



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **71255**

(13) **U**

(51) МПК

G01N 33/48 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2011 14828**

(22) Дата подання заявки: **13.12.2011**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **10.07.2012**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **10.07.2012, Бюл.№ 13**

(72) Винахідник(и):

**Черниченко Ігор Олексійович (UA),
Соверткова Лариса Степанівна (UA),
Баленко Ніна Василівна (UA)**

(73) Власник(и):

**ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ
ГІГІЄНИ ТА МЕДИЧНОЇ ЕКОЛОГІЇ ІМ. О.М.
МАРЗЄЄВА НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ
МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ",
вул. Попудренка, 50, м. Київ-94, 02094 (UA)**

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ КАНЦЕРОГЕННИХ N-НІТРОЗАМІНІВ У БІОЛОГІЧНОМУ МАТЕРІАЛІ

(57) Реферат:

Спосіб визначення канцерогенних N-нітрозамінів в біологічному матеріалі включає виділення N-нітрозамінів з матеріалу та визначення їх кількості. N-нітрозаміни виділяють з матеріалу за допомогою ультразвуку шляхом подрібнення та екстракції з подальшим центрифугуванням для розділення шарів екстракту.

UA 71255 U

Корисна модель належить до галузі досліджень біологічного матеріалу, зокрема, для визначення вмісту канцерогенних N-нітрозамінів (НА) в біологічних середовищах і може бути використана при вивченні дії шкідливих чинників довкілля на біологічні об'єкти.

Відомим є спосіб визначення летких з водяною парою N-нітрозамінів у різних середовищах, який включає сумарне визначення N-нітрозамінів за продуктами їх розкладу бромистоводневою кислотою в оцтовокислому середовищі, подальшим діазотуванням вільного NO^+ реактивом Грися та виміром оптичної густини за допомогою фотоколориметра [див. Кульдяє Л.А. "Обнаружение и суммарное определение N-нитрозаминов в пищевых продуктах, лекарственных средствах и других средах. - Таллин, 1984. - С. 13].

Недоліками цього способу є визначення суми вмісту всіх НА і неможливість кількісного визначення кожного з представників цього класу, а також недостатня точність визначення речовин за продуктами їх перетворення та довготривале виділення НА з проби перегонкою з водяною парою. Крім того, робота з бромистим воднем, який використовують для приготування реактиву, є небезпечною для здоров'я.

Найбільш близьким до заявленого за технічною суттю є спосіб газохроматографічного визначення кожного з N-нітрозамінів у сировині та продуктах харчування, який базується на виділенні НА із гомогенізованої проби продукту масою 100-300 г двоступеневою дистиляцією з водяною парою та подальшою екстракцією НА хлористим метиленом, [див. СанПіН 4.4.2.030-1999 "Державні санітарні правила та норми захисту продовольчої сировини та продуктів харчування від забруднення нітрозаминами", К., 2001. - С. 21].

Недоліками цього способу також є довготривала перегонка з водяною парою та при цьому низький коефіцієнт вилучення N-нітрозамінів з проби ($K_{\text{вилуч}}=0,75$). Крім того, пробопідготовка зразків, яка передбачає використання великої кількості матеріалу, взагалі робить неможливим цей спосіб для роботи з біологічними зразками, кількість яких завжди обмежена особливостями (межами) біологічного експерименту.

В основу розробки способу поставлено задачу експресного та чутливого визначення мікрокількостей індивідуальних канцерогенних N-нітрозамінів в біологічному матеріалі.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі визначення канцерогенних N-нітрозамінів в біологічному матеріалі, який включає виділення їх з матеріалу з наступним визначенням їх кількості, згідно із корисною моделлю, N-нітрозаміни виділяють із матеріалу за допомогою ультразвуку шляхом подрібнення та екстракції з подальшим центрифугуванням для розділення шарів екстракту.

Запропонований спосіб характеризується значним скороченням часу проведення дослідів, що важливо для надто летких речовин, якими є нітрозаміни, та підвищенням коефіцієнта вилучення N-нітрозамінів із проби за рахунок використання ультразвукового диспергатора для подрібнення проби та екстракції, а також центрифуги для відділення шару розчинника. Це дозволило скоротити час обробки проби з 2-3 годин до 15 хвилин. Крім того, підвищення коефіцієнту вилучення N-нітрозамінів із проби дозволило зменшити кількість дослідного матеріалу, тобто скоротити кількість тварин в експерименті.

Спосіб реалізується наступним чином. Зразок біологічного матеріалу поміщають у розчинник - метилен хлористий та піддають дії ультразвукової вібрації за допомогою ультразвукового диспергатора УЗДН-1, де відбувається як дрібно дисперсне подрібнення зразка, так і екстрагування досліджуваних речовин у розчинник. Наступний етап - розділення шарів екстракту за допомогою центрифуги при швидкості 3000 об/хв. Ідентифікацію та кількісне визначення вмісту N-нітрозамінів в метилени хлористому здійснюють шляхом введення сконцентрованої проби в систему газового хроматографа з термоіонним детектором.

Приклад здійснення способу:

Органи дослідних декапітованих тварин (щурів), зокрема печінки, масою 20-30 г заливали розчинником - дихлорметаном у кількості 20 мл на кожні 10 г біологічного матеріалу, подрібнювали та екстрагували за допомогою ультразвукового диспергатора УЗДН-1 (експозиція - 2-3 хв., настройка на резонансну частоту виконується за максимумом кавітаційного шуму на слух чи візуально за максимальною величиною фонтана рідини) три рази. Утворену суміш розділяли за допомогою центрифуги 3 хв. - 3000 об/хв. Дихлорметановий шар збирали та концентрували до об'єму 1 мл на ротаційному випарнику при температурі близько 40 °С. 2 мкл екстракту вводили у систему газового хроматографа з термоіонним детектором. Умови хроматографування:

температура термостата - 100 °С;

температура детектора - 300 °С;

температура випарника - 200 °С;

хроматографічна колонка -2 м, Inerton AW (0,16-0,20), 10 % Carbowax 20M.

Кількісне визначення N-нітрозодиметиламіну (НДМА) та N-нітрозодіетиламіну (НДЕА), як найбільш поширених та активних в біологічному відношенні нітрозамінів, проводили за калібрувальними графіками залежності площі хроматографічного піка від кількості НДМА та НДЕА у калібрувальних розчинах (шкала з п'яти стандартних розчинів різних концентрацій, які відповідають масі 0,1 мкг; 0,5 мкг; 1,0 мкг; 1,5 мкг; 2,0 мкг кожного N-нітрозаміну - НДМА та НДЕА у дихлорметані).

Для перевірки можливості виділення N-нітрозамінів НДМА і НДЕА із зразків та обчислення коефіцієнта, що показує ступінь добування цих сполук з проби, готували серію дослідів з внесенням відомої кількості досліджуваної речовини, наприклад, НДЕА у зразки видаленої печінки щурів контрольної групи в експерименті на білих щурах, та подальшою обробкою проби вищезазначеним способом. Результати наведено у таблиці 1.

Таблиця 1

Визначення середнього коефіцієнта виділення досліджуваних речовин з проб біологічного матеріалу

№	Кількість проб n	Внесено НДЕА, мкг	Визначено НДЕА, мкг	Коефіцієнт виділення $K_{\text{вид.}}$	Середній коефіцієнт виділення K
1	3	0,50	0,42±0,02	0,84	0,85
2	3	5,00	4,05±0,15	0,81	
3	3	10,00	8,90±0,38	0,89	

Вміст N-нітрозамінів у зразку обчислювали за формулою:

$$X = \frac{C_{\text{пр}}}{m \times k}$$

$C_{\text{пр}}$ - кількість речовини в пробі (знаходиться за калібрувальним графіком), мкг;

m - маса досліджуваного зразка, г;

k - коефіцієнт, що показує ступінь виділення НА з проби.

Результати обробки проб з урахуванням коефіцієнта, що показує ступінь виділення НА з проби наведено у таблиці 2.

Таблиця 2

Вміст N-нітрозодиметиламіну і N-нітрозодіетиламіну у внутрішніх органах дослідних тварин під час впливу попередників НА (діоксиду азоту, амідопірину, нітриту натрію)

Час спостережень	Найменування органу	Вміст НДМА, мкг/г		Вміст НДЕА, мкг/г	
		дослід	контроль	дослід	контроль
На 15 добу впливу попередників	Печінка	0,0064	відс.	0,0030	відс.
	Легені	0,0084	відс.	0,0030	відс.
	Нирки	0,0090	відс.	0,0060	відс.
На 30 добу впливу попередників	Печінка	0,0071	відс.	0,0035	0,018
	Легені	0,0080	відс.	0,0040	відс.
	Нирки	0,0125	відс.	0,0062	відс.

Таким чином, запропонований спосіб дає можливість в умовах біологічного експерименту визначати кількість кожного з нітрозамінів у біологічному матеріалі більш оперативно та з високим ступенем точності, використовуючи при цьому малі кількості дослідного матеріалу.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб визначення канцерогенних N-нітрозамінів в біологічному матеріалі, що включає виділення N-нітрозамінів з матеріалу та визначення їх кількості, який відрізняється тим, що N-нітрозаміни виділяють з матеріалу за допомогою ультразвуку шляхом подрібнення та екстракції з подальшим центрифугуванням для розділення шарів екстракту.

Комп'ютерна верстка В. Мацело

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601