

© Т.С. Уланова^{1,2}, Т.В. Нурисламова^{1,2}, О.А. Мальцева¹

¹ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения»

²ФГБОУ ВО «Пермский национальный исследовательский политехнический университет»

г. Пермь, Россия

МЕТОДИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ МОНИТОРИНГА N-НИТРОЗАМИНОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДАХ (МОЧА) ДЛЯ СКРИНИНГОВОГО ОБСЛЕДОВАНИЯ ДЕТСКОГО НАСЕЛЕНИЯ

Аннотация. Приведены результаты экспериментальных исследований по разработке методики определения N-нитрозодиметиламина (N-НДМА) и N-нитрозодиэтиламина (N-НДЭА) в биологической жидкости (моча) методом капиллярной газовой хроматографии. Высокая эффективность экстракции N-нитрозоаминов из образцов мочи для N-нитрозодиметиламина – 99% и N-нитрозодиэтиламина – 100% достигнута применением в качестве высаливающего реагента сульфата натрия в количестве 16 г в сочетании с анализом равновесной паровой фазы и капиллярной газовой хроматографии. Исследование образцов мочи детского населения, выполненное разработанной методикой, позволило определить средние концентрации N-нитрозоаминов в пробах мочи обследуемой группы детей на уровне $0,00083 \pm 0,00033$ ($p=0,018$) для N-НДМА мг/дм³ и N-НДЭА $0,00042 \pm 0,00011$ ($p=0,00$) мг/дм³, контрольной группы для N-НДМА $0,00012 \pm 0,00006$ ($p=0,047$) и N-НДЭА $0,00018 \pm 0,00007$ ($p=0,014$) мг/дм³.

Ключевые слова: N-нитрозамины (N-нитрозодиметиламин, N-нитрозодиэтиламин), биопроба, параметры экстракции, высаливающие реагенты, равновесная паровая фаза.

© T.S. Ulanova^{1,2}, T.V. Nurislamova^{1,2}, O.A. Maltseva¹

¹Federal Scientific Center for Medical and Preventive Population Health Risk Management Technologies

²Perm National Research Polytechnic University

Perm, Russia

METHODICAL MAINTENANCE OF MONITORING OF N-NITROSAMINES IN BIOLOGICAL FLUIDS (URINE) FOR CHILD POPULATION SCREENING

Abstract. The results of experimental studies on the development of methods for determining N-Nitrosodimethylamine (N-NDMA) and N-Nitrosodiethylamine (N-NDEA) in biological fluid (urine) by capillary gas chromatography are provided. A high extraction efficiency of N-nitrosamines from urine samples for N-nitrosodimethylamine - 99% and N-nitrosodiethylamine - 100% was achieved using sodium as sulphate salting out agent in the amount of 16 g in combination with equilibrium vapor phase analysis and capillary gas chromatography. The study of urine samples of child population, performed by the developed method, made it possible to determine the average concentration of N-nitrosamines in urine samples of the surveyed group of children at the level of 0.00083 ± 0.00033 ($p = 0.018$) for N-NDMA mg/dm³ and N-NDEA 0.00042 ± 0.00011 ($p = 0.00$) mg / dm³, the control group for N-NDMA 0.00012 ± 0.00006 ($p = 0.047$) and N-NDEA 0.00018 ± 0.00007 ($p = 0.014$) mg / dm³.

Keywords: N-nitrosamines (N-nitrosodimethylamine, N-nitrosodiethylamine), bioassay, extraction parameters, salting-out agents, equilibrium vapor phase.

Введение. Состояние здоровья населения является одним из важных показателей благополучия общества, отражающих характер экономических и социальных тенденций в стране [4]. Высокий уровень заболеваемости в Российской Федерации свидетельствует о сложившейся кризисной ситуации, необходимости углубленного изучения и принятия неотложных мер по улучшению здоровья населения [6]. Особенно тревожна эта тенденция среди детей и подростков, организм которых находится в стадии роста и при взаимодействии даже с минимально неблагоприятными факторами среды реагирует патологией развития [1].

Существенный вклад факторов окружающей среды в развитие различного вида патологии у детей делает необходимым совершенствование нормативной и методической базы контроля за загрязнителями химической и биологической природы [2]. Для формирования групп риска и проведения профилактических и оздоровительных мероприятий необходимо учитывать взаимоотношения между состоянием здоровья детского населения и факторами среды обитания, которые являются индикаторами риска [5]. Экспозиция человека в условиях загрязненной воздушной среды может приводить к различным эффектам в зависимости от величины, продолжительности и повторяемости воздействия. Известно, что N-нитрозамины – высоко токсичные вещества 1-го класса опасности, входят в список приоритетных токсикантов, утвержденных Международной организацией по исследованию рака (IARC) и Агентством по охране окружающей среды (США) [7]. Воздействие нитрозаминов заключается как в общетоксическом влиянии на организм, так и в появлении специфических и отдаленных эффектов (аллергическое, мутагенное, тератогенное или канцерогенное воздействие) [3].

В связи с этим представляется актуальной разработка неинвазивной селективной и высокочувствительной методики определения N-нитрозаминов в биологических средах (моча) для скрининговых

обследований детей, проживающих на экологически неблагоприятных территориях.

Материалы и методы исследований. Исследования выполнялись специалистами химико-аналитического отдела ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения». Объектами исследований являлись стандартные образцы N-нитрозаминов, образцы мочи, технология разработки газохроматографической методики: хроматографическое поведение исследуемых соединений на различных неподвижных жидких фазах, отработка оптимального способа пробоподготовки и концентрирования с использованием высаливающих реагентов.

Исследования стандартных образцов N-нитрозаминов и проб мочи выполняли методом капиллярной газовой хроматографии на хроматографе «Кристалл-5000» (Россия) с использованием специфического к N-нитрозамину термоионного детектора и аналитической колонки серии DB-624-30m*0,32mm*1,8µm. Для исключения влияния изменений температуры и общего давления на точность анализа при количественных измерениях применяли технику пневматического парофазного дозирования биологических проб в капиллярную колонку хроматографа дозатором DANI HSS 86.50 HEAD SPACE SAMPLER (Италия). На основании результатов предварительных экспериментальных исследований установлены оптимальные условия хроматографирования. Для построения градуировочных графиков готовили серию стандартных растворов N-нитрозаминов различной концентрации.

Экспериментальные исследования. В процессе разработки методики газохроматографического анализа учитывали факторы, влияющие на разделение изучаемых и матричных соединений: характеристики колонки (геометрические размеры – длина и внутренний диаметр), тип неподвижной жидкой фазы, толщину пленки в колонке, природу газа-носителя и его

скорость, температуру колонки. Изучены условия разделения на капиллярных колонках с различными характеристиками неподвижных жидких фаз: DB-624, HP-FFAP, HP-Plot/U, HP-VOC. Оптимальное разделение N-нитрозаминов (N-нитрозодиметиламина и N-нитрозодиэтиламина) с матричными компонентами было достигнуто на капиллярной колонке серии DB-624 длиной 30 метров и толщиной пленки неподвижной фазы 1,8 μm . Для повышения чувствительности и оптимизации селективности определения варьировали температуру колонки, скорость нагревания, расход и деление потока газа-носителя. Оптимальные газохроматографические параметры представлены в таблице 1.

Таблица 1

Газохроматографические параметры для определения летучих N-нитрозаминов в моче

Режим	Температура, $^{\circ}\text{C}$		Расход газа-носителя, мл/мин	Деление потока азот: воздух
	Колонка	Скорость нагревания, $^{\circ}\text{C}/\text{мин}$		
1	50–100–200	10	20	1:14
2	70–160–180	15	30	1:20
3	70–160–200	25	30	1:0

При температуре колонки в режиме линейного программирования 50–200 $^{\circ}\text{C}$ со скоростью программирования 10 $^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, температуре испарителя 200 $^{\circ}\text{C}$, детектора 320 $^{\circ}\text{C}$, расходе газа-носителя 20 мл/мин и делении потока 1:14 не наблюдалось интерференций с компонентами матрицы. Количественное определение N-нитрозодиметиламина и N-нитрозодиэтиламина в биологической среде осуществляли методом газохроматографического анализа равновесной паровой фазы. Хроматограмма стандартного раствора N-нитрозаминов при оптимально подобранных условиях анализа методом капиллярной газовой хроматографии представлена на рисунке 1.

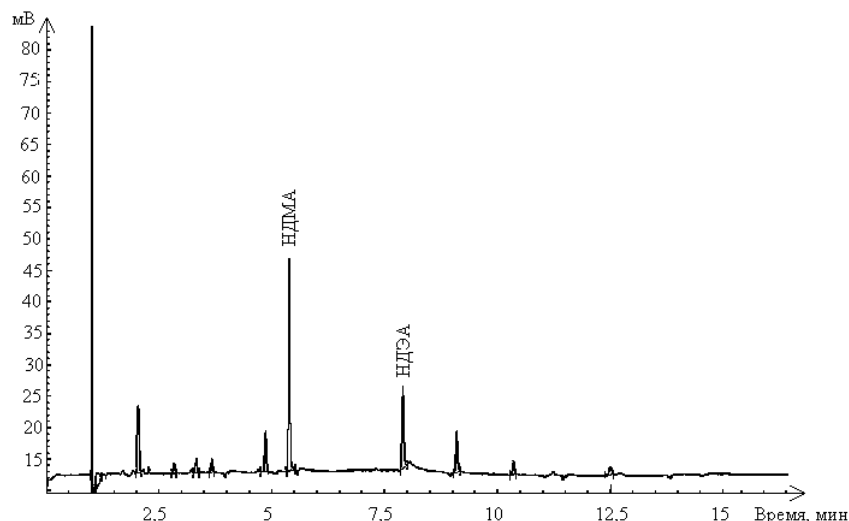


Рис.1. Хроматограмма стандартного раствора с содержанием N-нитрозаминов ($C_{\text{НДМА}}=0,05$ мг/дм³, $C_{\text{НДЭА}}=0,047$ мг/дм³)

При отработке способа подготовки пробы мочи к хроматографическому анализу и достижения оптимальной степени экстракции N-нитрозодиметиламина и N-нитрозодиэтиламина апробированы и подобраны различные условия процедуры экстракции. Для повышения эффективности экстракции использовали применение нейтральных солей щелочных и щелочноземельных металлов (Na_2SO_4 , K_2HPO_4 , NaCl , NH_4HPO_4 и смеси солей хлорида калия, K_2HPO_4 , Na_2SO_4) в качестве высаливающих реагентов с добавлением в образец мочи одинаковой и различной массы способом «введено–найдено» на основе стандартных растворов. Для этого в исследуемый образец мочи в объеме 5 см³ добавляли стандартный раствор N-нитрозодиметиламина и N-нитрозодиэтиламина, высаливающий реагент и помещали в замкнутую систему дозатора равновесного пара. После установления фазового равновесия в изотермических условиях газохроматографическим методом измеряли равновесную концентрацию N-нитрозоаминов в газовой фазе над исследуемым образцом мочи. Средние значения полноты экстракции N-нитрозодиметиламина и N-нитрозодиэтиламина из мочи методом анализа равновесной паровой фазы с

применением нейтральных солей щелочных и щелочноземельных металлов представлены в табл.2.

Таблица 2

Средние значения полноты экстракции N-нитрозоаминов из образца мочи с добавлением различных солей (n=5 и p=0,95)

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

Проведенные исследования показали недостаточно высокую полноту экстракции N-нитрозоаминов (для N-нитрозодиметиламина 90% и N-нитрозодиэтиламина 96%) из биосреды при отработанных параметрах пробоподготовки, а именно добавлением к образцу мочи одинаковой массы высаливающих реагентов. Поэтому были проведены дополнительные исследования по изучению полноты экстракции изучаемых соединений из образца мочи с использованием различной массы сульфата натрия в качестве высаливающего реагента. Полученные результаты представлены в табл.3.

Таблица 3

Средние значения полноты экстракции N-нитрозаминов из образца мочи с использованием различной массы сульфата натрия

Масса высаливающего реагента, г	Введено	Найдено	Степень экстракции, %
N-нитрозодиметиламин (концентрация, мг/дм ³)			
5	0,2±0,014	0,10±0,009	50
8	0,2±0,019	0,18±0,075	90
16	0,2±0,060	0,198±0,075	99
N-нитрозодиэтиламин (концентрация, мг/дм ³)			
5	0,2±0,06	0,140±0,028	70
8	0,2±0,045	0,198±0,085	99
16	0,2±0,039	0,20±0,035	100

В процессе проведенных исследований установлено, что наибольшая степень извлечения N-нитрозаминов из образца мочи методом анализа равновесной паровой фазы достигается при использовании высаливающего реагента сульфата натрия в количестве 16 г и составляет для N-нитрозодиметиламина 99%, для N-нитрозодиэтиламина 100%.

Результаты и обсуждение. Разработанной газохроматографической методикой определения N-нитрозаминов в биологической среде проанализированы образцы мочи детей, проживающих в зоне экспозиции и на территории относительного санитарно-эпидемиологического благополучия. Результаты выполненного количественного анализа образцов мочи обследуемой и контрольной групп детей с использованием разработанной методики представлены в табл.4.

Таблица 4

Результаты химического анализа образцов мочи на содержание N-нитрозаминов обследуемой и контрольной групп детей (p<0,01-0,05)

Контроль, (M±m), мг/дм ³ (n=41)		Обследуемая группа, (M±m), мг/дм ³ (n=29)	
N-НДМА	N-НДЭА	N-НДМА	N-НДЭА
0,00012±0,00006	0,00018±0,00007	0,00083±0,00033	0,00042±0,00011

Количество образцов мочи детей обследуемой группы с повышенным содержанием N-нитрозаминов составило для N-НДМА 21% и N-НДЭА 37,9%. Средняя концентрация N-нитрозаминов в пробах мочи обследуемой группы детей установлена на уровне $0,00083 \pm 0,00033$ ($p=0,018$) для N-НДМА мг/дм³ и N-НДЭА $0,00042 \pm 0,00011$ ($p=0,00$) мг/дм³; контрольной для N-НДМА $0,00012 \pm 0,00006$ ($p=0,047$) и N-НДЭА $0,00018 \pm 0,00007$ ($p=0,014$) мг/дм³.

Минимальная и максимальная концентрации N-нитрозаминов в моче детей соответственно для N-НДМА $C_{\min}=0,001 \pm 0,0001$ и $C_{\max}=0,0068 \pm 0,0015$ мг/дм³, для N-НДЭА $C_{\min}=0,001 \pm 0,0002$ и $C_{\max}=0,0016 \pm 0,0001$ мг/дм³. Хроматограмма образца мочи пациента группы обследования представлена на рисунке 2.

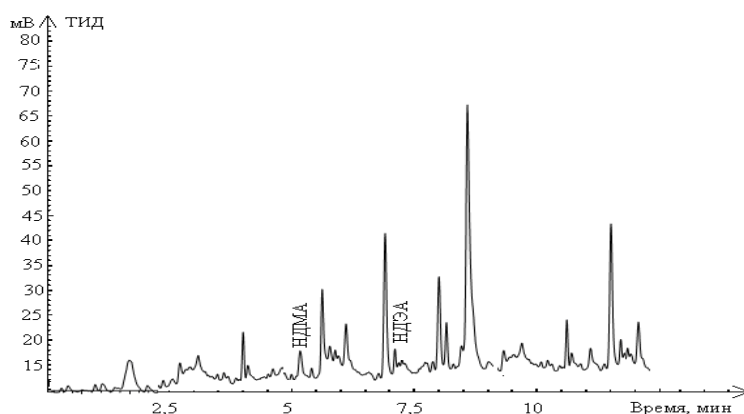


Рис.2. Хроматограмма образца мочи пациента группы обследования $C_{\text{НДМА}}=0,0036$ мг/дм³ и $C_{\text{НДЭА}}=0,001$ мг/дм³

Проведенные химико-аналитические исследования показали, что средние концентрации N-нитрозаминов в образцах мочи детей, проживающих в зоне экспозиции, достоверно выше, чем у детей контрольной группы в 6,9 раз для N-НДМА и в 2,3 раза N-НДЭА.

Таким образом, разработанная газохроматографическая методика определения N-нитрозаминов позволяет адекватно диагностировать химическую нагрузку в моче детей, что является доказательным звеном воздействия химических факторов окружающей среды на здоровье и может

быть использована в качестве неинвазивного диагностического исследования при обследовании детского населения.

Список литературы:

1. Баранов А.А., Кучма В.Р., Сухарева Л.М. Чубаровский В.В., Рапопорт И.К., Даниленко О.В., Гончарова Г.А., Павлович К.Э., Бережков Л.Ф., Ильин А.Г., Куинджи Н.Н. Методы оценки здоровья детей и подростков на основе массовых профилактических медицинских осмотров. // Здоровье здорового человека. Научные основы восстановительной медицины. Под ред. А.Н. Разумова, В.И. Покровского – М. – 2007. – С. 125-133.

2. Малышева А.Г, Рахманин Ю.А. Физико-химические исследования и методы контроля веществ в гигиене окружающей среды. – СПб.: НПО «Профессионал», 2012. – 720 с.

3. Нитраты, нитриты и N-нитрозосоединения. Женева: Всемирная организация здравоохранения.– 1981. – 118 с.

4. Онищенко Г.Г. Влияние состояния окружающей среды на здоровье населения. Нерешенные проблемы и задачи. // Гигиена и санитария – 2003.– №1. – С. 310.

5. Онищенко Г.Г., Рахманин Ю.А., Зайцева Н.В., Землянова М.А., Акатова А.А. /Научно-методические аспекты обеспечения гигиенической безопасности населения в условиях воздействия химических факторов. //М., МИГ «Медицинская книга». 2004. – С.109-119.

6. Рахманин Ю.А., Новиков С.М., Румянцев Г.И. Методологические проблемы оценки угроз здоровью человека факторов окружающей среды. // Гигиена и санитария – 2003. – №6. – С.5-10.

7. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks for Humans, Lyon, 1987, Suppl. 7. v. 1-42.

References

1. Baranov A.A., Kuchma V.R., Sukhareva L.M. Chubarovskiy V.V., Rapoport I.K., Danilenko O.V., Goncharova G.A., Pavlovich K.E., Berezhkov L.F., Il'in A.G., Kuindzhi N.N. Metody otsenki zdorov'ya detey i podrostkov na osnove massovykh profilakticheskikh meditsinskikh osmotrov [Methods of assessment of children and adolescents` health based on mass preventive medical examinations]. Health of a healthy man. Scientific basis of restorative medicine. Edited by Razumov A.N., Pokrovskiy V.I. Moscow, 2007. pp. 125-133. (in Russian).

2. Malysheva A.G, Rakhmanin Yu.A. Fiziko-khimicheskie issledovaniya i metody kontrolya veshchestv v gigiene okruzhayushchey sredy [Physical-chemical

investigations and methods of control of substances in environment hygiene]. St. Petersburg: NPO «Professional», 2012. 720 p. (in Russian).

3. Nitraty, nitrity i N-nitrozosoedineniya [Nitrates, nitrites and N-nitroso compounds]. Geneva: World Health Organization. 1981. 118 p. (in Russian).

4. Onishchenko G.G. Vliyaniye sostoyaniya okruzhayushchey sredy na zdorov'e naseleniya. Nereshennyye problemy i zadachi [Influence of environment condition on population`s health. Unsolved problems and goals]. *Gigiena i sanitariya*, 2003, no. 1, pp. 310 (in Russian).

5. Onishchenko G.G., Rakhmanin Yu.A., Zaytseva N.V., Zemlyanova M.A., Akatova A.A. Nauchno-metodicheskie aspekty obespecheniya gigienicheskoy bezopasnosti naseleniya v usloviyakh vozdeystviya khimicheskikh faktorov [Scientific-methodical aspects of providing hygienic safety of population under the conditions of chemical factors influence]. Moscow: «Meditsinskaya kniga». 2004. pp. 109-119. (in Russian).

6. Rakhmanin Yu.A., Novikov S.M., Rumyantsev G.I. Metodologicheskie problemy otsenki ugroz zdorov'yu- cheloveka faktorov okruzhayushchey sredy [Methodical problems of assessment of dangers to human health by environmental factors]. *Gigiena i sanitariya*, 2003, no. 6, pp. 5-10 (in Russian).

7. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks for Humans. Lyon, 1987, suppl. 7, vol. 1-42.

Уланова Татьяна Сергеевна – зав. отделом химико-аналитических методов исследования Федерального бюджетного учреждения науки «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», д-р биол. наук. Тел. (342)-233-10-37, e-mail: ulanova@fcrisk.ru; профессор кафедры охраны окружающей среды ФГБОУ ВО «Пермский национальный исследовательский политехнический университет»

Нурисламова Татьяна Валентиновна – зав. лабораторией методов газовой хроматографии Федерального бюджетного учреждения науки «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», д-р биол. наук. Тел. (342)-233-10-37, e-mail: nurtat@fcrisk.ru; профессор кафедры охраны окружающей среды ФГБОУ ВО «Пермский национальный исследовательский политехнический университет»

Мальцева Ольга Андреевна – химик лаборатории методов газовой хроматографии Федерального бюджетного учреждения науки «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения». Тел. (342)-233-10-37.

ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения». Россия, 614045, г. Пермь, ул. Монастырская, 82

ФГБОУ ВПО Пермский национальный исследовательский политехнический университет. 614990, Россия, г. Пермь, Комсомольский пр., 29

Ulanova Tatyana Sergeevna – Doctor of Biological Science, head of the department of chemical-analytical investigation methods, Federal Scientific Center for Medical and Preventive Population Health Risk Management Technologies, professor of the department of environmental protection, Perm National Research Polytechnic University, phone: (342)-233-10-37, e-mail: ulanova@fcrisk.ru

Nurislamova Tatyana Valentinovna – Doctor of Biological Science, head of the laboratory of gas chromatography methods, Federal Scientific Center for Medical and Preventive Population Health Risk Management Technologies, professor of the department of environmental protection, Perm National Research Polytechnic University, phone: (342)-233-10-37, e-mail: nurtat@fcrisk.ru

Maltseva Olga Andreevna – chemist of the laboratory of gas chromatography methods, Federal Scientific Center for Medical and Preventive Population Health Risk Management Technologies, phone: (342)-233-10-37

Federal Budgetary Scientific Institution “Federal Scientific Center for Medical and Preventive Population Health Risk Management Technologies”, 82, Monastyrskaya street, Perm, 614045, Russia.

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Professional Training “Perm National Research Polytechnic University”. 29, Komsomol av., Perm, 614990, Russia.