



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2013105360/28, 07.02.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
07.02.2013

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 07.02.2013

(45) Опубликовано: 10.07.2014 Бюл. № 19

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **Raymond Koseniauskas и Eric S. Burak "Reduced Blood Clearance and Increased Urinary Excretion of Nitrosodimethylamine in Patas Monkeys Exposed to Ethanol or Isopropyl Alcohol 1". American Association for Cancer Research. 52,стр. 1463-1468, 15.04.1992. RU 2241219 C1 27.11.2004. CN 102721768 A 10.10.2012 . US 4295856 A1 20.10.1981**

Адрес для переписки:

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

(72) Автор(ы):

**ЗАЙЦЕВА** Нина Владимировна (RU),  
**УЛАНОВА** Татьяна Сергеевна (RU),  
**НУРИСЛАМОВА** Татьяна Валентиновна  
(RU),  
**ПОПОВА** Нина Анатольевна (RU),  
**БАКУЛИНА** Ульяна Степановна (RU),  
**МАЛЬЦЕВА** Ольга Андреевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

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

(54) СПОСОБ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ N-НИТРОЗОДИМЕТИЛАМИНА И N-НИТРОЗОДИЭТИЛАМИНА В МОЧЕ МЕТОДОМ ГАЗОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицинским токсикологическим исследованиям, в частности к санитарной токсикологии, и может быть использовано для количественного определения N-нитрозаминов в биологических жидкостях, в частности в моче. Способ количественного определения N-нитрозаминов в моче заключается в том, что производят отбор пробы мочи. Далее осуществляют подготовку пробы мочи к анализу, для этого добавляют к ней сульфат натрия при соотношении: 1 объемная часть пробы к 3,2 массовой части сульфата натрия, смесь нагревают на водяной бане до установления фазового

равновесия, в дальнейшем производят отбор образовавшейся парогазовой пробы и вводят эту пробу в капиллярную колонку газохроматографа. Осуществляют газохроматографическое разделение N-нитрозодиметиламина и N-нитрозодиэтиламина, а количество каждого указанного вещества устанавливают по градуировочному графику. Техническим результатом является расширение спектра определения нитрозоаминов в моче, повышение чувствительности и точности, при одновременном упрощении стадии пробоподготовки. 3 з.п. ф-лы, 4 табл.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: 2013105360/28, 07.02.2013

(24) Effective date for property rights:  
07.02.2013

Priority:

(22) Date of filing: 07.02.2013

(45) Date of publication: 10.07.2014 Bull. № 19

Mail address:

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

(72) Inventor(s):

ZAJTSEVA Nina Vladimirovna (RU),  
ULANOVA Tat'jana Sergeevna (RU),  
NURISLAMOVA Tat'jana Valentinovna (RU),  
POPOVA Nina Anatol'evna (RU),  
BAKULINA Ul'jana Stepanovna (RU),  
MAL'TSEVA Ol'ga Andreevna (RU)

(73) Proprietor(s):

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

(54) **METHOD FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF N-NITROSODIMETHYLAMINE AND N-NITROSODIETHYLAMINE IN URINE BY GAS CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: method for quantitative determination of N-nitrosamines in urine involves collecting a urine sample; preparing the urine sample for analysis by adding sodium sulphate to the sample in ratio of 1 part by volume sample to 3.2 parts by weight sodium sulphate; heating the mixture on a water bath until phase equilibrium is established; collecting the formed gas-vapour sample and feeding said sample into the capil-

lary column of a gas chromatograph; performing gas chromatographic separation of N-nitrosodimethylamine and N-nitrosodiethylamine and the amount of each said substance is determined from a calibration curve.

EFFECT: wider range of determining nitrosamines in urine, high sensitivity and accuracy, while simplifying the sample preparation step.

4 cl, 4 tbl

Изобретение относится к медицинским токсикологическим исследованиям, в частности к санитарной токсикологии, и может быть использовано для количественного определения N-нитрозаминов в биологических жидкостях, в частности в моче.

Из патентной литературы известны способы определения N-нитрозаминов в воде (Патент РФ №2090864 и Авт. свид. СССР №1259187). Согласно первому патенту, выполняют колориметрический анализ природных и сточных вод, загрязненных высокотоксичными химическими веществами, такими как диметилгидразин и продукт его окисления - нитрозодиметиламин (НДМА). При анализе известным способом водный раствор НДМА смешивают с цинком в присутствии гидроокиси натрия в течение 1-3 мин при соотношении воды к гидроокиси натрия и к цинку, равном 1:(0,013-0,047):(0,005-0,15) соответственно, в реакционный раствор после отделения цинка вносят гидроксилламин солянокислый при массовом соотношении раствор: гидроксилламин солянокислый 1: 0,02 и гидроксид натрия при массовом соотношении воды к общему содержанию гидроокиси натрия, равном 1:(0,23-0,33), с последующей отдувкой образовавшегося несимметричного диметилгидразина в смесь паранитробензальдегида, этиленгликоля и уксусной кислоты с последующим его колориметрированием.

А согласно техническому решению по Авт.свид. СССР №1259187 проводят газохроматографическое определение летучих аминов и нитрозоаминов в пищевых продуктах и в других объектах окружающей среды. При реализации этого способа производят подготовку пробы путем экстракции и последующей обработки ее соляной кислотой и щелочью, и последующий газохроматографический анализ.

Недостатком указанного известного способа определения N-нитрозаминов в воде (Патент РФ №2090864 и Авт.свид. СССР №1259187) является неспецифичность и неселективность колориметрического метода. Это физический метод химического анализа, основанный на определении концентрации вещества по интенсивности окраски растворов. Невозможно сравнивать интенсивность окраски раствора в присутствии других окрашенных мешающих веществ. Мешающие вещества снижают чувствительность метода.

Также из уровня техники известен ряд методов определения нитрозоаминов в биосредах. Например, для определения N-нитрозодиметиламина в биосредах (Pylypiw НМ Jr., Zimmerman F, Harrington GW, et al. 1985. Apparatus for trace determination of volatile N-nitrosamines in small samples. Anal Chem 57:2996-2997) используется метод газовой хроматографии с термоэнергетическим анализом. Для этого в объем 2 см образцов крови или мочи добавляют серную кислоту и антивспениватель. Затем проводят экстракцию образцов крови или мочи хлористым метиленом в экстракторе. Биологические образцы концентрируют и анализируют методом газовой хроматографии с термоэнергетическим анализатором. Предел обнаружения N-нитрозодиметиламина в биологической среде этим известным способом составил 0,1 мкг/л.

Недостатком указанного известного способа является высокая трудоемкость выделения N-нитрозодиметиламина из биосреды и невозможность определения N-нитрозодидетиламина. При этом для осуществления этого процесса используется дорогостоящее оборудование - термоэнергетический анализатор.

В известном способе [Preussmann R. 1984. Occurrence and exposure to N-nitroso compounds and precursors. IARC Sci Publ. 57:3-15. Spiegelhalter B, Eisenbrand G, Preussmann R. 1982. Urinary excretion of N-nitrosamines in rats and humans. IARC Sci Publ 41:443-449] проводили качественное определение N-диметилнитрозамина в моче методом тонкослойной хроматографии. Для исследований использовали силикагель-гель, нанесенный на стеклянные пластины. В качестве растворителя применяли смесь N-гексан-эфир и

дихлорметан в соотношениях 4:3 и 2:2. Положительный фиолетовый цвет на пластинках подтвердил присутствие нитрозаминов в моче.

В статье «Метод непрерывной твердофазной экстракции для определения аминов в моче человека с кислотным гидролизом в микроволновой печи» [Beatriz Jurado-Sanchez, Evaristo Ballesteros and Mercedes Gallego. Continuous solid-phase extraction method for the determination of amines in human urine following on-line microwave-assisted acid hydrolysis. ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY Volume 396, Number 5, 1929-1937, DOI: 10.1007/s00216-009-3395-3] предложен метод для определения N-нитрозаминов, анилинов и хлоранилинов в моче человека с помощью кислотного гидролиза в микроволновой печи. После этого амины концентрировались с использованием метода твердофазной экстракции. Разделение и определение выполнялось методом газовой хроматографии и масс-спектрометрии, работающей в режиме контроля заданных ионов. Метод имеет низкий предел обнаружения (2-26 нг/л), хорошую точность (относительное стандартное отклонение менее 7%).

Однако все указанные выше способы характеризуются следующими недостатками:

- большие затраты времени на исследования, ввиду сложности выполнения пробоподготовки;
- высокая трудоемкость выделения N-нитрозодиметиламина из биосреды и невозможность определения N-нитрозодиэтиламина;
- применение дорогостоящего оборудования;
- неспецифичность и неселективность метода.

Также известен метод газовой хроматографии и масс спектрометрии количественного определения нитрозодиметиламина и нитрозопролина в моче человека, описанный в статье «Выделение нитрозодиметиламина и нитрозопролина с мочей у человека: межличностные и внутрииндивидуальные различия, эффект от назначения аскорбиновой кислоты и альфа-токоферола» [William A. Garland, 1 Wolfgang Kuenzig, Felix Rubio, Halyna Kornychuk, Edward P. Norkus, 2 and Allan H. Conney. Urinary Excretion of Nitrosodimethylamine and Nitrosoproline in Humans: Interindividual and Intraindividual Differences and the Effect of Administered Ascorbic Acid and  $\alpha$ -Tocopherol. CANCER RESEARCH 46, 5392-5400, October 1986]. Согласно известному способу производили отбор пробы мочи, ее пробоподготовку и выполнение газохроматографического анализа. Сущность указанного известного способа состоит в следующем: в пробу мочи объемом 20 мл или контрольный водный образец добавляли 40 мкл НДМА с меченым  $^{15}\text{N}_2$ . Затем пробу переливали в 50 мл центрифужные пробирки, центрифугировали на вортексе и оставили стоять в течение 30 мин. После этого в пробу добавляли 1 мл 1 молярного боратного буфера (61,8 г борной кислоты и 74,7 хлорида калия растворяли в 1 дм<sup>3</sup> дистиллированной воды и титровали этот раствор до pH=10 с 1 м карбоната натрия) и экстрагировали в течение 30 мин 20 мл гексана. Образец центрифугировали в течение 15 мин. Гексан удаляли с помощью аспирации и добавляли 10 мл дихлорметана. Проба перемешивалась и центрифугировалась способом, описанным выше, при этом слой дихлорметана разливали на 2 пробирки по 5 мл. Объем дихлорметана был уменьшен при комнатной температуре до 50 мкл под потоком аргона, вторично очищенного через ловушку с концентрированной серной кислотой.

Две пробы по 5 мкл раствора дихлорметана вводили в стеклянную колонку (1,9-м × 2 мм, 10% SP-1000 на 100/120 гранулы очищенного кислотой Chromosorb W) газового хроматографа. Температура колонки - 102°C, температура испарителя 150°C. В качестве газа носителя использовался водород (1,6 кг/см). Время удерживания для НДМА и

НДМА с меченым  $^{15}\text{N}_2$  составило 90 с. Эфлюент из газохроматографической колонки через 45 с после введения направлялся в стеклянный сепаратор масс-спектрометра высокого разрешения с источником химически ионизированных ионов. Разрешающая  
 5 способность масс-спектрометра составила  $M/\Delta M=10,000$ , ионы с  $m/z$  75.0558 ( $\text{MH}^+$  от НДМА) и  $m/z$  77.0499 ( $\text{MH}^+$  от  $^{15}\text{N}_2$ -меченных НДМА) генерируются положительной химической ионизацией. Температура сепаратора и источника ионов составила  $150^\circ\text{C}$ . В пробу вводился изобутан через химическую ионизацию для обеспечения давления 20  
 10 Па. Небольшое количество изобутанола ( $\text{MH}^+=75,0810$ ) добавлялось в ионный источник для настройки и калибровки.

Отношение иона ( $y$ ) с  $m/z$  75 к  $m/z$  77 в экспериментальном образце было вычислено и преобразовано в концентрацию НДМА из формулы  $x=(y-b)/m$ , где  $m$ -наклон и  $b$ -точка пересечения - это константы из среднеквадратичного линейнорегиессионного анализа  
 15 отношения иона (ордината) против концентрации (абсцисса). Данные анализа дублировались на водных образцах (20 мл). В каждую пробу добавлялось 2000 пг  $^{15}\text{N}_2$ -меченных НДМА или по 0, 200, 400, 800, 1600 пг НДМА. Количество НДМА, выделенное с мочой, вычислялось с поправкой на разбавление водой, морфолином и растворами азида натрия, которые добавлялись в контейнеры с мочой. Предел  
 20 определения известным способом для НДМА составил 5 пг/мл ( $1 \text{ пг}=10^{-12}$  грамма). Это очень высокая чувствительность достигается в результате использования хромато-масс-спектрометра высокого разрешения, ориентировочная стоимость которого около 20 млн. рублей.

25 Недостатками указанного известного способа являются:

- сложность подготовки образцов мочи к количественному определению, которую осуществляют путем длительной экстракции и перемешивания;
- в известном способе в моче определяют только НДМА;
- применение дорогостоящего оборудования - хромато-масс-спектрометр высокого  
 30 разрешения с химической ионизацией молекул;
- применение дорогих стандартных образцов (изотоп меченных  $^{15}\text{N}_2$ ).

Наиболее близким к предлагаемому изобретению является способ определения N-нитрозодиметиламина в биологической среде, описанный в статье Raymond Koseniauskas и Eric S. Burak «Reduced Blood Clearance and Increased Urinary Excretion of Nitrosodimethylamine in Patas Monkeys Exposed to Ethanol or Isopropyl Alcohol 1». American Association for  
 35 Cancer Research. 52,1463-1468, March 15, 1992. Согласно этому способу выполняют пробоподготовку отобранной биологической среды. Для этого рекомендуется использовать реакцию окисления с пентафлуоробензойной кислотой. Затем в биологический образец добавляют буфер, при рН 10 экстрагируют растворителем,  
 40 затем растворитель концентрируют и проводят определение изучаемого соединения на газовом хроматографе с детектором электронного захвата.

Недостатком указанного известного способа является:

- недостаточная чувствительность, т.к. детектор электронного захвата обладает  
 45 меньшей чувствительностью, чем, например, термоэнергетический анализ и требует более тщательной очистки биологического образца;
- невозможность определения N-нитрозодиэтиламина;
- неспецифичность и неселективность метода.

Технический результат, достигаемый предлагаемым способом, заключается в

расширении спектра определения нитрозоаминов в моче, в повышении чувствительности и точности, при одновременном упрощении стадии пробоподготовки.

Указанный технический результат достигается предлагаемым способом количественного определения N-нитрозодиметиламина и N-нитрозодиэтиламина в моче методом газохроматографического анализа, включающим отбор пробы мочи, подготовку ее к анализу и количественное определение нитрозоамина в пробе методом газохроматографического анализа, при этом новым является то, что подготовку пробы мочи к анализу производят путем добавления к ней сульфата натрия при соотношении: 1 объемная часть пробы к 3,2 массовой части сульфата натрия, с последующим нагревом смеси на водяной бане до установления фазового равновесия, последующего отбора образовавшейся парогазовой пробы и введения этой пробы в капиллярную колонку газохроматографа, далее осуществляют газохроматографическое разделение N-нитрозодиметиламина и N-нитрозодиэтиламина, а количество каждого указанного вещества устанавливают по градуировочному графику.

Газохроматографическое разделение N-нитрозодиметиламина и N-нитрозодиэтиламина осуществляют с использованием газового хроматографа с термоионным детектором на капиллярной колонке DB-624

- 30m\*0,32mm\*0,25µm, при температурном режиме: колонка - от 50°C-200°C; испаритель - 200°C; детектор - 250°C; расход газа-носителя - азота - 20 см<sup>3</sup>/мин, с делением потока 1:14,3.

Нагрев смеси на водяной бане осуществляют в течение 5 минут. Отбор образовавшейся парогазовой пробы производят шприцом, нагретым до температуры 60±5°C.

Поставленный технический результат достигается за счет следующего.

Следует пояснить, что для повышения полноты извлечения изучаемых соединений из мочи используется прием высаливания, который является фактором, понижающим растворимость вещества в моче и повышающим его экстрагируемость из биологических жидкостей [Токсикологическая химия: учебник для вузов/ под ред. Плетеновой. - 2-е изд., испр. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. - 512 с]. Высаливание или выделение вещества из биологической жидкости путем введения вещества-высаливателя, как правило, хорошо растворимого в данном растворителе, приводит к разрушению связей между веществами и заряженными группами белков мочи [Михайлов В.А., "Ж. физ. химии", 1962, т.36, №2, с.306-13; Высаливание-всаливание веществ из растворов, Каунас, 1970]. В процессе высаливания извлекаемые вещества могут выделяться в виде новой фазы - твердого осадка, жидкой или газовой фазы. В предлагаемом способе в качестве вещества-высаливателя рекомендуется использовать сульфат натрия в виде порошка или, иными словами, в виде твердой фазы. Механизм высаливания заключается во взаимодействии анионов (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) и катионов (Na<sup>+</sup>) соли с заряженными группами белков мочи (группы NH<sub>4</sub><sup>+</sup> и COO<sup>-</sup>). В результате заряд белка исчезает и одновременно резко уменьшается гидратная оболочка, т.к. ионы соли притягивают поляризованные молекулы воды. Количество воды, взаимодействующей с белком, уменьшается, поскольку при высоких концентрациях солей количество ионов соли огромно по сравнению с заряженными группами белков. А так как растворимость белков в воде зависит от образования гидратной оболочки вокруг гидрофильных ионных групп, перемещение молекул воды к другим ионам снижает растворимость белка. Все это приводит к "слипанию" молекул белка, их осаждению, высвобождению извлекаемых веществ и появлению их в моче в более высоких концентрациях.

При пробоподготовке производился последующий нагрев смеси мочи с сульфатом натрия в дозаторе равновесного пара (преимущественно, в течение 5 минут) до установления фазового равновесия. При этом при отработке оптимальных условий подготовки биопробы (моча) к парофазному анализу учитывали такие параметры как температура и давление, создаваемые в замкнутой гетерогенной системе жидкость-газ. Для исключения влияния изменений температуры и общего давления на точность парофазного анализа при количественных измерениях применяли технику пневматического парофазного дозирования биопроб в капиллярную колонку хроматографа дозатором DANI HSS 86.50 HEAD SPACE SAMPLER.

Цикл дозирования представляет собой механические операции, выполняемые дозатором DANI HSS 86.50 HEAD SPACE SAMPLER для переноса газовой фазы из виалы в газохроматографическую колонку. В процессе исследований были отработаны оптимальные параметры цикла дозирования проб мочи: температура термостата - 80°C; узла дозирования - 130°C; переходной линии - 135°C; время инкубации, мин - 25; расход газа-носителя - 60 мл/мин; оптимальное давление наддува - 0,2 bar.

Кроме того, вышеуказанные операции, по-видимому, обеспечивают снижение нижнего предела обнаружения и повышение чувствительности определений N-нитрозодиметиламина (НДМА) и N-нитрозодиэтиламина (НДЭА) в моче за счет их концентрирования с помощью метода селективной экстракции (методом анализа равновесной паровой фазы) из мочи N-нитрозаминов.

Экспериментальным путем были также подобраны оптимальные условия хроматографического процесса для четкого разделения пиков НДМА и НДЭА от пиков других соединений на аппаратно-программном комплексе "Кристалл 5000" с применением стандартных образцов. В процессе исследований были апробированы следующие капиллярные колонки различной длины и толщины пленки неподвижной фазы: DB-624, HP-FFAP, HP-Plot/U, HP-VOC. Качественное разделение N-нитрозаминов (N-нитрозодиметиламина и N-нитрозодиэтиламина) с близкими по физико-химическими свойствам соединениями было достигнуто на капиллярной колонке серии DB-624 - 30m\*0,32mm\*0,25µm, при температурном режиме: колонка - от 50°C-200°C; испаритель - 200°C; детектор - 250°C; расход газа-носителя - азота - 20 см<sup>3</sup>/мин, с делением потока 1:14,3. Это позволило расширить спектр определения нитрозоаминов в моче (два компонента вместо одного в прототипе) и повысить чувствительность и точность их определения.

Таким образом, благодаря совокупности и последовательности указанных операций предлагаемого способа, их режимам и обеспечивается высокая степень точности и чувствительности.

Для осуществления предлагаемого способа проводят следующие операции в нижеуказанной последовательности:

- проводят отбор пробы мочи в количестве примерно 10 см<sup>3</sup>;
- в виалы помещают по 5 см<sup>3</sup> образца мочи и 16 г сульфата натрия (т.е. при соотношении 1 объемная часть пробы к 3,2 массовой части сульфата натрия);
- виалы помещают в дозатор равновесного пара (пневматический парофазный дозатор биопроб);
- после установления фазового равновесия при оптимальных параметрах цикла дозирования проб мочи (температура термостата - 80°C, узла дозирования - 130°C, переходной линии - 135°C, время инкубации мин - 25, расход газа-носителя - 60 мл/мин, оптимальное давление наддува - 0,2 bar) парогазовая проба вводится в капиллярную

колонку газохроматографа через испаритель и анализируют в условиях: термоионный детектор (ТИД), капиллярная колонка DB-624 -30m\*0,32mm\*0,25µm, температурный режим: колонка - от 50°C-200°C; испаритель - 200°C; детектор - 250°C; расход газа-носителя 1 (азот) - 1,4 см<sup>3</sup>/мин; расход газа-носителя 2 (азот) - 20 см<sup>3</sup>/мин; количественное содержание N-нитрозодиметиламина и N-нитрозодиэтиламина устанавливают по градуировочным графикам, которые строятся посредством использования отобранных у контрольной группы детей проб мочи (дети проживают на экологически безопасной территории, и их пробы мочи не содержат нитрозамины) и стандартных растворов N-нитрозодиметиламина и N-нитрозодиэтиламина.

Градуировочный график строится следующим образом.

Сначала осуществляют приготовление исходного раствора. Для этого в мерную пробирку объемом 10 см<sup>3</sup> дозатором добавляют бидистиллированную воду в объеме 10 см<sup>3</sup>, вводят микрошприцем по 0,2 мм<sup>3</sup> N-нитрозаминов (N-нитрозодиметиламин и N-нитрозодиэтиламин) (вводят по отдельности в одну мерную колбу. Строят отдельно график для первого и для второго). Весовое содержание компонентов в исходном стандартном растворе составляет (с учетом плотности и содержания основного вещества): N-нитрозодиметиламин - 0,2 мкг/см<sup>3</sup>, N-нитрозодиэтиламин - 0,19 мкг/см<sup>3</sup>. Срок хранения раствора 12 часов.

Градуировочные характеристики устанавливают на градуировочных растворах N-нитрозоаминов методом абсолютной градуировки. Приготовленные стандартные растворы хроматографируют на капиллярной колонке не менее 5 раз. На полученной хроматограмме определяют площади пиков определяемых компонентов и по средним результатам из 5 серий растворов для градуировки строят градуировочную характеристику. Она выражает зависимость площади пика исследуемого вещества на хроматограмме (мВ - при автоматическом обсчете с использованием программно-аппаратного комплекса) от концентрации (мкг/см<sup>3</sup>). Каждая серия состоит из 6 растворов. Градуировочные растворы N-нитрозаминов готовят в мерных пробирках объемом 10 см<sup>3</sup>. Для этого в каждую пробирку дозатором вносят по 10 см бидисстиллированной воды и добавляют исходный стандартный раствор для градуировки в соответствии с таблицей 1 и тщательно перемешивают.

Таблица 1

Растворы для установления градуировочной характеристики при определении концентраций N-нитрозаминов (N-нитрозодиметиламин, N-нитрозодиэтиламин)

Градуировочный раствор	1	2	3	4	5	6
Объем исходного стандартного раствора, мм <sup>3</sup>	1	2	3	5	10	15
Концентрация N-нитрозодиметиламина, мкг/см <sup>3</sup>	0,04	0,08	0,12	0,2	0,4	0,6
Концентрация N-нитрозодиэтиламина, мкг/см <sup>3</sup>	0,038	0,076	0,114	0,19	0,38	0,57

Для построения градуировочного графика используют мочу, не содержащую исследуемые компоненты. В виалы помещают по 5 см<sup>3</sup> образца мочи со стандартной смесью (таблица 1) и 16 г сульфата натрия и ставят в пневматический дозатор равновесного пара. После установления фазового равновесия при оптимальных параметрах цикла дозирования проб мочи (температура термостата - 80°C, узла дозирования - 130°C, переходной линии - 135°C, время инкубации мин - 25, расход газа-носителя - 60 мл/мин, оптимальное давление наддува - 0,2 bar) парогазовая проба вводится в капиллярную колонку газохроматографа через испаритель и анализируют



в условиях: температуру термостата колонок 50-200°C при скорости нагревания 10°C/мин; расход газа-носителя (азот) - 1,4 см<sup>3</sup>/мин; деление потока 1:14,3 (часть паровообразной пробы поступает в колонку, но основная часть пробы выводится из системы).

Использование делителя потока гарантирует получение узких зон пробы на входе в колонку).

Для получения достоверных результатов анализ каждой градуировочной смеси проводят не менее 2-х раз. Процедуру повторяют аналогично для каждого градуировочного раствора.

Отработка оптимальных газохроматографических параметров для определения N-нитрозаминов в моче осуществлялась с использованием аппаратно-программного комплекса на базе газового хроматографа "Кристалл-5000" с термоионным детектором (ТИД). Высокая эффективность метода достигнута путем подбора оптимальных условий газохроматографического анализа: термоионный детектор (ТИД), капиллярная колонка DB-624 - 30m\*0,32mm\*0,25µm, температурный режим: колонка - от 50°C-200°C; испаритель - 200°C; детектор - 250°C; расход газа-носителя 1 (азот) - 1,4 см<sup>3</sup>/мин; расход газа-носителя 2 (азот) - 20 см<sup>3</sup>/мин.

Учитывая, что не любой высаливатель пригоден для определения N-нитрозоаминов в моче, в процессе исследований для извлечения N-нитрозоаминов из мочи предлагаемым способом при выборе высаливателя

применяли нейтральные соли щелочных и щелочноземельных металлов (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaCl, NH<sub>4</sub>HPO<sub>4</sub>), а также смесь солей хлорида калия, K<sub>2</sub>HPO, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Прецизионность анализа и эффективность извлечения N-нитрозаминов из мочи устанавливали экспериментально способом «введено-найденно» с применением стандартных растворов. Средние значения полноты экстракции N-нитрозодиметиламина и N-нитрозодиэтиламина из мочи методом анализа равновесной паровой фазы с применением нейтральных солей при n=5 (n-число проб) и с вероятностью p=0,95 представлены в таблице 2.

Таблица 2

Средние значения полноты экстракции N-нитрозоаминов из образца мочи с добавлением различных солей (высаливателей)

Высаливатель	Введено	Найдено	Степень экстракции, %
ГМ-нитрозодиметиламин (концентрация, мкг/см <sup>-5</sup> )			
1. Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,2±0,015	0,180±0,042	90,0
2. K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2±0,022	0,107±0,039	53,5
3. NaCl	0,2±0,025	0,053±0,028	26,5
4. NH <sub>4</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2±0,019	0,120±0,084	60,0
5. Смесь солей хлорида калия, K <sub>2</sub> HPO, Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .	0,2±0,020	0,120±0,084	60,0
N-нитрозодиэтиламин (концентрация, мкг/см <sup>-*</sup> )			
1. Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,2±0,015	0,192±0,064	96,0
2. K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2±0,022	0,168±0,045	84,0
3. NaCl	0,2±0,025	0,133±0,014	66,5
4. NH <sub>4</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2±0,019	0,180±0,133	90,0
5. Смесь солей хлорида калия, K <sub>2</sub> HPO, Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,2±0,020	0,170±0,133	85,0

Данные, приведенные в таблице 2, показывают, что наибольшая полнота экстракции N-нитрозодиметиламина и N-нитрозодиэтиламина в моче

обеспечивается использованием в предлагаемом способе в качестве высаливателя - сульфата натрия.

Проведенные исследования показали все-таки недостаточно высокую полноту экстракции N-нитрозосоединений из мочи при отработанных параметрах пробоподготовки. Поэтому были проведены дополнительные исследования по изучению полноты экстракции из образца мочи изучаемых соединений с использованием различной массы сульфата натрия в качестве высаливающего реагента. Полученные результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3				
Средние значения полноты экстракции N-нитрозосоединений из образца мочи с использованием различной массы сульфата натрия (на 5 см <sup>3</sup> мочи)				
Масса высаливающего реагента, г	Соотношение объемного количества мочи к массе сульфата натрия	Введено	Найдено	Степень экстракции, %
N-нитрозодиметиламин (концентрация, мкг/см <sup>3</sup> )				
5	1:1	0,2±0,014	0,10±0,009	50
8	1:1,6	0,2±0,019	0,18±0,075	90
16	1:3,2	0,2±0,060	0,198±0,075	99
N-нитрозодиэтиламин (концентрация, мкг/см <sup>3</sup> )				
5	1:1	0,2±0,06	0,140±0,028	70
8	1:1,6	0,2±0,045	0,198±0,085	99
16	1:3,2	0,2±0,039	0,20±0,035	100

В процессе проведенных исследований установлено, что наибольшая степень извлечения N-нитрозоаминов из мочи методом анализа равновесной паровой фазы достигается при соотношении: 1 объемная часть пробы мочи к 3,2 массовой части сульфата натрия, и составила для N-нитрозодиметиламина - 99%, для N-нитрозодиэтиламина - 100%.

Таким образом, результаты исследований доказывают, что благодаря совокупности и последовательности операций предлагаемого способа, их режимам и достигается высокая степень точности и чувствительности определения N-нитрозодиметиламина и N-нитрозодиэтиламина в моче методом газохроматографического анализа.

При проведении исследований также проводили анализы проб мочи у детей (группа обследования), проживающих в условиях экологического неблагополучия с возможным влиянием N-нитрозоаминов на организм ребенка. Пробы мочи обрабатывали предлагаемым способом и по калибровочному графику определяли содержание компонентов в пробах. Полученные результаты приведены в таблице 4.

Таблица 4		
Содержание N-нитрозодиметиламина и N-нитрозодиэтиламина в моче детей группы обследования, проживающих в условиях экологического неблагополучия, установленных предлагаемым способом		
№ пробы	N-нитрозодиметиламин	N-нитрозодиэтиламин
Концентрация, мкг/см <sup>3</sup>		
1	0	0,023
2	0,003	0,005
3	0,0022	0,0028
4	0	0,0015
5	0	0,0021
6	0,0026	0,002

Исследования показали, что предлагаемый способ позволяет с высокой степенью точности и чувствительности выполнять определение N-нитрозоаминов (N-нитрозодиметиламина и N-нитрозодиэтиламина) в моче в диапазоне концентраций от

0,04 до 0,6 мкг/см<sup>3</sup> (концентрация N-нитрозодиметиламина и N-нитрозодиэтиламина табл.4 в моче детей определена на уровне нижнего предела определения, который составляет для методики 0,002 мкг/см<sup>3</sup>), при погрешности метода 23,5% при оптимальных параметрах газохроматографического анализа и пробоподготовки. Установлено, что наибольшая степень извлечения N-нитрозоаминов из мочи методом анализа равновесной паровой фазы (предлагаемым способом) достигается при использовании высаливающего реагента сульфата натрия, при соотношении: 1 объемная часть пробы мочи к 3,2 массовой части сульфата натрия, и составила для N-нитрозодиметиламина - 99%, для N-нитрозодиэтиламина - 100%.

#### Формула изобретения

1. Способ количественного определения N-нитрозодиметиламина и N-нитрозодиэтиламина в моче методом газохроматографического анализа, включающий отбор пробы мочи, подготовку ее к анализу и количественное определение нитрозоамина в пробе методом газохроматографического анализа, отличающийся тем, что подготовку пробы мочи к анализу производят путем добавления к ней сульфата натрия при соотношении 1 объемная часть пробы к 3,2 массовой части сульфата натрия, с последующим нагревом смеси на водяной бане до установления фазового равновесия, последующего отбора образовавшейся парогазовой пробы и введения этой пробы в капиллярную колонку газохроматографа, далее осуществляют газохроматографическое разделение N-нитрозодиметиламина и N-нитрозодиэтиламина, а количество каждого указанного вещества устанавливают по градуировочному графику.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что газохроматографическое разделение N-нитрозодиметиламина и N-нитрозодиэтиламина осуществляют с использованием газового хроматографа с термоионным детектором на капиллярной колонке DB-624 - 30m\*0,32mm\*0,25µm, при температурном режиме: колонка - от 50°C-200°C; испаритель - 200°C; детектор - 250°C; расход газа-носителя - азота - 20 см<sup>3</sup>/мин, с делением потока 1:14,3.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что нагрев смеси на водяной бане осуществляют в течение 5 минут.

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что отбор образовавшейся парогазовой пробы производят шприцом, нагретым до температуры 60±5°C.