же вредного химического вещества из идентичной герметически закрытой емкости, в которой отсутствует образец. Воздушные пробы, полученные как в основном, так и в контрольном опытах, исследуют в идентичных условиях.

Исследование миграции вредных химических веществ из образцов в воздушную модельную среду в динамическом режиме проводят в камере-термостате. Камера-термостат тщательно моется, вытирается досуха, затем в камеру подается в течение 30 минут воздух. Для проверки чистоты камеры-термостата проводится контрольный опыт.

В камеру помещают исследуемый образец, устанавливают температуру 37 °С, воздухообмен 0,5 объём/час и выдерживают образец при данных условиях в течение 24 часов. Соотношение веса образца к объёму воздушной среды камеры составляет 100 : 1 г/м³. Скорость и время отбора при исследовании в динамическом режиме определяется конкретной методикой, согласно которой определяется данное летучее вещество.

Определение миграции вредных химических веществ из изданий учебных, книжных и журнальных, бумажно-беловых изделий для детей старше трех лет осуществляется в воздушную модельную среду. Пробоподготовка образцов изложена выше.

При изучении миграции вредных химических веществ в воздушную модельную среду из образцов колясок и велосипедов детских, не контактирующих с кожными покровами, исследования проводят согласно требованиям [24 п. 4.6].

Пробоподготовка продукции на соответствие ТР ТС 017/2011 «О безопасности продукции легкой промышленности» проводится в соответствии с [26].

Перед испытаниями образцы одежды и принадлежностей к одежде, прочих готовых текстильных изделий, обуви, портфелей, ранцев и рюкзаков ученических для детей выдерживают в лабораторных условиях 24 часа [24 п. 4.6]. Изделия и материалы для новорожденных и детей до одного года, а также первого слоя подлежат обязательной предварительной стирке без моющих средств. Изделие помещают в тщательно вымытые герметически закрытые емкости (эксикаторы или камеры) при соотношении площади исследуемого образца к объёму используемой емкости 1 м²/м³ (с учетом двух

поверхностей). Объем отобранного воздуха составляет трехкратный объем воздуха эксикатора. Из идентичной герметически закрытой емкости, в которой отсутствует образец отбирается «холостая проба». Воздушные пробы, полученные как в основном, так и в «холостом опыте», исследуют в идентичных условиях.

При гигиенической оценке тканей, одежды (3-го слоя) и обуви анализируется воздушная среда:

изделия помещают в тщательно вымытые герметически закрытые емкости (эксикаторы или камеры) при соотношении площади исследуемого образца к объему используемой ёмкости $1 \text{ м}^2/\text{м}^3$ (с учетом двух поверхностей) – для верхней одежды, $0,4 \text{ м}^2/\text{м}^3$ (с учетом двух поверхностей) для портьерной и шторных тканей, выдерживают в течение 24 часов при температуре 37°C (основной опыт). Для определения степени миграции летучего вещества параллельно проводят определение «холостой пробы» (контрольный опыт):

отбирается проба воздуха на содержание того же летучего вещества из идентичной герметически закрытой ёмкости, в котором отсутствует образец. Воздушные пробы, полученные как в основном, так и контрольном опытах, исследуют в идентичных условиях.

Пробоподготовка продукции на соответствие ТР ТС 019/2011 «О безопасности средств индивидуальной защиты» проводится согласно [27].

В соответствии с [27] исследуемые образцы производственной и специальной одежды (хлопчатобумажной, льняной, шерстяной, синтетической и т.д.), в зависимости от назначения и защитной способности материалов образцы закладываются в эксикаторы объемом не менее 4 литров в соотношении 10 см^2 образца к 1 дм^3 емкости. За площадь поверхности образца считают суммарную площадь обеих сторон поверхности образца. Исследуемые образцы выдерживают в течение 3 суток при комнатной температуре или при 37°C – 24 часа. Воздух из эксикатора аспирируют со скоростью, обусловленной методиками испытаний. Объем отобранного воздуха должен быть равен трехкратному объему эксикатора. Определение миграции каждого вещества при одинаковых условиях следует проводить дважды. Одновременно с опытными эксикаторами устанавливают контрольные, выдерживаемые при указанных выше условиях эксперимента.

Исследование степени миграции токсических веществ в воздух можно проводить в климатических камерах, с объемом рабочего пространства от $0,01$ до 1 м^3 . Конструкция камеры должна обеспечивать герметичность, автоматическое регулирование температуры. В рабочем объеме камеры во время проведения исследований должны поддерживаться следующие параметры: температура воздуха – 37°C , воздухообмен – 1 объем в час. Исследуемый образец помещают в климатическую камеру и кондиционируют не менее

4 часов при указанных выше условиях. Соотношение площади поверхности образца к рабочему объему камеры должно составлять 10 см^2 на 1 дм^3 . Отбор проб воздуха на исследуемые соединения из рабочего объема камеры проводится через 4 часа с момента стабилизации параметров воздуха в камере аспирационным устройством в соответствии с требованиями методик измерения по определению анализируемых веществ. Объем отобранного воздуха не должен превышать рабочего объема камеры. Перед помещением образца в камеру, проводят контрольный отбор воздуха на испытуемый показатель (контрольный опыт).

Пробоподготовка продукции на соответствие ТР ТС 025/2012 «О безопасности мебельной продукции» проводится согласно [28].

Исследование миграции ЛОС проводится в замкнутом объеме воздуха испытательной камеры при следующих (наиболее типичных) условиях эксплуатации: температура воздуха – $(23,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$, относительная влажность воздуха – $(50 \pm 3) \%$, скорость воздухообмена – $(1,00 \pm 0,05) \text{ л/ч}$. Насыщенность устанавливается в зависимости от эксплуатации и вида изделия: корпусная мебель, столы, кровати щитовой конструкции – $(1,00 \pm 0,05) \text{ м}^2/\text{м}^3$, мебель для сидения и лежания, кровати с мягкими спинками и элементами – $(0,300 \pm 0,015) \text{ м}^2/\text{м}^3$, напольные и стеновые панели – $(0,40 \pm 0,02) \text{ м}^2/\text{м}^3$.

Отбор проб проводят методом периодического активного отбора проб (прокачки) воздуха из рабочего объема испытательной камеры в поглотительные приборы, содержащие поглотительный раствор, с последующей обработкой в соответствии с методикой испытаний на исследуемые показатели.

При подготовке к испытаниям образцы изделий (деталей) мебели распаковывают, при необходимости собирают (монтируют) согласно прилагаемой к ним инструкции, а поверхности тщательно очищают обдувом и/или сухой щеткой (кромки и технологические отверстия не герметизируют, а имеющуюся фурнитуру сохраняют). Образцы изделий должны быть выдержаны перед испытанием в помещении с температурой и относительной влажностью воздуха, соответствующими принятым при испытании в камере, не менее трех суток.

Образцы жидких и термопластичных полимерных материалов (клей, связующее) смешивают с отвердителем и прочими компонентами по рекомендуемой рецептуре. Наносят на металлические пластины и отверждают по рекомендованным режимам. Размеры пластины должны соответствовать насыщенности. День нанесения материала на пластины считается днем его изготовления.

Образцы напольных и стеновых панелей при необходимости отбирают из середины пачки (рулона) с длиной, соответствующей рабочему объему камеры и выбранному

значению насыщенности. Перед испытанием поверхности образцов материалов очищаются с обдувом и/или сухой щеткой (бязью) и проводится кондиционирование в течение 7–15 дней при комнатных (лабораторных) условиях. До проведения испытаний кромки образцов материалов частично герметизируют, заклеивая металлической фольгой с силикатным или полиуретановым клеем (самоклеящаяся лента). При этом отношение длины открытых (не герметизированных) кромок к площади поверхности пластей должно составлять $(1,5 \pm 0,075) \text{ м/м}^2$. Обратные (не лицевые) поверхности образцов напольных покрытий и стеновых панелей герметизируют: соединяют образцы друг с другом этими поверхностями и герметизируют кромки или полностью герметизируют обратные поверхности и кромки металлической фольгой.

Пробоподготовка продукции на соответствие ТР ТС 042/2017 «О безопасности оборудования для детских игровых площадок» проводится согласно [24 п. 3.3.2].

3 Историография по исследуемой проблематике определения уровня миграции, выраженного в единицах массовой концентрации, в воздушную среду гексаметилендиамина, содержащегося в изделиях из полиамидов, на основе применяемых в мировой практике методов и методик определения массовой концентрации гексаметилендиамина в воздушной среде

Однако существует целый ряд методик определения массовой концентрации гексаметилендиамина в воздухе [29–31], которые могут стать основой для разработки методики определения уровней миграции гексаметилендиамина, содержащегося в изделиях из полиамидов, в воздушную среду.

ГОСТ Р ИСО 17734-2-2009 [29] устанавливает метод определения гексаметилендиамина по их производным с использованием ди-н-бутиламина (ДБА) в качестве реагента и дериватизации с этилхлорформиатом. Метод устанавливает определение 1,6-гексаметилендиамина в воздухе рабочей зоны в газообразном состоянии в виде твердых частиц. Предел обнаружения для аминов составляет около 50 фмоль (10-15). Пробы отбирают путем пропускания известного объема воздуха через миниатюрный импинжер с 10 мл раствора ДБА в толуоле концентрацией 0,01 моль/л, за которым расположен фильтр из стекловолокна. После отбора к растворам проб добавляют дейтерированные этилхлорформиатные производные аминов и ДБА-производные изоцианатов (используемые в качестве внутреннего стандарта). Пробы анализируют методом жидкостной хроматографии (ЖХ) с обращенной фазой с использованием масс-спектрометрического детектора с электроспреем (ЭСП-МС) в режиме регистрации положительно заряженных ионов. Количественное определение проводят путем регистрации избранных ионов. Количественное определение и качественные оценки могут быть выполнены методами ЖХ с УФ-детектором. Для количественного определения летучих соединений может быть использован газохроматографический термоионный детектор (ТИД). Токсичные растворители (этилхлорформиат, безводный этанол), труднодоступность референтных соединений, многоступенчатая и ресурсозатратная процедура обработки и подготовки проб значительно усложняют реализацию данной методики на практике.

Метод колориметрического определения гексаметилендиамина в воздухе представлен в МУ 1656-77 [30]. Согласно методическим указаниям определение основано на образовании окрашенного в желтый цвет продукта (1,6-бис-(2,4-динитрофенил)аминогексан) реакции гексаметилендиамина с 2,4-динитрофтор- или хлорбензолом. Чувствительность метода составляет 0,5 мг/м³. Отбор проб воздуха со скоростью 2 л/мин, осуществляется через два поглотительных прибора с пористой пластинкой, наполненные

3 см³ дистиллированной воды. Для определения 0,5 ПДК достаточно отбирать 15 л воздуха. Количественное определение содержания вещества проводят путем сравнения интенсивности образовавшейся окраски со спектром цветовой шкалы. Недостатки методики заключаются в том, что визуальный метод определения субъективен, так как сравнение интенсивности окрашивания раствора проводят невооруженным глазом, что и объясняет невысокую чувствительность метода.

В методических указаниях МУ 4481-87 представлен хроматографический метод измерения концентраций гексаметилендиамина в воздухе рабочей зоны [31]. Метод основан на использовании газожидкостной хроматографии с пламенно-ионизационным детектированием (ПИД). Диапазон измеряемых концентраций в воздухе от 0,05 до 0,5 мг/м³. Отбор проб проводится на фильтры «синяя лента» обработанные 0,01Н раствором серной кислоты, с объемным расходом воздуха 10 л/мин. Для 0,5 ПДК следует отбирать 100 л воздуха. Фильтры с отобранной пробой обрабатывают 1 см³ дистиллированной воды в бюксе и через 5 минут 2 мкл полученного раствора вводят в испаритель хроматографа. Количественное определение проводят по градуировочному графику. Также в данном методическом указании описан метод количественного определения гексаметилендиамина тонкослойной хроматографией. Метод основан на хроматографическом выделении гексаметилендиамина в тонком слое сорбента «силуфон» с последующим проявлением хроматограмм 0,2% раствором нингидрина в этиловом спирте при температуре 110 °С. Диапазон измеряемых концентраций в воздухе от 0,05 до 1,5 мг/м³. Отбор проб проводится с концентрированием на фильтры «синяя лента», обработанные 0,01Н раствором серной кислоты с объемным расходом воздуха 10 л/мин. Для измерения 0,5 ПДК необходимо отобрать 60 л воздуха. Количественное определение в пробе проводят путем измерения площади пятен пробы и стандартов с помощью планиметра и денситометра. Недостатком данного способа определения является его трудоемкость для рутинного анализа, а также методы упомянутые в МУ 4481-87 являются недостаточно чувствительными и не содержат метрологические характеристики.

Недостатком многих из вышеперечисленных методик является отсутствие метрологических характеристик, некоторые из методик устарели и труднореализуемы на практике. Следует отметить, что в литературе по аналитическим методам определения, нормативным документам, метод по определению уровня миграции гексаметилендиамина, содержащегося в изделиях из полиамидов, в воздушную среду отсутствует. Тем не менее, использование хроматографических методов при определении уровней миграции гексаметилендиамина из полиамидов в воздушную среду является выбором, обоснованным практикой.

4 Анализ международных стандартов (правил, директив, рекомендаций и иных документов, принятых международными организациями по стандартизации), региональных документов (регламентов, директив, решений, стандартов, правил и иных документов), а также законодательства экономически развитых государств (США, Великобритания, Германия, Китай, Япония), научно-информационных источников и результатов теоретических и экспериментальных исследований в части применяемых методов и методик определения массовой концентрации, в водных и воздушных средах, биологическом материале гексаметилендиамина, содержащегося в изделиях из полиамидов, и результатов теоретических и экспериментальных исследований в указанной области

Как видно из рассмотрения в предыдущей части результатов имеющихся методических документов по определению гексаметилендиамина в воздушных средах, основными методами его определения являются газовая хроматография с различными типами детектирования, а также тонкослойная хроматография.

Был описан метод измерения содержания гексаметилендиамина в водной среде с помощью газовой хроматографии [32]. Данный способ определения включает проведение предварительной дериватизации с гептафтормасляным ангидритом и дальнейшим газохроматографическим анализе с использованием детектора электронного захвата. Подготовка пробы осуществляется в несколько этапов: 100 см³ образца водной вытяжки переносят в разделительную воронку; добавляют 50 г гидроксида натрия и перемешивают до полного растворения щелочи; далее в воронку добавляют 50 см³ толуола и интенсивно встряхивают в течение 2 минут; после разделения фаз, органический слой сливают; повторяют экстракцию еще один раз 25 см³ толуола; экстракты объединяют и упаривают на ротационном испарителе при температуре водяной бани 65 °С; к сухому остатку добавляют 2 см³ толуола, 100 мкл гептафтормасляного ангидрита и перемешивают. Дериватизацию проводят при температуре 55 °С в течение 70 минут, далее охлаждают до комнатной температуры и пропускают через фильтр мембранный с диаметром пор 0,45 мкм.

Газохроматографическое разделение проводилось на неполярной колонке DB-1 длиной 30 м, внутренним диаметром 0,25 мм и толщиной неподвижной фазы 0,25 мкм. Температура испарителя составляла 250 °С, а детектора 300 °С. Температурный градиент разделения начинался с 60 °С без выдержки, далее нагревали колонку со скоростью 10 °С/мин до 200 °С с выдержкой 2 минуты и после снова прогревали колонку со скоростью 30 °С/мин до 270 °С с выдержкой 5 минут. Скорость потока равнялась 1 см³/мин.

Известен также метод определения гексаметилендиамина в водной среде, моче и плазме человека с помощью газовой хроматографии с термоионным специфическим детектированием [33]. Метод основан на процедуре дериватизации этилхлорформиатом в двухфазной системе с образованием гексаметилендиамина-диуретана. Для определения использовался газовый хроматограф Varian 3500/3600 и инжектор с программируемой температурой испарения. Начальная температура инжектора составляла 105 °С в течение 5 секунд, затем температуру повышали со скоростью 150 °С/мин до конечной температуры 280 °С, где поддерживалась в течение 7 минут. Для разделения использовалась капиллярная колонка DB-5 длиной 30 м, внутренним диаметром 0,24 мм и толщиной неподвижной фазы 0,5 мкм. Температура детектора составляет 270 °С, скорость потока водорода 3 см³/мин, воздуха 175 см³/мин и 20 см³/мин азота в качестве подпиточного газа. Температурный градиент разделения начинался с 115 °С с выдержкой 1 минута, далее нагревали колонку со скоростью 25 °С/мин до 280 °С без выдержки.

Первоначально к образцам (моча или плазма) добавляют 6 М соляную кислоту и выдерживают всю ночь при температуре 100 °С (гидролиз). После пробы объемом 2 см³ переносили в пробирки куда далее добавляли 1 см³ 3% водного раствора аммиака, 3 см³ 5 М NaOH и 2 см³ толуола, встряхивали и добавляли 100 см³ этилхлорформиата. Полученную смесь встряхивали в течение 15 минут при комнатной температуре. Аликвоту толуольного слоя объемом 1 см³ выпаривали на ротационном испарителе до сухого остатка и добавляли 1 см³ толуольного раствора, содержащего внутренний стандарт, состоящий из изобутутилхлорформиатного производного ди-н-бутиламина концентрацией 1 нг/мкл. Для водных образцов этап гидролиза исключался. Хроматограммы образцов представлены на рисунке 11.

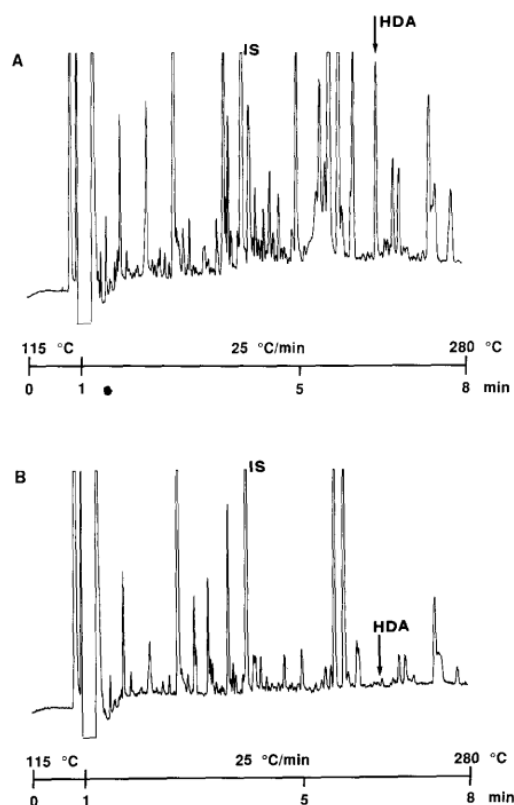


Рисунок 11 – Хроматограммы содержания гексаметилендиамина обработанного этилхлорформиатом (А) и холостой образец (В) с использованием газовой хроматографии с термоионным специфическим детектированием

Калибровочный график зависимости отношения площадей хроматографических пиков относительно внутреннего стандарта и концентрации производных гексаметилендиамина с этилхлорформиатом в диапазоне от 10 мкг/л до 350 мкг/л, полученный с помощью газовой хроматографии с термоионным специфическим детектированием, представлен на рисунке 12. Коэффициент корреляции для серии из шести концентраций составил 0,9998.

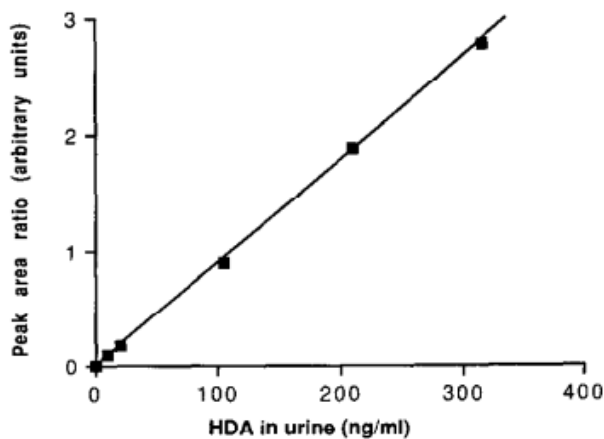


Рисунок 12 – Калибровочный график для гексаметилендиамина в моче человека

Метод также применим для определения диизоцианатов в воздухе с использованием импинджера и кислого водного раствора для отбора проб.

В работе [34] авторами представлен метод определения гексаметилендиамина в гидролизованной моче методом газовой хроматографии с МС детектированием. Метод основан на реакции дериватизации с гептафтормасляным ангидридом с образованием соответствующего амида. Определение проводили с помощью газовой хроматографии выбранных ионов в режиме химической ионизации с аммиаком в качестве газа-реагента. Предел обнаружения составил 0,5 мкг/л. В качестве внутреннего стандарта использовали меченный дейтерием гексаметилендиамин.

Использовали квадрупольный МС Shimadzu GCMS-QP 1000 EI/CI, подключенный к газовому хроматографу Shimadzu GC-9A. Начальная температура термостата колонки составляла 100 °С (близка к температуре кипения растворителя) с выдержкой 2 минуты, далее нагревали колонку со скоростью 30 °С/мин до 280 °С с выдержкой в течении 1 минуты. Источник ионов поддерживали при температуре 250 °С. Химическая ионизация проводилась с использованием аммиака или изобутана в качестве газов реагентов. Пробу объемом 4 мкл вводили в хроматографическую систему в режиме без деления при температуре испарителя 250 °С. В качестве газа-носителя использовали гелий. Для разделения использовалась капиллярная колонка DB-5 длиной 30 м, внутренним диаметром 0,24 мм и толщиной неподвижной фазы 0,25 мкм.

Для получения продукта взаимодействия 0,2 г (1,6 ммоль) гексаметилендиамина и 1,6 г гептафтормасляного ангидрида растворяли в этилацетате и нагревали при температуре 50 °С в течение 10 минут. После охлаждения до комнатной температуры избыток реагентов и выделившиеся кислоты экстрагировали 1 М фосфатным буферным раствором (pH = 7,0) и органическую фазу элюировали через колонку с диоксидом кремния и испаряли до образования осадка. Стандартные растворы производных готовили растворением точных навесок в толуоле и затем дополнительно разбавляли толуолом до соответствующих концентраций.

К образцу мочи объемом 2 см³ добавляли 1,5 см³ 6 М HCl и 1,5 см³ 6 М HCl содержащий внутренний стандарт концентрацией 6 мкг/л. Смесь нагревали при 100 °С в течение ночи для гидролиза. После охлаждения до комнатной температуры 2 см³ пробы переносили в пробирку и добавляли 4 см³ насыщенного гидроксида натрия и 3 см³ толуола, встряхивали в течении 5 минут. Затем образец центрифугировали при 1500g в течении 10 минут. После разделения фаз 2 см³ органического слоя переносили в пробирки объемом 10 см³ и добавляли 20 мкл гептафтормасляного ангидрида. Полученную смесь встряхивали интенсивно в течении 5 минут. Избыток реагента и образовавшуюся кислоту

экстрагировали 1 М фосфатным буферным раствором (pH = 7,0). Тoluольную фазу переносили в колбу и выпаривали до сухого остатка на ротационном испарителе при температуре 30 °C и далее его растворяли в 50 мкл толуола.

Использовались два метода ионизации: электронный удар и химическая ионизация. Было выявлено, что электронный удар обладает меньшей чувствительностью для получения приемлемого спектра, по сравнению с химической ионизацией (Рисунок 13).

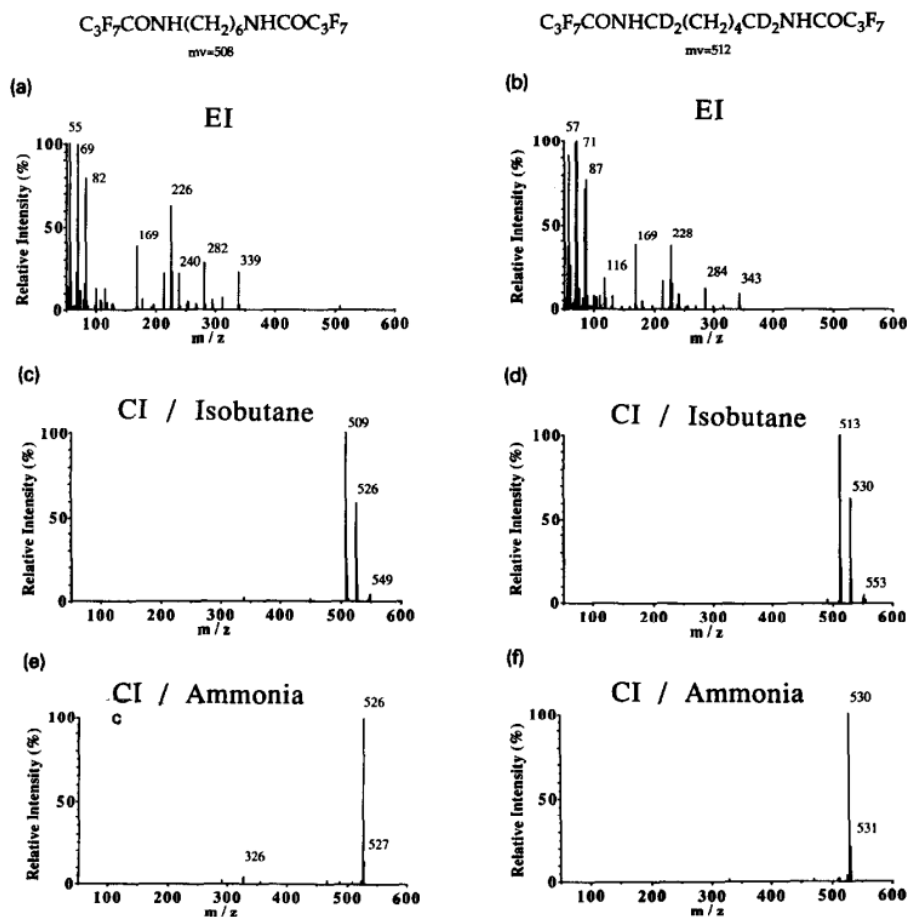


Рисунок 13 – Масс-спектры, полученные электронным ударом (a, b), химической ионизацией изобутаном (c, d) и аммиаком (e, f), mv = 512 г/моль

При использовании аммиака в качестве газа-реагента для химической ионизации наиболее распространенными ионами были M+18 (m/z 526 и 530) для амидов – продуктов реакции с гептафтормасляным ангидридом и гексаметилендиамином/дейтрированным гексаметилендиамином. При использовании в качестве газа-реагента изобутана наиболее распространенными ионами были M+1 (m/z 509 и 513). Более высокую чувствительность, примерно в 10 раз, показало использование аммиака в качестве газа-реагента (рисунок 14).

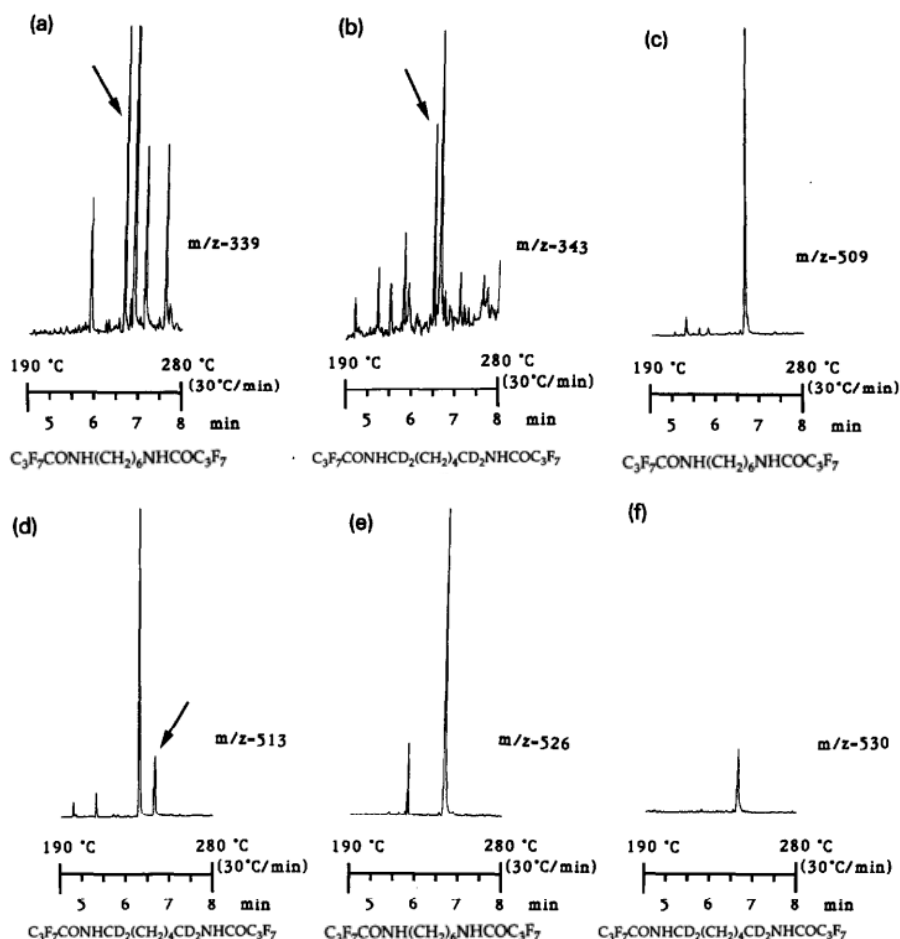


Рисунок 14 – Хроматограммы образцов мочи с использованием электронного удара (a, b) и химической ионизации (c, d, e, f)

Определение гексаметилендиамина в моче методом газовой хроматографии с МС детектированием также описаны в работе [35]. Описанный аналитический метод позволяет одновременно определять в моче человека метаболиты гексаметилендиизоцианата, 2,4- и 2,6-толуолдиизоцианата, изофорондиизоцианата и метилendifенилдиизоцианата. После кислотного гидролиза выделившиеся амины гексаметилендиамин, 2,4- и 2,6-толуилендиамин, изофорондиамин и метилendifанилин экстрагируются из мочи и дериватизируются с использованием гептафтормасляного ангидрида. Производные разделяют с помощью газовой хроматографии на капиллярной колонке и детектируют масс-чувствительным детектором с использованием выбранного режима ионного мониторинга с отрицательной химической ионизацией. Калибровка проводится с использованием образцов мочи с добавками аналитов, которые обрабатываются и анализируются так же, как и неизвестные образцы. Предел количественного обнаружения для гексаметилендиамина составлял 0,7 мкг/л.

Для анализа образец объемом 2 см³ пипеткой переносят в пробирку емкостью 10 см³. В каждую пробирку добавляют по 100 мкл рабочего раствора внутренних стандартов, а

затем концентрированную серную кислоту (200 мкл). Пробирки закрывают крышками, тщательно перемешивают и затем помещают на водяную баню ($>98^{\circ}\text{C}$) для гидролиза. Через 90 минут пробирки вынимают и дают остыть до комнатной температуры. В каждую пробирку добавляют раствор гидроксида натрия (10 М, 2 см³) и снова перемешивают. Затем в каждую пробирку добавляют диэтиловый эфир (4 см³). Наконец, пробирки закрывают крышками и тщательно перемешивают на вращающемся барабане в течение 20 минут с последующим центрифугированием ($2200\times g$) в течение 5 минут. Затем примерно 3 см³ надосадочной жидкости переносят в чистую пробирку и выпаривают досуха под слабым током азота (<50 мл/мин при $30\text{--}40^{\circ}\text{C}$). Остаток в пробирке растворяют в толуоле (200 мкл) и дериватизируют гептафтормасляным ангидридом (20 мкл) в пробирках с крышками при 55°C в течение 1 часа. После охлаждения толуол и избыток дериватизирующего агента удаляют слабым током азота со скоростью потока < 50 мл/мин при $30\text{--}40^{\circ}\text{C}$ до тех пор, пока остаток не высохнет. Остаток растворяют в толуоле (100 мкл) и анализируют на газовом хроматографе с МС детектированием.

Начальная температура термостата колонки составляла 150°C с выдержкой 2 минуты, далее нагревали колонку со скоростью $10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до 240°C без выдержки и после снова прогревали колонку со скоростью $20^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до 300°C с выдержкой 5 минут. Пробу объемом 2 мкл вводили в испаритель хроматографа в режим без деления при температуре испарителя 350°C . Температура переходной линии составляла 300°C . Гелий использовался в качестве газа-носителя со скоростью потока $0,9$ см³/мин. Для разделения использовалась капиллярная колонка DB-5 длиной 30 м, внутренним диаметром 0,32 мм и толщиной неподвижной фазы 1,00 мкм. Обнаружение осуществляется в режиме мониторинга выбранных ионов с использованием отрицательной химической ионизации газом-реагентом метаном. Энергия ионизации составляла 70 эВ, а температура источника 150°C . Для гексаметилендиамина характеристичными ионами являлись $m/z = 488, 448, 449$ со временем удерживания 10,4 минуты. Хроматограммы содержания гексаметилендиамина представлены на рисунке 15.

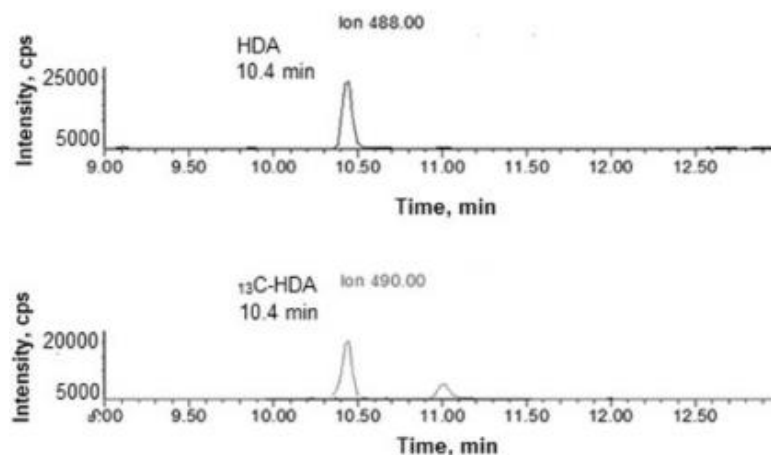


Рисунок 15 – Хроматограммы мочи с добавлением 120 нмоль/л гексаметилендиамина

Для определения низких концентраций мономера гексаметилендиамина в воде, имитирующей пищевые продукты, из полимерных материалов, контактирующих с пищевыми продуктами, авторами [36] предложена новая методика с применением капиллярной газовой хроматографии. Были изучены два методических подхода предварительной дериватизации соединения для газовой хроматографии. Первый подход включал в себя преобразование свободного диамина с использованием этилхлорформиата в качестве дериватирующего агента с последующим анализом полученного диуретана методом газовой хроматографии с использованием пламенной ионизации и масс-селективного детектирования. Количество гексаметилендиамина определялось методом селективного ионного мониторинга при $m/z = 102$, нижний предел обнаружения составлял 1 нг. Согласно второму методическому подходу образцы воды смешивались с хлоридом натрия и экстрагировались толуолом, затем дериватизировались трифторуксусным ангидридом в течении 60 минут при 55 °С до диамида. Далее для удаления избытка дериватирующего агента добавляли 1 М калий-фосфатный буфер ($pH = 7,0$) с последующим анализом полученного диамида методом газовой хроматографии с применением детектора электронного захвата. Нижнее предельное значение составило 0,01 нг. Конформация уровней гексаметилендиамина проводится методом комбинированной газовой хроматографии/МС. Количество гексаметилендиамина определялось методом селективного ионного мониторинга при $m/z = 126$, нижний предел обнаружения 0,1 нг. Было выявлено, что оптимальной предварительной дериватизацией является второго подхода для определения низких уровней гексаметилендиамина в водных вытяжках. Диапазон измеряемых концентраций 0,005–0,5 мг/дм³, извлечение 88–101 %, суммарная погрешность измерения 16 %, относительное стандартное отклонение 1,85 %. Методика была апробирована при

исследовании водных вытяжек из 10 случайных проб, предназначенных для пищевых продуктов, закупаемых на потребительском рынке.

Изоцианаты – это высокореактивные химикаты, используемые в двухкомпонентных аэрозольных красках, клеях и в производстве полиуретанов. Они также могут выделяться во время резки и сварки материалов. Изоцианаты являются наиболее распространенной причиной профессиональной астмы в национальных и региональных схемах отчетности. Биологический мониторинг имеет потенциал для измерения нагрузки на организм работника, полученной всеми путями воздействия (пероральным, ингаляционным и дермальным). Гексаметилендиамин был обнаружен в моче (после гидролиза) автомаляров, которые используют аэрозольные краски на основе изоцианатов, и было опубликовано несколько метод анализа в моче.

Известен метод определения гексаметилендиамина с помощью газовой хроматографии и МС детектора для анализа профессионального воздействия 1,6-гексаметилендиизоцианата, который широко используется в автомобильной ремонтной промышленности и является частой причиной профессиональной астмы у промышленных групп населения [37]. Биологический мониторинг воздействия 1,6-гексаметилендиизоцианата в первую очередь включал анализ гексаметилендиамина, продукта гидролиза 1,6-гексаметилендиизоцианата, в моче или плазме в качестве маркера воздействия на организм человека. Авторами описан способ количественного определения N-ацетил-1,6-гексаметилендиамина (моноацетил-гексаметилендиамин) и N,N-диацетил-1,6-гексаметилендиамина (диацетил-гексаметилендиамин) в образцах мочи и основного биомаркера гексаметилендиамина, предварительно дериватизированных с помощью гетафтормасляного ангидрита, газовой хроматографией с масс-селективным детектированием. Предел обнаружения диацетил-гексаметилендиамина и моноацетил-гексаметилендиамин составляет 1 нг/см³.

Образцы анализировались с помощью газового хроматографа Thermo GC Ultra, сопряженный с МС с ионной ловушкой PolarisQ в режиме отрицательной химической ионизации. Применялся режим сканирования в диапазоне $m/z = 200-600$ с использованием метана в качестве газа-реагента (1,8 см³/мин). Проба объемом 1 мкл вводилась в испаритель хроматографа в режиме без деления в течение 30 секунд при температуре испарителя 220 °С. Разделение проводилось на капиллярной колонке DB-5-MS длиной 30 м, внутренним диаметром 0,25 мм и толщиной неподвижной фазы 0,1 мкм. Температура источника ионов и линия передачи газового хроматографа поддерживался на уровне 150 и 260 °С. В качестве газа-носителя использовался гелий с постоянным потоком 1 см³/мин. Начальная температура режима газового хроматографа составляла 50 °С с выдержкой 1

минута, далее нагревали термостат хроматографа со скоростью 10 °C/мин до 155 °C без выдержки и снова прогревали со скоростью 2 °C/мин до 185 °C без выдержки, достигали конечной температуры 300 °C со скоростью 25 °C/мин с выдержкой 10 минут. Были идентифицированы основные ионы, соответствующие гексаметилендиамину, моноацетил-гексаметилендиамину и диацетил-гексаметилендиамину, а также внутренние стандарты, 1,7-гептандиамин, N-ацетил-1,7-гептандиамин и N,N-диацетил-1,7-гептандиамин. Основные ионы, соответствующие дериватизированному гексаметилендиамину, моноацетил-гексаметилендиамину и диацетил-гексаметилендиамину, имели m/z 448 [$M^-H_3F_3$], элюирование на 13,9 минуте, 510 [$M^-H_2F_2$], элюирование на 14,9 минуте, и 552 [$M^-H_2F_2$], элюирование на 16,0 минуте соответственно (рисунок 16).

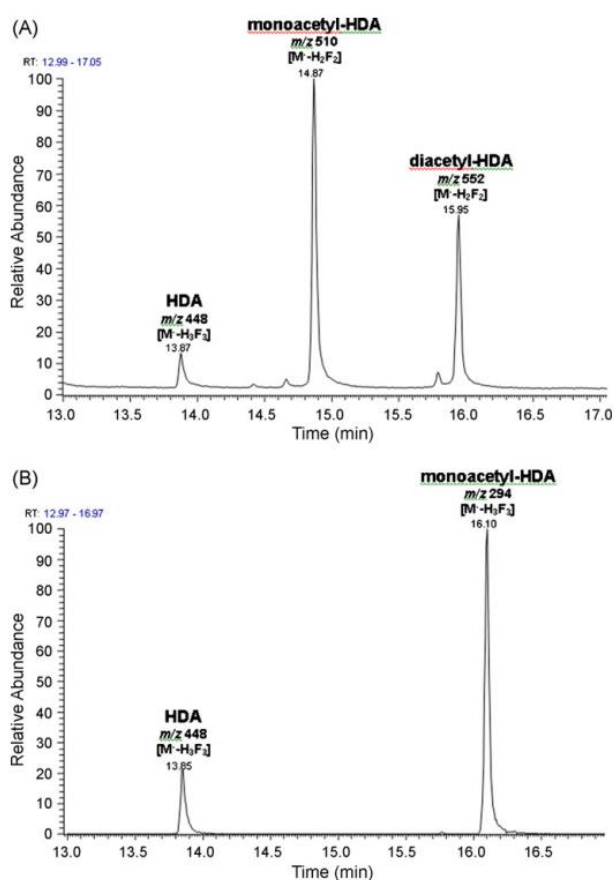


Рисунок 16 – Хроматограммы (m/z 200–600) (А) отфильтрованного раствора, содержащего гексаметилендиамин, моноацетил-гексаметилендиамин и диацетил-гексаметилендиамин, синтезированного при молярном соотношении 0,9:1 (уксусный ангидрид к гексаметилендиамну) в этилацетате с использованием времени реакции 2 часа и дериватизации с гептафтормасляным ангидритом, и (В) дериватизированного экстракта из контрольной мочи, в который добавлена смесь в молярном соотношении 0,9:1 и подвергнутого щелочному гидролизу.

Основной ион для внутренних стандартов 1,7-гептандиамин, N-ацетил-1,7-гептандиамин и N,N-диацетил-1,7-гептандиамин в смеси имел m/z 462 [$M^-H_3F_3$], время

выхода 15,6 минут, 524 [M⁻-H₂F₂], время выхода 16,6 минут, и 566 [M⁻-H₂F₂], время выхода 17,8 минут, соответственно (Рисунок 17).

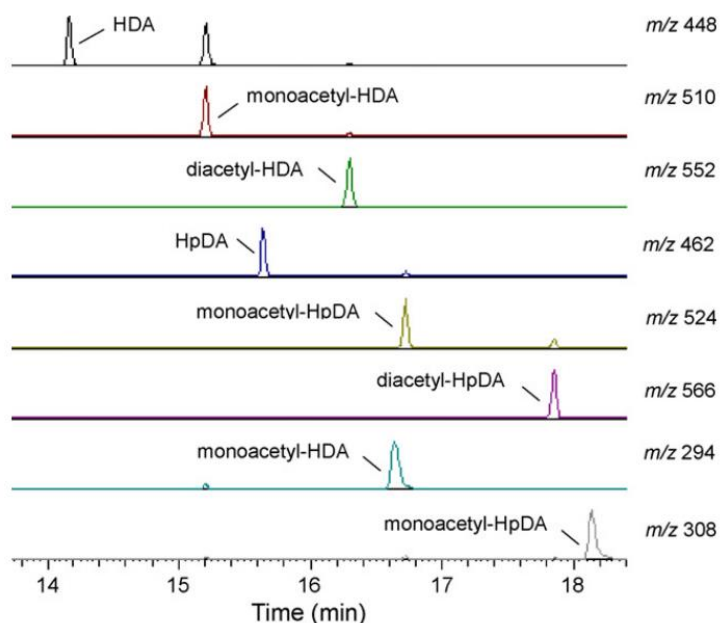


Рисунок 17 – Хроматограммы и наиболее распространённый масс-фрагментный ион для каждого амина и внутреннего стандарта в дериватизированном экстракте из контрольного образца мочи, гидролизованного основанием, с добавлением смесей в молярном соотношении 0,9:1 (уксусный ангидрид к гексаметилендиамну)

Масс-спектры для каждого соответствующего стандартного пика отражали последовательные потери атомов водорода (H) и фтора (F) из дериватизированных родительских аминов (гексаметилендиамин = 508 г/моль, моноацетил-гексаметилендиамин = 550 г/моль, диацетил-гексаметилендиамин = 592 г/моль) и аминов внутренних стандартов (1,7-гептандиамин = 522 г/моль, N-ацетил-1,7-гептандиамин = 564 г/моль, N,N-диацетил-1,7-гептандиамин = 606 г/моль). Выбор ионов, использованных при количественной оценке каждого амина, основывался на наиболее распространенном фрагменте иона в масс-спектрах (рисунок 18).

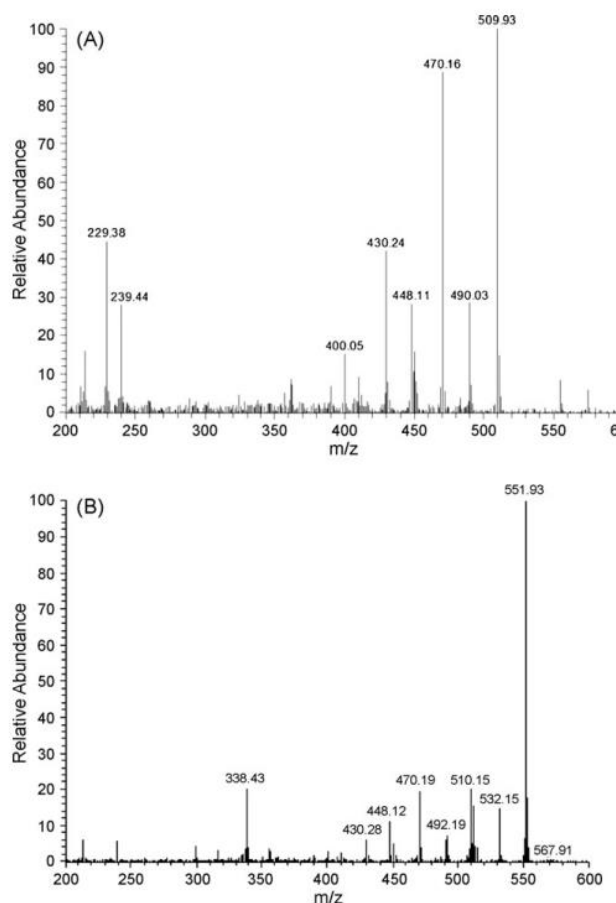


Рисунок 18 – Масс-спектры (m/z 200–600) моноацетил-гексаметилендиамина (А) и диацетил-гексаметилендиамина (В) в дериватизированном экстракте из необработанного контрольного образца мочи с добавлением смесей в молярном соотношении 0,9:1 (уксусный ангидрид к гексаметилендиамину или 1,7-гептандиамин)

Высококчувствительные и специфичные аналитические методы для биомаркеров 1,6-гексаметилендиизоцианата позволят улучшить характеристику моделей воздействия и предсказать системное воздействие и дозу, а также улучшить наше понимание взаимосвязи между воздействием и заболеванием.

Воздействие изоцианатов для биологического мониторинга среди рабочих, подвергавшихся воздействию продуктов термической деградации полиуретанов, также описывалось в статье [38]. Амины, полученные из изоцианата, в образцах мочи, гидролизированных кислотой, анализировались как перфторацилированные производные методом газовой хроматографии и МС в режиме отрицательной химической ионизации. Пределы количественного определения для ароматических диаминов 2,4- и 2,6-толуиленадиамина и 4,4-метилендианилина составили 0,25 нмоль/л, 0,25 нмоль/л и 0,15 нмоль/л соответственно. Пределы количественного определения для алифатических диаминов гексаметилендиамина, изофорондиамина и 4,4-диаминодициклогексилметана составил 5 нмоль/л.

Образцы стабилизировали, доведя $\text{pH} \leq 4$ с помощью серной кислоты–вода (1 + 4). Концентрированную серную кислоту в объеме 100 мкл и внутренние стандарты (900 пг 2,4-d₃- и 2,6-d₃- толуилендиамина и 4200 пг 4,4-d₂- метилendiанилина, и d₁₂-гексаметилендиамина в 30 мкл 1 М серной кислоты) добавляли к 1 см³ порции каждого образца мочи, после их выдерживали при 100 °С в течении 16 часов для гидролиза конъюгатов аминов. Далее добавляли хлорид натрия 0,5 г и 4 см³ насыщенного раствора гидроксида натрия, освобожденные амины экстрагировали в толуол (3 × 2 см³). Отделяли органический слой и добавляли 20 мкл гептафтормасляного ангидрита для дериватизации аминов. Избыток ацилирующего реагента удаляли через 30 минут путем экстракции фосфатным буферным раствором (4 см³ 1 М, $\text{pH} = 7,0$). Слой толуола был сохранен и высушен под слабым потоком азота, далее сухой остаток растворяли в 60 мкл этилацетата.

Калибровочные кривые были подготовлены путем добавления стандартов в 1 М серной кислоте в 1 см³ воды, содержащей 100 мкл концентрированной серной кислоты, и последующей обработки этих калибровочных стандартов в соответствии со схемой обработки образцов. Ответ был линейным до 250 нмоль/л.

Анализы проводились на МС Hewlett-Packard 5989А подключенном к газовому хроматографу Hewlett-Packard HP 5890 II. Использовалась капиллярная колонка из плавленого кварца Hewlett-Packard (HP-5 длиной 25 м, внутренним диаметром 0,32 мм и толщиной неподвижной фазы 0,17 мкм) с гелием в качестве газа-носителя при линейной скорости газа 50 см/с при 100 °С. Производные гептафтормасляного ангидрита анализировались путем работы МС в режиме отрицательной химической ионизации с метаном в качестве газа-реагента. Энергия электронов составляла 230 эВ, а температуры линии переноса, источника ионов и квадруполь составляли 260 °С, 150 °С и 100 °С соответственно. Газовый хроматограф работал в режиме ввода без деления (220 °С, 1 мкл, 30 секунд) со следующей программой температуры колонки: 50 °С в течение 1 минуты, увеличение на 10 °С/мин до 145 °С без выдержки, увеличение на 5 °С/мин до 165 °С без выдержки и дальнейшее увеличение на 25 °С/мин до 300 °С с выдержкой в течение 10 минут. Массовый фрагмент, соответствующий иону M^{-20} , для производного гексаметилендиамина соответствует 480,10, время задержки – 40 и время выхода 12,17 минут.

Еще одна методика определение гексаметилендиамина в моче после гидролиза с помощью газовой хроматографии с МС детектированием представлена авторами в статье [39]. Первый этап обработка пробы мочи заключалась в кислотном гидролизе концентрированной серной кислотой, которую добавляли к образцам в объеме 200 мкл и осуществляли добавку внутреннего образца 1,7-гептандиамина. Далее пробы тщательно

перемешивали и выдерживали при температуре 100 °С в течении 90 минут, затем их охлаждали и добавляли 2 см³ раствора гидроксида натрия (10 М). После гидролиза добавляли 4 см³ диэтилового эфира и образцы экстрагировали в течении 20 минут, затем центрифугировали. Около 3 см³ органического слоя переносили и выпаривали досуха под струей азота. Затем образцы ресупендировали в 500 мкл толуола и дериватизировали с 50 мкл гептафтормасляным ангидритом при 55 °С в течении 1 часа. Затем образцы охлаждали, выпаривали досуха и растворяли в 100 мкл толуола.

Образцы анализировали с помощью газовой хроматографией с МС-детектированием с химической ионизацией отрицательными ионами (метан в качестве газа-реагента). Введение образца в испаритель хроматографа проводился в режиме без деления объемом 1 мкл при 350 °С. Для разделения использовалась кварцевая капиллярная колонка ВР-5 длиной 25 м, внутренним диаметром 0,32 мм и толщиной неподвижной фазы 1,00 мкм. Температура термостата колонки повышали от 150 °С (первоначально поддерживалась в течении 1 минуты) до 280 °С со скоростью 10 °С/мин с выдержкой в течении 1,5 минуты. Температура переходной линии составляла 280 °С, а источник поддерживался при 200 °С. Анализ проводили с помощью выбранного ионного мониторинга: m/z 449 контролировался для гексаметилендиамина и m/z 462 для 1,7-гептандиамина. Предел обнаружения для гексаметилендиамина составил 5 нмоль/л.

В выше методиках описаны способы определения гексаметилендиамина с помощью газовой хроматографией и различных способов детектирования в виде амидов перфторуглеродных кислот и карбаматных эфиров. В качестве внутреннего стандарта использовался чаще всего меченный гексаметилендиамин. Далее будут описаны чувствительные и селективные методы определения с использованием высокоэффективной ЖХ.

Биологический мониторинг гексаметилен- и изофорондиизоцианата путем определения гексаметилен- и изофорондиамина в гидролизованной моче описан в работе [40]. Использовались ЖХ и МС с термораспылительной ионизацией. Для анализа применялся МС VG-Quattro с тройным квадрупольным насосом, подключенный к жидкостному хроматографу Pharmacia LKB HPLC Pump 2248. Выполнялась инъекция объемом 110 мкл. Температура источника ионов составляла 270 °С, а температура струи термораспылителя составляла 215 °С. Отражатель был установлен на 140 В. Масс-спектры и масс-хроматограммы были получены путем сканирования в диапазоне масс 200-650 с продолжительностью 1,0 секунда (стандартный центроид), а задержка между сканированиями составляла 0,02 секунды. Для количественного анализа контролировались положительные ионы при m/z = 426 и 480, соответствующие ионам (M+18)⁺ (M =

молекулярный ион) производных гексаметилендиамин-пентафторпропионового ангидрида и изофорондиамин-пентафторпропионового ангидрида соответственно. Также контролировались ионы $m/z = 430$ тетрадейтерий-меченого гексаметилендиамин-пентафторпропионового ангидрида (внутренний стандарт). Для измерений отрицательных ионов контролировались ионы $m/z = 407$ и 461 , соответствующие ионам $(M-1)^-$ производных гексаметилендиамин- и изофорондиамин-пентафторпропионового ангидрида, соответственно, и ионов $m/z = 411$ тетрадейтерий-меченого гексаметилендиамина. Время пребывания ионов составляло 0,2 секунды, а задержка между сканированиями составляла 0,02 секунды. Давление в источнике ионов поддерживалось приблизительно на уровне $2,5 \times 10^{-2}$ Па (давление считывания источника, а не фактическое давление в ионизационной камере).

Колонка для ЖХ являлась Millipore Waters Nova Pak C_{18} 3,9 мм $\times$ 150 мм с частицами 5 мкм. Подвижная фаза представляла собой 0,1 моль/л ацетата аммония в ацетонитриле-метаноле-воде (5,5 + 2 + 2,5) при скорости потока 1 см³/мин с давлением на входе в хроматограф 12 МПа.

Подготовка образцов мочи проходила в несколько этапов. Первым являлся щелочной гидролиз для выделения аминов из соответствующих изоцианатов при добавлении к 1 см³ пробы 1,5 см³ 5 М гидроксида натрия и 50 мкл внутреннего стандарта концентрацией 1 мкг/см³ в 1 М соляной кислоте. Далее смесь нагревали при 100 °С в течении 4 часов. Следующим этапом необходимо было перенести полученные амины в органическую фазу, для этого добавляли 4 см³ насыщенного раствора гидроксида натрия и 3 см³ толуола, встряхивали в течении 10 минут и центрифугировали при 1500g в течении 10 минут. Слой толуола отделяли и переносили в пробирку объемом 10 см³ и добавляли 20 мкл реагента. Раствор встряхивали в течении 10 минут. Избыток реагента и образовавшуюся кислоту экстрагировали в 2 см³ водным фосфатным буферным раствором (рН = 7,5, 1 М) при встряхивании в течении 30 секунд. Слой толуола отделяли. Перед определением методом ЖХ органическую фазу выпаривали досуха при 40 °С. Остаток растворяли в 100 мкл подвижной фазы, которую переносили в пробирку автосамплера объемом 0,3 см³.

В работе были изучены различные дериватизирующие реагенты такие как трифторуксусный ангидрид, пентафторпропионовый ангидрид и гептафтормасляный ангидрид. Все производные показали превосходное хроматографическое поведение. Хроматограммы, показывающие стандарты в толуоле трех производных гексаметилендиамина и изофорондиамина, показаны на рисунке 19.

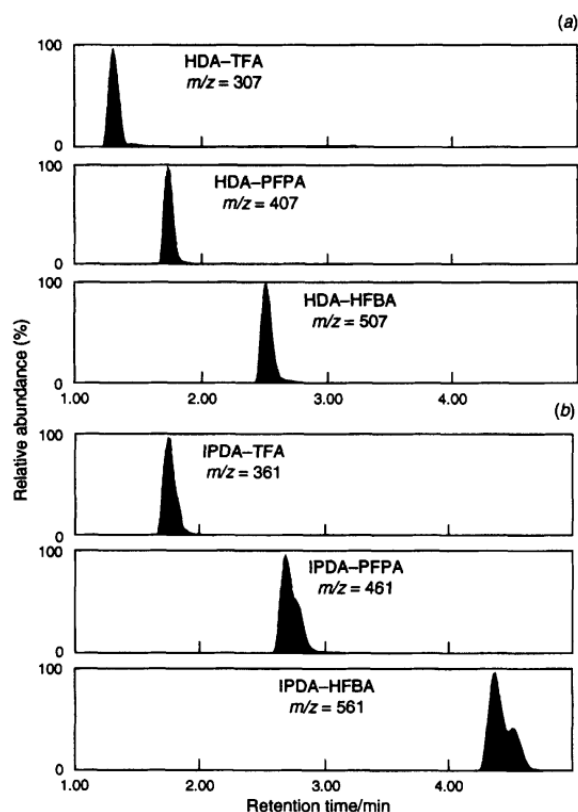
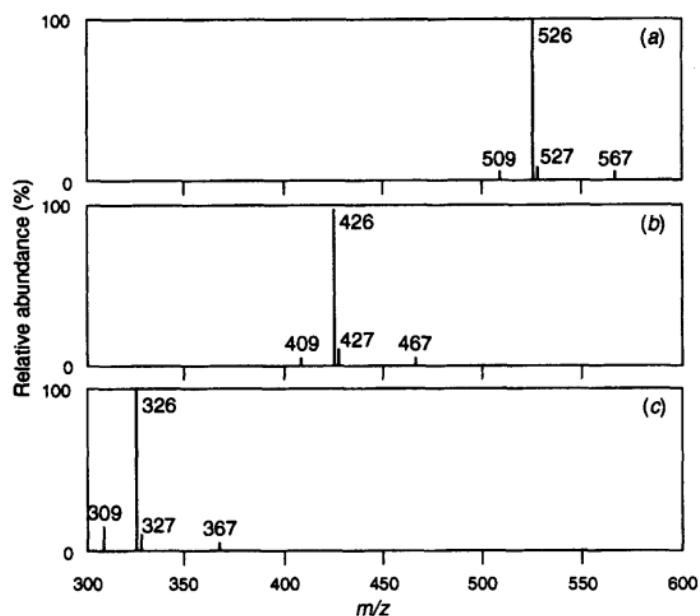


Рисунок 19 – Масс-хроматограммы производных трифторуксусной, пентафторпропионовой и гептафтормасляной амидов с (а) гексаметилендиаминном и (б) изофорондиаминном

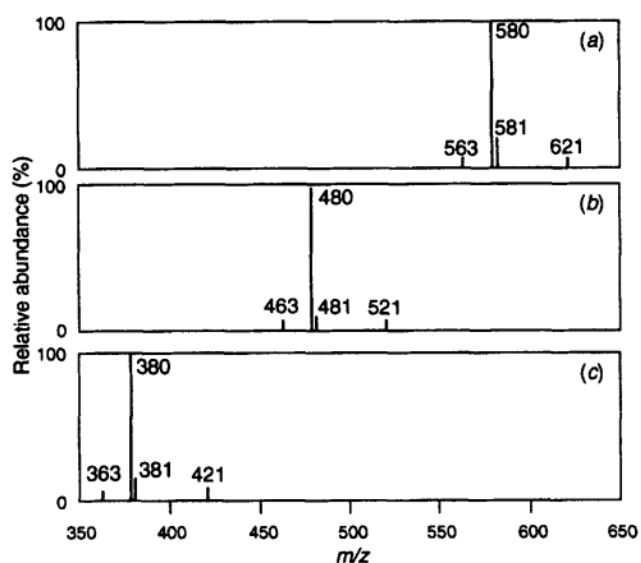
Для запусков термораспылительной ионизации в подвижной фазе должна присутствовать летучая соль, и производитель используемого прибора (VG-Biotech) рекомендовал использовать 0,1 М ацетата аммония. При сравнении подвижных фаз, состоящих из метанол-вода (7,5 + 2,5) с ацетонитрилом-вода (7,5 + 2,5), немного лучшая чувствительность к положительным ионам была достигнута с первой подвижной фазой. При мониторинге отрицательных ионов ацетонитрил-вода показала несколько лучшую чувствительность. Подвижная фаза, содержащая как ацетонитрил, так и метанол, показала хорошую чувствительность как к положительным, так и к отрицательным ионам.

На рисунках 20 и 21 представлены спектры положительных ионов. Видно очень мало фрагментации. Фрагменты $m/z = (M + 18)^+$ и $(M + NH_4^+)$ являются наиболее распространенными для всех шести изученных производных диамина. Полученные масс-спектры весьма похожи на спектры, полученные с помощью газовой хроматографии с МС детектированием, с использованием химической ионизации аммиаком с мониторингом положительных ионов.



а – производное гептафтормасляного амида, б – производное пентафторпропионового амида, с – производное трифторуксусного амида

Рисунок 20 – Масс-спектры производных гексаметилендиамина с мониторингом положительных ионов:

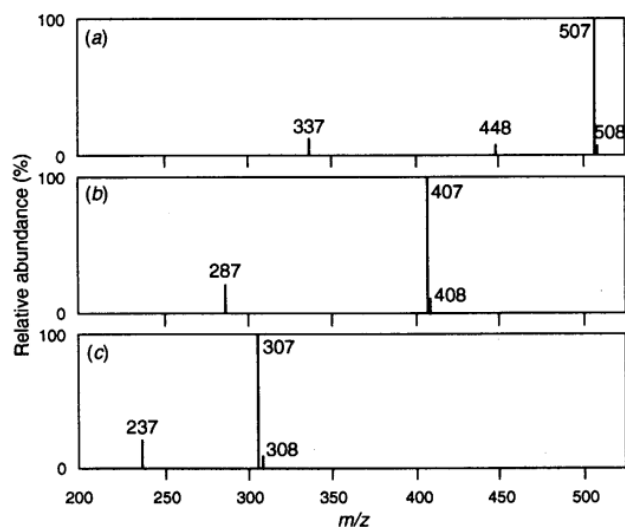


а – производное гептафтормасляного амида, б – производное пентафторпропионового амида, с – производное трифторуксусного амида

Рисунок 21 – Масс-спектры производных изофорондиамин с мониторингом положительных ионов

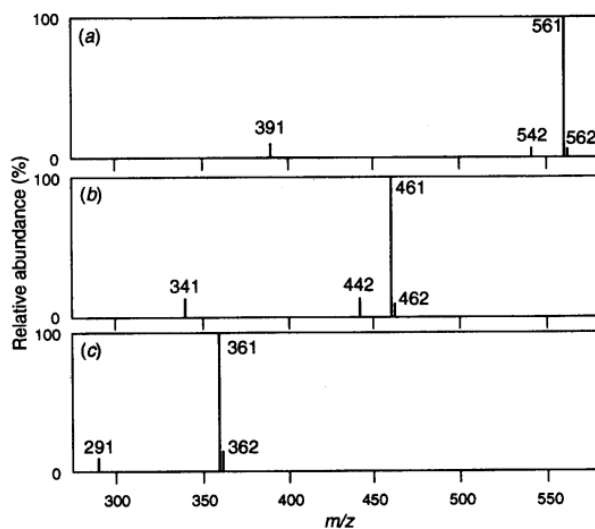
Масс-спектры мониторинга отрицательных ионов показаны на рисунке 22 и 23. Наиболее распространенным фрагментом для всех изученных соединений являются ионы $m/z = (M-1)^-$. Сравнивая эти масс-спектры со спектрами, полученными с помощью газовой хроматографии с МС детектированием с использованием отрицательной химической

ионизации (реагент аммиак) с мониторингом отрицательных ионов наблюдались различные закономерности.



а – производное гептафтормасляного амида, б – производное пентафторпропионового амида, с – производное трифторуксусного амида

Рисунок 22 – Масс-спектры производных гексаметилендиамина с мониторингом отрицательных ионов

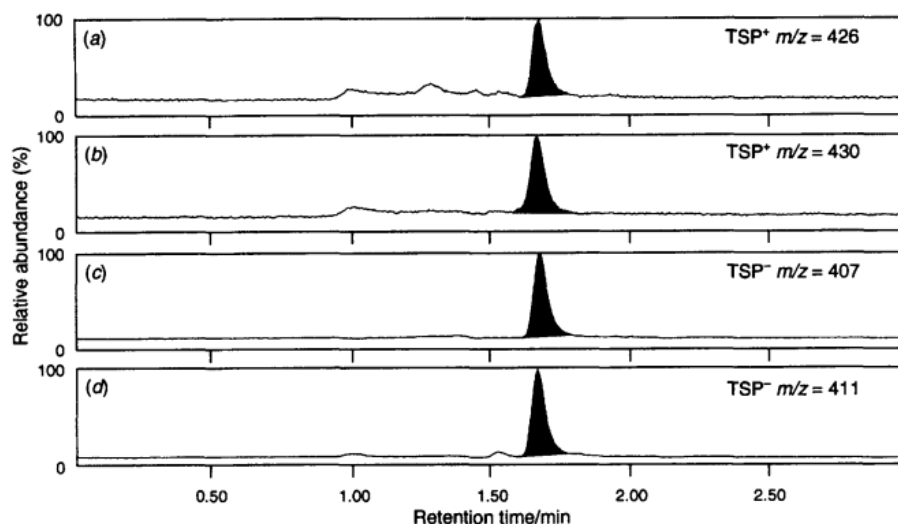


а – производное гептафтормасляного амида, б – производное пентафторпропионового амида, с – производное трифторуксусного амида

Рисунок 23 – Масс-спектры производных изофорондиамин с мониторингом отрицательных ионов

Градуировочный график строился по шести различным концентрациям в диапазоне от 2,5 до 20 мкг/л. для этого использовались образцы мочи обогащенные гексаметиленамином и изофорондиамином. Была получена линейная зависимость с коэффициентом корреляции для гексаметилендиамина 0,998 и для изофорондиамин 0,973.

Предел обнаружения, определенный как удвоенное отношение сигнал/шум (мониторинг $m/z = (M-1)^-$ фрагментов производных гексаметилендиамин- и изофорондиамин-пентафторпропионовый ангидрид] находился в диапазоне 0,5-1 пг. Хроматограммы образца мочи от работника, подвергшегося воздействию гексаметиленизоцианату, представлена на рисунке 24. Концентрация гексаметилендиамина в моче меняется со временем и воздействием.



a и b – мониторинг положительных ионов $(M+18)^+$ $m/z = 426$ и 430 для гексаметилендиамин-пентафторпропионного ангидрида и тетрадейтерий-меченого гексаметилендиамин-пентафторпропионного ангидрида (внутренний стандарт), c и d – мониторинг отрицательных ионов $(M-)^-$ $m/z = 407$ и 411 для гексаметилендиамин-пентафторпропионного ангидрида и тетрадейтерий-меченого гексаметилендиамин-пентафторпропионного ангидрида (внутренний стандарт)

Рисунок 24 – Хроматограммы гидролизованной мочи добровольца, подвергшегося воздействию воздуха с концентрацией гексаметилендиамина 25 мкг/м^3 в течении 2 часов

Показано, что использование тетрадейтерированного гексаметилендиамина в качестве внутреннего стандарта дает точные определения гексаметилендиамина. В этом исследовании данный внутренний стандарт также использовался для изофорондиамина, что привело к трехкратной потере точности. Это указывает на необходимость лучшего внутреннего стандарта. Таким внутренним стандартом, конечно, был бы изофорондиамин, меченый дейтерием.

Было представлено несколько методов определения алифатических диаминов, в том числе гексаметилендиамина, в биологическом материале после воздействия изоцианатов. Применялась газовая хроматография с селективным детектированием азота или с селективным ионным мониторингом производных перфторуглеродной кислотой, карбаматных эфиров этилхлорформиата и триэтилхлорформиата, а также были

продемонстрированы методы ЖХ с МС с использованием термораспыления и селективным ионным мониторингом. Данные методы были рассмотрены в статье [41] анализирующая воздействие 1,6-гексаметилендиизоцианата и изофлорондиизоцианата на человека в испытательной камере, с последующим определением гексаметилендиамина в образцах мочи и крови, гидролизованного в щелочных условия.

Образцы воздуха отбирались внутри камеры экспозиции с помощью двух колб импинжера содержащие 10 см³ раствора 9-(N-метиламино-метил)-антрацена гидрохлорида концентрацией 1×10^{-4} моль/л в толуоле при потоке воздуха 1 л/минуту в течение 30 минут. Для определения гексаметилендиамина использовался метод ЖХ с фотометрическим детектированием в ультрафиолетовой области.

Образцы биологического материала были гидролизованы для высвобождения диамина и после использовали два различных метода обработки. Первый (метод А) был основан на двухфазной процедуре дериватизации с использованием трифторированного этилхлорформиата с образованием соответствующего эфира карбамата. Для первого метода используются в основном газовая хроматография с термоионным детектором или/и МС-детектором. Второй (метод В) был основан на процедуре дериватизации с использованием пентафторпропионового ангидрида с образованием соответствующего амида. В основном для данного способа обработки используется ЖХ с МС детектированием.

Метод А с щелочным гидролизом: к образцу мочи объемом 1 см³ добавляли 1,5 см³ 5 М гидроксида натрия или 10 М гидроксид натрия. Затем смесь гидролизовали при температуре 100 °С. К образцу добавляли 1 см³ воды, 10 мкл трибутиламина и 2 см³ толуола. Смесь встряхивали в течение 30 секунд перед добавлением 40 мкл 2,2,2-трифторэтилхлорформиат. Затем смесь встряхивали в течение 20 минут. Фазу толуола отделяли и встряхивали в течение 30 секунд с 2 см³ 1 М водным фосфатным буфером (pH = 7,5), а затем выпаривали досуха.

Для определения газовой хроматографией с термоионным детектором сухой остаток растворяли в 1 см³ раствора толуола, содержащего около 1 нг/мкл производного изобутилхлорформиата ди-н-бутиламина в качестве внутреннего стандарта.

Для определения газовой хроматографией с МС детектированием 50 мкл 6 М соляной кислоты, содержащего тетрадейтерий-меченый гексаметилендиамин (200 нг/см³), добавляли перед гидролизом. Сухой остаток растворяли в 100 мкл толуола.

Метод А с кислотным гидролизом: к образцу мочи объемом 1 см³ добавляли 1,5 см³ 6 М соляной кислоты или 3 М серной кислоты. После стадии гидролиза добавляли 3 см³ 5 М гидроксида натрия. Затем процедура была такой же, как для щелочных условий гидролиза.

Метод В с щелочным гидролизом: к образцу мочи объемом 1 см³ добавляли 1,5 см³ 5 М гидроксида натрия. После этого добавляли 50 мкл 1 М соляной кислоты, содержащего 1 мкг/мл тетрадейтерий-меченый гексаметилендиамин. Смесь нагревали при 100 °С в течение 4 ч (гидролиз). Затем добавляли 4 см³ насыщенного гидроксида натрия и 3 см³ толуола. Смесь встряхивали в течение примерно 10 минут, а затем центрифугировали при 1500g в течение 10 минут. Слой толуола отделяли и переносили в пробирку объемом 10 см³, добавляли 20 мкл пентафторпропионового ангидрида. Раствор встряхивали в течение 10 минут. Избыток реагента и образовавшуюся кислоту экстрагировали в течение 30 секунд 2 см³ 1 М водного фосфатного буфера (pH = 7,5). Фазу толуола выпаривали досуха. Сухой остаток растворяли в 100 мкл подвижной фазы.

Было выявлено, что значительные потери гексаметилендиамина наблюдались в пробах обработанных по кислотному гидролизу. Потери увеличивались со временем. Применение щелочного гидролиза 6 М гидроксидом натрия показало примерно такую же картину. Меньшие потери наблюдались при гидролизе с использованием 3 М гидроксида натрия.

Для ЖХ с МС детектированием использовался квадрупольный МС VG-Quattro в режиме термораспыления, который был подключен к жидкостному хроматографу Pharmacia LKB HPLC Pump 2248. Количественные измерения проводились путем мониторинга отрицательных ионов $m/z = (M-1)^-$. При определении гексаметилендиамина отслеживаемыми ионами были ионы $m/z = 407$ и $m/z = 411$ производных гексаметилендиамин-пентафторпропионового ангидрида и тетрадейтерий-меченого гексаметилендиамин-пентафторпропионового ангидрида, соответственно. Колонкой являлась Millipore Waters Nova Pak Cs 3,9×150 мм с 5 мкм частицами. Подвижная фаза состояла из 0,1 М ацетата аммония в 55 % ацетонитриле, 20 % метанола и 25 % воды.

Для определений газовой хроматографией с МС детектированием, МС был подключен к газовому хроматографу Carlo Erba GC 8000, оснащенный холодным инжектором Grob-type. Прибор использовался в режиме химической ионизации с использованием аммиака в качестве газа-реагента, контролирующего положительные ионы. Измерялись ионы $m/z = 386$ и $m/z = 390$, соответствующие ионам $(M+18)^+$ карбаматных эфиров.

Для определения изоцианатов в воздухе использовали ЖХ с фотометрическим детектированием в ультрафиолетовой области (254 нм). Колонка представляла собой Nukleosil C₁₈ 5×200 мм с частицами 5 мкм. Подвижная фаза состояла из 70 % ацетонитрила и 30 % воды с 3 % триэтиламина. pH воды доводили до 3,0 фосфорной кислотой. Для разделения фаз использовали центрифугу Sigma 3 E-1. Образцы выпаривали при 400 °С в

центрифуге Speed-Vac 290 (Savant, Фармингдейл, Нью-Йорк, США). Отбор проб воздуха проводили с помощью персонального пробоотборника воздуха Gil Air (Gilian Instr Corp, США) и миниатюрных импинжерных колб объемом 30 см³, содержащих 10 см³ поглощающего раствора.

Биологические образцы анализировались с помощью метода В (ЖХ-МС). Линейные калибровочные графики проходили через начало координат, а коэффициенты корреляции составляли 0,998 (гексаметилендиамин) и 0,991 (изофорондиамин). Предел обнаружения, определенный как двойное отношение сигнал/шум, составил около 0,1 мкг/дм³ в моче. Образцы плазмы анализировали с помощью модифицированного метода В с использованием ГХ-МС вместо ЖХ-МС. Сухой остаток растворяли в 50 мкг/дм³ толуола перед инъекцией, что давало коэффициент обогащения 2. Предел обнаружения составил < 0,1 мкг/дм³.

Также метод газовой хроматографии с использованием дериватизирующего реагента, 2,2,2-трифторэтилхлорформиата для первичных и вторичных аминов с образованием карбаматных эфиров представлен в работе [42]. Метод применяется для определения гексаметилендиамина в водных растворах и моче человека с использованием капиллярной газовой хроматографии. Детектирование проводилось с использованием термоионного специфического детектирования и МС с селективным ионным мониторингом с использованием электронного удара и химической ионизации с аммиаком в качестве газа-реагента, контролирующим как положительные, так и отрицательные ионы. Количественные измерения проводились в режиме химической ионизации. В качестве внутреннего стандарта использовался тетрадейтерий-меченый гексаметилендиамин. В режиме мониторинга положительных ионов измеряли $m/z = 386$ и 390 соответствующие ионам $(M+18)^+$ (M = молекулярный ион) производных гексаметилендиамина. Для измерений отрицательных ионов контролировались ионы $m/z = 267$ и 271 , соответствующие ионам $(M-1)^-$ производных гексаметилендиамина. Минимальная определяемая концентрация в моче составила менее 20 мкг/л с использованием газовой хроматографии с термоионным детектированием и 0,5 мкг/л с использованием газовой хроматографии с МС детектированием.

Использовался газовый хроматограф Varian 3500, оснащенный термоионным детектором. Начальная температура инжектора составляла 105 °С в течении 1,2 секунды, затем она была запрограммирована до конечной температуры 280 °С со скоростью на 150 °С/мин с выдержкой в течении 7 минут. Для разделения использовалась кварцевая капиллярная колонка DB-5 длиной 30 м, внутренним диаметром 0,25 мм и толщиной неподвижной фазы 0,25 мкм. Температура термостата колонки повышали от 105 °С (с

выдержкой в течении 1 минуты) до 280 °C со скоростью 25 °C/мин с выдержкой конечной температуре в течении 2 минут. Температура детектора составляла 280 °C, расход газа водорода 3 см³/мин, воздуха 175 см³/мин и азота – подпиточного газа 20 см³/мин.

Использовался МС с тройным квадруполом VG-Quattro, подключенный к газовому хроматографу Carlo Erba GC 8000. Начальная температура термостата колонки была изотермической при температуре 100 °C в течении 1 минуты, затем ее повышали до 300 °C со скоростью 25 °C/мин, где ее поддерживали в течении 2 минут. Температура источника ионов составляла 250 °C, а температура интерфейса переходной линии 250 °C. Давление гелия на входе в капилляр составляло 1,0 кг/м³. Задержка растворителя была установлена на 3 минуты. Прибор использовался в режиме электронного удара и химической ионизации с использованием аммиака в качестве газа-реагента, контролируя как положительные, так и отрицательные ионы. Использование неполярной неподвижной фазы с относительно малой толщиной пленки является предпочтительным из-за того, что гексаметилен-диуретан термически разлагается при повышенных температурах.

К образцу мочи объемом 1 см³ добавляли 1,5 см³ 5 М гидроксида натрия и 50 мкл 6 М соляной кислоты, содержащей тетрадейтерий-меченый гексаметилендиамин (10 нг/см³) (для метода газовой хроматографии с термоионным детектором добавляли 1,5 см³ 5 М гидроксида натрия). Смесь нагревали при 100 °C в течение 4 ч (гидролиз). Далее к образцу добавляли 1 см³ воды, 10 мкл трибутиламина и 2 см³ толуола. Смесь встряхивали в течение 30 секунд, а затем добавляли 40 мкл трифторированного этилхлорформиата. Затем смесь встряхивали в течение 20 минут при комнатной температуре. Фазу толуола отделяли и встряхивали в течение 30 секунд с 2 см³ 1 М водного фосфатного буфера (рН = 7,5), а затем выпаривали досуха в центрифуге при 40°C. В случае определения газовой хроматографией с МС детектором сухой остаток растворяли в 100 мкл толуола. Для определений газовой хроматографией с термоионным детектором сухой остаток растворяли в 1 см³ раствора толуола, содержащего около 1 нг/мкл производного изобутилхлорформиата ди-н-бутиламина, используемого в качестве внутреннего стандарта. Затем анализировали слой толуола. Та же процедура использовалась для водных образцов, где можно было исключить стадию гидролиза.

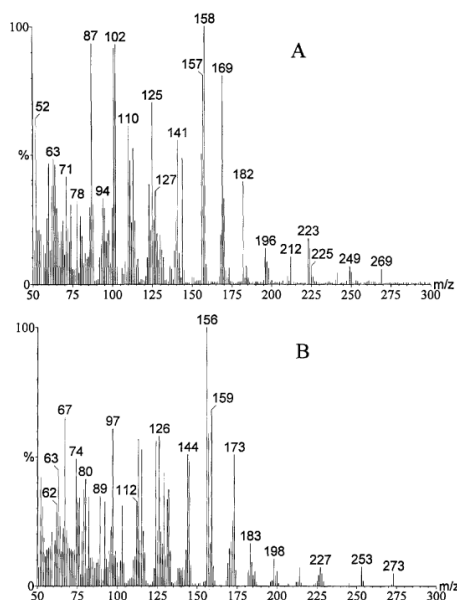
Выбор рН зависит от основности амина при дериватизация с использованием ангидридов и хлорформиатов. Для того чтобы реакция протекала с разумной скоростью при комнатной температуре, должны присутствовать непротонированные амины. Для двухфазной хлорформиатной дериватизации пиперазина (рK_a = 9,8) было обнаружено, что с фосфатным буферным раствором (рН = 10) и с аммиаком в качестве катализатора реакция

завершается менее чем за 5 мин. Для гексаметилендиамина ($pK_a = 11,9$) эта процедура дала неудовлетворительные результаты. Реакция является количественной только при $pH > 12$.

Аммиак, пиридин и трибутиламин были испытаны в качестве катализаторов для дериватизации гексаметилендиамина с 2,2,2-трифторэтилхлорформиатом. Только трибутиламин дал восстановление более 80%. Добавленное количество катализатора варьировалось от 0 до 40 мкл. Влияние добавленного количества было небольшим, но был выбран объем 10 мкл из-за относительно лучшего восстановления реакции и достигнутой точности.

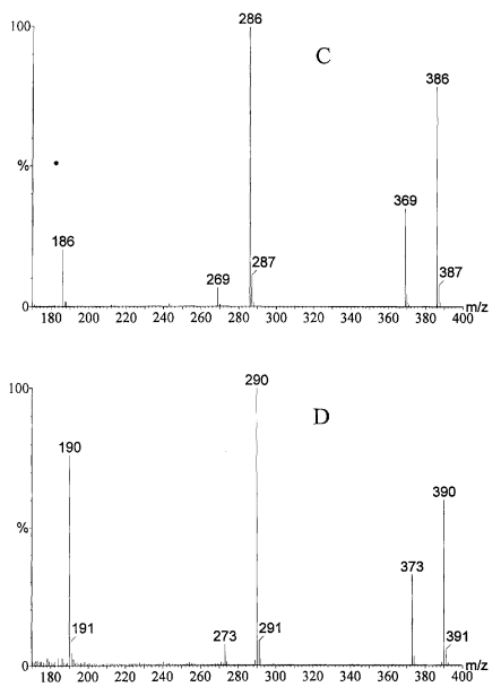
Объем 2,2,2-трифторэтилхлорформиата варьировался, и оптимальный объем для базовой процедуры обработки, соответствующий приблизительно 100% восстановлению, оказался 40 мкл. Более низкое восстановление, обнаруженное при увеличении количества реагента, вероятно, связано с увеличением растворимости производного в водной фазе.

Как видно на рисунках 25–27, электронный удар производит много фрагментов при более низких значениях m/z . Для алифатического производного гексаметилендиамина не было обнаружено молекулярных ионов. Сравнивая спектры двух соединений, можно увидеть значительные различия из-за атомов дейтерия в молекуле. Мониторинг химического ионизации положительных ионов показывает довольно простые и легко интерпретируемые спектры, и наблюдается небольшая фрагментация. Фрагменты m/z $[M+18]^+$, $[M+]^+$, $[M- 82]^+$, $[M-99]^+$ и $[M-182]^+$ являются наиболее распространенными ионами.



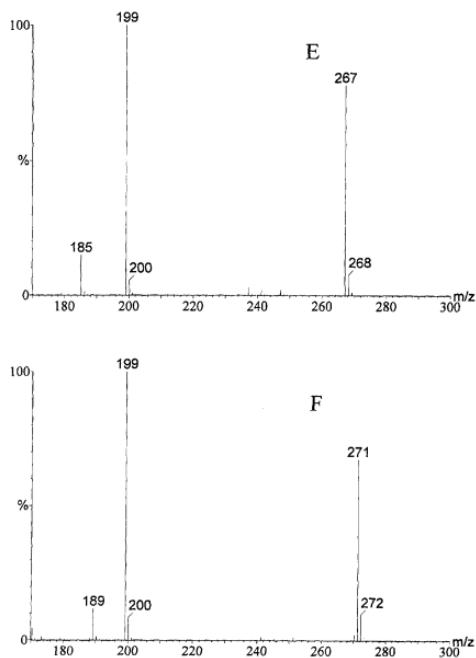
А – гексаметилендиамин, В – тетрадейтерий меченый гексаметилендиамин

Рисунок 25 – Масс-спектры гексаметилендиамина и меченого тетрадейтерием гексаметилендиамина в качестве производных трифторэтилхлорформиата полученные с помощью электронного удара с аммиаком, контролирующим положительные и отрицательные ионы



C – гексаметилендиамин, D – тетрадейтерий меченый гексаметилендиамин

Рисунок 26 – Масс-спектры гексаметилендиамина и меченого тетрадейтерием гексаметилендиамина в качестве производных трифторэтилхлорформиата полученные с помощью химической ионизации с аммиаком, контролирующим положительные ионы



E – гексаметилендиамин, F – тетрадейтерий меченый гексаметилендиамин

Рисунок 27 – Масс-спектры гексаметилендиамина и меченого тетрадейтерием гексаметилендиамина в качестве производных трифторэтилхлорформиата полученные с помощью химической ионизации с аммиаком, контролирующим отрицательные ионы

Калибровочный график с использованием термоионного детектора был линейен в диапазоне концентраций от 100 до 400 мкг/л, с коэффициентом корреляции 0,9982 для серии из 6 концентраций ($y = 0,926x + 0,013$).

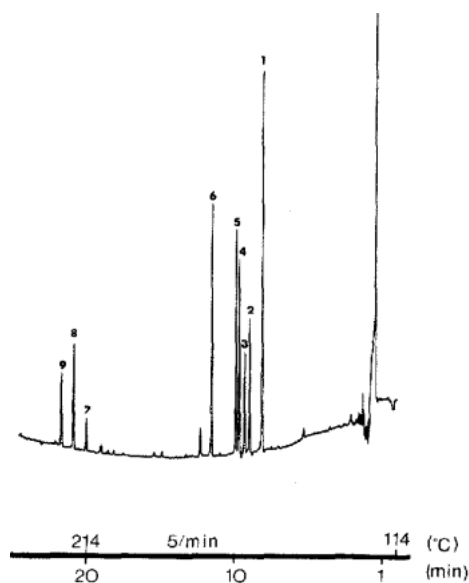
Калибровочный график с использованием МС детектора был линейен в диапазоне от 1 до 10 мкг/л, с коэффициентом корреляции 0,988 ($y = 0,0034x + 0,0027$) в режиме мониторинга отрицательных ионов для $m/z = 267, 271$ и 0,992 ($y = 0,0031x + 0,0017$) в режиме мониторинга положительных ионов для $m/z = 386, 390$.

Представлен метод анализа следов алифатических и алициклических аминов [37]. Он включает дериватизацию аминов в соответствующие амиды путем реакции с ангидридом перфторуглеродной кислоты. Амины разделяли с помощью стеклянной капиллярной газовой хроматографии и количественно определяли с помощью инъекции в колонку с применением детектора электронного захвата или азотселективного. Пределы обнаружения находились в диапазоне 2-30 фмоль с электронным захватом и в диапазоне 40-60 фмоль с азотселективным обнаружением.

Использовался газовый хроматограф Varian 3700, оснащенный термоионным детектором. Температура детектора составляла 290 °С, расход газа водорода 4 см³/мин, воздуха 180 см³/мин и азота – подпиточного газа 20 см³/мин. Для детектора электронного захвата температура детектора составляла 300 °С. Газом-носителем использовался гелий с входным давлением 0,3 кг/см².

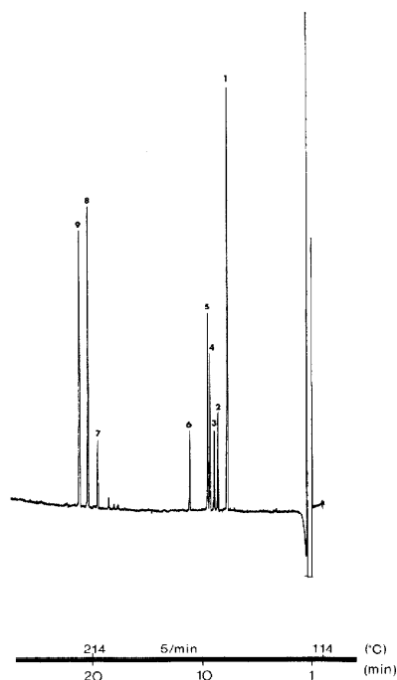
Стандартные растворы амидов готовили путем растворения точно взвешенных количеств аминов в 100 мл 10 % соляной кислоты. К 1 см³ аликвоты этого раствора добавляли 2 см³ насыщенного раствора гидроксида натрия, а затем свободный амин экстрагировали толуолом. К 1 см³ толуольного раствора, содержащего примерно 20 мкг амина, добавляли 60 мкл ангидрид гептафтормасляной кислоты, и через 10 минут при комнатной температуре избыток ангидрида и образовавшуюся кислоту удаляли встряхиванием с 1 см³ фосфатного буферного раствора (pH = 7,0). Затем из этого раствора готовили стандартные растворы амида нужного состава путем разбавления толуолом.

Результаты разделения методом газовой хроматографии производных аминов представлены на рисунке 28 и 29.



Идентификация пиков: 1 – гексаметилендиамин, 2,4 – тетрадейтрированный меченный гексаметилендиамин

Рисунок 28 – Хроматограммы производных аминов с применением детектора электронного захват



Идентификация пиков: 1 – гексаметилендиамин, 2,4 – тетрадейтрированный меченный гексаметилендиамин

Рисунок 29 – Хроматограммы производных аминов с применением термоионного детектора

С использованием ионизации электронным ударом для производного гексаметилендиамина с гептафтормасляным ангидридом получили ионы CF_3^+ , C_2F_5^+ и C_3F_7^+

с m/e 69, 119 и 169, соответственно. Среди ионов $(M-X)^+$ обнаружены ионы с $X = C_3F_7$ (m/e 339), C_3F_7CO (m/e 311), C_3F_7CONH (m/e 296) и $2C_3F_7CO$ (m/e 114) (рисунок 30).

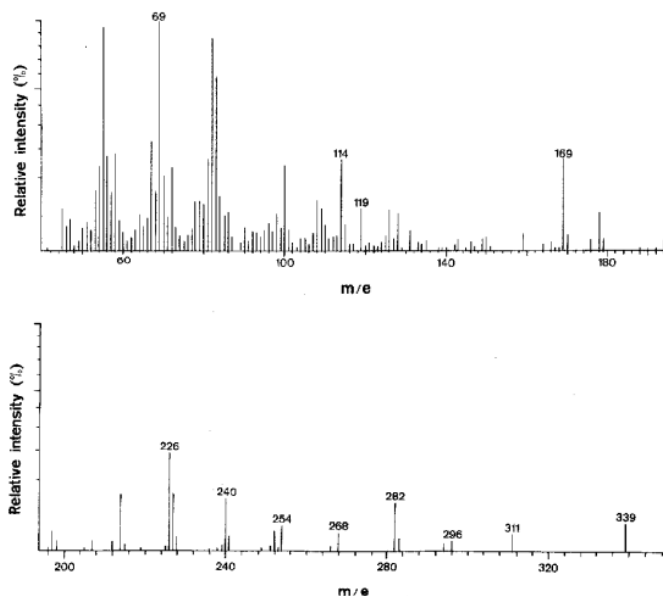


Рисунок 30 – Масс-спектр производного гексаметилендиамина, полученный с помощью ионизацией электронным ударом

Ионы с m/e 282, 296 и 339 также появляются в масс-спектре с применением химической ионизации (Рисунок 31).

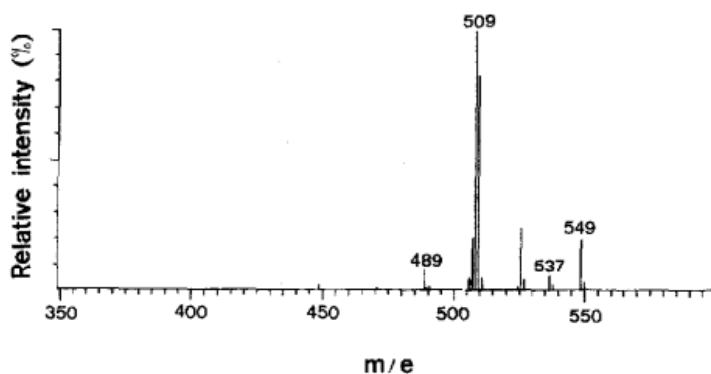


Рисунок 31 – Масс-спектры производного гексаметилендиамина, полученные с помощью химической ионизации

Авторами [44] представлено исследование для изучения и одновременного определения трех диаминов гексаметилендиамин, 4,4-метилендиамин и изофорондиамин в образцах мочи с применением tandemной МС и ЖХ для биомониторинга воздействия изоцианатов. Предел обнаружения для гексаметилендиамин, 4,4-метилендиамин и изофорондиамин составил 0,074, 0,059 и 0,053 нг/см³.

Для обработки образцов мочи берут 250 мкл пробы и добавляют 100 мкл 6 М соляной кислоты и 650 мкл воды, хорошо встряхивают. Образцы нагревали при

температуре 80 °С на 4 часа. Затем образцы охлаждали до комнатной температуры. Регулировали pH с помощью 500 мкл 1 М гидроксида натрия перед выполнением твердофазной микроэкстракции (ТФЭ). Активировали колонку ТФЭ с помощью 1 см³ метиловым спиртом и 1 см³ воды. Загружали колонку 1,5 см³ образца и промывали о примесей 1 см³ вода и метилового спирта. Элюировали аналиты раствором гидроксида аммония с концентрацией 5% и 10%, смешанным с метиловым спиртом. Затем образец концентрировали досуха газообразным N₂ при 60°C. Остаток растворяли в 1 см³ водного раствора: MeOH (95:5; по объему), содержащего 0,1 % ангидрида гептафтормасляной кислоты, и затем анализировали ЖХ с тандемная МС.

Просмотр материнских и дочерних ионов проводится в автоматическом режиме обзора с бомбардировкой родительского молекулярного иона в дочерние ионы. Для каждого вещества были выбраны два дочерних иона, дочерний ион с большей интенсивностью использовался для количественного определения, а ион с меньшей интенсивностью использовался для подтверждения, результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Условия тандемной МС для анализа гексаметилендиамина, 4,4-метилендиамина и изофорондиамин

Аналит	Молекулярная масса	Энергия бомбардировки (Е)	Энергия бомбардировки фрагментов (V)	Родительский ион (M+1) (m/z)	Дочерний ион (m/z)
гексаметилендиамин	116,1	9	81	117,1	100,1*
		17	81		55,0
4,4-метилендиамин	198,2	25	128	199,2	106,0*
		25	128		182,1
изофорондиамина	170,1	10	102	171,1	154,4*
		22	102		95,4
* ионы для количественного определения					

В ЖХ-МС подвижная фаза влияет не только на разделение веществ, но и на процесс ионизации и сигнал аналита. При методе ионизации электрораспылением в режиме положительных ионов процесс ионизации усиливается при добавлении ионоспаривающих веществ, таких как гептафтормасляная кислота (ГФМК), трифторуксусная кислота (ТФК), пентафторпропионовый ангидрид (ПФПА), муравьиная кислота. Поэтому эти вещества добавляли к раствору подвижной фазы одно за другим для исследования эффективности разделения со смешанным стандартным раствором гексаметилендиамина, 4,4-метилендиамина и изофорондиамин концентрацией 25 нг/мл.

Компоненты подвижной фазы, использованные в исследовании: канал В – ацетонитрил и метиловый спирт соответственно; канал А представляет собой соответственно 0,1% ГФМК, 0,1% ТФК, 0,1% муравьиной кислоты в воде. Результаты показаны на рисунке 31.

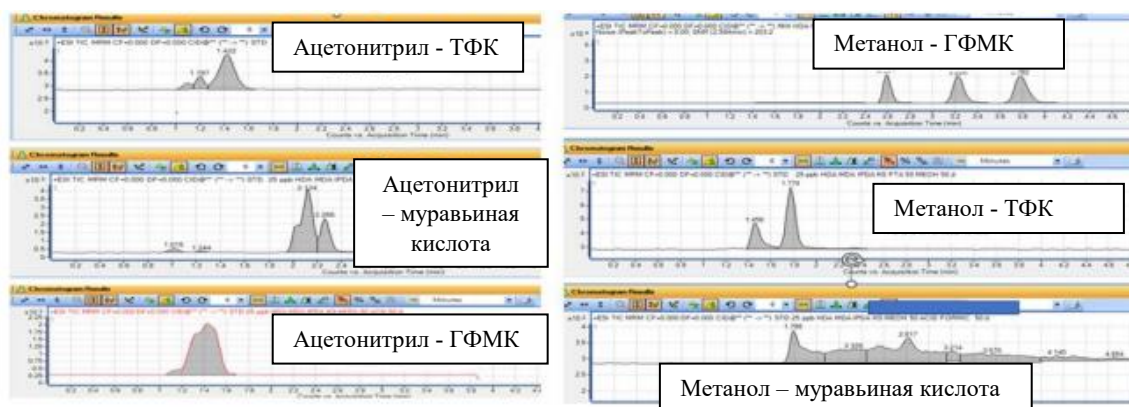
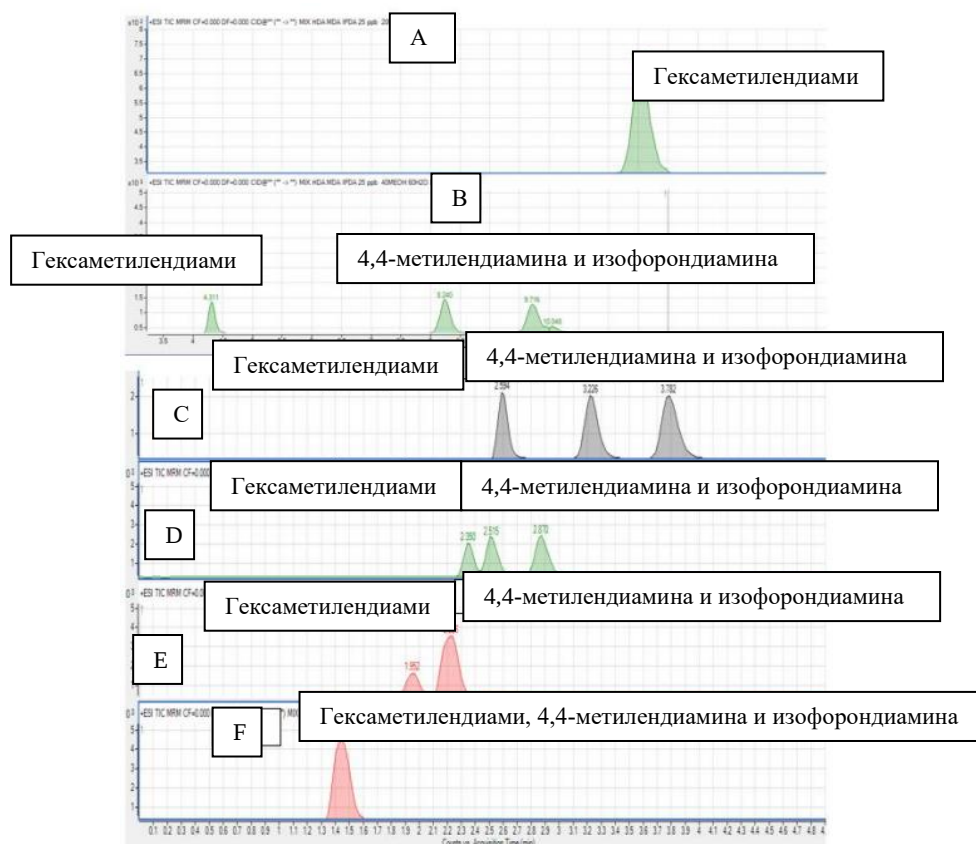


Рисунок 31 – Результаты исследования состава подвижной фазы

Для дальнейших исследований была выбрана подвижная фаза метилового спирта с добавлением 0,1% ГФМК в воде, обеспечивающая короткое время удерживания и максимальную площадь пика, что повышало чувствительность метода.

После выбора подходящего состава подвижной фазы исследования о влияние полярности путем регулирования соотношения состава подвижной фазы метилового спирта с добавлением 0,1% ГФМК в воде представлены на рисунке 32. Эксперимент А – 20-80 %; В – 40-60%; С – 50-50%; D – 55-45%; E – 60-40%, F – 80-20%.



А – 20-80 %; В – 40-60%; С – 50-50%; D – 55-45%; E – 60-40%, F – 80-20%

Рисунок 32 – Хроматограммы результатов исследования влияние соотношения растворителей на анализ аналитов

Результаты исследования на рисунке 32 показывают, что при анализе в изократическом режиме при соотношении метилового спирта с добавлением 0,1% ГФМК в воде (50:50 – С) получаются большие сигналы аналита с хорошим разрешением при коротком времени удерживания. Поэтому именно это соотношение растворителей было выбрано для последующих экспериментов.

Растворы, использованные для построения стандартной кривой, получали разбавлением исходных стандартных растворов. Каждую точку анализируют повторно 3 раза, полученная средняя площадь пика служила данными для построения стандартной кривой зависимости площади пика от концентрации. Строили 7-точечную стандартную кривую для определения гексаметилендиамина, 4,4-метилендиамина и изофторондиамина в диапазоне концентраций от 0,50 до 100,0 нг/см³. Результаты показаны в таблице 3.

Таблица 3 – Результаты построения калибровочного графика для гексаметилендиамина, 4,4-метилендиамина и изофторондиамина с помощью тандемной МС и ЖХ

Аналиты	Уравнение регрессии $y = a + bx$	Коэффициент корреляции R^2	Диапазон концентраций, нг/см ³
гексаметилендиамин	$y = 60,8 + 367,9x$	0,9998	0,50-100,0
4,4-метилендиамин	$y = -69,0 + 914,7x$	0,9999	
изофторондиамина	$y = 105,7 + 704,9x$	0,9999	

На основе установленной стандартной кривой предел обнаружения (ПО) и предел количественного определения (ПКО) метода определяли путем повторения анализа 6 раз при концентрации добавления 0,5 нг/см³ на пустой матрице. Полученные результаты представлены в таблице 4.

Таблицы 4 – Предел обнаружения и предел количественного определения метода

Аналиты	ПО (нг/см ³)	ПКО (нг/см ³)
гексаметилендиамин	0,074	0,24
4,4-метилендиамин	0,059	0,19
изофторондиамина	0,053	0,18

Заслуживает рассмотрения также опыт по определению примеси гексаметилендиамина в полимерном биоцидном материале методом высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) [45].

Хорошо известно, что, отсутствие у гексаметилендиамина хромофорных групп затрудняет его выявление при помощи наиболее распространенных диодно-матричных и УФ-детекторов. Одним из решений данной проблемы, позволяющим проводить непосредственное обнаружение аминов в сложных смесях, является использование дериватизирующих агентов. Широкое распространение в качестве дериватизирующих агентов, используемых при проведении анализа аминокислот и аминов, получили 9-флуоренилметилхлорформиат (ФМОХ) [46] и о-фталевый альдегид [47]. Учеными в ходе

предварительных экспериментов, которые включали дериватизацию гексаметилендиамина указанными агентами, была установлена недостаточная стабильность комплекса гексаметилендиамин–о-фталевый альдегид в условиях проведения хроматографического анализа. Комплекс гексаметилендиамин–ФМОХ напротив оказался стабилен в течение 10–15 мин после приготовления и позволяет проводить количественное определение с использованием диодно-матричного детектора. В данном случае процесс дериватизации был довольно прост и заключался во внесении 0,1 см³ ФМОХ с концентрацией 1 мг/см³ к 1 см³ стандартного или анализируемого образца непосредственно перед анализом. Раствор дериватирующего агента был приготовлен в ацетонитриле.

Анализ содержания гексаметилендиамина в анализируемых пробах проводили путем хроматографического разделения на колонке OTU TriKala C18, размером 4,6 × 150 мм, заполненной сорбентом с размером частиц 5 мкм и УФ-детектированием. В качестве подвижной фазы А использовали очищенную воду, а в качестве подвижной фазы В – ацетонитрил для градиентной хроматографии. Элюировании образцов проводили при 30 °С в градиентном режиме, объем вводимой пробы составлял 50,0 мкл, время анализа – 25 мин. Программа градиента приведена в таблице 5.

Таблица 5 – Программа градиента

Время (мин)	% подвижной фазы А	% подвижной фазы В
0	40	60
1,0	40	60
10,0	90	10
16,0	90	10
17,0	40	60
25,0	40	60

На рисунке 33 представлены хроматограммы раствора для идентификации пиков ФМОХ–ОН, ФМОХ–Cl, ФМОХ–гексаметилендиамин и испытуемого раствора полигексагуанидина (ПГМГ) гидрохлорида. На хроматограмме раствора для идентификации присутствует четкий пик комплекса ФМОХ–гексаметилендиамин с временем удерживания 13,35–13,40 минут, который не перекрывается с другими пиками.

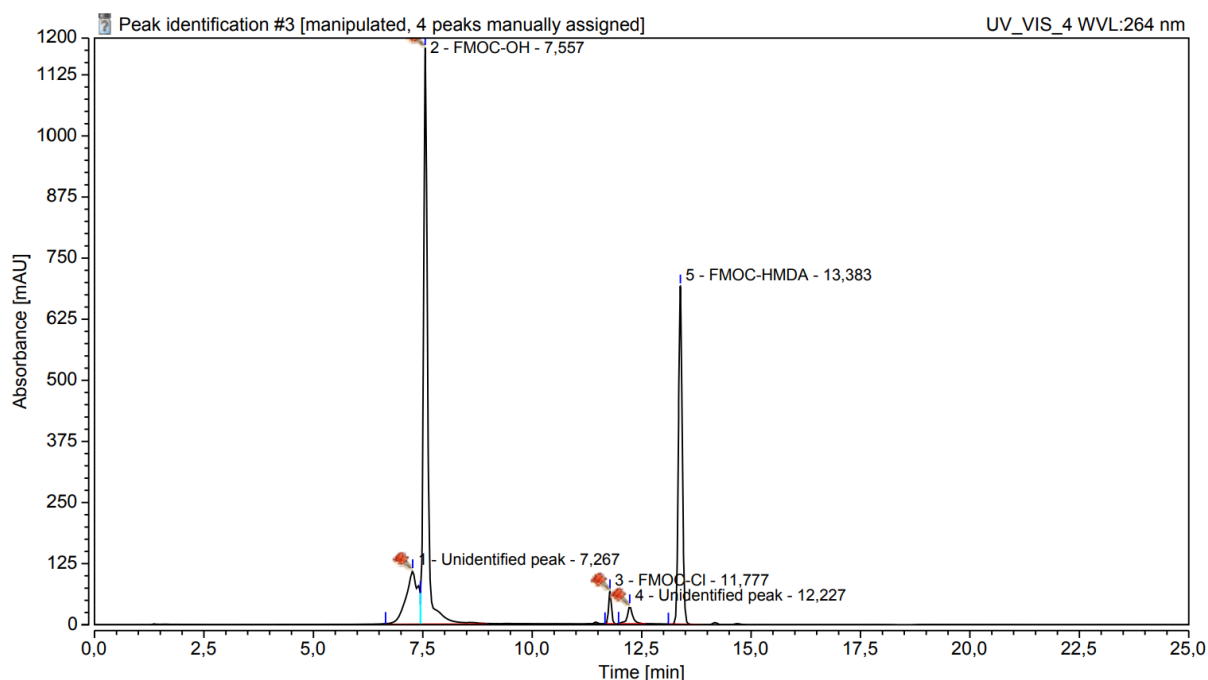


Рисунок 33 – Хроматограмма раствора для идентификации пиков ФМОХ–ОН, ФМОХ–Cl, ФМОХ–гексаметилендиамин

ПО и ПКО определяли на основании отношения сигнал/шум для пика ФМОХ–гексаметилендиамин. За ПО методики принимали концентрацию гексаметилендиамина при которой отношение сигнал/шум для пика ФМОХ–гексаметилендиамин было 3 : 1. За ПКО методики принимали концентрацию при которой отношение сигнал/шум для пика ФМОХ–гексаметилендиамин было 10 : 1. Исходя из результатов испытаний и аналитических данных установлено, что данная методика позволяет определять содержание гексаметилендиамина на уровне 0,02 мкг/см³.

Группа ученых по главе с Deepak Bhandari в своей работе описывает количественный высокопроизводительный аналитический метод для одновременного измерения малых алифатических азотистых биомаркеров, в том числе гексаметилендиамина, в моче человека. Присутствие данного алифатического диамина в моче является потенциальным биомаркером опасного, экологического воздействия соответствующего ему диизоцианата. Из-за высокополярных характеристик гексаметилендиамина и аналогичных аминов анализ данных соединений в сложных матрицах образцов является сложной задачей, для решения которой учеными был апробирован метод ВЭЖХ–МС/МС с ионизацией электрораспылением для измерения гексаметилендиамина в моче человека [48] (рисунок 34).

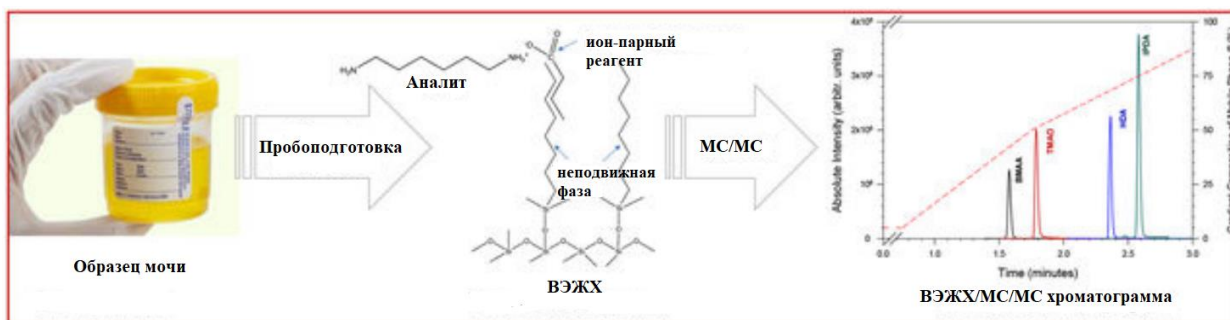


Рисунок 34 – Дизайн эксперимента

Хроматографическое разделение в данной работе оптимизировалось с использованием мобильной фазы на основе ГФМК и обращенно-фазной колонки C18. Помимо определения гексаметилендиамина данный метод подразумевал определения других маркеров, таких как изофорондиамин, β -метиламино-L-аланина и триметиламин N-оксида. В экспериментальных исследованиях подготовка образца включала четыре часа кислотного гидролиза с последующей автоматизированной ТФЭ, выполненной с использованием слоя сильного катионообменного сорбента с 7 Н раствором аммиака в метаноле в качестве элюента. Пределы обнаружения составили от 0,05 нг/см³ до 1,60 нг/см³. Точность между днями и в течение дня была в пределах 10 %, а воспроизводимость в пределах 15 %.

Пробоподготовка является ключевым элементом любой аналитической методики. Преобразование пробы в формат, совместимый с аналитическим оборудованием, может быть достаточно простым, таким как разбавление или фильтрация, или может включать многоступенчатые процедуры обработки образца. Как один из первых этапов в аналитической методике, выбор соответствующего метода пробоподготовки критически важен для получения надежных результатов и, следовательно, требует подробнейшего изучения.

Традиционные методы пробоподготовки требуют значительного вмешательства специалиста, занимают много времени и расходуют большие количества растворителя и/или других расходных материалов. В настоящее время существует потребность в повышенной чувствительности и селективности методов анализа, что привело к поиску более эффективных и экономически выгодных альтернатив для классических подходов изолирования и очистки образцов сложного состава.

Одним из перспективных вариантов пробоподготовки в биоаналитических исследованиях, контроле качества лекарственных средств синтетического и природного происхождения, эколого-фармацевтического мониторинге является ТФЭ, позволяющая за счет использования сорбентов и подбора условий экстракции осуществлять изолирование и/или очистку аналитов различной химической природы. В качестве сорбентов для ТФЭ

используются различные материалы на основе силикагеля, оксида алюминия и синтетические полимерные сорбенты. В последнее время широко применяются полимерные сорбенты, благодаря их химической стабильности, широкому диапазону физико-химических характеристик и возможности их целенаправленного дизайна, определяющего параметры селективности.

В ТФЭ аналиты, которые должны быть извлечены, разделяются между твердой и жидкой фазами, следовательно, они должны обладать большей способностью к сорбции на твердой фазе, чем к матрице пробы. ТФЭ в основном используется для подготовки жидких проб, но может быть адаптирована для твердых проб, извлеченная с помощью различных растворителей. Известно, что применение ТФЭ на этапе пробоподготовки может снизить нагрузку на дорогостоящее аналитическое оборудование и требования к специалистам [49]. Известно применение различных типов сорбентов для ТФЭ в экологическом мониторинге и биоаналитических исследованиях [50, 51]. Наиболее распространенным вариантом ТФЭ в вышеуказанных аналитических методиках является применение модифицированных силикагелей. В последнее время все более широкое распространения получают сорбенты на основе сверхсшитого полистирола.

Таким образом, пробоподготовка является ключевым элементом аналитической методики. Методы извлечения, очистки и концентрирования особенно важны для количественного определения аналитов в сложных матрицах. ТФЭ на этапе пробоподготовки может быть основой достижения селективности и чувствительности аналитической методики в целом, а ее применение может привести к снижению нагрузки на дорогостоящее аналитическое оборудование и требования к специалистам.

Максимально полное удаление мешающих компонентов при сохранении оптимальной степени извлечения целевого соединения является ключом к успешной разработке методик ТФЭ. Для контроля оптимизации методики необходимо собрать и проанализировать посредством хроматографии элюаты с каждого этапа – от внесения пробы до элюирования (рисунок 35).

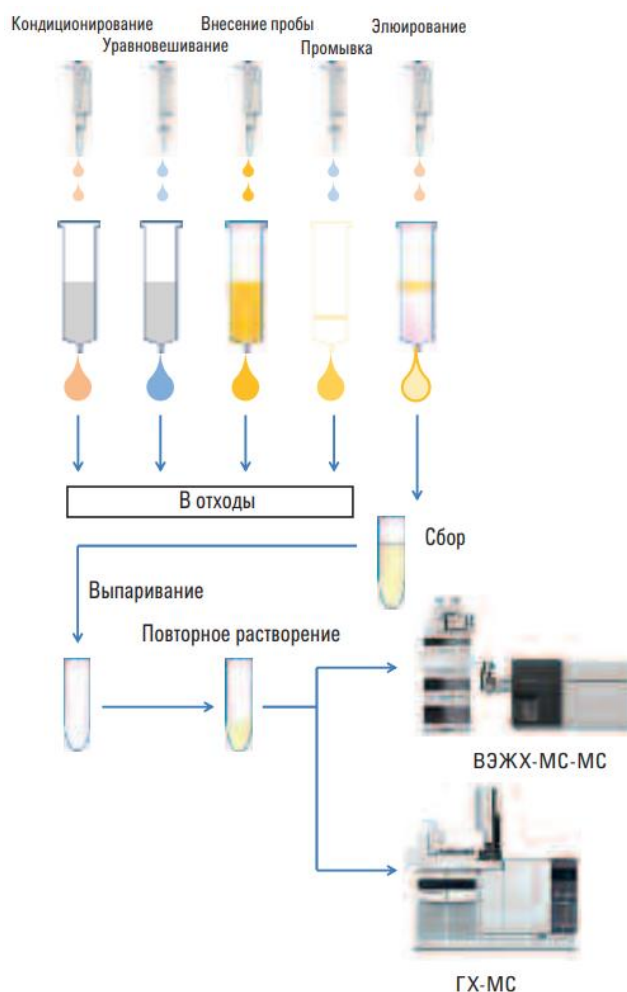


Рисунок 35 – Блок-схема анализа проб с помощью ТФЭ

Возвращаясь к эксперименту Deepak Bhandari, в образец мочи для проведения кислотного гидролиза, вносили 6 Н раствор соляной кислоты (конечная концентрация кислоты составляла 0,6 Н), смеси внутреннего стандарта и воду. Раствор образца помещали в термостатируемый блок, инкубировали образцы при 80 °С в течении 4 часов. Раствор охлаждали до комнатной температуры, доводили до значения рН до 1,0 с помощью 1 Н NaOH перед проведением ТФЭ. Для очистки образцов использовались 96-луночные планшеты Strata XC, обладающие сильными катионо-обменными свойствами. Планшеты ТФЭ кондиционировались с использованием метанола, а затем уравновешивались водой. Далее гидролизованные образцы загружались и промывались 0,1 Н HCl кислотой, затем метанолом. На следующем этапе аналиты элюировались дважды 7 Н раствором аммиака в метаноле. После ТФЭ элюенты выпаривали досуха в системе выпаривания в атмосфере азота при 60 °С. Перед анализом проведением хромато-МС анализа высушенные образцы восстанавливали в смеси воды/метанола (95:5 об./об.) содержащей 0,1% ГФМК.

Для проведения МС анализа исследуемые аналиты предварительно подвергали хроматографическому разделению режиме сверхвысокопроизводительной хроматографии и дальнейшей детекцией с использованием МС с тройным квадруполом, оснащенный источником ESI. Химическое разделение было выполнено с использованием градиента растворителя 0,1% ГФМК в воде. (подвижная фаза А) и 0,1% ГФМК в метаноле (подвижная фаза В), как показано в таблице 6. Температуры колонки была установлены на 50 °С и объем анализируемой пробы составил 2 мкл.

Таблица 6 – градиентное элюирование при хроматографическом разделении (0,1% HFBA в воде. (подвижная фаза А) и 0,1% HFBA в метаноле (подвижная фаза В)

Время (мин)	Скорость потока (мл/мин)	% подвижной фазы В
0	0,2	5
0,75	0,5	5
1,75	0,5	50
3,25	0,3	95
3,5	0,3	5
5,0	0,2	5

Учеными было показано, что использование ГФМК в качестве ион-парного реагента для ВЭЖХ в сочетании с МС анализом обеспечивает высокую чувствительность, линейность более трех порядков, точность и достоверность в пределах 15 %. Однако дорогостоящая пробоподготовка осложняет повсеместное использование данного подхода.

Maggy Lépine и ее коллегами был предложен метод определения гексаметилендиамина, как метоболита и биомаркера при отравлении 1,6-гексаметилендиизоцианатом, который обычно используются в производстве полиуретансодержащих материалов в различных областях применения. В своих исследованиях ученые приняли решение использовать подход МС основываясь на том, что он обладает хорошей селективностью и высокой чувствительностью для анализа этих биомаркеров в сложной матрице [52].

Для реализации поставленной задачи был разработан новый и достоверный метод количественного анализа гексаметилендиамина и других метоболитов соединений, выделяемых при производстве полиуритан-содержащих материалов в моче человека с использованием ТФЭ на этапе пробоподготовки и очистке образцов мочи, дериватизации целевых соединений с последующим хромато-МС анализом (ВЭЖХ-МС/МС), в режиме ионного мониторинга на МС детекторе типа тройной квадруполь.

В данной работе пробы мочи подвергались кислотному гидролизу, последующей ТФЭ и дериватизации с использованием уксусного ангидрида. Хорошо известно, что гексаметилендиамин является довольно полярной молекулой, что осложняет ее хроматографическое разделение на классических обращеннофазных колонках особенно в

сложных многокомпонентных матрицах. Дериватизация в данном случае необходима для надлежащего хроматографического удерживания, последующего разделения смеси и повышения чувствительности определения. В газохроматографическом анализе полярных соединений низкой летучести для повышения чувствительности и воспроизводимости полярные функциональные группы подвергают превращению в неполярные группы дериватизацией без изменения основной структуры молекулы. Это улучшает хроматографические возможности, улучшает разделение структурно похожих соединений, повышает их летучесть и термическую стабильность, снижает потери при экстракции и в процессе анализа. За счет образования ионов с более высокими массами повышается чувствительность. Дериватизация может служить рядом целей: для облегчения извлечения интересующих соединений из биологических сред; для повышения чувствительности обнаружения; для изменения хроматографических свойств, таких как полярность и форма пика; и/или для изменения времени удерживания на хроматографических колонках, для облегчения разделения интересующих соединений от других веществ в экстракте [53]. Амины и фенолы (но не спирты) могут быть дериватизированы уксусным ангидридом в основных водных условиях и полученные ацетилированные производные более липофильны, чем исходные амины или фенолы, что облегчает экстракцию интересующих соединений в органические растворители. Кроме того амины, фенолы и спирты могут быть дериватизированы уксусным ангидридом в безводных условиях. Также важно, что первичные амины, однажды дериватизированные уксусным ангидридом, часто могут быть далее дериватизированы другим ацилирующим агентом; такие соединения, как было доказано, обладают высокой чувствительностью в аналитических системах газовой хроматографии (ГХ) и газовой хроматографии с МС детектированием.

Дериватизацию в газовой хроматографии применяют для анализа нелетучих или нестабильных соединений, а в жидкостной хроматографии зачастую для анализа низкомолекулярных полярных соединений. Дериватизация также дает более специфичные переходы MRM, по сравнению с недериватизированными соединениями. В данной работе была выбрана реакция с уксусным ангидридом в боратном буфере при значении pH 8,5, поскольку известно, что данный ангидрид дает простую и быструю реакцию со свободными аминами, без необходимости удаления избытка реагента [54].

Ацилирование применяют для деривации и последующего хроматографического анализа полярных органических соединений (например аминов, фенолов), содержащих функциональные группы с активными атомами водорода (рисунок 36):

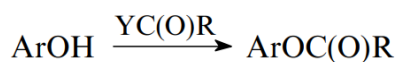


Рисунок 36 – Реакция ацилирования

Здесь Y – носитель ацильной группы. При прочих равных условиях ацильные производные характеризуются большей гидролитической устойчивостью, чем соответствующие синильные производные.

Ацилирование аминов или фенольных соединений непосредственно в воде проводят ангидридом уксусной кислоты в присутствии карбонатов либо гидрокарбонатов калия или натрия. Сложность применения данных солей состоит в том, что процесс ацилирования сопровождается интенсивным выделением CO₂, а это в свою очередь может привести к потерям анализируемых веществ. По этой причине в ряде работ используют гидрофосфаты (фосфаты) или гидроксид натрия.

Часто при анализе данных соединений их рекомендуют использовать трифторацетаты, пентафторпропионаты и гептафторбутираты, для этого широко применяют перфторацелирующие реагенты. Перфторацелирование обычно проводят в среде апротонных органических растворителей трифторуксусным, пентафторпропионовым, гептафтормасленным ангидридами или пентафторбензоилхлоридом. В качестве акцепторов побочных продуктов (свободных перкарбоновых кислот или галогеноводородов) используют пиридин или триэтиламин. Однако с увеличением числа атомов углерода в перфторацелильных фрагментах отмечено уменьшение устойчивости получаемых эфиров к гидролизу и повышению фонового тока при газохроматографическом анализе на детекторе электронного захвата из-за образования большого числа побочных фторсодержащих продуктов.

Хроматографическое разделение анализов проводили на обращеннофазной колонке C₁₈ с размером частиц 1,7 мкм, 2,1 × 50 мм (Acquity UPLC HSS T3, Waters), объем анализируемой пробы составлял 5 мкл. Элюирование проводили при 40 °C со скоростью потока 0,6 мл/мин с использованием градиентного элюирования, в качестве подвижной фазы использовали воду (А) и ацетонитрил (В), оба из которых содержали 0,1 % муравьиной кислоты. Градиент представлен в таблице 7.

Таблица 7 – градиентное элюирование при хроматографическом разделении (0,1% муравьиная кислота в воде. (подвижная фаза А) и 0,1% муравьиная кислота в ацетонитриле (подвижная фаза В)

Время (мин)	Скорость потока (мл/мин)	% подвижной фазы В
0	0,6	2
1	0,6	2
4	0,6	17
5,5	0,6	40

Продолжение таблицы 7

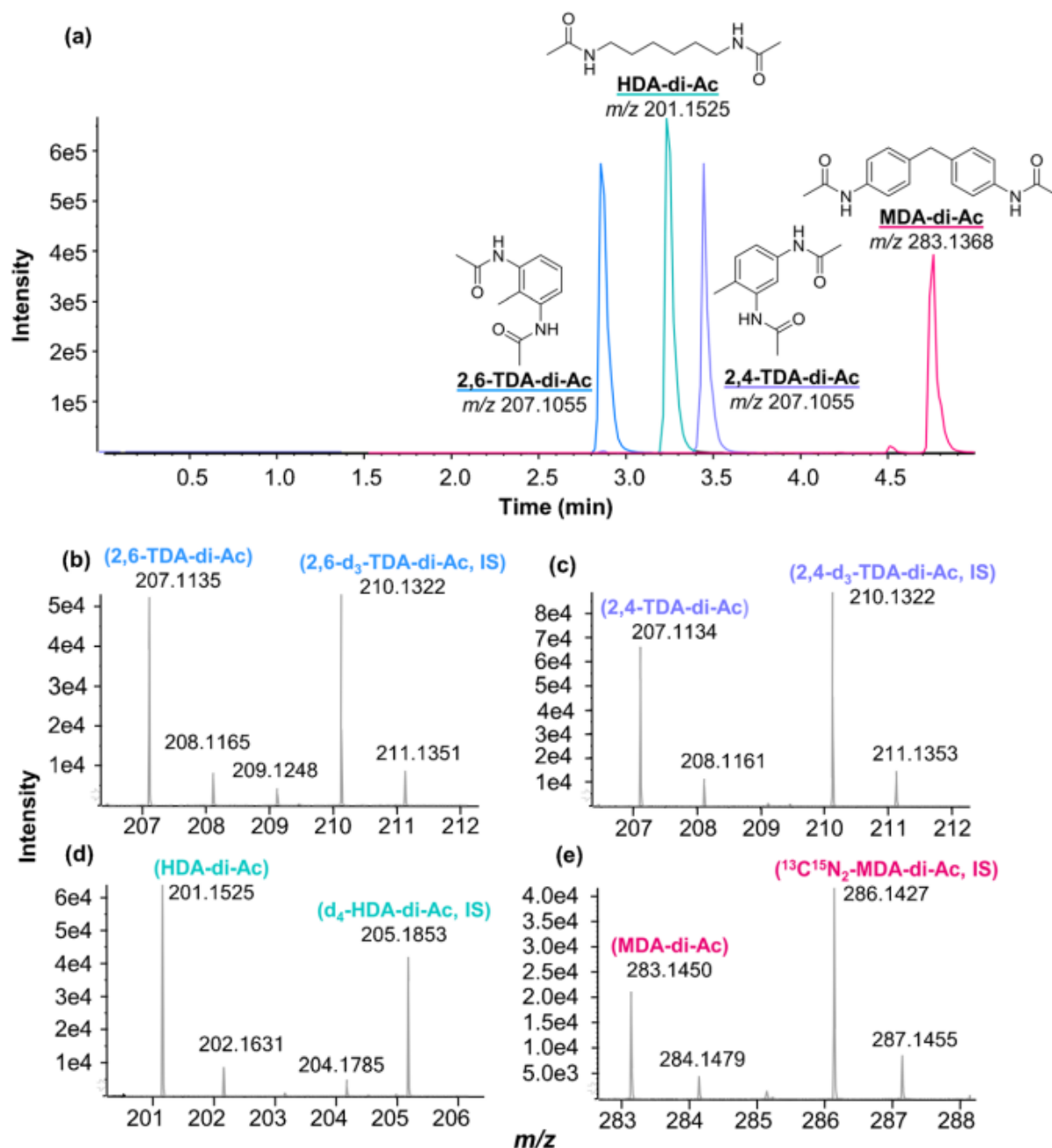
Время (мин)	Скорость потока (мл/мин)	% подвижной фазы В
6,0	0,6	90
7,0	0,6	90

Тандемный МС анализ осуществляли на МС Waters Xevo TQ с детектором типа тройной квадруполь с ионизацией в режиме электрораспыления положительных ионов. Параметры источника ионизации были следующими: температура источника 150 °С, напряжение конуса 35 В, температура десольватации 500 °С и поток десольватации азота 1000 л/ч. С целью повышения чувствительности и селективности анализа был применен режим мониторинга множественных ионов, переходы и условия гексаметилендиамина приведены в таблице 8.

Таблица 8 – Структура деривата гексаметилендиамина и параметры МС детекции

Аналит	Напряжение на конусе (В)	Переходы ионов, m/z (энергия столкновения, эВ)
диацетил-гексаметилендиамин	20	201,1 → 100,1 (20)
		201,1 → 142,0 (15)

На ионных хроматограммах высокого разрешения целевых соединений, представленные на рисунке 37, наблюдались только диацетилированные аналиты, при этом недериватизированные или монодериватизированные аналиты не были обнаружены. Дериватизация также дала более специфичные переходы, чем это было бы возможно с недериватизированными соединениями.



а – диацетил-толуолдиамин, диацетил-гексаметилендиамин, диацетил-метилендиамин, б – 2,6- толуолдиамин, с – 2,4- толуолдиамин, д – гексаметилендиамин, е – метилендиамин

Рисунок 37 – Хроматограмма высокого разрешения экстрагированных ионов дериватизированных изомеров толуолдиамин, гексаметилендиамин, метилендиамин и масс-спектры дериватизированных целевых соединений

Данный высокочувствительный подход позволят анализировать содержание гексаметилендиамина в моче на уровне 5,8 мкг/дм³, что соответствует рекомендуемым пороговым значениям и может быть использован для мониторинга окружающей среды (воздуха) и обеспечения безопасности на рабочем месте.

Еще один пример исследования аминов, в том числе ГМДА в биологических образцах методом tandemной хромато-масс-спектрометрии представила группа ученых во главе с Åsa Marand [55]. В этом исследовании представлен подход для определения аминов в биологических образцах в качестве производных перфторжирных амидов в моче и плазме человека. Как уже упоминалось ранее для определения аминов в биологических жидкостях требуются чувствительные и селективные методы. Для определения некоторых аминов, например толуолдиамина (ТДА), метилendiамина (МДА) в биологических образцах использовали метод, основанный на ВЭЖХ разделении и детекции с использованием электрохимического или диодно-матричного детектора. Эти методы также отличаются процедурой прободготовки перед анализом.

В связи с выше сказанным данная группа ученых также склоняется к дериватизации аминов перед хроматографическим разделением, что увеличивает селективность и способность проводить анализ с высокой чувствительностью. Для дериватизации аминов в подобных исследованиях регулярно используются два типа реагентов: хлорформиаты для образования производных эфиров карбамата и ангидриды перфторжирных кислот в качестве дериватирующих соединений для образования производных перфторжирных амидов. В ходе работы были опробованы реакции с рядом ангидридов и в качестве предпочтительного им был выдвинут ангидрид пентафторпропионовой кислоты (PFPA).

Пробирки, содержащие 1 см³ мочи или 0,5 см³ плазмы, гидролизуют 1,5 см³ 3М серной кислотой при 100 °С в течение 16 часов. Перед гидролизом в пробирки добавляли 100 см³ исходного раствора, содержащего 0,1 мг/см³ каждого из аминов, меченных дейтерием, в 1 М серной кислоте (используемых в качестве внутренних стандартов). После гидролиза амины экстрагировали в 2 см³ толуола путем добавления 5 см³ насыщенного гидроксида натрия. Образцы встряхивали и центрифугировали в течение 10 минут. Органический слой переносили в новые пробирки, добавляли 20 см³ ангидрида перфторжирной кислоты и смеси немедленно встряхивали в течение примерно 10 секунд. Избыток реагента и образовавшуюся кислоту удаляли путем экстракции 2 см³ 1 М фосфатного буферного раствора (рН 7,5). Фазы толуола, содержащие производные амида, выпаривали досуха с помощью вакуумной центрифуги. Сухие остатки растворяли в 100 см³ ацетонитрила и помещали в ультразвуковую ванну на 10 минут. Растворы образцов затем переносили во флаконы и анализировали с помощью ЖХ-МС/МС.

В качестве инструментальных методов исследования авторами были рассмотрены подходы анализа на газовом хроматографе с масс-селективным детектором (ГХ/МС/МС), газовом хроматографе с термоионным детектором (ТИД), ВЭЖХ и ультрафиолетовым детектором (ВЭЖХ/УФ) и жидкостной хромато-масс-спектрометрии (ВЭЖХ/МС/МС).

Традиционно высокой чувствительность определения дериватов перфторжирных амидов обладает аналитический подход основанный на с использованием ГХ-МС либо с электронным ударом (ЭИ), либо с химической ионизацией (ХИ) в режиме мониторинга отрицательных ионов. Однако хорошо известны варианты определения производных перфторжирных амидов на ВЭЖХ/УФ [56, 57]. Ранние, до создания источника ионизации электрораспылением (ESI) определение амина-PFPA производных имело ряд ограничений, однако на сегодняшний день робастность и удобство данного метода не вызывают сомнений.

ВЭЖХ/МС/МС анализ аминов как производных перфторжирных амидов осуществляли масс-спектрометре с детектором типа тройной квадруполь Quattro Micro (Waters, Altrincham, Cheshire, UK) с ионизацией ESI и мониторингом отрицательных ионов. В коллизионную ячейку подавался аргон на этапе разбивки родительских ионов и получения целевых дочерних. Температура источника ионизации составляла 100 °С, а температура десольватации – 200 °С, варьируя значениями напряжения конуса в пределах 5–40 В и коллизионной энергии 10–35 эВ в процессе хроматографических заколов анализируемых дериватов перфторжирных амидов, были группой ученых были подобраны оптимальные параметры для исследуемых родительских и соответствующих дочерних ионов. В режиме MRM проводился для переходов $[M - H]^- \rightarrow [M - 120]^-$ и $[119]^-$ путем мониторинга 10 ионов со временем задержки 0,2 с. Количественное определение выполнялось с помощью MRM производных амин-PFPA и меченых дейтерием производных амин-PFPA.

Особенностью данного хроматографического разделения было использование микроколонки для ВЭЖХ Xterra® C18, 50 мм × 1.0 мм, размер частиц 2,5 мм (Waters, Massachusetts, США), насоса с возможностью поддержания микропотоков (Shimadzu LC10ADVP micro-LC, Shimadzu Corporation, Киото, Япония). Заколы концентрированного образца объемом 4 мл производился в петлю объемом 20 мл, окруженную 16 мл фокусирующей жидкости (5/95 ацетонитрил/вода об./об.), выполнялись с помощью автосэмплера LC-PAL (CTC Analytics AG, Цвинген, Швейцария).

В качестве подвижной фазы А при градиентном элюировании для определения дериватов перфторжирных амидов использовали раствор с соотношением ацетонитрил/вода (об./об.) 5/95 и подвижной фазы В: 95/5 ацетонитрил/вода (об./об.). Скорость потока составляла 70 мл/мин. Анализ дериватов PFPA начался с 20-ой мин при достижении в процессе элюирования содержания раствора подвижной фазы В 25% до 40% и затем с 40 % до 70 % в течение последующих 15 минут.

В дополнение к хромато-масс-спектрометрическому анализу, представленному выше был разработан метод определения в гидролизированных биологических образцах ТДА и МДА как дериватов PFPA с использованием масс-детектора типа тройной квадруполь MS MD 800, объединенного с газовым хроматографом GC 8000, оснащенного автодозатором A200S (Fisons Instruments, Altrincham, UK). Инъекции по 1 мл выполнялись с в режиме splitless. Перед забором проводили в инжекторе в течение 10 сек нагрев иглы шприца, температура инжектора составляла 290 °C. Для хроматографического разделения образца использовали капиллярную колонку с химически связанной неподвижной фазой, DB-5 (J & B Scientific, Folsom, CA, USA), размеры колонки составляли длина 30 м, внутренний диаметр 0,25 мм и толщина неподвижной фазы 0,25 мкм. Температурный градиент был следующим: начальная температура колонки 110 °C поддерживалась в изотермическом режиме в течение 1 мин, затем повышалась по 25 °C/мин до 300 °C, где оставалась постоянной в течение 1 мин. Клапан с отдельным выходом держался закрытым в течение 1 мин после инъекции. Температура источника ионизации ионов составляла 200 °C, а температура интерфейса ГХ/МС – 250 °C. Задержка на входе капилляра была установлена на 2,9 мин. Химическая ионизация (ХИ) проводилась аммиаком, детектирование осуществляли в режиме мониторинга отрицательных ионов (НХИ). Давление на ионном источнике составляло около 2×10^{-4} мбар. Ток эмиссии составлял 200 мВ, а энергия электронов 70 эВ. Количественное определение ионов, соответствующих дериватам амин-PFPA и дейтерий-меченых производных амин-PFPA было выполнено в режиме SIR [M–20][–] производимых со временем задержки 0,2 сек и задержкой между сканированиями 0,02 сек.

Третьим подходом, предложенным в данной статье, был анализ методом ВЭЖХ с хемилюминесцентным детектированием (ХЛД). Хемилюминесцентный азотспецифический детектор Antek 8060 (Antek Instruments Inc., Техас, США) использовался для количественного определения производных амина-PFPA в эталонных растворах с использованием кофеина в качестве внешнего стандарта. Температура пиролиза была установлена на 1050 °C. Расходы кислорода и аргона на входе составляли 100 мл/мин и 50 мл/мин соответственно. Давление в реакционной камере находилось на уровне 20 торр, а поток озона в реакционную камеру составлял 25 мл/мин. Напряжение фотоумножителя было установлено на значении в 750 В. ХЛД был подключен к насосу Phoenix 40 micro-LC (Fisons Instruments, Carlo-Erba, Милан, Италия). Образцы объемом 200 нл вводились в систему ВЭЖХ для последующего анализа с использованием линейного градиентного элюирования в течение 15 мин с подвижной фазой метанол/вода в соотношении от 50/50 до 20/80% об./об. и со скоростью потока 100 мл/мин. Разделение

проводили на хроматографической колонке для ВЭЖХ PerMap® C18, 50 мм × 1,0 мм, диаметр частиц 3 мм (LC Packings, Амстердам, Нидерланды).

Для получения дериватов амин-PFPA. Исходные растворы ГМДА, 2,4- и 2,6-ТДА, МДА, а также соответствующие дейтерированные амины, d₄-ГМДА, 2,4- и 2,6-d₃-ТДА и d₂-МДА, готовили путем растворения точных взвешенных количеств в растворе 1 М серной кислоты (H₂SO₄) до концентраций в диапазоне 2–4 мг/мл. Объемы 0,1 мл каждого раствора амина добавляли в пробирки для образцов с 1 мл воды, и проводили процедуру обработки (без гидролиза и добавления внутреннего стандарта). В конце процедуры остатки амина-PFPA растворяли в 1 мл метанола и количественно определяли с помощью ВЭЖХ/ ХЛД. Эталонные растворы, содержащие производные амин-PFPA и дейтерий меченые производные амин-PFPA, готовили путем разбавления метанольных растворов в ацетонитриле до 0,1 мг/мл. На следующем этапе пробы подвергались кислотному гидролизу, экстракцией толуолом в присутствии насыщенного раствора гидроксида натрия. Все образцы подвергались встряхиванию в течение 10 минут и последующему центрифугированию 10 минут. Органический слой переносили в новые пробирки, добавляли 20 мл ангидрида перфторжирной кислоты и смеси немедленно встряхивали в течение примерно 10 с. Избыток реагента и образовавшуюся кислоту удаляли экстракцией 2 мл 1 М фосфатного буферного раствора (pH 7,5). Фазы толуола, содержащие производные амида, выпаривали досуха с помощью вакуумной центрифуги (SC210A; Savant Instruments Inc., Холбрук, Нью-Йорк, США). Сухие остатки растворяли в 100 мкл ацетонитрила и помещали в ультразвуковую ванну на 10 мин. Растворы образцов переносили в вials и анализировали с помощью ВЭЖХМС/МС.

Используя ВЭЖХ/МС/МС с ESI в отрицательном режиме детектирования, были получены воспроизводимые спектры с характерными паттернами фрагментации для различных дериватов амин-PFPA. В спектре MRM наблюдался ряд интенсивных пар ионов, соответствующих дериватам амин-PFPA, который позволил выбрать наиболее информативные для дальнейшего анализа целевых соединений. Установив молекулярные ионы $[M - H]^-$ в качестве ионов-предшественников, типичные образовавшиеся дочерние ионы обладали потерей группы (neutral loss) CF₃CHF₂ $[M - H]^- \rightarrow [M - H - 120]^-$, потеря двух групп (neutral loss) CF₃CHF₂ $[M - H]^- \rightarrow [M - H - 240]^-$ и $[M - H]^- \rightarrow [119]^-$, соответствующих иону [CF₃CF₂]⁻. Различные варианты значений коллизионной энергии позволяют выполнять несколько переходов MRM в рамках анализа, подтверждающих структуру и повышающие селективность. Приложенное напряжение конуса было индивидуально оптимизировано для различных ионов $[M - H]^-$, а также коллизионные энергии для MRM переходов различных дериватов (таблица 9). В целом, структура

соединений (алифатический или ароматический амин) и молекулярная масса влияли на выбор оптимальных параметров определения. Дериваты амин-PFPA обладающие алифатическими свойствами требовали меньшего напряжения конуса и коллизионной энергии по сравнению с ароматическими.

Таблица 9 – ВЭЖХ/МС/МС параметры для анализа дериватов

Компонент	Родительский ион [M – H] ⁻	Напряжения конуса / В [M – H] ⁻	Коллизионная энергия / эВ [M – H] ⁻ → [M – H – 120] ⁻	Коллизионная энергия / эВ [M – H] ⁻ → [119] ⁻
HDA-PFPA	407,1	20	15	23
d ₄ -HDA-PFPA	411,1	20	15	23
TDA-PFPA	413,0	20	17	27
d ₃ -TDA-PFPA	416,0	20	17	27
MDA-PFPA	489,1	25	27	27
d ₂ -MDA-PFPA	491,1	25	27	27

Исследования команды ученых во главе с Linda G. T. Gaines были направлены на изучение влияния 1,6-гексаметилен диизоцианата (HDI) по средством анализа ГМДА в моче и смывах кожных покровов профессионально подверженных групп населения [58]. Принцип построения эксперимента, схож с описанными выше. В данном случае в 1 мл мочи вносили 10 мкл внутреннего стандарта 1,7-диаминогептана в концентрации 150 мкг/л. С целью проведения кислотного гидролиза в реакционную смесь добавляли 100 мкл концентрированной серной кислоты. Гидролиз протекал при 100 °С в течение 4 ч. Для нейтрализации реакции гидролиза в образцы вносили 4 мл насыщенного раствора гидроксида натрия (NaOH), 0,5 г хлорида натрия (NaCl). Далее целевые соединения подвергали тройной толуольной экстракции по 2 мл.

Этап дериватизации гептафтормасляным ангидридом (20 мкл) проводился в течение 60 мин при 55 °С. С целью удаления избытка дериватирующего агента после охлаждения образцов до комнатной температуры добавляли 1 М калий-фосфатного буфера (рН 7,0, 4 мл). Далее к органическому слою добавляли сульфат натрия для удаления следовых количеств воды из образца. Органический слой переносили в чистую пробирку и высушивали, используя испаритель TurboVar LV (Zymark Center, Хопкинтон, Массачусетс, США) с водяной баней, нагретой до 55 °С до полного высыхания образца. Образцы восстанавливали в 200 мкл этилацетата, обрабатывали ультразвуком и переносили вставки для виал для газовой хроматографии с последующим полным высушиванием в вакуумной системе SpeedVac (Savant Instruments Inc., Холбрук, Нью-Йорк, США). Окончательно пробы восстанавливали в 60 мкл этилацетата.

Образцы анализировали методом газовой хромато-масс-спектрометрии (Thermo, Остин, Техас, США) в режиме отрицательной химической ионизации с метаном в качестве газа-реагента (1,8 мл/мин). Температурный градиент был следующим: начальная

температура колонки 50 °С поддерживалась в изотермическом режиме в течение 1 мин, затем повышалась по 10 °С/мин до 155 °С, далее скорость нагрева снижали до 5 °С/мин до достижения температуры колонки в 185 °С, на следующем этапе скорость нагрева составляла 25 °С/мин до достижения 290 °С после чего поддерживали изотермический режим в течение 10 °С мин Температура источника ионизации ионов составляла 150 °С, а температура переходной линии ГХ/МС – 300 °С.

Количественное определение ГМДА и 1,7-диаминогептана проводилось в режиме селективного мониторинга ионов (SRM) с (ГМДА при m/z 448 и 1,7-диаминогептана при m/z 462). Данный подход позволил определять содержание ГМДА в диапазоне концентраций 0,08–20,0 мкг/л.

Полученные результаты подтвердили возможность использования данного подхода для определения ГМДА в моче человека, однако использование метода ограничивается наличием специфического дорогостоящего оборудования.

5 Проект технического задания для проведения исследований по разработке методики определения гексаметилендиамина в воздушной среде из изделий из полиамидов

На основании проведенных исследований разработан проект технического задания на разработку методики определения уровня миграции гексаметилендиамина, выраженного в единицах массовой концентрации, в воздушную среду из изделий из полиамида. Проект технического задания представлен в Приложении Б.

Разработка методики предполагает проведение исследований определения гексаметилендиамина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуориметрическим или масс-спектрометрическим детектированием, подбор оптимальных условий хроматографирования, подбор условий пробоподготовки воздушных вытяжек, набор данных для метрологической аттестации методики.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведен анализ международных стандартов (правил, директив, рекомендаций и иных документов, принятых международными организациями по стандартизации), региональных документов (регламентов, директив, решений, стандартов, правил и иных документов), а также законодательства экономически развитых государств (США, Великобритания, Германия, Китай, Япония), научно-информационных источников и результатов теоретических и экспериментальных исследований в части применяемых методов и методик определения массовой концентрации гексаметилендиамина в водных и воздушной средах, в том числе выделяемого из изделий из полиамидов. Отражена историография по исследуемой проблематике. Временные границы анализируемого периода составили 40 лет (с 1984 г. по 2024 г.). Всего изучено более 50 источников методической и научно-технической информации.

Показано, что основные методы определения гексаметилендиамина основаны на газовой и высокоэффективной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

Приведено описание способов приготовления воздушных вытяжек из товаров народного потребления согласно методическим документам, включенным в перечни стандартов к ТР ТС 005/2011, ТР ТС 007/2011, ТР ТС 008/2011, ТР ТС 017/2011, ТР ТС 019/2011, ТР ТС 025/2012, ТР ТС 042/2017.

На основании проведенных исследований разработан проект технического задания на разработку методики определения гексаметилендиамина, содержащегося в изделиях из полиамидов в воздушной среде, предложено для разработки методики использовать метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением масс-спектрометрического или флюориметрического детектирования.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Томилов, А. П. Адиподинитрил и гексаметилендиамин / А. П. Томилов, С. К. Смирнов. – М. : Химия, 1974. – 280 с.
2. Pubchem : Hexamethylenediamine = Гексаметилендиамин. – Текст : электронный // National Library of Medicine = Национальная Медицинская Библиотека : [сайт]. – URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/16402> (дата обращения: 11.11.2024).
3. Свойства органических соединений. Справочник / под ред. А. А. Потехина. – Л. : Химия, 1984. – 520 с.
4. Производство химических волокон : метод. указания для студ. всех спец. / Ивановск. гос. текстильн. академия ; сост.: О. Г. Циркина, научн. ред.: Л. А. Гарцева. – Иваново : ИГТА, 2010. – 65 с.
5. Vagholkar, Path K. Nylon / Path K. Vagholkar // International Journal of Scientific Research. – 2016. – Vol. 5, № 9. – P. 349-351.
6. Демина, В. А. Химия диэлектриков : [электронное издание] / В. А. Демина. – Москва, 2006. – URL: <https://portal.tpu.ru/departments/kafedra/eict/Students/Tab1/Book1.pdf> (дата обращения: 12.11.2024).
7. Хорохордин, А. М. Эпоксидные композиции в строительстве (обзор) / А. М. Хорохордин, Е. А. Хорохордина, О. Б. Рудаков // Научн. Вестн. Воронежского гос. арх.-строит. ун-та. Сер. Физ.-хим. проблемы и высок. технолог. строит. материаловедения. – 2017. - № 1 (14). – С. 7-18.
8. Энциклопедия полимеров. Ред. коллегия: В. А. Каргин (глав. ред.) [и др.] Т. 1. А-К. – М. : «Советская Энциклопедия», 1972. – 1224 стб. с илл. – Текст : непосредственный.
9. Платэ, Н. А. Основы химии и технологии мономеров : учеб. пособие / Н. А. Платэ, Е. В. Сливинский. – М. : Наука : МАИК Наука/Интерпериодика, 2002. – 696 с. – ISBN 5-02-006396-7. – Текст : непосредственный.
10. Санитарные правила при производстве и применении эпоксидных смол и материалов на их основе : утверждены Зам. Главного государственного санитарного врача СССР от 28 ноября 1989 г. № 5159-89. – Москва, 1990. – 28, [2] с. – Текст : непосредственный.
11. Вредные вещества в промышленности : Справочник для химиков, инженеров и врачей : изд. 7-е : пер. и доп. в трех томах. Т. II. Органические вещества / под ред. засл. деят. науки проф. Н. В. Лазарева и докт. мед. наук Э. Н. Левиной. – Л. : «Химия», 1976. – 624 с. – Текст : непосредственный.

12. Kennedy, G. L. Toxicity of hexamethylenediamine / G. L. Kennedy // Drug and chemical toxicology. – 2005. – Vol. 28, № 1. – P. 15–33.
13. Ракитский, В.Н. Методические аспекты гигиенической оценки безопасности полимерных материалов, контактирующих с пищевыми продуктами / В.Н. Ракитский, Т.В. Юдина, Н.Е. Федорова // Вопросы питания. – 2012. – № 6(81). – С. 67-73. – Текст : непосредственный.
14. Трахтенберг, И.М. Проблема кардиовазотоксического действия экзогенных химических веществ [Электронный ресурс] / И.М. Трахтенберг, В.А. Тычинин. – 2003. – URL: http://www.journal.ukrcardio.org/cardio_archive/2003/5/trachtenberg.htm (дата обращения: 14.11.2024).
15. Кулаков, А. Е. Действие малых концентраций гексаметилендиамина на организм человека / А. Е. Кулаков. – Текст : непосредственный // Гигиена и санитария / А. Е. Кулаков ; Институт общей и коммунальной гигиены им. А. Н. Сысина АМН СССР. – М., 1964. – №4. – С. 12-13. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/deystvie-malyh-kontsentratsiy-geksametilendiamina-na-organizm-cheloveka/viewer> (дата обращения: 18.11.2024).
16. Гигиенический норматив «Показатели безопасности и безвредности микроорганизмов-продуцентов, микробных препаратов и их компонентов, вредных веществ в воздухе рабочей зоны и на кожных покровах работающих» [Электронный ресурс] : утв. постановлением Совета Министров Респ. Беларусь, 25 янв. 2021 г., № 37. – URL: http://www.hoynikicge.rcge.by/uploads/b1/s/13/935/basic/1/184/C22100037_1614891600_326-486.pdf?t=1623915018 (дата обращения 18.11.2024).
17. ТР ТС 005/2011. О безопасности упаковки [Электронный ресурс] : Технический регламент Таможенного союза. – Введ. 2011–08–16. – URL: <https://www.gost.ru/documentManager/rest/file/load/1515750093571> (дата обращения: 18.11.2024).
18. ТР ТС 007/2011. О безопасности товаров, предназначенных для детей и подростков [Электронный ресурс] : Технический регламент Таможенного союза. – Введ. 2011–09–23. – URL: http://www.eurasiancommission.org/ru/act/tehnreg/deptexreg/tr/Documents/P_797_1.pdf (дата обращения 18.11.2024).
19. ТР ТС 008/2011. О безопасности игрушек [Электронный ресурс] : Технический регламент Таможенного союза. – Введ. 2011–09–23. – URL: http://www.eurasiancommission.org/ru/Lists/EECDocs/P_798_3.pdf (дата обращения 18.11.2024).

20. ТР ТС 017/2011. О безопасности продукции легкой промышленности [Электронный ресурс] : Технический регламент Таможенного союза. – Введ. 2012–07–01. – URL: <https://files.stroyinf.ru/Data2/1/4293799/4293799018.pdf> (дата обращения 18.11.2024).
21. ТР ТС 019/2011. О безопасности средств индивидуальной защиты [Электронный ресурс] : Технический регламент Таможенного союза. – Введ. 2012–06–01. – URL: <https://www.aenor.com/INSEPECCINPDF/CU%20TR%20019.pdf> (дата обращения 18.11.2024).
22. ТР ТС 025/2012. О безопасности мебельной продукции [Электронный ресурс] : Технический регламент Таможенного союза. – Введ. 2014–07–01. – URL: https://eec.eaeunion.org/upload/medialibrary/f2f/RS_P_32.pdf (дата обращения 18.11.2024).
23. ТР ТС 042/2011. О безопасности оборудования для детских игровых площадок [Электронный ресурс] : Технический регламент Таможенного союза. – Введ. 2018–11–11. – URL: <https://files.stroyinf.ru/Data2/1/4293745/4293745755.pdf> (дата обращения 18.11.2024).
24. Санитарно-химические исследования изделий, изготовленных из полимерных и других синтетических материалов, контактирующих с пищевыми продуктами : инструкция 2.3.3.10-15-64-2005. – Введ. 01.03.2006. – Минск, 2005. – 98 с.
25. Методы оценки гигиенической безопасности отдельных видов продукции для детей : инструкция по применению № 016-1211. – Введ. 2011–12–15. – Минск, 2011. – 26 с.
26. Санитарно-эпидемиологическая оценка игрушек : МУК 4.1/4.3.2038-05. – Введ. 2006-04-01. – М., 2006. – С. 8–9.
27. Гигиеническая оценка тканей, одежды и обуви : Инструкция 1.1.10-12-96-2005. – Введ. 01.03.2006. – Минск, 2005. – 20 с.
28. Порядок и организация проведения гигиенической экспертизы производственной и специальной одежды. Показатели гигиенической безопасности и методы определения : Методические указания 11-11-15. – Введ. 30.12.2002. – Минск, 2002. – 28 с.
29. ГОСТ 30255-2013. Мебель, древесные и полимерные материалы. Метод определения выделения формальдегида и других вредных летучих химических веществ в климатических камерах. – Введ. РБ 01.07.2015. – Минск : Стандартинформ, 2014. – 15 с. – Текст : непосредственный.
30. ГОСТ Р ИСО 17734-2-2009. Анализ азоторганических соединений в воздухе методом жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии. Часть 2. Определение аминов и аминизоцианатов по их дибутиламиновым и этилхлорформиатным производным : национальный стандарт Российской Федерации : издание официальное : утвержден и

введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 3 декабря 2009 г. № 551-ст. – М. : Стандартинформ, 2010. – 24, [1] с. – Текст : непосредственный.

31. МУ 1656-77. Методические указания на колориметрическое определение гексаметилендиамина в воздухе : выпуски с 1 по 5 : утверждены Зам. Главного государственного санитарного врача СССР 18 апреля 1977 г. № 1656-77. – М. : ЦРИА «Морфлот», 1981. – 252, [1] с. – Текст : непосредственный.

32. МУ 4481-87. Методические указания по хроматографическому измерению концентраций гексаметилендиамина в воздухе рабочей зоны : утверждены Зам. Главного государственного санитарного врача СССР 21 декабря 1987 г. № 4481-87. Ред. коллегия: Е. К. Прохорова [и др.]. – М., 1988. – С. 76-84. – Текст : непосредственный.

33. Patent CN102221594A. Method for determining hexylene diamine content in water by using gas chromatography method : filing date 11.04.2011 6 publ. date 19.10.2011 / Song Wei ; applicants PONY TEST TECHNOLOGY (TIANJIN) CO LTD. – на кит. языке. – URL: <https://patents.google.com/patent/CN102221594A/en> (дата обращения: 15.11.2024). – Текст электронный.

34. Chromatographic determination of amines in biological fluids with special reference to the biological monitoring of isocyanates and amines : I. Determination of 1,6-hexamethylenediamine using glass capillary gas chromatography and thermionic specific detection / G. Skarting [et al.] // Journal of Chromatography A. – 1989. – Vol. 479. – P. 125–133.

35. Dalene, M. Chromatographic determination of amines in biological fluids with special reference to the biological monitoring of isocyanates and amines. IV. Determination of 1,6-hexamethylenediamine in human urine using capillary gas chromatography and selective ion monitoring / M. Dalene, G. Skarping, T. Brorson // Journal of Chromatography A. – 1990. – Vol. 516, № 2. – P. 405-413.

36. Hexamethylene diisocyanate, 2,4-toluene diisocyanate, 2,6-toluene diisocyanate, isophorone diisocyanate and 4,4'-methylene diphenyl diisocyanate – Determination of hexamethylenediamine, 2,4-toluenediamine, 2,6-toluenediamine, isophoronediamine and 4,4'-methylenedianiline in urine using gas chromatography-mass spectrometry / J. Cocker [et al.] // Biomonitoring Methods. – 2017. – Vol. 2, № 3. – P. 1415-1435.

37. Rakitskiĭ, V. N. [Methodical aspects of hygienic safety assessment of polymeric materials in contact with foodstuffs] / V. N. Rakitskiĭ, T. V. Iudina, N. E. Fedorova // Problems of Nutrition. – 2013. – Vol. 81, № 6. – P. 67-73.

38. Flack, Sheila L. Occupational exposure to HDI: Progress and challenges in biomarker analysis / Sheila L. Flack, Louise M. Ball, Leena A. Nylander-French // *Journal of Chromatography B*. – 2010. – Vol. 878, № 27. – P. 2635-2642.
39. Rosenberg, C. Biological monitoring of aromatic diisocyanates in workers exposed to thermal degradation products of polyurethanes / C. Rosenberg // *J. Environ. Monit.* – 2002. – Vol. 4, № 5. – P.711–716.
40. Williams, N. R. Biological monitoring to assess exposure from use of isocyanates in motor vehicle repair / N. R. Williams, K. Jones, J. Cocker // *Occupational and Environmental Medicine*. – 1999. – Vol. 56, № 9. – P. 598-601.
41. Skarping, G., Biological monitoring of hexamethylene- and isophorone-diisocyanate by the determination of hexamethylene- and isophorone-diamine in hydrolysed urine using liquid chromatography and mass spectrometry / G. Skarping, M. D. Dalene, H. Tinnerberg // *The Analyst*. – 1994. – Vol. 119, № 9. – P. 2051-2055.
42. Test chamber exposure of humans to 1,6-hexamethylene diisocyanate and isophorone diisocyanate / H. Tinnerberg [et al.] // *International Archives of Occupational and Environmental Health*. – 1995. – Vol. 67. – P. 367-374.
43. Dalene, M. Biological monitoring of hexamethylene diisocyanate by determination of 1,6-hexamethylene diamine as the trifluoroethyl chloroformate derivative using capillary gas chromatography with thermionic and selective ion monitoring / M. Dalene, G. Skarping, H. Tinnerberg // *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. – 1994. – Vol. 656. – P. 319-328.
44. Skarping, G. Trace analysis of amines and isocyanates using glass capillary gas chromatography and selective detection : III. Determination of aliphatic and alicyclic amines as perfluoro fatty acid amides using electron-capture and nitrogen-selective detection / G. Skarping, B. E. F. Smith, M. Dalene // *Journal of Chromatography A*. – 1984. – Vol. 303. – P. 89-98.
45. Study on the determination of some diamine in urine by LC-MS/MS / Tong Thi Ngan [et al.] // *Heavy metals and arsenic concentrations in water, agricultural soil, and rice in Ngan Son district, Bac Kan province, Vietnam*. – 2023. – Vol. 6, № 1. – P. 66-82.
46. Определение примеси гексаметилендиамина в полигексаметиленгуанидин гидрохлориде методом ВЭЖХ / В. В. Юрочка [и др.] // *Известия Национальной академии наук Беларуси : серия химических наук* / В. В. Юрочка [и др.] ; Институт химии новых материалов Национальной академии наук Беларуси. – 2019. – Т. 55, № 2. – С. 156-162.
47. Zhou, W., Liquid-Chromatography Quantitative Analysis of 20 Amino acids after Derivatization with FMOC-Cl and Its Application to Different Origin Radixids isatidis / W. Zhou,

X.-Y. Zhanga, G.-L. Duana // Journal of the Chinese Chemical Society. – 2011. – Vol. 58, № 4. – P. 509–515.

48. Brent, L. A Method for Quantitative Amino Acid Analysis Using Precolumn *o*-Phthalaldehyde Derivatization and High Performance Liquid Chromatography / L. Brent, W. Frederick // Journal of Chromatographic Science. – 1981. – Vol. 19, № 5. – P. 259–265.

49. UPLC-ESI-MS/MS Method for the Quantitative Measurement of Aliphatic Diamines, Trimethylamine *N*-oxide, and β -Methylamino-*L*-alanine in Human Urine / Bhandari, D. [et al.] // Journal of Chromatography B. – 2018. – Vol. 1083. – P. 86-92.

50. Green Extraction Techniques as Advanced Sample Preparation Approaches in Biological, Food, and Environmental Matrices: A Review / J. S. Câmara [et al.] // Molecules. – 2022. – Vol. 27, № 9. – 29 p.

51. Bosire, G. O. Comparison of Three Solid Phase Materials for the Extraction of Carboxylic Acids from River Water Followed by 2D GC $\times$ GC-TOFMS Determination / G. O. Bosire, J. C. Ngila, H. Parshotam // International Journal of Analytical Chemistry. – 2016. – Vol. 2016. – P. 1-8.

52. Jurado-Sánchez, B. Determination of carboxylic acids in water by gas chromatography–mass spectrometry after continuous extraction and derivatization / B. Jurado-Sánchez, E. Ballesteros, M. Gallego // Talanta. – 2012. – Vol. 93. – P. 224-232.

53. A validated UPLC-MS/MS method for the determination of aliphatic and aromatic isocyanate exposure in human urine / M. Lépine, L. Sleno, J. Lesage, S. Gagné // Analytical and Bioanalytical Chemistry. – 2019. – Vol. 412. – P. 753-762.

54. Baker, G. B. Derivatization with acetic anhydride: Applications to the analysis of biogenic amines and psychiatric drugs by gas chromatography and mass spectrometry / G/ B/ Baker, R. T. Coutts, A. Holt // Journal of Pharmacological and Toxicological Methods. – 1994. – Vol. 31, № 3. – P. 141-148.

55. Determination of amines as pentafluoropropionic acid anhydride derivatives in biological samples using liquid chromatography and tandem mass spectrometry / Å. Marand [et al.] // The Analyst. – 2004. – Vol. 129, № 6. – P. 522-528.

56. Tiljander, A. Determination of 4,4'-methylenedianiline in hydrolysed human urine using liquid chromatography with UV detection and peak identification by absorbance ratio / A Tiljander, G. Skarping // J. Chromatogr. – 1990. – Vol. 511. – P. 185–194.

57. Skarping, G. Liquid chromatography and mass spectrometry determination of aromatic amines in hydrolysed urine from workers exposed to thermal degradation products of polyurethane / G. Skarping, M. Dalene and P. Brunmark // Chromatographia. – 1994. – Vol. 39. – P. 619–623.

58. Skarping, G. Biological monitoring of hexamethylene- and isophorone-diisocyanate by the determination of hexamethylene- and isophorone-diamine in hydrolysed urine using liquid chromatography and mass spectrometry / G. Skarping, M. D. Dalene and H. Tinnerberg // The Analyst. – 1994. Vol. 119, № 9. – P. 2051–2055.

59. Urine 1,6-Hexamethylene Diamine (HDA) Levels Among Workers Exposed to 1,6-Hexamethylene Diisocyanate / Linda G. T. Gaines [et al.] // The Annals of Occupational Hygiene. – 2010. – Vol/ 54, № 6. – P. 678-691.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Методы определения гексаметилендиамина в водных и воздушных средах, биологическом материале

Таблица А1 – Методы определения гексаметилендиамина в водных, воздушных средах и биологическом материале

№	Метод измерения	Объект измерений	Пробоподготовка	Предел обнаружения (чувствительность)	Ссылка на источник
1	2	3	4	5	6
Определение гексаметилендиамина в водных средах					
1	ГХ-ДЭЗ	Водные вытяжки	Подщелачивание водной вытяжки гидроксидом натрия. Экстракция толуолом и дальнейшее упаривание органической фазы на ротационном испарителе до сухого остатка. Растворение сухого остатка толуолом и проведение реакции дериватизации с ГФМА при температуре 55 °С в течение 70 минут, далее охлаждают до комнатной температуры и пропускают через фильтр мембранный с диаметром пор 0,45 мкм.	5,0 мг/дм ³	[33]
2	ГХ-ТИД	Водные вытяжки Биологический материал (моча и плазма)	Кислотный гидролиз биологических образцов 6 М соляной кислотой с выдержкой в течении всей ночи при температуре 100 °С. Подщелачивание раствора гидроксидом натрия 5 М и аммиаком 3%. Добавляют толуол и проводят реакцию дериватизации с этилхлорформиатом. Выпаривают органическую фазу на ротационном испарителе до сухого остатка и растворяют его в толуоле, содержащий внутренний стандарт, состоящий из изобутутилхлорформиатного производного ди-н-бутиламина.	10,0 мкг/дм ³	[34]
3	ГХ-ПИД и МС	Водные вытяжки, имитирующие пищевые продукты	Проводят реакцию дериватизации с использованием этилхлорформиата с превращением диамина в соответствующий диуретан.	1 нг	[37]
4	ГХ-ДЭЗ и МС		Проводят реакцию дериватизации с использованием трифторуксусного ангидрида в течении 60 минут при 55 °С с превращением диамина в соответствующий диамид. Удаляют избыток дериватирующего агента калий-фосфатным буфером.	0,01 нг	
5	ГХ-ТИД и ДЭЗ	Водная вытяжка	–	ГХ-ТИД – 40-60 фмоль ГХ-ДЭЗ – 2-30 фмоль	[44]

Продолжение таблицы А1

1	2	3	4	5	6
6	ГХ-ТИД и МС	Водные вытяжки Биологический материал (моча и плазма)	Щелочной гидролиз биологического материала 5 М гидроксидом натрия при 100 °С в течении 4 часов. Затем проводят реакцию дериватизации с трифторированным этилхлорформиатом. Отделяют фазу толуола и смешивают с фосфатным буфером для удаления избытка реагента и образовавшейся кислоты. Органическую фазу выпаривают досуха. Остаток растворяют в толуоле.	ГХ-ТИД – 20 мкг/дм ³ ГХ-МС – 0,5 мкг/дм ³	[43]
7	ВЭЖХ-МС	Водная вытяжка из полимерного биоцидного материала	Проведение реакции дериватизации с 9-флуоренилметилхлорформиатом	0,02 мкг/см ³	[46] [47] [48]
Определение гексаметилендиамина в биологическом материале и воздушной среде					
8	ГХ-МС	Биологический материал (моча)	Кислотный гидролиз биологического материала 6 М соляной кислотой, содержащая добавку внутреннего стандарта, при 100 °С в течение ночи. Подщелачивание раствора гидроксидом натрия и экстракция толуолом. Отделение органической фазы и проведение реакции дериватизации с ГФМА. Экстракция фосфатным буфером избытка реагента и образовавшийся кислоты. Толуольную фазу выпаривали до сухого остатка на ротационном испарителе при температуре 30 °С и далее его растворяют в 50 мкл толуола.	0,5 мкг/дм ³	[35]
9	ГХ-МС	Биологический материал (моча)	Кислотный гидролиз на водяной бане биологического материала концентрированной серной кислотой в течении 90 минут. Подщелачивание раствора гидроксидом натрия 10 М и экстракция диэтиловым эфиром. Выпаривание органической фазы до сухого остатка под слабым током азота. Растворяют сухой остаток в толуоле и проводят реакцию дериватизации с ГФМК при 55°С в течение 1 часа. После охлаждения толуол и избыток дериватирующего агента удаляют слабым током азота при 30–40 °С. Остаток растворяют в толуоле.	0,7 мкг/дм ³	[36]

Продолжение таблицы А1

1	2	3	4	5	6
10	ГХ-МС	Биологический материал (моча и плазма)	—	1 нг/см ³	[38]
11	ГХ-МС	Биологический материал (моча)	Кислотный гидролиз биологического материала концентрированной серной кислотой при 100 °С в течении 16 часов. Добавление хлорида натрия и гидроксида натрия. Экстракция в толуол. Проведение реакции дериватизации с ГФМА. Экстракция фосфатным буфером избытка реагента. Слой толуола высушивают под слабым потоком азота, далее сухой остаток растворяют в этилацетате.	5 нмоль/дм ³	[39]
12	ГХ-МС	Биологический материал (моча)	Кислотный гидролиз биологического материала концентрированной серной кислотой при температуре 100 °С в течении 90 минут. Добавляют гидроксид натрия 10 М. Экстракция в диэтиловый эфир. Выпаривание органической фазы на ротационном испарителе до сухого остатка под струей азота. Растворяют сухой остаток в толуоле и проводят реакцию дериватизации с ГФМА при 55°С в течение 1 часа. Органическую фазу выпаривают до сухого остатка и его растворяют в толуоле.	5 нмоль/дм ³	[40]
13	ЖХ-МС	Биологический материал (моча)	Щелочной гидролиз биологического материала 5 М гидроксидом натрия при 100 °С в течении 4 часов. Экстракция толуолом и проведение реакции дериватизации с пентафторпропионовым ангидридом. Экстракция избытка реагента и образовавшейся кислоты фосфатным буфером при 40 °С. Остаток растворяют с подвижной фазе.	0,5 пг	[41]

Продолжение таблицы А1

1	2	3	4	5	6
14	ЖХ-МС ГХ-МС	Воздушная среда Биологический материал (моча и плазма)	Щелочной (кислотный) гидролиз биологического материала 5 М или 10 М гидроксидом натрия (5 М или 3 М соляная кислота) при 100 °С. Добавляют трибутиламин и толуол. Смесь встряхивают и добавляют 2,2,2-трифторэтилхлорформат. Отделяют органическую фазу и экстрагируют Избыток реагента и образовавшуюся кислоту фосфатным буфером. Слой толуола высушивают и сухой остаток растворяют в толуоле, содержащий добавку внутреннего стандарта. Щелочной гидролиз биологического материала 5 М гидроксидом натрия при 100 °С в течении 4 часов. Добавляли насыщенный гидроксид натрия и толуол. Отделяют толуольный слой и добавляют пентафторпропионовый ангидрид. Экстракция избытка реагента и образовавшейся кислоты фосфатным буфером. Органическую фазу выпаривают досуха и остаток растворяют в подвижной фазе.	моча – 0,1 мкг/дм ³ плазма – <0,1 мкг/дм ³	[42]
15	ЖХ-МС	Биологический материал (моча)	Кислотный гидролиз биологического материала 6 М соляной кислотой при 80 °С в течении 4 часов. Проводят твердофазную микроэкстракция для очистки образца гидроксидом аммония смешанный с метиловым спиртом. Выпаривают органическую фазу до сухого остатка под слабым током азота при 60 °С. Остаток растворяют в водном растворе метилового спирта, содержащего ангидрид ГФМК.	0,074 нг/см ³	[45]
16	ВЭЖХ–МС/МС	Биологический материал (моча)	Кислотный гидролиз биологического материала в течении 4 часов, с последующей автоматизированной ТФЭ, выполненной с использованием слоя сильного катионообменного сорбента с 7 Н раствором аммиака в метаноле в качестве элюента.	0,05 нг/см ³	[49] [50] [51] [52]
17	ВЭЖХ–МС/МС	Биологический материал (моча)	Кислотный гидролиз биологического материала, с последующей ТФЭ/ Проведение реакции дериватизации с уксусным ангидридом в боратном буфере при значении рН 8,5.	5,8 мкг/дм ³	[53] [54]

Продолжение таблицы А1

1	2	3	4	5	6
18	ВЭЖХ–МС/МС	Биологический материал (моча и плазма)	Кислотный гидролиз биологического материала 3 М серной кислотой при 100 °С в течение 16 часов. После гидролиза амины экстрагируют в толуол путем добавления насыщенного гидроксида натрия. Отделяют органический слой и проводят реакцию дериватизации с ангидридом перфторжирной кислоты. Избыток реагента и образовавшуюся кислоту удаляют путем экстракции фосфатным буферным раствором. Фазу толуола выпаривают досуха с помощью роторного испарителя. Сухой остаток растворяют в ацетонитриле.	1 нг	[55] [56] [57] [58]
19	ГХ-МС	Биологический материал (моча)	Кислотный гидролиз биологического материала концентрированной серной кислотой при 100 °С в течение 4 часов. Для нейтрализации реакции гидролиз вносят насыщенный раствор гидроксида натрия. Далее целевое соединение экстрагируют в толуол. Проводят реакцию дериватизации с ГФМК в течение 60 мин при 55 °С. Избыток реагента и образовавшуюся кислоту удаляют путем экстракции фосфатным буферным раствором. Добавляют к органическому слою сульфат натрия для удаления следовых количеств воды из образца. Фазу толуола выпаривают досуха на водяной бане, нагретой до 55 °С. Сухой остаток растворяют в этилацетате и обрабатывают в ультразвуке.	0,08 мкг/см ³	[59]

Примечания:

1 «—» – отсутствует информация по характеристике метода.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

**Техническое задание
на разработку методики измерений «Массовая концентрация
гексаметилендиамина, выделяемого из изделий из полиамидов, в воздушной среде.
Методика измерений методом высокоэффективной жидкостной хроматографии»**

(ПРОЕКТ)

УТВЕРЖДАЮ

Директор
научно-исследовательского
института гигиены, токсикологии,
эпидемиологии, вирусологии и
микробиологии государственного
учреждения «Республиканский
центр гигиены, эпидемиологии и
общественного здоровья»

_____ С.И. Сычик

«__» _____ 2024 г.

ТЕХНИЧЕСКОЕ ЗАДАНИЕ

на разработку методики измерений

«Массовая концентрация гексаметилендиамина, выделяемого из изделий из полиамидов в воздушной среде. Методика измерений методом высокоэффективной жидкостной хроматографии»

Сроки разработки: начало — 11.11.2024 г., окончание — 05.12.2025 г.

Основание для разработки методики: договор № Н-16/303 с ЕЭК от 11.11.2024 г.

Цель: разработка методики определения массовой концентрации гексаметилендиамина, выделяемого из изделий из полиамидов в воздушной среде. Разработка методики проводится в соответствии с ГОСТ 34100.3-2017/ISO/IEC Guide 98-3:2008, ГОСТ 8.010-2013, ТКП 8.006-2011, СТБ ISO 5725-2-2002, СТБ ИСО 5725-3-2002, СТБ ISO 5725-4-2002, СТБ ИСО 5725-6-2002.

Область применения: воздушные вытяжки из изделий из полиамидов, процедуры приготовления которых осуществляются в соответствии с Методическими указаниями и Инструкциями, включенными в Перечни стандартов к ТР ТС 005/2011, ТР ТС 007/2011, ТР ТС 008/2011, ТР ТС 017/2011, ТР ТС 019/2011, ТР ТС 025/2012, ТР ТС 042/2017.

Диапазон измерения: содержание гексаметилендиамина в воздушной среде: от 0,0005 до 0,002 мг/м³. Минимальное допустимое количество миграции (ДКМ) гексаметилендиамина в воздушную среду – 0,0005 мг/м³.

Требования к метрологическим характеристикам методики:

Требования к метрологическим характеристикам методики приведены в таблице 1.

Неопределенность измерений включает в себя неопределенность отбора проб из единичных образцов воздушных вытяжек.

Таблица 1 - Показатели точности и относительной расширенной неопределенности методики измерений гексаметилендиамина в воздушной среде при доверительной вероятности

$P = 95 \%$, при $k = 2$

Определяемое вещество	Диапазон измерений массовой концентрации, мг/м ³	Предел повторяемости r , %, не более	Предел промежуточной прецизионности $R_{I(TO)}$, %, не более	Относительная расширенная неопределенность $U(X)$, %, не более
Гексаметилендиамин в воздушной среде	от 0,0005 до 0,002	25	30	30

Руководитель НИР,
директор

С.И. Сычик

Ответственный исполнитель НИР,
заведующий лабораторией
хроматографических исследований

Т.П. Крымская