

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ  
Заместитель Министра,  
Главный государственный  
санитарный врач

\_\_\_\_\_ М.И. Римжа

5 января 2006 г.

Регистрационный № 107-1006

**МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ НИТРОЗАМИНОВ В ПИЩЕВЫХ  
ПРОДУКТАХ И ПРОДОВОЛЬСТВЕННОМ СЫРЬЕ  
ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: Республиканский научно-практический  
центр гигиены

АВТОРЫ: Н.И. Марусич, А.Л. Перцовский, Н.П. Лешошук, Н.Н. Турко, И.Н.  
Масалов

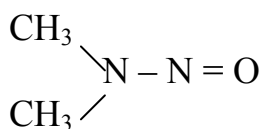
Минск 2007

Настоящая инструкция предлагает методику идентификации и выполнения измерений массовой концентрации (далее — концентрация) суммы летучих нитрозаминов (далее — НА), диметилнитрозаминов (далее — ДМНА) и диэтилнитрозаминов (далее — ДЭНА) в пищевых продуктах (мясных и колбасных изделиях, в рыбе и рыбных изделиях, в детском питании на основе мясных и рыбных продуктов) и продовольственном сырье (в зерне) методами газожидкостной хроматографии с детектором электронного захвата (далее — ДЭЗ) и жидкостной хроматографии с флуоресцентным детектором.

Настоящая инструкция предназначена для органов и учреждений, осуществляющих государственный санитарный надзор, для научно-исследовательских учреждений и других заинтересованных организаций.

### **Краткая характеристика исследуемых веществ**

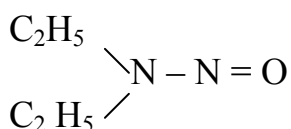
*Структурная формула ДМНА:*



Молекулярная масса — 74,08.

Диметилнитрозамин — маслянистая жидкость, плотность (далее —  $d^{18}$ ) 1,005, температура кипения 152–153 °С, растворим в воде, этаноле, эфире и других органических растворителях. ДМНА обладает широким спектром токсического действия и может вызывать опухоли различной локализации.

*Структурная формула ДЭНА:*



Молекулярная масса — 102,13.

ДЭНА — маслянистая жидкость,  $d^{20} = 0,9422$ , температура кипения 176,9 °С, растворим в воде, этаноле, эфире и других органических растворителях. ДЭНА обладает широким спектром токсического действия и может вызывать опухоли различной локализации.

В соответствии с Санитарными правилами и нормами 11-63 РБ 98 «Гигиенические требования к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов», утвержденными постановлением Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь от 02.07.98 г. № 22, предельно допустимая концентрация (ПДК) НА в мясе, мясных изделиях, колбасах — не более 0,002 мг/кг, в копченостях — не более 0,004 мг/кг, в рыбе свежей — не более 0,003 мг/кг, в продуктах для детского питания — не допускается при чувствительности метода не более 0,001 мг/кг, в зерне (пивной солод) — не более 0,015 мг/кг.

## **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ПРЕПАРАТОВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ**

- Хроматограф газожидкостной с ДЭЗ.  
Колонка хроматографическая капиллярная, длина 30 м, диаметр 0,1 мм.
- Хроматограф жидкостной с флуоресцентным детектором.  
Колонка НР С<sub>18</sub>.  
Весы аналитические ВЛА-200 (ГОСТ 34104-80Е).  
Весы лабораторные общего назначения (ГОСТ 19491-74).  
Барометр (ТУ 2504-1797-75).  
Термометр лабораторный шкальный ТЛ-2, цена деления 1°С, пределы измерения 0-55°С (ГОСТ 21 5-73Е).  
Микрошприц для хроматографа, МШ 10.  
Пипетки 1-1-1-0,1  
1-1-1-1  
1-1-1-2 (ГОСТ 29227-91).  
Колба мерная 2-10 (25, 100, 250, 500)-2 (ГОСТ 1770-74).  
Цилиндр мерный на 50, 100, 250 мл (ГОСТ 1770-74).  
Пробирка мерная на 5,10 мл.  
Ротационный вакуумный испаритель ИР-1М (ТУ 25-11-917-74).  
Воронки ВД-1-250 (ГОСТ 25336-82).  
Воронки конические, стеклянные диаметром 30-33 мм (ГОСТ 25336-82).
- Колба К<sub>н</sub>—1-100(250)-14/23 (29/32)ТС (ГОСТ 25336-82).  
Колба К<sub>г</sub>-50-14/23 ТС (ГОСТ 25336-82).  
Колба К-1-100 (250)-29/32 ТС (ГОСТ 25336-82).  
Мясорубка.  
Фарфоровые чашки для выпаривания<sup>1</sup>.  
Ацетонитрил, химически чистый (далее — х.ч.) (ТУ 6-09-3534-74).  
Кислота бромистоводородная, х.ч. (ТУ 6-09-1649-87).  
Кислота уксусная, х.ч. (ГОСТ 61-75).  
Ацетонитрил для хроматографии или сорт 5 «Криохром».  
Хлористый метилен, х.ч.  
Натрий серноокислый безводный, х.ч.  
Стандартный образец (далее — СО) ДМНА в метаноле 100 мкг/см<sup>3</sup>.  
СО ДЭНА в метаноле 100 мкг/см<sup>3</sup>.  
СО дипропилнитрозамин (далее — ДПНА) в метаноле 100 мкг/см<sup>3</sup>.  
Дансилхлорид.  
Вода дистиллированная (ГОСТ 3118-77).  
Кислота соляная, х.ч. (ГОСТ 4204-77).  
Кислота серная, х.ч. (ГОСТ 4328-77).  
Натрия гидроокись, х.ч. (ГОСТ 4201-79).  
Натрий углекислый кислый, х.ч. (ГОСТ 4233-77).  
Сульфаминовая или сульфаниловая кислота.  
Бензол, х.ч. (ГОСТ 5955-68).

Натрий хлористый, х.ч. (ГОСТ 4233-77).

Фильтры бумажные «синяя лента» (ТУ-6-09-1678-86).

Примечание 1 — Могут быть использованы другие средства измерений и вспомогательные устройства, по точности не уступающие рекомендованным в настоящей Инструкции.

Примечание 2 — Могут быть использованы реактивы и материалы, по техническим характеристикам отличающиеся от указанных, но не влияющие на результаты измерения настоящей Инструкции.

## **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПОСОБА**

Методика основана на выделении НА перегонкой с водяным паром и экстракции органическим растворителем, денитрозировании НА бромистым водородом в уксусной кислоте до соответствующих аминов, синтезе производных полученных аминов с 1-диметиламино-5-науталансульфохлоридом (далее — дансилхлоридом), разделении и количественном определении образовавшихся производных на газовом хроматографе с ДЭЗ или на жидкостном хроматографе с флуоресцентным детектором.

Диапазон измеряемых массовых долей НА — 0,0005–0,1 мг/кг при навеске анализируемой пробы 100 г.

Чувствительность жидкостного хроматографа с флуоресцентным детектором — 0,5 нг, газожидкостного хроматографа с ДЭЗ — 20 нг в анализируемом объеме пробы.

Идентификация производных НА проводится по времени удерживания, а количественное определение — методом абсолютной калибровки по градуировочному графику.

Метрологические значения методики характеризуются согласно приложению 1.

### **Требования безопасности**

- Помещение, в котором производится определение НА, обязательно должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией.

- Работать с НА следует в вытяжном шкафу с использованием индивидуальных средств защиты (очки, перчатки и др.).

- В лаборатории, где проводится работа с канцерогенными летучими НА, необходимо всегда иметь 2–4% раствор бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте для разрушения НА при попадании их на рабочие места и пол. В целях разрушения летучих НА в воздухе по окончании работы помещение необходимо обработать УФ-светом.

- Транспортировка и хранение НА осуществляется в стеклянных запаянных ампулах, обернутых в асбестовую ткань и упакованных в металлическую тару, которую оплавливают парафином.

- НА хранят в специальном холодильнике в отсутствие анализируемых проб.

### **Требования к квалификации оператора**

К выполнению измерений могут быть допущены лица, имеющие высшее или среднее специальное образование, изучившие требования безопасности и настоящую инструкцию.

### **Условия выполнения измерений**

Выполнение измерений в лаборатории по настоящей инструкции осуществляется при следующих условиях:

температура воздуха  $20 \pm 5$  °С;

атмосферное давление 84,0–106,7 кПа (630–800 мм рт. ст.);

влажность воздуха не более 80% при температуре 25°С.

### **Подготовка к определению**

#### ***Приготовление растворов***

##### *Раствор дансилхлорида с концентрацией 1 мг/см<sup>3</sup>*

Навеску дансилхлорида массой 25 мг помещают в мерную колбу вместимостью 25 см<sup>3</sup> и растворяют в 25 см<sup>3</sup> ацетонитрила. Готовый раствор хранят в холодильнике, тщательно предохраняя от попадания влаги. Срок хранения — не более 3 мес.

##### *3%-й раствор бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте (денитрозирующий раствор)*

В коническую колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup> вносят 5 см<sup>3</sup> 30%-й бромистоводородной кислоты и добавляют 45 см<sup>3</sup> ледяной уксусной кислоты. Смесь хранят в холодильнике в посуде из темного стекла. Срок хранения — не более 1 мес. Признаком непригодности смеси является появление желто-коричневой окраски.

##### *Буферный раствор с рН = 10,5*

В мерную колбу вместимостью 500 см<sup>3</sup> помещают 3,2 г NaOH и вливают 200 см<sup>3</sup> дистиллированной воды, перемешивают до полного растворения щелочи, добавляют 20,0 г NaHCO<sub>3</sub>. Тщательно перемешивают раствор до полного растворения соли, доводят объем смеси до метки дистиллированной водой. Хранят раствор в полиэтиленовой посуде. Срок хранения — 3 мес.

##### *Раствор соляной кислоты с концентрацией 1,5 н*

В мерную колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup> помещают 12 см<sup>3</sup> концентрированной соляной кислоты. Доводят объем смеси дистиллированной водой до метки, перемешивают. Срок хранения не ограничен.

##### *Раствор серной кислоты с концентрацией 1 н*

В мерную колбу вместимостью 250 см<sup>3</sup> помещают 200 см<sup>3</sup> дистиллированной воды. Добавляют 6,7 см<sup>3</sup> концентрированной серной кислоты. Доводят объем до метки дистиллированной водой и перемешивают. Срок хранения не ограничен.

##### *Рабочий раствор ДМНА с концентрацией 10 мкг/см<sup>3</sup>*

В мерную колбу вместимостью 10 см<sup>3</sup> помещают 1 см<sup>3</sup> стандартного образца состава ДМНА с концентрацией 100 мкг/см<sup>3</sup> и доводят объем до метки метиловым спиртом, перемешивают. Смесь хранится в посуде из темного стекла в холодильнике не более 1 года.

#### *Рабочий раствор ДЭНА с концентрацией 10 мкг/см<sup>3</sup>*

В мерную колбу вместимостью 10 см<sup>3</sup> помещают 1 см<sup>3</sup> стандартного образца состава ДЭНА с концентрацией 100 мкг/см<sup>3</sup> и доводят объем до метки метиловым спиртом, перемешивают. Смесь хранится в посуде из темного стекла в холодильнике не более 1 года.

#### *Рабочий раствор ДПНА с концентрацией 10 мкг/см<sup>3</sup>*

В мерную колбу вместимостью 10 см<sup>3</sup> помещают 1 см<sup>3</sup> стандартного образца состава ДПНА с концентрацией 100 мкг/см<sup>3</sup> и доводят объем до метки метиловым спиртом, перемешивают. Смесь хранится в посуде из темного стекла в холодильнике не более 1 года.

*Смесь ДМНА, ДЭНА и ДПНА с концентрациями компонентов 1, 4 и 5 мкг/см<sup>3</sup> соответственно*

В пробирке вместимостью 10 см<sup>3</sup> с притертой пробкой смешивают 1 см<sup>3</sup> раствора ДМНА (10 мкг/см<sup>3</sup>), 4 см<sup>3</sup> ДЭНА (10 мкг/см<sup>3</sup>) и 5 см<sup>3</sup> ДПНА (10 мкг/см<sup>3</sup>). Смесь хранится в посуде из темного стекла в холодильнике не более 1 мес.

#### *2%-й раствор сульфаминовой (сульфаниловой) кислоты*

2 г сульфаминовой (сульфаниловой) кислоты помещают в коническую колбу вместимостью 250 см<sup>3</sup>, растворяют при нагревании в 100 см<sup>3</sup> дистиллированной воды. Выдерживают смесь при комнатной температуре в течение 1 сут. Очищают раствор через бумажный фильтр «красная лента». Срок хранения — 1 год.

*Подвижная фаза для жидкостного хроматографа — смесь ацетонитрил:вода (2:1)*

В коническую колбу вместимостью 250 см<sup>3</sup> помещают 100 см<sup>3</sup> ацетонитрила. Добавляют 50 см<sup>3</sup> дистиллированной воды и тщательно перемешивают. Срок хранения не ограничен.

#### *Хлористый метилен*

Очистку хлористого метилена производят перегонкой с дефлегматором. При этом отбирают не более 80% растворителя от начального объема.

#### **Обработка градуировочных растворов**

##### *Проведение реакции денитрозирования — получение аминов*

В 5 колб для упаривания вливают по 60 см<sup>3</sup> хлористого метилена и в каждую колбу вносят смесь НА, приготовленную согласно настоящей инструкции (приложение 2). Содержимое в колбах хорошо перемешивают и добавляют в каждую по 2 см<sup>3</sup> 3%-го раствора бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте. Колбы выдерживают 30 мин при комнатной температуре, затем упаривают хлористый метилен до 2–2,5 мл каждой колбы на ротационном испарителе при 40 °С. Остаток раствора из колб переносят в фарфоровые чашки и осторожно выпаривают его досуха на песчаной бане при 100–120 °С.

##### *Получение дансилпроизводных аминов*

К сухому остатку в фарфоровых чашках добавляют по 0,4 мл буферного раствора с рН = 10,5. Затем к смеси добавляют по 0,2 мл раствора

дансилхлорида в ацетоне концентрацией 1 мг/мл и выдерживают 40 мин при 40 °С. Образовавшиеся дансилпроизводные аминов переносят в пробирки с притертыми пробками и экстрагируют их 1 мл бензола встряхиванием в течение 3–5 мин. Бензольный экстракт из каждой пробирки анализируют газохроматографически.

По 0,5 мл из 1 мл бензольных экстрактов переносят количественно в 5 пробирок с пришлифованными пробками, упаривают досуха и растворяют сухой остаток в 0,1 мл ацетонитрила. 20 мкл ацетонитрильного раствора каждой пробирки анализируют методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

*Приготовление «холостой» пробы* производится с целью определения наличия НА в применяемых реактивах.

В колбу для упаривания помещают 10 мл метанола, 60 мл хлористого метилена, добавляют 2 мл 3%-го раствора **HBr** в уксусной кислоте, выдерживают 30 мин при комнатной температуре. Затем проводят операцию упаривания, денитрозирования и получения дансилпроизводных.

Хроматографирование градуировочных растворов и «холостой» пробы проводится при следующих условиях.

А) условия газохроматографического анализа:

газовый хроматограф с ДЭЗ;

капиллярная колонка длиной 60 м, внутренним диаметром 0,32 мм, нанесенная фаза RTX-1 (HP-1, ДВ-1), толщина пленки — 0,5 мкм;

температура колонки — программирование температуры от 180 до 250 °С со скоростью 30 °С/мин, изотермический режим при 250 °С в течение 12 мин, программирование температуры от 250 до 270 °С со скоростью 30 °С/мин и изотермический режим при 270 °С в течение 5 мин;

температура испарителя — 280 °С;

температура детектора — 300 °С;

количество вводимой пробы — 3 мкл.

Б) условия высокоэффективной жидкостной хроматографии:

жидкостной хроматограф с флуоресцентным детектором;

колонка из нержавеющей стали (250×4 мм), заполненная сорбентом Hypersil ODS C<sub>18</sub>, зернением 5 мкм;

подвижная фаза — смесь ацетонитрил-вода (2:1), скорость подачи — 0,6 л/мин;

волна возбуждения — 350 нм;

волна измерения — 530 нм;

объем вводимой пробы — 20 мкл.

Каждый полученный экстракт записывается дважды. Порядок выхода пиков дансилпроизводных на хроматограммах — ДМНА, ДЭНА, ДПНА.

Рассчитывают площади пиков каждой пробы. За конечный результат площади пика каждого НА принимают среднюю величину двух пиков с

вычитанием площади соответствующего пика «холостой» пробы в случае его присутствия на хроматограмме.

#### *Построение градуировочных графиков*

График зависимости площади пика от пяти концентраций строят для каждого НА, откладывая на оси абсцисс концентрацию соответствующего НА, в соответствии с приложением 2, на оси ординат — площадь пика его дансилпроизводного.

Возможен вариант компьютерного построения градуировочного графика с использованием указанных выше значений.

#### **Отбор проб**

Отбирают не менее 1 кг средней пробы пищевого продукта или продовольственного сырья в соответствии с требованиями СТБ 1036-97 «Продукты пищевые и продовольственное сырье. Методы отбора проб для определения показателей безопасности».

Отобранные образцы можно хранить в морозильной камере при  $-8 \div -18$  °С 1–3 сут в зависимости от сроков реализации продукции.

#### **Проведение анализа**

##### *1. Выделение НА путем отгонки с водяным паром*

Навеску 100 г измельченного в мясорубке или гомогенизаторе пищевого продукта помещают в круглодонную колбу вместимостью 500 см<sup>3</sup>, соединенную с паровиком и прямым холодильником в соответствии с рисунком приложения 3. К продукту добавляют 100–150 мл дистиллированной воды (в зависимости от влажности продукта), 0,1 мл раствора НДПА с концентрацией 10 мкг/мл в метаноле и перемешивают. В смесь добавляют 10 г хлорида натрия, 10 г сульфата натрия или магния, 5 мл 2%-го раствора сульфаниловой кислоты, 10 мл 1 н раствора серной кислоты и перегоняют НА с водяным паром, собирая 200–250 мл дистиллята.

##### *2. Экстракция НА из дистиллята*

НА из дистиллята экстрагируют в делительной воронке хлористым метиленом три раза порциями по 20 мл. Каждую порцию экстракта пропускают через воронку с бумажным фильтром, заполненную 5 г безводного сульфата натрия. Фильтр промывают 10 мл экстрагента.

Затем производят операции денитрозирования, получения дансилпроизводных и их хроматографирование в соответствии с настоящей инструкцией.

#### **Вычисление результатов анализа**

Рассчитывают площади пиков на полученной хроматограмме пробы, соответствующих дансилпроизводных ДМНА, ДЭНА и ДПНА. Вычитают площади соответствующих пиков «холостой» пробы. По градуировочным графикам определяют концентрацию каждого из рассматриваемых НА.

Возможен компьютерный вариант обработки результатов анализа.

Расчет содержания суммы НА в пробе (С, мкг/кг) в случае газожидкостной хроматографии производят по формуле:



$$C = \frac{(C_{\text{ДМНА}} + C_{\text{ДЭНА}}) \times C_{\text{ДПНА},1} \times V}{P \times C_{\text{ДПНА},2}}, \quad (1)$$

где  $C_{\text{ДМНА}}$ ,  $C_{\text{ДЭНА}}$  и  $C_{\text{ДПНА},1}$  — концентрации ДМНА, ДЭНА и ДПНА, найденные по градуировочным графикам, мкг/мл;

$C_{\text{ДПНА},2}$  — концентрация внутреннего стандарта ДПНА, введенная в пробу;

$V$  — объем пробы, подготовленный для хроматографирования, мл;

$P$  — навеска пробы, взятая для анализа, кг.

При использовании для измерений высокоэффективной жидкостной хроматографии применяют формулу:

$$C = \frac{(C_{\text{ДМНА}} + C_{\text{ДЭНА}}) \times C_{\text{ДПНА},1} \times V}{5 \times P \times C_{\text{ДПНА},2}} \quad (2)$$

с теми же обозначениями входящих в нее букв.

За результат анализа принимается среднее арифметическое двух параллельных определений НА, расхождение между которыми не должно превышать от величины среднего результата двух определений в соответствии с приложением 1.

#### **Контроль стабильности градуировочных графиков**

В качестве средств контроля стабильности градуировочных графиков служат градуировочные растворы НА, приготовленные в соответствии с настоящей инструкцией.

Градуировочные графики подлежат проверке перед каждым циклом измерений минимум по одной точке. Градуировочный график считается стабильным, если для каждого из используемых для контроля градуировочных растворов сохраняется соотношение:

$$A = (X + C) \times 100 \leq 12\%, \quad (3)$$

где  $X$  — концентрация градуировочного раствора НА, измеренная в день проведения анализа, мкг/мл;

$C$  — концентрация градуировочного раствора НА, взятая для построения градуировочного графика, мкг/мл;

12% — погрешность градуировочных графиков для каждого НА.

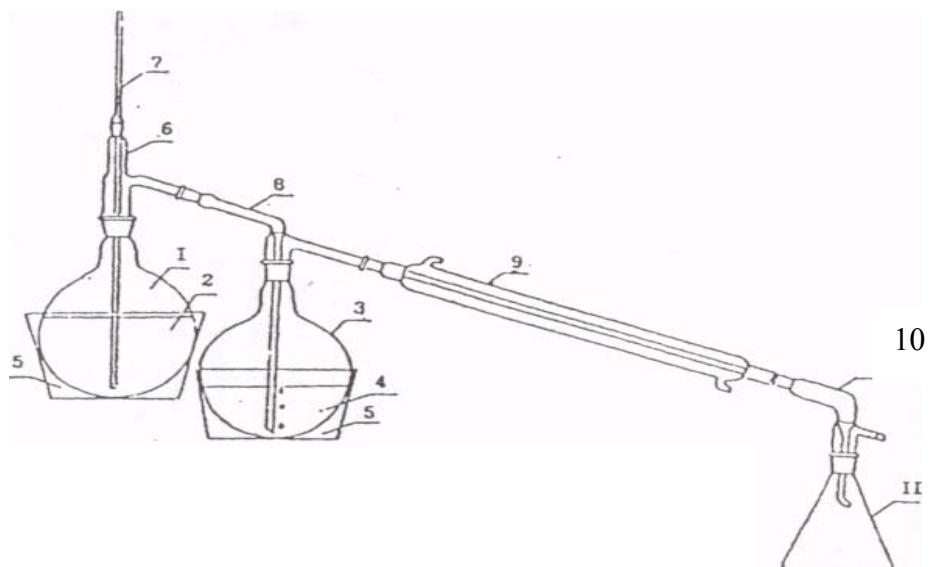
**Метрологическая характеристика методики определения суммы НА  
(ДМНА+ДЭНА)**

Анализируемый объект	Метрологические параметры, $p=0,95$ , $n=5$			
	Предел обнаружения, мг/кг	Среднее значение определения, %	Относительное стандартное отклонение, %	Сходимость двух параллельных определений, %
Мясо свежее, мясные, колбасные изделия, мясные консервы	0,001–0,1	80,5	25,0	10,0
Рыба свежая	0,001–0,1	85,0	19,5	8,5
Зерно (пивной солод)	0,007–0,1	80,0	22,0	10,0
Детское питание	0,0005*–0,1	80,0	30,0	12,5

Примечание \* — для жидкостного хроматографа с флуоресцентным детектором.

**Приготовление градуировочных растворов НА**

Объем раствора НА, вводимого в колбу с концентрациями, мкл	Содержание НА, мкг			
	ДМНА	ДЭНА	ДПНА	Сумма НА, ДМНА+ДЭНА
10	0,01	0,04	0,05	0,05
20	0,02	0,08	0,1	0,1
60	0,06	0,24	0,3	0,3
100	0,1	0,4	0,5	0,5
200	0,2	0,8	1,0	1,0



1. Паровик.
2. Дистиллированная вода.
3. Круглодонная колба.
4. Гомогенизат исследуемого продукта.
5. Баня с глицерином.
6. Насадка Вюрца.
7. Трубка на шлифе.
8. Насадка-барбатер.
9. Холодильник Либиха.
10. Аллонж.
11. Приемник

**Рисунок — Круглодонная колба, соединенная с паровиком и прямым холодильником**