ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫНЫҢ МЕМЛЕКЕТТІК СТАНДАРТЫ

ТАҒАМДЫҚ ӨНІМДЕР

Жұқа қабатты хроматографиялау әдісімен астықта, ысталған ет және балық өнімдерінде бенз(а)пиренді анықтау

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

Определение бенз(а)пирена в зерне, копченых мясных и рыбных продуктах методом ТСХ

ҚР СТ 1502-2006

Ресми басылым

Қазақстан Республикасы Индустрия және сауда министрлігінің Техникалық реттеу және метрология комитеті (Мемстандарт)

Астана

gost.e-ecolog.ru

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫНЫҢ МЕМЛЕКЕТТІК СТАНДАРТЫ

ТАҒАМДЫҚ ӨНІМДЕР

Жұқа қабатты хроматографиялау әдісімен астықта, ысталған ет және балық өнімдерінде бенз(а)пиренді анықтау

ҚР СТ 1502-2006

Ресми басылым

Қазақстан Республикасы Индустрия және сауда министрлігінің
Техникалық реттеу және метрология комитеті
(Мемстандарт)

Астана

Алғысөз

1 Қазақстан Республикасының Индустрия және сауда министрлігі Техникалық реттеу және метрология комитетінің «Қазақстан стандарттау және сертификаттау институты» РМК **ӘЗІРЛЕП ЕНГІЗДІ**

2 Қазақстан Республикасы Индустрия және сауда министрлігінің Техникалық реттеу және метрология комитетінің 2006 жылғы 23 маусымдағы № 249 бұйрығымен **БЕКІТІЛІП ІСКЕ ҚОСЫЛДЫ**

3 Осы стандарт ИСО 15302:1998 «Жануарлар мен өсімдікден алынған шикі майлар мен майлар. Бенз(а)пиренді анықтау. Кері фазалы тиімділігі жоғары хроматографиялау әдісі» стандартымен үйлестірілген.

4 БІРІНШІ ТЕКСЕРУДІҢ МЕРЗІМІ 2011 жыл
ТЕКСЕРУДІҢ КЕЗЕҢДІЛІГІ 5 жыл

5 АЛҒАШ РЕТ ЕНГІЗІЛДІ

Осы стандарт Қазақстан Республикасы Индустрия және сауда министрлігінің Техникалық реттеу және метрология жөніндегі комитетінің рұқсатынсыз ресми басылым ретінде Қазақстан Республикасы аумағында толықтай немесе бөлшектеліп басылып шығарыла, көбейтіле және таратыла алмайды

Мазмұны

1	Қолданылу саласы	1
2	Нормативтік сілтемелер	1
3	Сынамаларды іріктеу	2
4	Төмен температуралы спектрофлуометрия әдісі	2
5	Бөлме температурасы жағдайында тиімділігі жоғары сұйықтықтық хроматографиялау және спектрофлуометрия әдістері	9
6	Қауіпсіздік техникасы талаптары	20
7	Оператор біліктілігіне қойылатын талаптар	20

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫНЫҢ МЕМЛЕКЕТТІК СТАНДАРТЫ

ТАҒАМДЫҚ ӨНІМДЕР
Жұқа қабатты хроматографиялау әдісімен астықта, ысталған ет және балық өнімдерінде бенз(а)пиренді анықтау

Енгізілген күні 2007.07.01

1 Қолданылу саласы

Осы стандарт азық-түлік шикізатына, тағамдық өнімдер, тағамдық және дәмдік қоспаларға таратылады және төмен және бөлме температурасы жағдайында спектрофлуориметрияны қолданып жұқа қабатты хроматографиялау әдісімен және тиімділігі жоғары сұйықтықтық хроматографиялаумен астықта, ысталған ет және балық өнімдеріндегі бенз(а)пиренді анықтауды белгілейді.

Осы стандартта берілген Ресей Федерациясының стандарттары ҚР СТ 1.9 белгіленген тәртіпте қолданылады.

2 Нормативтік сілтемелер

Осы стандартта мынадай стандарттарға сілтемелер пайдаланылды:

ҚР СТ 1.9-2003 Қазақстан Республикасының мемлекеттік стандарттау жүйесі. Халықаралық, өңірлік және ұлттық стандарттар мен стандарттау, сертификаттау және аккредиттеу жөніндегі нормативтік құжаттарды қолдану тәртібі.

ГОСТ 12.1.004-91 Еңбек қауіпсіздігі стандарттарының жүйесі. Өрт қауіпсіздігі. Жалпы талаптар.

ГОСТ 12.1.007-76 Еңбек қауіпсіздігі стандарттарының жүйесі. Зиянды заттар. Жіктеу және қауіпсіздіктің жалпы талаптары.

ГОСТ 12.1.019-79 Еңбек қауіпсіздігі стандарттарының жүйесі. Электр қауіпсіздік. Жалпы талаптар және қорғаныс түрлерінің атаутізімі.

ГОСТ 427-75 Өлшейтін металл сызғыштар. Техникалық шарттар.

ГОСТ 1770-74 Өлшемді зартханалық шыны ыдыс. Цилиндрлер, өлшеуірлер, құтылар, түтіктер. Техникалық шарттар.

ГОСТ 2603-79 Ацетон. Техникалық шарттар.

ГОСТ 4204-77 Күкірт қышқылы. Техникалық шарттар.

ГОСТ 5777-84 Марганец қышқылды техникалық калий. Техникалық шарттар.

ГОСТ 5789-78 Толуол. Техникалық шарттар.

ГОСТ 5815-77 Сірке су ангидриді Техникалық шарттар.

ГОСТ 5955-75 Бензол. Техникалық шарттар.

ГОСТ 6709-72 Дистилденген су. Техникалық шарттар.

ГОСТ 9147-80 Зертханалық фарфор ыдыс және жабдық. Техникалық шарттар.

ГОСТ 9293-74 Газ тектес және сұйық азот. Техникалық шарттар.

ГОСТ 12026-76 Сүзгіш зертханалық қағаз. Техникалық шарттар.

ГОСТ 14919-83 Электроплиталар, электроплиткалар және қыздыратын тұрмыстық электршкафтар. Жалпы техникалық шарттар.

ГОСТ 18300-87 Ректификатталған техникалық этил спирті. Техникалық шарттар.

ГОСТ 20015-88 Хлороформ. Техникалық шарттар.

ГОСТ 20289-74 Диметилформамид. Техникалық шарттар.

Ресми басылым

ГОСТ 24104-2001 Зертханалық таразы. Жалпы техникалық талаптар.

ГОСТ 24363-80 Калий гидрототығы. Техникалық шарттар.

ГОСТ 25336-82 Зертханалық шыны ыдыс және жабдық. Түрлері, негізгі параметрлері мен өлшемдері.

ГОСТ 29224-91 Зертханалық шыны ыдыс. Сұйықтықтық шыны зертханалық термометрлер. Құрылғы, құрастыру және қолдану қағидаттары.

ГОСТ 29228-91 Зертханалық шыны ыдыс. Градусталған тамшуырлар. 2-бөлім. Күту уақыты белгіленбеген градусталған тамшуырлар.

ГОСТ 29229-91 Зертханалық шыны ыдыс. Күту уақыты 15 с градусталған тамшуырлар.

ГОСТ Р 51652-2000 Тағамдық шикізаттан алынған ректификатталған этил спирті. Техникалық шарттар.

3 Сынамаларды іріктеу

3.1 Зертханалық сынаманы іріктеу және оны сынауларға дайындауды өнімнің сыналатын түріне арналған нормативтік құжатқа сәйкес жүргізеді.

Біріктірілген зертханалық сынамадан сынақ үшін екі параллель өлшендіні алады.

4 Төмен температуралы спектрофлуориметрия әдісі

Әдіс негізі көмірсутектерін , оның ішінде бенз(а)пиренді, гександы ащы калийдің спирттік ерітіндісімен алдын ала өңделген өнімнен шайғындау, көмірсутектерінің полициклді түйіршіктерін жұқа қабатты хроматографиялаумен алюминий тотығына бөлу және алынған түйіршіктен бенз(а)пиренді төмен температуралы спектрофлуориметрия әдісімен сандық анықтау болып табылады.

Талданатын өнімдерде бенз(а)пиреннің салмақтық үлесінің анықталатын шамаларының ауқымы - 0,0002 0,005 мг/кг немесе $0,2 \times 10^{-7}$ $5,0 \times 10^{-7}$ %. Ерітіндіде бенз(а)пиреннің салмақтық шоғырын анықтаудың оңтайлы ауқымы 0,01 0,05 мкг/см^3 құрайды.

4.1 Аппаратура, материалдар мен реактивтер

Сұйық азоттың (- 196) °С температурасы жағдайда өлшеулер орныдауға арналған криогенді қоспалы және толқындар ұзындығының спектралды ауқымы 360 420 нм флуоресцентті спектрофотометр

Спектралды ауқымы 250-700 нм және УФ сәулелену көзі ретінде БУВ-15 типті лампалы «Хроматоскоп» түрлі ультракүлгін сәулелендіргіш.

(250±4) ^{0}С температурасын қамтамасыз ететін зертханалық кептіретін шкаф.

ГОСТ 24104 бойынша ең жоғары өлшеу шегі 200 г дәлдік сыныбы 2 зертханалық таразы.

ГОСТ 24104 бойынша ең жоғары өлшеу шегі 500 г дәлдік сыныбы 2 жалпы арналған зертханалық таразы.

ИР-1М ротационды буландырғыш.

Су моншасы

Спиралі жабық және қызуды реттегіші бар ГОСТ 14919 бойынша тұрмыстық электр плитасы.

Кез келген сиымдылықты сұйық азотқа арналған Дьюар ыдысы.

Хроматографиялауға арналған ванналар (эмаль фото астаушалар).

15 х 30 және 20 х 40 см өлшемді шыны пластиналар.

ГОСТ 25336 бойынша К-1-250-29/32 ТХС, К-1-100-29/32 ТХС, К-1-500-29/32 ТХС немесе П-1-500-29/32 ТХС құтылар.

ГОСТ 25336 бойынша ХПТ-1-300-14/23 ХС немесе ХПТ-1-400-14/23 ХС тоңазытқыштар.

ГОСТ 25336 бойынша ХПТ-2-400-29/32 ХС және ХПТ-1-300-29/32 немесе ХПТ-400-29/32 ХС тоңазытқыштар.

ГОСТ 25336 бойынша 250-19/26-29/32 ТС дефлегматор немесе 300-19/26-29/32 ТС дефлегматор.

ГОСТ 25336 бойынша П2-10-180 ХС шыны түтіктер.

ГОСТ 25336 бойынша АИО-14/23-50 ТС аллонж.

ГОСТ 25336 бойынша П-1-19/26-14/23 ТС немесе Н2-19/23 қондырма.

ГОСТ 25336 бойынша су ағынды зертханалық сорғы.

ГОСТ 29228 және ГОСТ 29229 сиымдылығы 1, 2, 5, 10 $см^3$ тамшуырлар.

ГОСТ 25336 бойынша ВФО-32-ПОР 100-14/23 ХС немесе ВФО-32-ПОР 160-14/23 ХС құйғы.

ГОСТ 1770 бойынша П-2-15-14/23 ХС өлшемді түтіктер.

ГОСТ 25336 бойынша ВД-1-500 немесе ВД-3-500 бөлгіш құйғы.

ГОСТ 25336 бойынша 1-100, 1-250 немесе 3-100, 3-250 өлшемді цилиндрлер.

ГОСТ 25336 бойынша СВ-14/8, немесе СВ-19/9, немесе СВ-24/10, немесе СВ-34/12 өлшеуге арналған стакандар (шынышақшалар).

ГОСТ 29224 бойынша өлшеу температурасының шегі 0 250 ^{0}С, өлшеу бағамы 1 ^{0}С термометр.

ГОСТ 427 бойынша бөлу бағамы 0,1 см өлшегіш сызғыш.

ГОСТ 25336 бойынша 2-100-2 өлшемді құтылар.

Шыны қылтүтіктер, шыны таяқшалар.

Қолданыстағы нормативтік құжаттар бойынша н.октан, т.,

Қолданыстағы нормативтік құжаттар бойынша н.гексан, т.,

ГОСТ 18300 бойынша ректификатталған техникалық этил спирті немесе ГОСТ Р 51652 бойынша ректификатталған этил спирті.

Қолданыстағы нормативтік құжаттар бойынша фракциялы 40 70 ^{0}С петролейлі эфир.

ГОСТ 20015 бойынша хлороформ.

ГОСТ 5955 бойынша бензол.

Қолданыстағы нормативтік құжаттар бойынша белсенділігі 2 деңгейлі хроматографиялауға арналған алюминий тотығы.

ГОСТ 24363 калий гидрототығы.

Бенз(а)пирен, негізгі заттың болуы 98 % кем емес.

1,12-Бензперилен, негізгі заттың болуы 98 % кем емес.

ГОСТ 9293 бойынша сұйық азот.

ГОСТ 6709 бойынша дистилденген су.

Метрологиялық сипаттамалары бар өзге де өлшеу құралдарын және техникалық сипаттамалары бар жабдықтарды, сондай-ақ сапасы бойынша көрсетілгендерден төмен емес реактивтер мен материалдарды қолдану рұқсат етіледі.

4.2 Сынаққа дайындық

4.2.1 Ерітінділерді тазарту

Ерітінділерді (н.октан, этил спирті, петролейлі эфир, хлороформ және н.гексан) жалпы қабылданған тәсілмен дефлегматормен айдайды.

4.2.2 Алюминий тотығын дайындау

Алюминий тотығын (250±4) ^{0}С температурасы жағдайында 4 сағат бойына кептіргіш шкафында кептіреді және тығынды ыдыста сақтайды.

Жұқа қабатты хроматография үшін бенз(а)пирен ерітіндісін дайындау («куәгер» ерітіндісі).

Шынышақшаға шамамен 10 мг бенз(а)пирен өлшеп салады, алынған өлшенді толық ерігенге дейін бірнеше миллилитр петролейлі эфир құяды.

Алынған ерітіндіні сиымдылығы 100 $см^3$ өлшемді құтыға құяды және ерітінді көлемін белгіге дейін петролейлі эфирмен жеткізеді. Ерітіндінің сақталу мерзімі тоңазытқышта үш айдан артық емес.

4.2.4 Бенз(а)пиреннің стандартты ерітіндісін дайындау.

Шынышақшаға (10,0±0,2) мг бенз(а)пиренді өлшеп алады, алынған өлшенді толық ерігенге дейін бірнеше миллилитр н.октанды құяды. Алынған ерітіндіні сиымдылығы 100 $см^3$ өлшемді құтыға құяды және ерітінді көлемін белгіге дейін н.октанмен жеткізеді. Алынған ерітіндіде бенз(а)пиреннің салмақтық шоғыры 100 мкг/$см^3$. Ерітіндіні тоңазытқышта сақтайды. Ерітіндінің сақталу мерзімі үш айдан артық емес.

4.2.5 Бенз(а)пиреннің жұмысшы ерітіндісін дайындау

н.октандағы салмақтық шоғыры 0,1; 0,04 және 0,02 мкг/$см^3$ бенз(а)пиреннің жұмысшы ерітінділерін 4.4.4 бойынша дайындалған бенз(а)пиреннің бастапқы стандартты ерітіндісінен сиымдылығы 100 $см^3$ тығынды өлшемді құтыларда біртіндеп дайындайды. Ерітінділерді тоңазытқышта сақтайды. Ерітінділердің сақталу мерзімі бір айдан артық емес.

4.2.6 1,12-бензпериленнің стандартты ерітіндісін дайындау (ішкі стандарт).

Бастапқы ерітіндіні дайындау үшін шынышақшаға (10,0±0,2) мг 1,12-бензпериленді өлшеп салады, алынған өлшенді толық еріп кеткенге дейін бірнеше миллилитр н.октан құяды. Алынған ерітіндіні сиымдылығы 100 $см^3$ тығынды өлшемді құтыға құяды және белгіге дейін н.октанмен жеткізеді. Алынған ерітіндіде 1,12-бензпериленнің салмақтық шоғыры 100 мкг/$см^3$. Ерітіндіні тоңазытқышта сақтайды. Ерітіндінің жарамдылық мерзімі үш айдан артық емес.

4.2.7 1,12-бензпериленнің жұмысшы ерітіндісін дайындау (ішкі стандарт ерітінділері)

Салмақтық шоғыры 0,01; 0,005; 0,002 және 0,001 мкг/$см^3$ 1,12-бензпериленнің жұмысшы ерітінділерін 4.4.6 бойынша дайындалған бенз(а)пиреннің бастапқы стандартты ерітіндісінен сиымдылығы 100 $см^3$ тығынды өлшемді құтыларда біртіндеп н.октанда дайындайды. Ерітінділерді тоңазытқышта сақтайды. Ерітінділердің сақталу мерзімі бір айдан артық емес.

4.2.8 Хроматографиялық бөлуге арналған пластиналарды дайындау

20х40 см өлшемді шыны пластинаға алюминий тотығын тегістеп себеді. Содан кейін қалыңдығы 1мм және ені 3мм резеңке сақиналармен үш бөлікке (14,1 және 3 см) бөлінген шыны таяқшаның көмегімен алюминий тотығын әбден тегістейді.

4.3 Сынақ жүргізу

4.3.1 Өнімнен бенз(а)пиренді бөліп алу

Сиымдылығы 500 $см^3$ дөңгелек табанды құтыға салмағы 25 г өнім өлшендісін салады, құтыға 20 $см^3$ дистилденген су, 200 $см^3$ этил спиртін және 20 г калий гидрототығын қосады. Құты ішіндегіні сілкіп араластырады. Құтыны кері тоңазытқышпен қосады және реакциялық қоспаның 3 сағат бойына қайнауы жағдайында су моншасында қыздырады. Содан кейін құтыға тоңазытқыш арқылы 150 $см^3$ су қосады; құтыны моншадан алады және бөлме температурасына дейін салқындатады.

Суығаннан кейін реакциялық қоспаның сұйық фазасын қалқымалап бөлу құйғысына құяды, өнім қалдығын құтыда қалдырады. Қалдық салынған құтыға 150 $см^3$ н.гексан қосады, құты ішіндегіні қатты араластырады және н.гександы бөлу құйғысына қалқымалап алады.

Құйғыны тығынмен жабады және қатты сілкиді, сондай кеін штативке бекітіп сұйықтықтар қабатталып бөлінгенге дейін қалдырады. Түзілген эмульсияны бөлу үшін бөлу құйғысындағы қоспаға 20 $см^3$ этил спиртін қосады. Қабатталып ажыраған кейін

төменгі сулы-спиртті фазаны тұнба салынған құтыға кері құяды, ал гександы шайғынды сиымдылығы 500 $см^3$ құтыға құйып алады.

Бұндай реакциялық қоспаны өңдеуді шайғындау үшін 100 $см^3$ н.гексан және эмульсия қабатталып бөліну үшін 20 $см^3$ порциялы этил спиртін пайдаланып тағы екі рет жүргізеді.

Шайғындау аяқталғаннан кейін құтыдағы қалдық пен гидролизатты төгіп тастайды, ал шайғынды бөлу құйғысында үш рет 50 $см^3$ дистилленген сумен жуады және үтірден кейінгі екінші белгіге дейін дәлдікпен алдын ала өлшенген порциямен сиымдылығы 250 $см^3$ дөңгелек табанды құтыда ротациялық буландырғышта су моншасының температурасы 60 ^{0}С артық емес жағдайда суалтады.

Шайғынды құтыны ерітінді ізін кетіру үшін тарту шкафына қалдырады, содан кейін қайтадан өлшейді. Өлшеулер арасындағы айырмашылықтар бойынша бөлінген шайғынның салмағын анықтайды.

Құтыдағы шайғыннан өлшемей шыны шақшаға $^1/_5$ бөлігін іріктеп алады. Шайғын қалдығы бар құтыны өлшейді. Шайғын бөлігі салынған шыны шақшаға 4.2.3 бойынша дайындалған бенз(а)пирен «куәлігінің» 0,1 0,2 $см^3$ ерітіндісін қосады. Шыны шақша ішіндегі мен құтыдағы қалдықты петролейлі эфирдің кішкене көлемінде ерітеді.

Алынған ерітінділерді шыны қылтүтікті дайындалған пластиналарға: тар бөлігіне шыны шақшадан алынған ерітіндіні («куәлік»), кең бөлігіне құтыдан алынған өнім шайғынын жағады. Ерітінділерді пластинаның төменгі шетінен 7-8 см кері қарай тегіс теліммен жағады.

Пластинаны хроматографиялау үшін кішкене 20 ^{o} 25 ^{o} бұрыш астында ваннаға орналастырады, петролейлі эфирді сынаманы жағу сызығына дейін жеткенге дейін құяды. Ваннаны шынымен жабады және ерітінді шетін пластинаның жоғарғы шетіне жеткізіп хроматографиялау жүргізеді.

Пластинаны кептірмей оны ультра күлгін сәулемен сәулелендіреді және «куәліктің» сәулеленген телімі бойынша сыналатын сынамада бенз(а)пиреннің болу орнын анықтайды. Сыналатын сынаманың хроматограммасында бенз(а)пирен телімінің шектерін белгілейді. Пластинаны кептіретін шкафта далада кептіреді.

Хроматограммада белгіленген сыналатын сынаманың алюминий тотығының телімін шыны көмегімен пластинадан алады және сүзетін құйғының кеуекті пластинасына салады. Құйғыны сиымдылығы 100 $см^3$ дөңгелек табанды құтымен қосады және бенз(а)пиренді бензолды аздап порциялап қосып және алюминий тотығын құйғыда таяқшамен араластыра отырып алюминий тотығын 50 $см^3$ бензолмен элюрлейді. Бензолды су моншасының 60 ^{0}С артық емес температурасы жағдайында ротациялық буландырғышта құрғағанша суалтады. Құтыдағы октан қалдығын түтікке салады. Түтіктегі ерітінді көлемі 5 $см^3$ аспауы керек.

Кейбір өнімдерді талдау кезінде шайғын өнімінен ажыраған бірінші хроматографиялау кезінде үлгінің флуоресцентті құрамбірліктерінің толық және нақты ажырауы болмайды. Бұл жағдайда пластинада «куәлік» көлемінде алюминий тотығының үлкен телімін бөледі, бенз(а)пиренді бензолдың алюминий тотығымен жоғарыда көрсетілгендей элюрлейді және суалтқаннан кейінгі қалдықты этил спиртінде ерітеді және алынған спирт шайғынын қайтадан хроматографиялайды.

Спирт шайғынын хроматографиялық бөлу үшін 15 х 30 см өлшемді пластинаны 0,3 мм қалыңдықты алюминий тотығының қабатын пайдаланады. Пластинада ені 10 және 3 см екі телімді бөледі. Пластинаның кең бөлігіне шыны қылтүтіктің көмегімен талданатын өнімнің спирттік ерітіндісін, тар бөлігіне петролейлі эфирдегі бенз(а)пирен ерітіндісін («куәлік» ерітіндісі) жағады. Пластинаны ваннаға бұрыш астында орналастырады және ерітінді шетін пластинаның жоғарғы шетіне жеткізіп хлороформда хроматографиялауды жүргізеді. Ультракүлгін сәуледе «куәлік» бойынша алюминий

тотығын зерттелетін өнімнің бенз(а)пирен телімін белгілейді. Содан кейін бенз(а)пиренді алюминий тотығымен бензолмен элюрлейді және жоғарыда көрсетілген қалған операцияны жүргізеді.

Н.октандағы бенз(а)пирен ерітіндісін түтікке құяды. Ерітінді көлемі өнімнің бастапқы өлшендісі 25 г жағдайда 5 $см^3$ аспауы керек.

Алынған ерітіндіде (шайғында) сандық бағалау үшін қоспа әдісін немесе ішкі стандарт әдісін пайдаланып төмен температуралы спектрофлуориметрия әдісімен бенз(а)пиреннің болуын анықтайды.

4.3.2 Қоспа әдісімен 4.3.1 бойынша алынған ерітіндіде (шайғында) бенз(а)пиреннің болуын анықтау.

Үш түтікке тамшуырмен н.октандағы бенз(а)пиреннің 1 $см^3$ алынған ерітіндісін құяды. Содан кейін бірінші түтікке 2 $см^3$ н.октанды құяды. Екінші түтікке 1,5 $см^3$ н.октанды және 4.2.5 бойынша дайындалған салмақтық шоғыры 0,1 мкг/$см^3$ бенз(а)пиреннің 0,5 $см^3$ жұмысшы ерітіндісін құяды. Үшінші түтікке 1 $см^3$ н.октанды және екінші түтікке құйғандай бенз(а)пиреннің 1 $см^3$ жұмысшы ерітіндісінен құяды.

Спектрофлуориметрикалық талдауды үшінші түтіктен бастайды. Ол үшін үшінші түтікті спектрофотометрдің кіру саңылауы алдында сұйық азот құйылған Дьюар ыдысына салады; 367 нм қоздыру сәулесінің 403 нм толқын ұзындығы жағдайында бенз(а)пирен флуоресценциясының аналитикалық сызығын орнатады. Саңылауды үлкейту және ашу коэффициентін реттеумен, сондай-ақ бірдей уақытта дәлдеумен Дьюар ыдысындағы түтіктер спектрофотометрдің тіркейтін құралы бойынша ең жоғары белгіге (50 80 % дейін қол жеткізеді, содан кейін толқын ұзындығы 401 нм ұзындығы жағдайында спектрофотометрдің тіркейтін құралында белгіні белгілеп 401-404 нм шамасында бенз(а)пиреннің спектрограммасын жазады. Спектр жазбасын екі рет қайталайды.

Содан кейін сұйық азотта бірінші және екінші түтіктерді мұздатады және флуоресценция спектрлерін 401-404 нм толқын ұзындықтары шамасында, үшінші түтіктегі сынаманы сканерлеу кезінде сол жағдайда ұстап 401 нм толық ұзындығы жағдайында өзі жазатын машина ұшын міндетті түрде қойып жазады.

Талданатын шайғындағы бенз(а)пиреннің салмақтық шоғырын график бойынша анықтайды, онда абсциссалар осін бенз(а)пирен қоспасының мәнін қояды, ал ординаталар осі бойынша миллиметрде алынған спектрограммалар бойынша өлшенген 403нм жағдайында бенз(а)пиреннің тән сызығының жоғары шыңының тиіктігін көрсетеді.

Егер зерттелетін ерітіндіде бенз(а)пиреннің салмақтық шоғыры өлшеулер үшін жарамды шамаға түсетін болса, онда алынған тәжірибелік нүктелер бір түзу бойында жатады. Бұл түзудің абсциссалар осімен қиылысқанға дейінгі экстраполяция қоспасыз ерітіндіде, яғни 1 $см^3$ зерттелетін ерітіндіде бенз(а)пиреннің болуына сәйкесетін телімді береді. Егер бенз(а)пиреннің салмақтық шоғыры талданатын ерітіндіде құралмен өлшенетін шоғыр ауқымының жоғары шегінен жоғары болса, онда талданатын ерітіндіні н.октанмен араластырады.

4.3.3 Ішкі стандарт әдісімен 4.3.1 бойынша алынған ерітіндіде (шайғында) бенз(а)пиреннің болуын анықтау

Ішкі стандарт ретінде 1,12-бензпериленді пайдаланады. Түтікке 4.3.1 бойынша алынған 3 $см^3$ н.октандағы бенз(а)пиреннің ерітіндісін құяды және спектрофотометрдің кіру саңылауы алдында сұйық азот құйылған Дьюар ыдысына салады, 367 нм қоздыру сәулесінің 403 нм толқын ұзындығы жағдайында аналитикалық сызығын орнатады және 401-409 нм толқын ұзындығы шамасында ерітінді спектрінің жазбасын жүргізеді. Сызық қанықтылығы бойынша (403 нм жағдайында бенз(а)пиреннің тән сызығының жоғары шыңы биіктігі бойынша) сынамада бенз(а)пиреннің шамамен болуын бағалайды. Осы бағалауға сәйкес 3 $см^3$ н.октандағы бенз(а)пиреннің ерітіндісі құйылған түтікке сынама спектрінде 406,3 нм жағдайында қанықтылығы 403 нм толық ұзындығы жағдайында

бенз(а)пирен сызығының қанықтылығынан 3-5 есе артық болатындай санда 1,12-бензпериленнің ерітіндісін қосады.

401-409 нм толық ұзындығы аралығында спектр жазуын екі рет жүргізеді.

403 нм жағдайында бенз(а)пиреннің және 406,3 нм жағдайында 1,12-бензпериленнің тән сызықтарының қанықтылығын (сәйкес H_1 және H_2) осы миллиметрдегі қосылыстардың тән сызықтарының жоғары жағдайында шыңдар биіктігін өлшеп спектрограммалар бойынша анықтайды. Есептеулерде орташа шаманы қабылдайды. Бенз(а)пирен сызығының (H_1) қанықтылығының 1,12-бензперилен сызығының (H_2) қанықтылығына қатынас коэффициентін есептейді, $K = H_1/H_2$.

Бұдан әрі бенз(а)пиреннің стандартты ерітінділері үшін осы коэффициентті ($K_{ст}$) анықтайды. Ол үшін екі түтікке салмақтық шоғыры 0,02 және 0,04 мкг/см^3 бенз(а)пиреннің 3 см^3 стандартты ерітінділерінен құяды. Түтіктердің әрбіріне сынама салынған түтікке сияқты 1,12-бензпериленнің сондай санын құяды. Әр ерітіндінің спектрлерін 401-409 нм толқын ұзындығы аралығында екі рет жазады.

Бұл жағдайда 401 нм толық нұзындығы жағдайында өзі жазатын қалам ұшы барлық жағдайларда міндетті түрде бір деңгейде белгіленгендей болуына қарайды.

Бұдан әрі спектрограммалар бойынша 403 нм жағдайында бенз(а)пиреннің және 406,3 нм жағдайында 1,12-бензпериленнің тән сызықтарының қанықтылығын (сәйкес H_1 және H_2) анықтайды. Есептеулерде орташа мәндң қабылдайды. Бенз(а)пиреннің әр шоғыры үшін $K_{ст} = H_1/H_2$ есептейді.

Талданатын ерітіндіде бенз(а)пиреннің салмақтық шоғырын (с), мкг/см^3, мына формуламен есептейді:

$$c = c_{ст} K/K_{ст}, \qquad (1)$$

мұнда $c_{ст}$ стандартты ерітіндідегі бенз(а)пирен шоғыры, мкг/см^3;

К 1,12-бензперилен қосылған талданатын ерітінді спектрограммасы бойынша табылған коэффициент;

$K_{ст}$ 1,12-бензпериленнің сәйкес қоспасымен талданатын ерітінді коэффициентіне мәні бойынша жақын 1,12-бензперилен қосылған бенз(а)пиреннің стандартты ерітіндісінің спектрограммалары бойынша табылған коэффициент.

Екі параллель анықтаулар мен әдістемеге сәйкес, бірақ өнімнің өлшендісіз барлық реактивтерді пайдаланып талдаудың барлық кезеңінен өткізетін бірдей уақыттағы бақылау тәжірибесін жүргізеді.

4.4 Нәтижелерді өңдеу

Бенз(а)пиреннің салмақтық шоғырын X_1, %, X и X_2, мг/кг, мына формулалар бойынша есептейді:

$$X_1 = \frac{(c - c_o) \cdot m_1 \cdot V \cdot 100}{m_2 \cdot m \cdot 1000 \cdot 1000} = \frac{(c - c_o) \cdot m_1 \cdot V}{m_2 \cdot m} \cdot 10^{-4} \qquad (2)$$

$$X_2 = \frac{(c - c_o) \cdot V \cdot m_1}{m_2 \cdot m} \cdot \qquad (3)$$

мұнда с 4.3.1 бойынша алынған талданатын өнім ерітіндісінде (шайғында) 4.3.2 немесе 4.3.3 бойынша белгіленген бенз(а)пирен шоғыры, мкг/см^3;

c_0 4.3.1 бойынша алынған бақылау тәжірибе ерітіндісінде бенз(а)пиреннің шоғыры, мкг/см^3;

V өнімнің талданатын сынамасынан бөлінген бенз(а)пирен ерітіндісінің көлемі, см^3,

m_1 талданатын өнімнен бөлінген шайғын салмағы, г;

m_2 пластинаның кең теліміне жағылған шайғын салмағы, г;

m өнім өлшендісінің салмағы, г.

Нәтижені екінші мәнді санға дейін дөңгелектейді.

Соңғы нәтиже ретінде сол мәнді санды екі параллель анықтамалардың орташа арифметикалық мәнін қабылдайды.

Егер параллель анықтаулар нәтижелері арасында айырмашылық $|X_1 \quad X_2| \leq 0{,}01dX$ аспайтын болса, мұнда X_1, X_2 және X бірінші және екінші параллель анықтаулардың нәтижелері мен олардың орташа арифметикалық мәні, ал d ұқсастықты бақылау нормативі болған жағдайда онда орташа арифметикалық X талдау нәтижесі ретінде қабылдайды. Олай болмаған жағдайда талдауды қайталайды. Ұқсастықты бақылау нормативтінің мәні d 1-кестеде берілген.

Алынған талдау нәтижесі X және 1-кестеде берілген салыстырмалы кінарат мәні δ бойынша абсолют кінаратты есептейді $\Delta = 0{,}01\ \delta\ X$, мг/кг немесе %.

Талдау нәтижесін (X Δ), мг/кг немесе P = 0,95 жағдайында % түрінде береді.

4.5 Талдау нәтижелерінің дәлдігін бақылау

Талдау нәтижелерінің сапасына ішкі шұғыл бақылау (ШШБ) талдау нәтижелерінің ұқсастығы, қайталанғыштығы және дәлдігін бақылаудан тұрады.

4.5.1 Параллель анықтаулардың ұқсастығын 4.4 сәйкес әр талданатын сынама үшін бақылайды.

4.5.2 Қайталанғыштыққа ішкі бақылау жүргізу үшін жұмысшы сынамаларды пайдаланады. Сынаманы тең екі бөлікке бөледі және әдістемеге сәйкес түрлі зертханаларда немесе бір зертханада, талдау жүргізудің шарттарын барынша түрлендіріп, яғни өлшемді ыдыстың түрлі жиынтығын пайдаланады, талдауларды түрлі күндері немесе екі түрлі аналитик орындап жүргізеді.

Егер $|X_1 \quad X_2| \leq 0{,}01DX$, мұнда X_1, X_2 және X түрлі зертханаларда немесе бір хертханада түрлі шарттар жағдайында алынған бірдей сынаманы талдау нәтижелері мен олардың орташа арифметикалық мәні, D қайталанғыштықты ішкі шұғыл бақылау нормативінің мәні жағдайында бақылау талдаулардың қайталанғыштығы қанағаттанарлық деп таниды. D нормативінің мәні 1-кестеде берілген.

Қайталанғыштыққа бақылау жүргізу кезеңділігі екі аптада бір реттен жиі емес.

1-кесте P = 0,95 сенімділік ықтималдығы жағдайында өлшеу ауқымдары, салыстырмалы кінарат сипаттамаларының мәні мен салыстырмалы кінаратты (ұқсастық және қайталанғыштық) кездейсоқ құрайтын шұғыл бақылау нормативтері

Өлшеу ауқымы, мг/кг	Кінарат сипаттамасы (кінарат берілген ықтималдықпен болатын аралық шегі) $\pm\delta$, %	Ұқсастықты шұғыл бақылау нормативі $d_{отн}$, % (параллель анықтаулардың екі нәтижелері үшін, n = 2)	Қайталанғыштықты шұғыл бақылау нормативі $D_{отн}$, % (өлшеулердің екі нәтижелері үшін, m = 2)
0,0002- 0,001 қоса	42	40	60
0,001 - 0,005 қоса	32	30	45

4.5.3 Дәлдікке бақылау жүргізу үшін бенз(а)пирен нақты қосылған жұмысшы сынамаларды пайдаланады. Сынаманы тең екі бөлікке бөледі, біреуін әдістемеге сәйкес талдайды, екіншісіне бенз(а)пиреннің белгілі қоспасын енгізеді және содан кейін әдістемеге сәйкес талдайды. Қоспа шамасы талданатын сынамада бенз(а)пиреннің 50-150 % болуын құрауы керек.

Бақылау талдауларының дәлдігін егер $|X_1 \quad X \quad c| \leq 0{,}01К$ болса, мұнда X_1, X және c бенз(а)пирен қосылған сынаманы, нақты сынаманы бақылау талдау нәтижелері мен бенз(а)пирен қоспасының шамасы, К-дәлдікті шұғыл бақылау нормативі болса, қанағаттанарлық деп есептейді.

Дәлдікті шұғыл бақылау нормативін мына формулалар бойынша есептейді:

Ішкі зертханалық бақылауды жүргізген кезде (P = 0,90)

$$К= 0{,}84\sqrt{(\Delta_{X1})^2+(\Delta_X)^2} \qquad (4)$$

Сырткы бақылау жүргізген кезде (P = 0,95)

$$К= \sqrt{(\Delta_{X1})^2+(\Delta_X)^2} \qquad (5)$$

мұнда Δ_{X1} + Δ_X хлоридтер қосылған сынамадағы және нақты сынамадағы хлоридтердің салмақтық шоғырына сәйкесетін кінарат сипаттамаларының мәндері;

$\Delta_{X1} = 0{,}01\ \delta_{X1}X_1$ және $\Delta_X = 0{,}01\ \delta_X X$, мұнда X_1 және X қоспалы сынамадағы және нақты сынамадағы бенз(а)пиреннің салмақтық үлесі, % немесе мг/кг.

Салыстырмалы кінараттың δ_X (δ_{X1}) мәні 1-кестеде берілген.

Талдау дәлдігіне бақылауды айына бір реттен жиі емес, сондай-ақ реактивтерді алмастырған кезде немесе жұмыста ұзақ үзілістен кейін жүргізеді.

Дәлдікке шұғыл бақылау нормативтерінің артқаны жағдайда қайталау талдауларын жүргізеді.

Көрсетілген нормативтер қайтадан артқан жағдайда талдауларды тоқтатады, қанағатсызданарлық нәтижелерге әкелетін себебін анықтайды және оларды түзейді.

ІШБ нәтижелерін арнайы журналға тіркейді.

5 Бөлме температурасы жағдайында тиімділігі жоғары сұйықтықтық хроматографиялау және спетрофлуорометрия әдістері

Әдіс негізі көмірсітектерін, оның ішінде алдын ала спиртті ерітіндімен өңделген өнімнен бенз(а)пиренді, гександы, ащы калийді шайғындау, құрамында бенз(а)пирен бар полициклді хош иісті көмірсутектерінің түйіршіктерін бөлу, алынған түйіршікті кедергі келтіретін қоспалардан сефадексті бағанада және ацетилирленген целлюлозаның жұқа қабатында немесе анықталған бенз(а)пиренді кейіннен сандық анықтаумен пластинкаларда бөлме темрпературасы жағдайында тиімділігі жоғары сұйықтықтық хроматографиялаумен немесе спектрофлуориметриялаумен тазарту болып табылады.

Тиімділігі жоғары сұйықтықтық хроматография әдісін және бөлме температурасы жағдайында спектрофлуориметрия әдісін пайдаланып талданатын өнімдерде бенз(а)пиреннің салмақтық үлесінің анықталатын шамаларының ауқымы 0,0001-0,002 мг/кг немесе $0{,}1 \times 10^{-7}$ $2{,}0 \times 10^{-7}$ %. Тиімділігі жоғары сұйықтықтық хроматография

әдісін қолданған жағдайда ерітіндіде анықталатын бенз(а)пиреннің салмақтық шоғырының оңтайлы ауқымы 0,01-0,02 мкг/см^3, спектрофлуориметрия әдісін пайдаланған жағдайда 0,02-0,2 мкг/см^3 құрайды.

5.1 Аппаратура, материалдар мен реактивтер

Толқын ұзындығы 300 460 нм спектралды ауқымды, астаушалар сиымдылығы 0,4 см^3 флуоресцентті спектрометр.

Толқын ұзындығы 300 420 нм спектралды ауқымды флуориметриялық детектормен сұйықтықтық хроматограф.

Қосылған фазалы сорбентпен толтырылған ұзындығы 150 мм және диаметрі 6 мм болат немесе шыны хроматографиялық бағана (мысалы, Supersosil LC-PAH).

ГОСТ 24104 бойынша ең жоғары өлшеу шегі 200 г дәлдік сыныбы 2 зертханалық таразы.

ГОСТ 24104 бойынша ең жоғары өлшеу шегі 500 г дәлдік сыныбы 2 жалпы арналған зертханалық таразы.

ИР-1М ротационды буландырғыш.

ГОСТ 25336 бойынша су ағынды зертханалық сорғы

Су моншасы

Электр қыздырғышты ММ-3М типті магнитті араластырғыш.

Спектралды ауқымы 250-700 нм және УФ сәулелену көзі ретінде БУВ-15 типті лампалы «Хроматоскоп» түрлі ультракүлгін сәулелендіргіш.

УФ сәулелендіру көзі ретінде ОЛД диагностикалық лампа

х х см өлшемді хроматографиялық шыны камера

Жұқа қабатты хроматографиялауға арналған 5 х 20 және 20 х 20 см шыны пластинкалар.

ТСХ арналған х см өлшемді Силуфол пластиналары

Ұзындығы 500 мм және диаметрі 20 мм шеті төмен тартылған және сиымдылығы 50 60 см^3 ПШ 14/23 сұйыққоймалы хроматографиялық шыны бағана.

ГОСТ 25336 бойынша ХПТ-2-400-29/32 ХС немесе ХШ-1-400-29/32 ХС тоңазытқыш.

ГОСТ 25336 бойынша АИО-14/23-50 ТС немесе АИО-14/23-14/23-65 ТС типті алонж.

ГОСТ 427 бойынша өлшеу бағамы 0,1 см өлшейтін сызғыш.

ГОСТ 25336 бойынша 250-19/26-29/32 ТС немесе 300-19/26-29/32 дефлегматор.

ГОСТ 25336 бойынша П-1-19/26-14/23-14/23 ТС немесе Н-2-19/26-14/23 ТС қондырғы.

ГОСТ 25336 бойынша ВД-1-500 немесе ВД-3-500 бөлгіш құйғы.

ГОСТ 25336 бойынша ВФО-32-ПОР 100-14/23 ХС немесе ВФО-32-ПОР 160-14/23 ХС құйғы.

ГОСТ 25336 бойынша 1-100, 1-250 немесе 3-100, 3-250 өлшемді цилиндр.

ГОСТ 25336 бойынша В-1-100 немесе В-1-150 химиялық стакан.

ГОСТ 25336 бойынша 1-500 құты.

ГОСТ 25336 бойынша Гр 50-14/23 құты.

ГОСТ 25336 бойынша К-1-100-29/32 ТХС, К-1-25Р-29/32 ТХС, К-1-500-29/32 ТХС немесе П-1-500-29/32 ТХС құтылар.

ГОСТ 25336 бойынша $К_н$-1000-29/32 ТХС, ГОСТ 25336 бойынша $К_н$-250-34 ТХС құтылар.

ГОСТ 25336 бойынша 2-100-2 өлшемді құтылар.

ГОСТ 9147 бойынша 1 немесе 2 немесе 3 Бюхнер құйғысы.

ГОСТ 25336 бойынша СВ-14/8 немесе СВ-19/9, немесе СВ-24/10, немесе СВ-34/12 өлшеуге арналған стакандар (шыны шақшалар).

МШ-10 типті микроқысқаштар, шыны қылтүтіктер.

ГОСТ 29228 немесе ГОСТ 29229 бойынша 1-1-1, 1-1-2, 2-1-5, 8-2-0,2 тамшуырлар.

Индикаторлы әмбебап қағаз.

ГОСТ 12026 бойынша сүзетін зертханалық қағаз.

Қолданыстағы нормативтік құжаттама бойынша қандауыр немесе жұқа қалақша.

н.гексан, т., қолданыстағы нормативтік құжаттар бойынша.

ГОСТ Р 51652 бойынеша ректификатталған этил спирті немесе ГОСТ 18300 бойынша ректификатталған техникалық спирт.

ГОСТ 5955 бойынша бензол.

ГОСТ 5789 бойынша толуол.

ГОСТ 4204 бойынша күкірт қышқылы.

ГОСТ 2603 бойынша ацетон, т. немесе әс.т.

ГОСТ 5815 бойынша сіркесу ангидриді, т.

ГОСТ 20289 бойынша диметилформамид, т.ү.т.

Қолданыстағы нормативтік құжаттар бойынша ацетонитрил.

ГОСТ 24363 бойынша калий гидрототығы.

Қолданыстағы нормативтік құжаттама бойынша микрокристалды ұнтақ целлюлоза.

Бенз(а)пирен, негізгі заттың болуы 98 % кем емес.

Бенз(в)хризен, негізгі заттың болуы 98 % кем емес.

Сефадекс LH-20.

АСКГ саркалы құмсірне.

Белсенділігі деңгейлі хроматографиялауға арналған алюминий тотығы

ГОСТ 6709 бойынша дистилденген су.

Метрологиялық сипаттамалары бар өзге де өлшеу құралдарын және техникалық сипаттамалары бар жабдықтарды, сондай-ақ сапасы бойынша көрсетілгендерден төмен емес реактивтер мен материалдарды қолдану рұқсат етіледі.

5.2 Сынаққа дайындық

5.2.1 Ерітінділерді дайындау

Ерітінділерді (н.октан, этил спирті, ацетон, бензол) жалпы қабылданған тәсілмен дефлегматормен айдайды.

Айдау құтысына 120 $см^3$ бензолды және 1 $дм^3$ ерітіндіге 36 $см^3$ суды қосып диметилформамидті айдайды.

5.2.2 Ацетилді целлюлозаны дайындау

(50,0±2,0) г микрокристаллды целлюлозаны сиымдылығы 500 $см^3$ жалпақ түпті құтыға салады, жеке құтыда дайындалған 150 $см^3$ бензол мен толуол қоспасын, 70 $см^3$ сіркесуы ангидридін және 0,3 $см^3$ күкірт қышқылын қосады. Реакциялық қоспаны магнитті араластырғышпен 6-8 сағ бойына араластырады, араластырмай тағы 18 сағ қалдырады, содан кейін сұйық фазаны қалқымалайды, ал қалдығына 300 $см^3$ этил спиртін құяды, араластырады, спиртте 24 сағатқа қалдырады, содан кейін целлюлозаны Бюхнер құйғысымен сүзеді, 100 $см^3$ этил спиртімен және жуатын судың бейтарап реакциясына дейін дистилденген сумен жуады (индикаторлы қағаз бойынша).

Содан кейін ацетилді целлюлозамен хроматографиялық белсенділікті тексереді. Ол үшін талдауды жүргізерден 3-4 сағат бұрын 60:25:15 көлемді қатынаста алынған этил спирті, ацетон және су қоспасын дайындайды да оны сүзетін қағаз телімдері төселген хроматографиялық камераға құяды. Ерітінді қабатының биіктігі 1,5 2 см болу керек. 1,5 г ацетилирленген целлюлозаны 7 $см^3$ этил спиртінде қалқымалайды және қалқыманы тегіс қабатпен 5 х 20 см шыны пластинаға құяды, ерітіндіні ауада толық буландырады да пластинкаға микрошприцпен немесе шыны қылтүтікпен нүктеге салмақтық шоғыры 1 мкг/$см^3$ бенз(а)пиреннің 5 мкл ерітіндісін жағады. Пластинаны хроматографиялық камераға салады да ерітінді деңгейі құйған сызықтан 100мм-ге көтерілгенге дейін камерада қалдырады. Хроматографиялау аяқталғаннан кейін пластинаны шағырады, ауада

кептіреді және ультра күлгін сәулелендіргіш лампасы астында бенз(а)пирен тамшысын флуоресцентті көгілдір түспен белгілейді. Бастапқы сызықтан ерітінді соңғы сызығына және ортасына дейін бенз(а)пирен тамшыларының қашықтығын өлшейді, пластинка бойынша бенз(а)пиреннің жылжу жылдамдығын бағалайтын R_f мәнін мына формула бойынша есептейді:

$$R_f = \frac{L_{БП}}{L}, \qquad (6)$$

мұнда $L_{БП}$ бенз(а)пиреннің бастапқы сызығынан соңына дейінгі қашықтық, мм;

L ерітіндінің бастапқы сызығыдан шетіне дейінгі қашықтық, мм.

бенз(а)пиреннің R_f мәні 0,1 құрауы керек.

5.2.3 Жұмысшы пластиналарды дайындау

5.2.3.1 Бірінші тәсіл

Жұмысшы пластинаны дайындау үшін 5 г ацетилирленген целлюлозаны 20 см³ этил спиртінде қалқымалайды және тегіс қабатпен 20х20 см пластинаға құяды.

5.2.3.2 Екінші тәсіл

Жұмысшы пластинаны дайындау үшін 16 г ацетилирленген целлюлозаны, 8 г алюминий тотығын және 20 $см^3$ метанолды 1 минут бойына қатты араластырады да балшық тектес ерітіндіні 20х20 см пластинкаларға 0,25 мм қабатпен жағады. Пластинаны бірінші ауада, содан кейін 2 сағат бойы 60°С температурасы жағдайында кептіретін шкафта кептіреді де ылғалсорғышта сақтайды.

5.2.4 Бенз(а)пирен мен бенз(в)хризеннің стандарты ерітінділерін дайындау

Өлшеуге арналған стакандарға (шыны шақша) (10,0±0,2) мг бенз(а)пирен мен бенз(в)хризенді өлшеп салады. Өлшенділерді сиымдылығы 100 $см^3$ өлшемді құтыға: бензолмен бенз(а)пиренді, ацетонитрилмен бенз(в)хризенді салады, содан кейін бенз(а)пирен ерітіндісінің көлемін белгіге дейін бензолмен, бенз(в)хризен ерітіндісіні көлемін ацетонитрилмен жеткізеді. Алынған ерітінділер 100 мкг/$см^3$ салмақтық шоғырға ие болады. Ерітінділерді салқын қараңғы жерде үш айға дейін сақтайды.

5.2.5 Бенз(а)пирен мен бенз(в)хризеннің жұмысшы ерітінділерін дайындау.

Жұмысшы ерітінділерді сиымдылығы 1, 5 және 10 $см^3$ тамшуырлар мен сиымдылығы 100 $см^3$ өлшемді құтыларды пайдаланып стандарттарды ерітінділерді араластырып дайындайды, ерітінді көлемін белгіге дейін сәйкес еріткішпен жеткізеді, араластырады және бір айдан артық емес салқын жерде сақтайды.

Салмақтық шоғыры 1,0 мкг/$см^3$ бенз(а)пирен ерітіндісін дайындау (спектрофлуориметрия әдісімен анықтау үшін): стандартты ерітіндіден 1,0 $см^3$ алады да сиымдылығы 100 $см^3$ өлшемді құтыға салады; ерітінді көлемін белгіге дейін бензолмен жеткізеді.

Салмақтық шоғыры 0,25: 1,0 және 5,0 мкг/$см^3$ бенз(а)пирен ерітіндісін дайындау (тиімділігі жоғары сұйықтықтық хроматографиялау әдісімен анықтау үшін): стандартты ерітіндіден сәйкес 0,25; 1,0; 5,0 $см^3$ сұрыптайды және сиымдылығы 100 $см^3$ өлшемді құтыларға салады; ерітінділер көлемін белгіге дейін ацетонитрилмен жеткізеді.

Салмақтық шоғыры 0,5 және 10 мкг/$см^3$бенз(в)хризен ерітінділерін дайындау: стандартты ерітіндіден 0,5 және 10 $см^3$ сәйкес сұрыптайды, сиымдылығы 100 $см^3$ өлшемді құтыларға салады; ерітіндінің әр көлемін белгіге дейін ацетонитрилмен жеткізеді.

5.2.6 Градусталған ерітінділерді дайындау

Ббенз(а)пирен және бенз(в)хризен қоспаларының градусталған ерітінділерін дайындау үшін сиымдылығы 250 $см^3$ өлшемді құтыларға сиымдылығы 1 $см^3$ тамшуырмен 2-кестеде берілген салмақтық шоғыры 100 мкг/$см^3$ бенз(а)пиреннің стандартты ерітінді және салмақтық шоғыры 10 мкг/$см^3$ бенз(в)хризеннің жұмысшы ерітінділерінің

көлемдерін салады, көлемін белгіге дейін ацетонитрилмен жеткізеді. Алынған ерітінділерді араластырады және қараңғы салқын жерде бір айдан артық емес сақтайды.

2-кесте

Ерітінді нөмірі	Бастапқы ерітінді көлемі, $см^3$		Градусталған ерітіндіде салмақтық шоғыр, мкг/$см^3$	
	Салмақтық шоғыры 100 мкт/$см^3$ бенз(а)пирен	Салмақтық шоғыры 10 мкг/$см^3$ бенз(в)хризен	Бенз(а)пирен	Бенз(в)хризен
1	1,00	1,00	0,40	0,04
2	0,50	0,50	0,20	0,02
3	0,25	0,25	0,30	0,01
4	0,10	0,10	0,04	0,004

5.3 Сынақ жүргізу

5.3.1 Өнімнен бенз(а)пиренді шығару

Дөңгелек түпті немесе жалпақ түпті сиымдылығы 100 $см^3$ құтыға салмағы 10 г өнімнің өлшендісін салады, 50 $см^3$ 92 %-ті этил спиртіндегі 4 г калий гидрототығынан тұратын ерітіндіні қосады. Құты ішіндегіні сілкіп араластырады. Құтыны кері тоңазытқышпен қосады және реакциялық қоспаның 3 сағ бойына қайнауы жағдайында су моншасында немесе магнитті араластырғышта қыздырады. Содан кейін құтыға тоңазытқыш арқылы 100 $см^3$ дистилденген суды қосады. Реакциялық массаны бөлме температурасына дейін салқындатады. Салқындатқаннан кейін реакциялық массаны сиымдылығы 500 $см^3$ бөлгіш құйғыға салады. Егер өршіткеннен кейін реакциялық массада қатты қалдық қалса, оны қалдықты 30 $см^3$ ыстық этил спиртінің сүзгішінде жуып Бюхнер құйғысында ажыратып алады. Реакциялық массаның сұйық фазасын шайғындау үшін пайдаланады. Бөлгіш құйғыға 30 $см^3$ н.гександы қосады. Құйғы ішіндегіні сілкиді де сұйықтықтар қабатталып бөліну үшін қалдырады. Бөлгіш құйғыдағы қоспада эмульсия түзілген жағдайда 20 $см^3$ этил спиртін қосады. Қабатталып бөлінгеннен кейін төменгі сулы-спиртті фазаны құтыға құйып алады, ал гексан шайғындысын басқа бөлгіш құйғыға құйып алады. Бұндай реакциялық массаны өңдеуді 20 $см^3$ дан порциялап эмульсиялар бөліну үшін шайғындауға 30 $см^3$ дан н.гексан және этил спиртін пайдаланып екі рет жүргізеді.

Шайғындауды аяқтағаннан кейін біріктірілген гексан шайғындысын бөлгіш құйғыда дистилденген сумен үш рет 30 $см^3$ дан жуады, шайғындыны кеуекті сүзгімен құйғыда сусыз натрий сульфатының қабаты арқылы сүзіп сиымдылығы 100 $см^3$дөңгелек түпті құтыға салады. Ерітіндіні ротациялық буландырғышта 50 $см^3$ көлеміне дейін сулы моншаның 60 ^{0}С артық емес температурасы жағдайда суалтады.

Суалтылған шайғынды сиымдылығы 500 $см^3$ бөлгіш құйғыға салады және оған 9:1 көлемдік қатынаста алынған 50 $см^3$ диметилформамид және су қоспасын қосады. Қоспаны 1 мин. бойына қатты сілкиді, фазалар ажыраған кейін төменгі қабатты сиымдылығы 200 $см^3$ жалпақ түпті құтыға құяды, ал жоғарғы гексан қабатынан 50 $см^3$ диметилформамид және су қоспасымен шайғындау жүргізеді. Гексан қабатын алып тастайды, түбі жалпақ құтыда біріктірілген диметилформамидті шайғынды бөлгіш құйғыға салады, 100 $см^3$ дистилденген су қосады да гександы су фазасымен 50 $см^3$ тен үш рет шайғындай жүргізеді. Сулы фазаны төгіп тастайды, ал гександы шайғынды 30 $см^3$ тен сумен үшін рет жуады, түбі жалпақ құтыға салады, 10 г сусыз натрий сульфатын қосады да бір сағат бойына ұстайды. н.гександы ротациялық буландырғышта 1,5 2,0 $см^3$

көлеміне дейін суалтады, қалған ерітіндіні су ағынды сорғымен қосылған вакуумды алонж арқылы ауа ағынымен кетіреді, құтыдағы қалдықты 0,5 $см^3$ этил спиртінде ерітеді.

Сиымдылығы 100 $см^3$ стаканға (2,5 $\pm$ 0,2) г сефадекс LH-20 өлшеп салады, 20 $см^3$ этил спиртін қосады және ісіну үшін 3-4 сағатқа қалдырады. Содан кейін гельді спирттің аз бөлігімен жуып шыны хроматографиялық бағанға құяды, ерітіндіні сорбент үстіндегі спирт қабаты 2 мм-ге төмен емес қалғандай етіп құяды. Дайындалған бағанға 0,5 $см^3$ порциялап этил спиртімен құтыдан үш рет жуып, құтыдағы шайғын қалдығын тамшуырмен жағады. Бағанадан полициклді хош иісті көмірсутектерін, оның ішінде бенз(а)пиренді элюирлеуді 40 $см^3$ этил спиртінде жүргізеді, 12 $см^3$ көлемді бірінші фракцияны алып тастайды, 25 $см^3$ көлемді екінші түйіршіктерді жинайды. 0,5 $см^3$/мин ерітіндіні элюирлеу жылдамдығын ауа үрлегіш немесе газ баллонымен қосылған қондырғы арқылы ауа немесе азот ағынымен кішкене артық қысым құрап қамтамасыз етеді. Газды силикагельмен толтырылған шыны трубка арқылы беру керек.

LH-20 сефадексті бағананы бірнеше рет қолдануға болады. Ол үшін түйіршіктегеннен кейін сорбенттің кеуіп кетуін болдырмай бағананы 25 $см^3$ этил спиртімен жуады және келесі сынаманы енгізеді.

Екінші түйіршікті ерітіндіні сиымдылығы 50 $см^3$ алмұрт тектес құтыға салады, ерітіндіні 0,5 1,0 $см^3$ көлеміне дейін суалтады, оның қалдығын ауа немесе азот ағынында кетіреді.

Құрамында бенз(а)пирен бар алынған түйіршіктерді әрі қарай тиімділігі жоғары сұйықтықтық хроматографиялау немесе спектрофлуориметриялық әдіс көмегімен талдайды.

Бірдей уақытта әдістемеге сәйкес бірақ өнімнің өлшендісінсіз реактивтерді пайдаланып талдаудың барлық кезеңдерін өткізіп бақылау тәжірибесін жүргізеді.

5.3.2 Тиімділігі жоғары сұйықтықтық хроматографиялау әдісімен бенз(а)пиреннің болуын анықтау

5.3.2.1 Хроматографиялау шарттары

Хроматографиялау шарттары қолданылатын сұйықтықтық хроматограф және хроматографиялық бағана түріне қарай таңдалады.

Мысал ретінде бенз(а)пиренді хроматографиялық анықтаудың мынадай шарттары келтіріле алады.

«Kratos FS-970» флуоресцентті детекторлы «Altex-334» сұйықтықтық хроматограф.

5 мк түйіршіктейтін, ұзындығы 150 мм, диаметрі 4,6 мм Supelcosil LC-PAM бағана.

Флуориметриялық детектор: қоздыратын түс толқынының ұзындығы 300 нм, эмиссионды сүзгі 418 нм.

Жылжымалы фаза: 8:2 көлемдік қатынасты ацетонитрил және су,

Элюирлеу жылдамдығы 2,0 $см^3$/мин.

Енгізілетін сынама көлемі 20 мкл.

Күшейткіш сезімталдығын бенз(а)пиреннің және ішкі стандарт -бенз(в)хризен белгілерінің қанықтылығы шәкілдің 95 % аспайтындай етіп таңдайды.

Талдау уақыты 15 мин; бенз(а)пиреннің ұстау уақыты 5 мин, бенз(в)хризеннің 13 мин.

Талданатын ерітінділерді бірдей жағдайларда екі рет хроматографиялайды. Шыңдар аландарын интегратор көмегімен немесе шың биіктігін және биіктік жартысын оның еніне көбейтіп қолмен өлшейді.

Бенз(а)пиреннің болуын анықтауды ішкі стандарт әдісімен немесе қоспалар әдісімен жүргізеді.

5.3.2.2 Ішкі стандарт әдісімен 5.3.1 бойынша алынған ерітіндідегі бенз(а)пиреннің болуын анықтау

Сандық бағалаудың бұндай тәсілін пайдаланған кезде 5.2.6 бойынша дайындалған градусталған ерітінділерді пайдаланып алдын ала хроматографты градустауды жүргізеді.

5.3.2.1 көрсетілген шарттарда әр дайындалған ерітінді үшін үш хроматограммадан жазып алады және бенз(а)пирен және бенз(в)хризен шыңдарының алаңдарын өлшейді. Үш хроматограммалардан есептелген бензин(а)пирен және бена(в)хризен шыңдары алаңдарының орташа арифметикалық мәндерін анықтайды.

Градусталған коэффициентті К мына формуламен есептейді

$$K = \frac{m_1 \cdot S_2}{m_2 \cdot S_1} \qquad (7)$$

мұнда m_1 және m_2 енгізілген бенз(а)пирен (m_1) мен бенз(в)хризеннің (m_2) салмақтары,мкг;

S_1 және S_2 бенз(а)пирен (S_1) және бенз(в)хризен (S_2) шыңдарының алаңдары, $см^3$.

Градусталған коэффициентті К әр ерітінді үшін есептейді.

Оның мәндері барлық нәтижелердің градусталған коэффициентінің орташа арифметикалық мәндерінен 10 % артық емес ерекшелінбеуі керек.

Қоздыратын сәуленің толқын ұзындығы 300 нм және эмиссионды сүзгіштің 418 нм жағдайда градусталған коэффициенттің мәні 9,5 құрайды.

Талдауды бастар алдында сынамаларды сілтілік күйдіруге дайындау кезеңінде өнім сынамасына және бақылау тәжірибесінің сынамасына салмақтық шоғыры 0,5 мкг/$см^3$ бенз(в)хризеннің 50 мкл ерітіндісін енгізеді. Екі сынаманы да 5.3.1 көрсетілген сынақтың барлық кезеңдері арқылы өткізеді. Құрғақ қалдықты 200 мкл ацетонитрилде ерітеді.

5.3.3.1 көрсетілген жағдайларда салмақтық шоғыры 100 мкг/$см^3$ бенз(а)пирен ерітіндісінің және салмақтық шоғыры 100 мкг/$см^3$ бена(в)хризен ерітіндісінің хроматограммаларын жазып алады, бенз(а)пирен және бенз(в)хризеннің шыққан уақытын белгілейді. Содан кейін бенз(в)хризен қосылған бақылау тәжірибесі сынамасының және бенз(в)хризен қосылған сол өнім сынамасының хроматограммаларын жазып алады. Өнім сынамасы мен бақылау тәжірибесі сынамасындағы хроматограммаларда бенз(а)пирен және бенз(в)хризен шыңдарының алаңдарын өлшейді.

Әр сынама үшін екі хроматограммадан жазып алады. Екі хроматограммадан бенз(а)пирен және бенз(в)хризен шыңдары алаңдарының орташа арифметикалық мәнін есептейді. Алынған деректер негізінде өнім сынамасындағы m_1 және бақылау тәжірибесі сынамасындағы m_2 бенз(а)пиреннің салмағын анықтайды, мкг:

$$m_1 = \frac{m_{cm} \cdot S_1 \cdot K}{S_3}; \qquad m_2 = \frac{m_{cm} \cdot S_2 \cdot K}{S_4}; \qquad (8)$$

мұнда m_1 өнім сынамасындағы бенз(а)пирен салмағы, мкг;

m_2 бақылау тәжірибесі сынамасындағы бенз(а)пирен салмағы, мкг;

m_{cm} өнім сынамасына және бақылау тәжірибесі смынамасына енгізілген бенз(в)хризен салмағы, мкг;

S_1 және S_2 өнім сынамасы (S_1) және бақылау тәжірибесі смынамасы (S_2) хроматограммаларындағы бенз(а)пирен шыңдарының алаңы, $см^2$;

S_3 және S_4 өнім сынамасы (S_3) және бақылау тәжірибесі смынамасы (S_4) хроматограммаларындағы бенз(в)хризен шыңдарының алаңы, $см^2$;

К 5.3.2.2 бойынша белгіленген градусталған коэффициент.

5.3.2.3 Қоспалар әдісімен 5.3.1 бойынша алынған ерітіндіде (шайғында) бенз(а)пиреннің болуын анықтау

Қоспалар әдісін пайдаланған кезде сандық бағалау үшін өнім сынамасымен бірге бақылау тәжірибесі сынамасын талдайды. 5.3.1 бойынша өнім сынамасы мен бақылау тәжірибесі сынамасынан алынған түйіршіктерді 400 мкл ацетонитрилде ерітеді. Алынған ерітіндінің кіші бөлігін (40 мкл) түтікке немесе алмұрт тектес құтыға құйып екі бөлікке бөледі.

Өнім сынамасының, бақылау тәжірибесі сынамасының және салмақтық шоғыры 0,25 мкг/см^3 бенз(а)пирен ерітіндісінің хроматограммасын жазып алады. Бенз(а)пиреннің бөлінген уақытын белгілейді.

Өнім сынамасы мен бақылау тәжірибесі сынамасының қалған бөлігіне (360 мкл) салмақтық шоғыры 5 мкг/см^3 бенз(а)пирен ерітіндісінің 10-20 мкл қоспасын қосады. Алынған ерітіндіні тағы да хроматографқа енгізеді.

Барлық хроматограммаларды екі рет жазып алады. Бенз(а)пирен шыңдарының алаңдарын өлшейді. Екі хроматограммадан бенз(а)пирен шыңы алаңының орташа арифметикалық мәнін есептейді.

Алынған деректер негізінде өнім сынамасы m_1 мен бақылау тәжірибесі сынамасындағы m_2 бенз(а)пирен салмағын анықтайды, мкг.

$$m_1 = \frac{m_o \cdot S_1}{S_2 - 0{,}9S_1}; \qquad m_2 = \frac{m_k \cdot S_3}{S_4 - 0{,}9S_3}, \tag{9}$$

мұнда m_{on} және m_k өнім сынамасынан (m_{on}) және бақылау тәжірибесі сынамасынан (m_k) алынған шайғын бөлігіне қосылған бенз(а)пирен салмағы, мкг;

S_1 және S_2 өнім сынамасы (S_1) және бақылау тәжірибесі смынамасы (S_2) хроматограммаларындағы бенз(а)пирен шыңдарының алаңы, см^2;

S_3 және S_4 өнім сынамасы (S_3) және бақылау тәжірибесі смынамасы (S_4) хроматограммаларындағы бенз(в)хризен шыңдарының алаңы, см^2;

0,9 бенз(а)пирен қосылған сынама бөлігі.

5.3.3 Жұқа қабатты хроматографиялау әдісімен бенз(а)пиреннің болуын анықтау

5.3.3.1 Жұқа қабатты хроматографиялау әдісімен бенз(а)пиреннің болуын сапалық анықтау

Жұқа қабатты хроматографиялау әдісімен бенз(а)пиреннің болуын анықтау кезінде өнім сынамасымен бірге салмақтық шоғыры 1 мкг/см^3 бенз(а)пиреннің 50 мкл ерітіндісі қосылған бақылау тәжірибесі сынамасын да талдайды (бенз(а)пирен ерітіндісінің шоғыры мен көлемін алынған шоғыр талданатын өнімдегі бенз(а)пиреннің ШРШ сәйкестенідей үлгіде алады).

Өнім сынамасынан және бақылау тәжірибесі сынамасынан 5.3.1 бойынша алынған, құрамында бенз(а)пирен бар түйіршіктерді 0,5 см^3 бензолда ерітеді және әрі қарай жұқа қабатта хроматографиялауға түсіреді.

Ол үшін 5.2.2 көрсетілгендей дайындалған 20 х 20 см пластинаны немесе ТСХ «Силуфол» арналған пластинаны сорбент қабаты бойынша қандауырмен немесе жұқа қалақшамен бөлу телімін жүргізіп екі өріске бөледі: 1,5 2 см енді бүйірлік және негізгі. Негізгі өріске тегіс теліммен, пластинаканың төменгі шетінен 2 см алшақтатып және бүйір шеттерінен 1 см алшақтатып 5.3.1 бойынша бөлінген түйіршік ерітіндісін жағады. Ерітіндіні жұқалап керілген қылтүтік немесе микрошприц көмегімен жағады, дақтар өлшемі 5 мм-ден аспауы керек. Затты сандық тасымалдау үшін оны бензолдың аз көлемімен (0,4 0,6) см^3 құты қабырғасынан екі рет жуып алады. Бүйір өрістің бастапқы сызығына нүктеге салмақтық шоғыры 1 мкг/см^3 бенз(а)пиреннің 5 мкл ерітіндісін жағады. Ерітінді толық буланып кеткеннен кейін пластинканы алдын ала қанықтырылған хроматографиялық камераға 70° 85° бұрыш астында орналастырады және 60:25:15 қатынасында алынған этил спирті, ацетон және су қоспасында элюирлеу жүргізеді.

Ерітінді шеті пластинканың жоғарғы шетінен 2 см жеткен кезде, оны камерадан шығарып алады, ауада кептіреді және толқын ұзындығы 366 нм жағдайында ультракүлгін сәулелендіргіш лампасы астында бенз(а)пиреннің хроматографиялық аймағын көрсетеді. Бенз(а)пиреннің шамалы санын шайғынг тамшысында оның флуоресценциясын стандартпен қанықтылығын салыстырып бағалайды. Егер шайғында бенз(а)пирен байқалса, онда жұқа қабатты хроматографиялау (5.3.3.2) немесе бөлме температурасы жағдайында спектрофлуориметриялаудың (5.3.4) сандық әдісі көмегімен сандық анықтау жүргізу қажет.

5.3.3.2 Жұқа қабатты хроматографиялау әдісімен бенз(а)пиреннің болуын сандық анықтау

20х20 өлшемді «Силуфол» пластинкасын 1-суретке сәйкес жұқа қарандаш сызықтарымен белгілейді. Пластинканың төменгі оң бұрышында шетінен 1,5 см қашықтықта микрошприц көмегімен 20 мкл сынама шайғынын жағады. Пластинканың төменгі сол бұрышында шетінен 1,5 см қашықтықта микрошприц көмегімен 20 мкл бенз(а)пиреннің жұмысшы ерітіндісін жағады. Пластинканың жоғарғы оң бұрышына пластинканың жоғары шетінен 1, 2 және 3 см қашықтықта микрошприц көмегімен 2,0, 4,0 және 6,0 мкл сәйкес бенз(а)пиреннің стандартты ерітіндісін жағады.

Хроматографиялауды 5.3.3.1т. ұқсас жағдайларда жүргізеді. Шайғын тамшысының флуоресценциялану қанықтылығын бен(а)пирен стандартты ерітіндісінің түрлі санының флуоресценциялану қанықтылығымен салыстырып шайғын тамшысында бенз(а)пирен нанограммаларының (нг) санын анықтайды.

Екі параллель анықтаулар жүргізеді.

Бенз(а)пиреннің болуын 5.4.2 бойынша есептейді.

5.3.4 Бөлме температурасы жағдайында спектрофлуориметрия әдісімен бенз(а)пиреннің болуын анықтау

Негізгі өрістегі бенз(а)пирен аймағынан алынған сорбентті қандауыр немесе жұқа қалақша көмегімен пластинкадан қырып алады да шыны сүзгіге салады, одан затты бірнеше рет сиымдылығы 100 $см^3$ құтыға 50 $см^3$ бензолмен элюирлейді, әрі қарай ерітіндіні кішкене көлемге дейін суалтады, ерітінді қалдығын ауа ағынымен кетіреді және құтыға 1 $см^3$ бензолды қосады.

Спектрофлуориметрде сканерлеу жылдамдығы 60 нм/мин жағдайында 400 440 нм ауқымында қоздыратын сәуленің толқын ұзындығы 386 нм жағдайынжа өнім сынамасының және бенз(а)пирен қосылған бақылау тәжірибесі сынамасының флуоресценция спектрлерін жазады.

Ерітінді спектрлерін саңылау мен бенз(а)пирен белгісі 406 нм жағдайында құрал шкаласының 0,4 0,6 құрағандай ерітінді бойынша бақылау сынымасын күшейту коэффициентін реттеп күшейтудің бір режимінде жазып алады. Әр ерітінді үшін жақсы қайталанғыштыққа қол жеткізіп спектрді екі рет жазып алады. Алынған спектрограммаларда жоғары 406 нм жағдайында өнім сынамасы мен бақылау тәжірибесі сынамасы үшін бенз(а)пиреннің спектралды сызығының биіктігін миллиметрде өлшейді.

Берілген екі спектограммалар бойынша бенз(а)пирен биіктігінің орташа мәнін есептейді. Өнім сынамасында бенз(а)пиреннің болуы жоғары деңгей жағдайында бензолмен араластырады және бақылау сынамасына сияқты күшейтудің сол режимінде спектрді қайта жазып алады.

Екі параллель анықтаулар жүргізеді.

Бенз(а)пиреннің болуын 5.4.3 бойынша есептейді.

5.4 Нәтижелерді өңдеу

5.4.1 Тиімділігі жоғары сұйықтықтық хроматографиялау әдісін пайдаланған кездегі өнімдегі бенз(а)пиреннің салмақтық үлесін X_1, %, немесе X_2, мг/кг мына формулалар бойынша есептейді:

$$X_1 = \frac{(m_1 - m_2)\cdot 100}{m\cdot 1000\cdot 1000} = \frac{(m_1 - m_2)}{m}\cdot 10^{-4} \quad (10)$$

$$X_2 = \frac{(m_1 - m_2)}{m} \quad (11)$$

мұнда m_1 өнім сынамасындағы бенз(а)пиреннің салмағы, мкг;

m_2 бақылау тәжірибесі сынамасындағы бенз(а)пиреннің салмағы, мкг;

m талдау үшін алынған өнім салмағы, г.

5.4.2 Жұқа қабатты хроматографиялау әдісін пайдаланған және спектрофлуориметрия әдісін пайдаланған жағдайда өнімдегі бенз(а)пиреннің салмақтық үлесін X_1, %, немесе X_2, мг/кг мына формуламен есептейді:

$$X_1 = \frac{c_{CT}\cdot H\cdot V\cdot 100}{H_{CT}\cdot m\cdot 1000\cdot 1000} = \frac{c_{CT}\cdot H\cdot V}{H_{CT}\cdot m}\cdot 10^{-4} \quad (12)$$

$$X_2 = \frac{c_{CT}\cdot H\cdot V}{H_{CT}\cdot m} \quad (13)$$

мұнда сст 5.2.5 бойынша дайындалған жұмысшы ерітіндідегі және бақылау тәжірибесі сынамасына қосылған бенз(а)пиреннің салмақтық шоғыры, мкг/см^3;

H өнім сынамасының спектрограммасындағы бенз(а)пиреннің спектралды сызығының биіктігі, мм;

H_{CT} бақылау тәжірибесі сынамасының спектрограммасындағы бенз(а)пиреннің спектралды сызығының биіктігі, мм;

V бақылау тәжірибесі сынамасына қосылған бенз(а)пирен жұмысшы ерітіндісінің көлемі, см^3;

m сынақ үшін алынған өнім өлшендісінің салмағы, г.

Нәтижені екінші белгілі санға дейін дөңгелектейді.

За окончательный результат испытания принимают среднеарифметическое двух параллельных определений с тем же числом значащих цифр.

Егер параллель анықтаулар нәтижелері арасында айырмашылық $|X_1 \quad X_2| \leq 0{,}01dX$ аспасы, мұнда X_1, X_2 және X параллель анықтаулардың нәтижелері мен олардың орташа арифметикалық мәні, ал d ұқсастықты бақылау нормативі жағдайда, онда X орташа арифметикалықты талдау нәтижесі деп қабылдайды. Олай болмаған жағдайда талдауды қайталайды. Норматив d мәні 3-кестеде берілген.

Талдаудың алынған нәтижесі X және 3-кестеде берілген салыстырмалы кінарат мәні δ бойынша абсолют кінаратты $\Delta = 0{,}01\ \delta X$ есептейді.

Талдау нәтижесін P = 0,95 жағдайында ($X \pm \Delta$), мг/кг немесе % түрінде береді.

5.5 Талдау нәтижелерінің дәлдігін бақылау

Талдау нәтижелерінің сапасына ішкі шұғыл бақылау (ІШБ) талдау нәтижелерінің ұқсастық, қайталанғыштығы және дәлдігін бақылаудан тұрады.

5.5.1 Параллель анықтаулардың ұқсастығын 5.3 сәйкес әр талданатын сынама үшін бақылайды.

5.5.2 Қайталанғыштыққа бақылау жүргізу үшін жұмысшы сынамаларды пайдаланады. Сынаманы тең екі бөлікке бөледі және әдістемеге сәйкес екі түрлі зертханаларда немесе талдау жүргізудің шарттарын барынша түрлендіріп, яғни өлшемді

ыдыстың түрлі жинағын пайдаланады, талдауды екі күнде жасайды немесе екі талдаушы жасап талдайды.

Бақылау талдаулардың қайталанғыштығын, егер $|X_1 \quad X_2| \leq 0{,}01DX$ болса қанағаттанарлық деп есептейді, мұнда X_1, X_2 және X түрлі зертханаларда немесе бір зертханада түрлі жағдайларда алынған бірдей сынаманы талдау нәтижелері мен олардың орташа арифметикалық мәні, D қайталанғыштықты ішкі шұғыл бақылау нормативінің мәні. Нормативтің D мәні 3-кестеде берілген.

Қайталанғыштыққа бақылау жүргізу кезеңділігі екі аптада бір реттен жиі емес.

3-кесте Сенімділік ықтималдығы P = 0,95 жағдайында өлшеулер ауқымы, салыстырмалы кінарат сипаттамаларының мәні мен салыстырмалы кінаратты (ұқсастық және қайталанғыштық) кездейсоқ құрайтын шұғыл бақылау нормативтері

өлшеу ауқымы, мг/кг	Кінарат сипаттамасы (онда кінарат берілген ықтималдықпен болатын аралық шегі) $\pm \delta$, %	Ұқсастықты шұғыл бақылау нормативі $d_{отн}$, % (екі параллель анықтаулар нәтижелері үшін, n=2)	Қайталанғыштықты шұғыл бақылау нор-мативі $D_{отн}$, % (өл-шеулердің екі нәти-желері үшін, m = 2)
0,0001-0,001 дейін қоса	42	40	60
0,001-0,002 дейін қоса	29	28	42

5.5.3 Дәлдікке бақылау жүргізу үшін қосылған бенз(а)пирен белгілі жұмысшы сынамаларды пайдаланады. Сынаманы тең екі бөлікке бөледі, біріншісін әдістемеге сәйкес талдайды, ал екіншісіне бенз(а)пиреннің белгілі көлемін енгізеді және әдістемеге сәйкес талдайды. Қоспа шамасы талданатын сынамада бенз(а)пиреннің болуы 50 150 % құрауы керек.

Бақылау талдаулардың дәлдігін егер $|X_1 \quad X \quad c| \leq K$ болса қанағаттанарлық деп есептейді, мұнда X_1, X және c бенз(а)пирен қосылған сынаманы және нақты сынаманы бақылау талдау нәтижелері мен сәйкес бенз(а)пирен қоспасының шамасы; K дәлдікті шұғыл бақылау нормативі.

Дәлдікті шұғыл бақылау нормативін мына формулалармен есептейді:

зертхана ішінде бақылау жүргізген жағдайда (P = 0,90)

$$K = 0{,}84\sqrt{(\Delta_{X1})^2 + (\Delta_X)^2} \qquad (14)$$

Сыртқы бақылау жүргізген жағдайда (P = 0,95)

$$K = \sqrt{(\Delta_{X1})^2 + (\Delta_X)^2} \qquad (15)$$

мұнда $\Delta_{X1} + \Delta_X$ бенз(а)пирен қосылған сынамадағы және нақты сынамадағы хлоридтердің салмақтық шоғырына сәйкесетін кінарат сипаттамаларының мәндері;

$\Delta_{X1} = 0{,}01 \ \delta_{X1} \ X_1$ және $\Delta_X = 0{,}01 \ \delta_X X$, мұнда X_1 және X қоспалы және нақты сынамадағы хлоридтердің салмақтық шоғыры, мг/кг немесе %;

Салыстырмалы кінарат мәні δx ($\delta x1$) 3-кестеде берілген.

Талдау дәлдігіне бақылауды айына бір реттен жиі емес, сондай-ақ жұмыста ұзақ үзілістен кейін реактивтерді алмастырған кезде жүргізеді.

Дәлдікке шұғыл бақылау нормативтері асқан жағдайда қайталау талдауларын жүргізеді. Көрсетілген нормативтердің қайта жоғары асқаны жағдайда талдауларды тоқтата тұрады, қанағатсызданарлық нәтижелерге әкелетін себептерін анықтайды және оларды жояды.

ІШБ нәтижелерін арнайы журналға тіркейді.

6 Қауіпсіздік техникасы талаптары

6.1 Өлшеулерді орындау кезінде ГОСТ 12.1.007 бойынша химиялық реактивтермен жұмыс кезіндегі қауіпсіздік талаптарын, ГОСТ 12.1.004 бойынша өрт қауіпсіздігі талаптарын және ГОСТ 12.1.019 бойынша электр қауіпсіздігі талаптарын, сондай-ақ спектрофлуориметр, сұйықтықтық хроматограф, ультракүлгін жарықтандырғыш және өзге де құралдар мен жабдықтарға арналған нормативтік құжаттарда берілген талаптар сақталуы керек.

6.2 Өлшеулер орындалатын үймарат тарту және әкелу желдеткішімен жабдықталған болуы керек. Жұмысты резеңке қолғап пайдаланып иіс тарту шкафында жүргізу керек.

6.3 Бенз(а)пирен ерітінділері, сондай-ақ өңделген алюминий тотығы мен ацетилирленген целлюлозаны пайдаланып болғаннан кейін бенз(а)пиренді тотықтыру үшін ГОСТ 5777 бойынша марганец қышқылды калийдің қатты ерітіндісімен өңдеу, содан кейін ерітіндіні судың көп мөлшерімен канализацияға төгеді.

7 Оператор біліктілігіне қойылатын талаптар

Өлшеулер орындауға және алынған нәтижелерді өңдеуге жоғары немесе арнайы химиялық білімі немесе химиялық зертханада жұмыс тәжірибесі бар, сондай-ақ хроматографиялық және спектрофлуориметрлік талдау техникасын меңгерген, жаттығу процесінде талдау әдістерін игерген және талдау кінаратын бақылау процедураларын орындау кезінде шұғыл бақылау нормативтеріне үлгеретін маман қатыстырылады.

ӘОС 663/664:543.9:006.354 **МСЖ 67.040**

Түйінді сөздер: тағамдық өнімдер, азық-түлік шикізаты, тағамдық және дәмдік қоспалар, бенз(а)пиреннің салмақтық үлесін анықтау, төмен температуралы спектрофлуометрия әдісі, сұйықтықтық хроматография әдісі, бөлме температурасы жағдайындағы спектрофлуориметрия

Ескертпелер үшін

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ.

Определение бенз(а)пирена в зерне, копченых мясных и рыбных продуктах методом ТСХ

СТ РК 1502-2006

Издание официальное

Комитет по техническому регулированию и метрологии Министерства индустрии и торговли Республики Казахстан

Астана

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН И ВНЕСЕН Республиканским государственным предприятием «Казахстанский институт стандартизации и сертификации» Комитета по техническому регулированию и метрологии

2 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ приказом Комитета по техническому регулированию и метрологии Министерства индустрии и торговли Республики Казахстан от 23 июня 2006 года № 249

3 Настоящий стандарт гармонизирован с ИСО 15302:1998 Животные и растительные жиры и масла. Определение бенз(а)пирена. Метод высокоэффективной хроматографии с обратной фазой.

4 СРОК ПЕРВОЙ ПРОВЕРКИ **2011 год**
ПЕРИОДИЧНОСТЬ ПРОВЕРКИ **5 лет**

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Комитета по техническому регулированию и метрологии Министерства индустрии и торговли Республики Казахстан

Содержание

1 Область применения 1

2 Нормативные ссылки 1

3 Отбор проб 2

4 Метод низкотемпературной спектрофлуориметрии 2

5 Методы высокоэффективной жидкостной хроматографии и спектрофлуориметрии при комнатной температуре 9

6 Требования техники безопасности 20

7 Требования к квалификации оператора 20

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ
Определение бенз(а)пирена в зерне, копченых мясных и рыбных продуктах методом ТСХ

Дата введения 2007.07.01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на продовольственное сырье, пищевые продукты, пищевые и вкусовые добавки и устанавливает определения бенз(а)пирена в зерне, копченых мясных и рыбных продуктах методом тонкослойной хроматографии с применением спектрофлуориметрии при низкой и комнатной температуре и высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Стандарты Российской Федерации, приведенные в настоящем стандарте применяются в порядке, установленном СТ РК 1.9.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы ссылки на следующие стандарты:

СТ РК 1.9-2003 Государственная система стандартизации Республики Казахстан. Порядок применения международных, региональных и национальных стандартов и нормативных документов по стандартизации, сертификации и аккредитации.

ГОСТ 12.1.004-91 Система стандартной безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования.

ГОСТ 12.1.007-76 Система стандартной безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности.

ГОСТ 12.1.019-79 Система стандартной безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты.

ГОСТ 427-75 Линейка измерительная металлическая. Технические условия.

ГОСТ 1770-74 Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Технические условия.

ГОСТ 2603-79 Ацетон. Технические условия.

ГОСТ 4204-77 Кислота серная. Технические условия.

ГОСТ 5777-84 Калий марганцовокислый технический. Технические условия.

ГОСТ 5789-78 Толуол. Технические условия.

ГОСТ 5815-77 Ангидрид уксусный. Технические условия.

ГОСТ 5955-75 Бензол. Технические условия.

ГОСТ 6709-72 Вода дистиллированная. Технические условия.

ГОСТ 9147-80 Посуда и оборудование лабораторные фарфоровые. Технические условия.

ГОСТ 9293-74 Азот газообразный и жидкий. Технические условия.

ГОСТ 12026-76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия.

ГОСТ 14919-83 Электроплиты, электроплитки и жарочные электрошкафы бытовые. Общие технические условия.

ГОСТ 18300-87 Спирт этиловый ректификованный технический. Технические условия.

Издание официальное

ГОСТ 20015-88 Хлороформ. Технические условия.

ГОСТ 20289-74 Диметилформамид. технические условия.

ГОСТ 24104-2001 Весы лабораторные. Общие технические требования.

ГОСТ 24363-80 Калия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 25336-82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры.

ГОСТ 29224-91 Посуда лабораторная стеклянная. Термометры жидкостные стеклянные лабораторные. Принципы устройства, конструирования и применения.

ГОСТ 29228-91 Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 2. Пипетки градуированные без установленного времени ожидания.

ГОСТ 29229-91 Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные с временем ожидания 15 с.

ГОСТ Р 51652-2000 Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья. Технические условия.

3 Отбор проб

3.1 Отбор и подготовку лабораторной пробы к испытаниям проводят в соответствии с нормативным документом на испытуемый вид продукции.

Из объединенной лабораторной пробы для испытания отбирают две параллельные навески.

4 Метод низкотемпературной спектрофлуориметрии

Сущность метода заключается в экстракции углеводородов, в том числе бенз(а)пирена, гексаном из продукта, предварительно обработанного спиртовым раствором едкого калия, выделении фракции полициклических углеводородов тонкослойной хроматографией на окиси алюминия и количественном определении в полученной фракции бенз(а)пирена методом низкотемпературной спектрофлуориметрии.

Диапазон определяемых величин массовой доли бенз(а)пирена в анализируемых продуктах – 0,0002 – 0,005 мг/кг или 0,2 х 10^{-7} – 5,0 х 10^{-7} %. Оптимальный диапазон определения массовых концентраций бенз(а)пирена в растворе составляет 0,01 – 0,05 мкг/см^3.

4.1 Аппаратура, материалы и реактивы

Спектрофотометр флуоресцентный с криогенной приставкой для выполнения измерений при температуре жидкого азота (- 196) °С и спектральным диапазоном длин волн 360 – 420 нм.

Осветитель ультрафиолетовый типа «Хроматоскоп» со спектральным диапазоном 250 – 700 нм и лампой типа БУВ-15 в качестве источника УФ-излучения.

Шкаф сушильный лабораторный, обеспечивающий температуру (250±4) ^{0}С.

Весы лабораторные 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г по ГОСТ 24104.

Весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 500 г по ГОСТ 24104.

Испаритель ротационный ИР-1М.

Баня водяная.

Электроплитка бытовая с закрытой спиралью и регулятором нагревания по ГОСТ 14919.

Сосуд Дьюара для жидкого азота любой вместимости

Ванны для хроматографирования (фотокюветы эмалированные).

Пластины стеклянные размером 15 х 30 и 20 х 40 см.

Колбы К-1-250-29/32 ТХС, К-1-100-29/32 ТХС, К-1-500-29/32 ТХС или П-1-500-29/32 ТХС по ГОСТ 25336.

Холодильники ХПТ-1-300-14/23 ХС или ХПТ-1-400-14/23 ХС по ГОСТ 25336

Холодильники ХПТ-2-400-29/32 ХС и ХПТ-1-300-29/32 или ХПТ-400-29/32 ХС по ГОСТ 25336.

Дефлегматор 250-19/26-29/32 ТС или дефлегматор 300-19/26-29/32 ТС по ГОСТ 25336.

Пробирки стеклянные П2-10-180 ХС по ГОСТ 25336.

Алонж АИО-14/23-50 ТС по ГОСТ 25336.

Насадка П-1-19/26-14/23 ТС или Н2-19/23 по ГОСТ 25336.

Насос водоструйный лабораторный по ГОСТ 25336.

Пипетки вместимостью 1, 2, 5, 10 $см^3$ по ГОСТ 29228 и ГОСТ 29229.

Воронка ВФО-32-ПОР 100-14/23 ХС или ВФО-32-ПОР 160-14/23 ХС по ГОСТ 25336.

Пробирки мерные П-2-15-14/23 ХС по ГОСТ 1770.

Воронка делительная ВД-1-500 или ВД-3-500 по ГОСТ 25336.

Цилиндры мерные 1-100, 1-250 или 3-100, 3-250 по ГОСТ 25336.

Стаканчики для взвешивания (бюксы) СВ-14/8, или СВ-19/9, или СВ-24/10, или СВ-34/12 по ГОСТ 25336.

Термометр с пределами измерения температуры 0 – 250 ^{0}С с ценой деления 1 ^{0}С по ГОСТ 29224.

Линейка измерительная с ценой деления 0,1 см по ГОСТ 427.

Колбы мерные 2-100-2 по ГОСТ 25336.

Капилляры стеклянные, палочки стеклянные.

н.октан, ч., по действующим нормативным документам.

н.гексан, ч., по действующим нормативным документам.

Спирт этиловый ректификованный технический по ГОСТ 18300 или спирт этиловый ректификованный по ГОСТ Р 51652.

Эфир петролейный фракция 40 – 70 ^{0}С по действующим нормативным документам.

Хлороформ по ГОСТ 20015.

Бензол по ГОСТ 5955.

Алюминия окись для хроматографии 2 степени активности по действующим нормативным документам.

Калия гидроокись по ГОСТ 24363.

Бенз(а)пирен, содержание основного вещества не менее 98 %.

1,12-Бензперилен, содержание основного вещества не менее 98 %.

Азот жидкий по ГОСТ 9293.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Допускается применение других средств измерений с метрологическими характеристиками и оборудования с техническими характеристиками, а также реактивов и материалов по качеству не ниже указанных.

4.2 Подготовка к испытанию

4.2.1 Очистка растворителей

Растворители (н.октан, этиловый спирт, петролейный эфир, хлороформ и н.гексан) перегоняют общепринятым способом с дефлегматором.

4.2.2 Подготовка окиси алюминия

Окись алюминия высушивают в сушильном шкафу при температуре (250±4) ^{0}С в течение 4 ч и хранят в сосуде с пришлифованной пробкой.

4.2.3 Приготовление раствора бенз(а)пирена для тонкослойной хроматографии (раствор «свидетель»).

В бюксу отвешивают около 10 мг бенз(а)пирена, приливают несколько миллилитров петролейного эфира до полного растворения взятой навески.

Полученный раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ и доводят объем раствора до метки петролейным эфиром. Срок хранения раствора не более трех месяцев в холодильнике.

4.2.4 Приготовление стандартного раствора бенз(а) пирена.

В бюксу отвешивают (10,0± 0,2) мг бенз(а)пирена, приливают несколько миллилитров н.октана до полного растворения взятой навески. Полученный раствор количественно переносят в мерную колбу с притертой пробкой вместимостью 100 $см^3$ и доводят до метки н.октаном. Массовая концентрация бенз(а)пирена в полученном растворе 100 $мкг/см^3$. Раствор хранят в холодильнике.

Срок годности раствора не более трех месяцев.

4.2.5 Приготовление рабочих растворов бенз(а)пирена

Рабочие растворы бенз(а)пирена массовой концентрации 0,1; 0,04 и 0,02 $мкг/см^3$ в н.октане готовят последовательным разведением исходного стандартного раствора бенз(а)пирена, приготовленного по 4.4.4, в мерных колбах с притертой пробкой вместимостью 100 $см^3$. Растворы хранят в холодильнике. Срок годности растворов не более одного месяца.

4.2.6 Приготовление стандартного раствора 1,12-бензперилена (внутренний стандарт)

Для приготовления исходного раствора в бюксу отвешивают (10,0±0,2) мг 1,12-бензперилена, приливают несколько миллилитров н.октана до полного растворения взятой навески. Полученный раствор количественно переносят в мерную колбу с притертой пробкой вместимостью 100 $см^3$ и доводят до метки н.октаном. Массовая концентрация 1,12-бензперилена в полученном растворе 100 $мкг/см^3$. Раствор хранят в холодильнике. Срок годности раствора не более трех месяцев.

4.2.7 Приготовление рабочих растворов 1,12-бензперилена (растворы внутреннего стандарта)

Рабочие растворы 1,12-бензперилена массовой концентрации 0,01; 0,005; 0,002 и 0,001 $мкг/см^3$ готовят в н.октане последовательным разведением исходного стандартного раствора, приготовленного по 4.4.6, в мерных колбах с притертой пробкой вместимостью 100 $см^3$. Растворы хранят в холодильнике. Срок годности растворов не более одного месяца.

4.2.8 Подготовка пластин для хроматографического разделения

На стеклянную пластину размером 20х40 см равномерно насыпают окись алюминия. Затем с помощью стеклянной палочки, разделенной на три части (14, 1 и 3 см) резиновыми колечками толщиной 1 мм и шириной 3 мм, тщательно разравнивают окись алюминия.

4.3 Проведение испытания

4.3.1 Выделение бенз(а)пирена из продукта

В круглодонную колбу вместимостью 500 $см^3$ помещают навеску продукта массой 25 г, добавляют в колбу 20 $см^3$ дистиллированной воды, 200 $см^3$ этилового спирта и 20 г гидроокиси калия. Содержимое колбы перемешивают встряхиванием. Колбу соединяют с обратным холодильником и нагревают на водяной бане при кипении реакционной смеси в течение 3 ч. Затем в колбу через холодильник добавляют 150 $см^3$ воды; колбу снимают с бани и охлаждают до комнатной температуры.

После охлаждения жидкую фазу реакционной смеси декантацией переносят в делительную воронку, оставляя остаток продукта в колбе. В колбу с остатком добавляют 150 $см^3$ н.гексана, содержимое колбы энергично перемешивают и н.гексан декантируют в делительную воронку.

Воронку закрывают пробкой и энергично встряхивают, затем закрепляют в штативе и оставляют для расслаивания жидкостей. Для разделения образовавшейся эмульсии к смеси в делительной воронке добавляют 20 $см^3$ этилового спирта. После расслаивания нижнюю водно-спиртовую фазу сливают обратно в колбу с осадком, а гексановый экстракт переливают в колбу вместимостью 500 $см^3$.

Такую обработку реакционной смеси проводят еще два раза, используя для экстракции н.гексан по 100 $см^3$ и этиловый спирт для расслаивания эмульсии, порциями по 20 $см^3$.

По окончании экстракции остаток в колбе и гидролизат отбрасывают, а экстракт промывают в делительной воронке дистиллированной водой три раза по 50 $см^3$ и упаривают порциями в предварительно взвешенной с точностью до второго знака после запятой круглодонной колбе вместимостью 250 $см^3$ на ротационном испарителе при температуре водяной бани не более 60 ^{0}С.

Колбу с экстрактом оставляют в вытяжном шкафу для удаления следов растворителя, после чего вновь взвешивают. По разности между взвешиваниями определяют массу выделенного экстракта.

От экстракта в колбе отбирают $^1/_5$ часть в бюксу, не взвешивая. Колбу с остатком экстракта взвешивают. В бюксу с частью экстракта добавляют 0,1 – 0,2 $см^3$ раствора «свидетеля» бенз(а) пирена, приготовленного по 4.2.3. Содержимое бюксы и остаток в колбе растворяют в небольшом объеме петролейного эфира.

Полученные растворы количественно наносят на подготовленную пластину стеклянными капиллярами: на узкую часть – раствор из бюксы («свидетель»), на широкую – экстракт продукта из колбы. Растворы наносят равномерно сплошной полосой, отступив от нижнего края пластины 7 – 8 см.

Пластину помещают в ванну для хроматографирования под небольшим 20 ^{o} – 25 ^{o} углом, наливают петролейный эфир так, чтобы он не доходил до линии нанесения пробы. Ванну накрывают стеклом и проводят хроматографию, доводя фронт растворителя до верхнего края пластины.

Не высушивая пластину, облучают ее ультрафиолетовым светом и по светящейся полосе «свидетеля» определяют место нахождения бенз(а)пирена в исследуемой пробе. Отмечают границы полосы бенз(а)пирена на хроматограмме исследуемой пробы. Пластину высушивают на воздухе в вытяжном шкафу.

Отмеченную на хроматограмме исследуемой пробы полоску окиси алюминия с помощью предметного стекла снимают с пластины и количественно переносят на пористую пластину фильтрующей воронки. Воронку соединяют с круглодонной колбой вместимостью 100 $см^3$ и бенз(а)пирен элюируют с окиси алюминия 50 $см^3$ бензола, добавляя бензол небольшими порциями и перемешивая окись алюминия на воронке палочкой. Бензол упаривают досуха на ротационном испарителе при температуре водяной бани не более 60 ^{0}С. Остаток в колбе октаном количественно переносят в пробирку. Объем раствора в пробирке не должен превышать 5 $см^3$.

При анализе некоторых продуктов не происходит полного и четкого разделения флуоресцирующих компонентов образца при первичном хроматографировании выделенного из продукта экстракта. В этом случае на пластине выделяют более широкую полоску окиси алюминия на уровне «свидетеля», бенз(а)пирен элюируют с окиси алюминия бензолом так, как описано выше, и остаток после упаривания растворяют в этиловом спирте и полученный спиртовой экстракт повторно хроматографируют.

Для хроматографического разделения спиртового экстракта используют пластину размером 15 х 30 см толщиной слоя окиси алюминия 0,3 мм. На пластине отделяют две полосы шириной 10 и 3 см. На широкую часть пластины наносят с помощью стеклянного капилляра спиртовой экстракт анализируемого продукта, на узкую – раствор бенз(а)пирена в петролейном эфире (раствор «свидетель»). Пластину помещают в ванну под углом 20 – 25" и проводят хроматографию в хлороформе, доводя фронт растворителя до верхнего края пластины. В ультрафиолетовом свете отмечают по «свидетелю» полосу окиси алюминия с бенз(а)пиреном исследуемого продукта. Затем бенз(а)пирен элюируют с окиси алюминия бензолом и проводят все дальнейшие операции так, как указано выше.

Раствор бенз(а)пирена в н.октане переносят в пробирку. Объем раствора не должен превышать 5 $см^3$ при исходной навеске продукта 25 г.

В полученном растворе (экстракте) определяют содержание бенз(а)пирена методом низкотемпературной спектрофлуориметрии, используя для количественной оценки метод добавок или метод внутреннего стандарта.

4.3.2 Определение содержания бенз(а)пирена в растворе (экстракте), полученном по 4.3.1, методом добавок.

В три пробирки наливают пипеткой по 1 $см^3$ полученного раствора бенз(а)пирена в н.октане. Затем в первую пробирку приливают 2 $см^3$ н.октана. Во вторую пробирку приливают 1,5 $см^3$ н.октана и 0,5 $см^3$ рабочего раствора бенз(а)пирена массовой концентрации 0,1 мкг/$см^3$, приготовленного по 4.2.5. В третью пробирку вносят 1 $см^3$ н.октана и 1 $см^3$ того же рабочего раствора бенз(а)пирена, что и во вторую пробирку.

Спектрофлуориметрический анализ начинают с третьей пробирки. Для этого третью пробирку помещают в сосуд Дьюара с жидким азотом перед входной щелью спектрофотометра; устанавливают аналитическую линию флуоресценции бенз(а)пирена 403 нм при длине волны возбуждающего света 367 нм. Регулировкой коэффициента усиления и раскрытием щели, а также одновременной юстировкой пробирки в сосуде Дьюара добиваются максимального сигнала по регистрирующему прибору спектрофотометра (до 50 – 80 %), после чего записывают спектрограмму бенз(а)пирена в области 401 – 404 нм, фиксируя значение регистрирующего прибора спектрофотометра при длине волны 401 нм. Запись спектра повторяют дважды.

Затем последовательно замораживают в жидком азоте вторую и первую пробирки и записывают спектры флуоресценции в области длин волн 401 – 404 нм, обязательно выставляя перо самописца при длине волны 401 нм в то же положение, что при сканировании пробы в третьей пробирке.

Массовую концентрацию бенз(а)пирена в анализируемом экстракте определяют по графику, на котором по оси абсцисс откладывают значение добавки бенз(а)пирена (мкг), а по оси ординат – высоту пика максимума характеристической линии бенз(а)пирена при 403 нм, измеренную по полученным спектрограммам в миллиметрах.

Если массовая концентрация бенз(а)пирена в исследуемом растворе попадает в область, пригодную для измерений, то полученные экспериментальные точки лежат на одной прямой. Экстраполяция этой прямой до пересечения с осью абсцисс дает на ней отрезок, соответствующий содержанию бенз(а)пирена в растворе без добавки, т. е в 1 $см^3$ исследуемого раствора. В случае, если массовая концентрация бенз(а)пирена в анализируемом растворе выше верхнего предела диапазона измеряемых прибором концентраций, то проводят разбавление анализируемого раствора н. октаном.

4.3.3 Определение содержания бенз(а)пирена в растворе (экстракте), полученном по 4.3.1, методом внутреннего стандарта

В качестве внутреннего стандарта используют 1,12-бензперилен. В пробирку наливают 3 $см^3$ раствора бенз(а)пирена в н.октане, полученного по 4.3.1, и помещают в сосуд Дьюара с жидким азотом перед входной щелью спектрофотометра, устанавливают аналитическую линию 403 нм при длине волны возбуждающего света 367 нм и проводят запись спектра раствора в области длин волн 401 – 409 нм. По интенсивности линии (по высоте пика максимума характеристической линии бенз(а)пирена при 403 нм) оценивают приблизительное содержание бенз(а)пирена в пробе. В соответствии с этой оценкой далее в пробирку с 3 $см^3$ раствора бенз(а)пирена в н.октане добавляют раствор 1,12-бензперилена в таком количестве, чтобы в спектре пробы интенсивность 1,12-бензперилена при 406,3 нм была в 3 – 5 раз больше интенсивности линии бенз(а)пирена при длине волны 403 нм.

Проводят запись спектра в интервале длин волн 401 – 409 нм дважды.

Интенсивности характеристических линий бенз(а)пирена при 403 нм и 1,12-бензперилена при 406,3 нм (H_1 и H_2 соответственно) определяют по спектрограммам, измеряя высоты пиков в максимумах характеристических линий этих соединений в миллиметрах. В расчетах принимают среднюю величину. Рассчитывают коэффициент отношения (К) интенсивности линии бенз(а)пирена (H_1) к интенсивности линии 1,12-бензперилена (H_2), $K = H_1/H_2$.

Далее определяют этот коэффициент для стандартных растворов бенз(а)пирена ($K_{ст}$). Для этого в две пробирки наливают по 3 $см^3$ стандартных растворов бенз(а)пирена с массовой концентрацией 0,02 и 0,04 мкг/$см^3$. В каждую из пробирок наливают такое же количество 1,12-бензперилена, что и в пробирку с пробой. Проводят дважды запись спектров каждого раствора в интервале длин волн 401 – 409 нм.

При этом обязательно следят за тем, чтобы положение пера самописца при длине волны 401 нм во всех случаях фиксировалось на одном уровне.

Далее по спектрограммам определяют интенсивность характеристических линий бенз(а)пирена при 403 нм и 1,12-бензперилена при 406,3 нм (H_1 и H_2 соответственно). В расчетах принимают среднее значение. Рассчитывают $K_{ст} = H_1/H_2$ для каждой концентрации бенз(а)пирена.

Массовую концентрацию бенз(а)пирена в анализируемом растворе (с), мкг/$см^3$, вычисляют по формуле:

$$c = c_{ст}\, K/K_{ст}, \qquad (1)$$

где $c_{ст}$ – концентрация бенз(а)пирена в стандартном растворе, мкг/$см^3$;

К – коэффициент, найденный по спектрограмме анализируемого раствора с добавкой 1,12-бензперилена;

$K_{ст}$ – коэффициент, найденный по спектрограммам стандартного раствора бенз(а)пирена с добавкой 1,12-бензперилена, значение которого ближе по значению к коэффициенту анализируемого раствора с соответствующей добавкой 1,12-бензперилена.

Проводят два параллельных определения и одновременно контрольный опыт, который проводят через все стадии анализа с использованием всех реактивов согласно методике, но без навески продукта.

4.4 Обработка результатов

Массовую долю бенз(а)пирена X_1, %, X и X_2, мг/кг, вычисляют по формулам:

$$X_1 = \frac{(c - c_o)\cdot m_1 \cdot V \cdot 100}{m_2 \cdot m \cdot 1000 \cdot 1000} = \frac{(c - c_o)\cdot m_1 \cdot V}{m_2 \cdot m}\cdot 10^{-4} \qquad (2)$$

$$X_2 = \frac{(c - c_o)\cdot V \cdot m_1}{m_2 \cdot m}. \qquad (3)$$

где с – концентрация бенз(а)пирена, установленная по 4.3.2 или 4.3.3 в растворе (экстракте) анализируемого продукта, полученного по 4.3.1, мкг/$см^3$;

c_0 – концентрация бенз(а)пирена в растворе контрольного опыта, полученного по 4.3.1, мкг/$см^3$;

V – объем раствора бенз(а)пирена, выделенного из анализируемой пробы продукта, $см^3$,

m_1– масса экстракта, выделенного из анализируемого продукта, г;

m_2– масса экстракта, нанесенного на широкую полосу пластины, г;

m – масса навески продукта, г.

Результат округляют до второй значащей цифры.

За окончательный результат определения принимают среднеарифметическое двух параллельных определений с тем же числом значащих цифр.

Если расхождение между результатами параллельных определений не превышает $|X_1 - X_2| \leq 0{,}01dX$, где X_1, X_2 и X – результаты первого и второго параллельных определений и их среднеарифметическое, а d – норматив контроля сходимости, то среднеарифметическое X принимают за результат анализа. В противном случае анализ повторяют. Значение норматива контроля сходимости d приведено в таблице 1.

По полученному результату анализа X и значению относительной погрешности δ, приведенной в таблице 1, рассчитывают абсолютную погрешность $\Delta = 0{,}01\ \delta\ X$, мг/кг или %.

Результат анализа представляют в виде $(X \pm \Delta)$, мг/кг или % при P = 0,95.

4.5 Контроль точности результатов анализа

Внутренний оперативный контроль (ВОК) качества результатов анализа включает контроль сходимости, воспроизводимости и точности результатов анализа.

4.5.1 Сходимость параллельных определений контролируют для каждой анализируемой пробы согласно 4.4.

4.5.2 Для проведения внутреннего контроля воспроизводимости используют рабочие пробы. Пробу делят на две равные части и анализируют в соответствии с методикой в разных лабораториях или в одной лаборатории, максимально варьируя условия проведения анализа, т. е. используют разные наборы мерной посуды, анализы выполняют в разные дни или два различных аналитика.

Воспроизводимость контрольных анализов признают удовлетворительной, если $|X_1 - X_2| \leq 0{,}01DX$, где X_1, X_2 и X – результаты анализа одной и той же пробы, полученные в разных лабораториях или при варьирующих условиях в одной лаборатории и их среднеарифметическое значение, D – значение норматива внутреннего оперативного контроля воспроизводимости. Значение норматива D приведено в таблице 1.

Периодичность проведения контроля воспроизводимости – не реже одного раза в две недели.

Т а б л и ц а 1 – Диапазон измерений, значение характеристики относительной погрешности и нормативы оперативного контроля случайной составляющей относительной погрешности (сходимости и воспроизводимости) при доверительной вероятности P = 0,95

Диапазон измерений, мг/кг	Характеристика погрешности (граница интервала, в котором погрешность находится с заданной вероятностью) ± δ, %	Норматив оперативного контроля сходимости $d_{отн}$, % (для двух результатов параллельных определений, n = 2)	Норматив оперативного контроля Воспроизводимости $D_{отн}$, % (для двух результатов измерений, m = 2)
От 0,0002 до 0,001 включ.	42	40	60
Св. 0,001 до 0,005 включ.	32	30	45

4.5.3 Для проведения контроля точности используют рабочие пробы с известной добавкой бенз(а)пирена. Пробу делят на две равные части, одну из которых анализируют в соответствии с методикой; во вторую – вводят известную добавку бенз(а)пирена и затем также анализируют в соответствии с методикой. Величина добавки должна составлять 50 – 150 % содержания бенз(а)пирена в анализируемой пробе.

Точность контрольных анализов признают удовлетворительной, если $|X_1 - X - c| \leq 0{,}01K$, где X_1, X и с – результаты контрольных анализов пробы с добавкой бенз(а)пирена, реальной пробы и величина добавки бенз(а)пирена, соответственно; К – норматив оперативного контроля точности.

Норматив оперативного контроля точности рассчитывают по формулам:

при проведении внутрилабораторного контроля (Р = 0,90)

$$K = 0{,}84\sqrt{(\Delta_{X1})^2 + (\Delta_X)^2} \quad (4)$$

при проведении внешнего контроля (Р = 0,95)

$$K = \sqrt{(\Delta_{X1})^2 + (\Delta_X)^2} \quad (5)$$

где $\Delta_{X1} + \Delta_X$ – значения характеристики погрешности, соответствующие массовой концентрации хлоридов в пробе с добавкой хлоридов и в реальной пробе;

$\Delta_{X1} = 0{,}01\ \delta_{X1} X_1$ и $\Delta_X = 0{,}01\ \delta_X X$, где X_1 и X – массовая доля бенз(а)пирена в пробе с добавкой и в реальной пробе, % или мг/кг.

Значение относительной погрешности δ_X (δ_{X1}) приведены в таблице 1.

Контроль точности анализа проводят не реже одного раза в месяц, а также при смене реактивов или после длительного перерыва в работе.

При превышении нормативов оперативного контроля точности проводят повторные анализы.

При повторном превышении указанных нормативов анализы приостанавливают, выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и устраняют их.

Результаты ВОК заносят в специальный журнал.

5 Методы высокоэффективной жидкостной хроматографии и спектрофлуориметрии при комнатной температуре

Сущность метода заключается в экстракции углеводородов, в том числе бенз(а)пирена, гексаном из продукта, предварительно обработанного спиртовым раствором едкого калия, выделении фракции полициклических ароматических углеводородов, содержащей бенз(а)пирен, очистке полученной фракции от мешающих примесей на колонке с сефадексом и в тонком слое ацетилированной целлюлозы или пластинки с последующим количественным определением выделенного бена(а)пирена высокоэффективной жидкостной хроматографией или спектрофлуориметрией при комнатной температуре.

Диапазон определяемых величин массовой доли бенз(а)пирена в анализируемых продуктах при использовании метода высокоэффективной жидкостной хроматографии и метода спектрофлуориметрии при комнатной температуре 0,0001-0,002 мг/кг или $0{,}1 \times 10^{-7} - 2{,}0 \times 10^{-7}$ %. Оптимальный диапазон определяемых массовых концентраций бенз(а)пирена в растворе при использовании метода высокоэффективной жидкостной хроматографии составляет 0,01-0,02 мкг/см^3, при использовании метода спектрофлуориметрии – 0,02-0,2 мкг/см^3.

5.1 Аппаратура, материалы и реактивы

Флуоресцентный спектрометр со спектральным диапазоном длин волн 300 – 460 нм с кюветами вместимостью 0,4 см^3.

Хроматограф жидкостный с флуориметрическим детектором со спектральным диапазоном длин волн 300 – 420 нм.

Колонка хроматографическая стальная или стеклянная длиной 150 мм и диаметром 6 мм, заполненная сорбентом с привитой обращенной фазой (например, Supersosil LC-PAH).

Весы лабораторные 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г по ГОСТ 24104.

Весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 500 г по ГОСТ 24104.

Испаритель ротационный ИР-1М.

Насос водоструйный лабораторный по ГОСТ 25336.

Баня водяная.

Мешалка магнитная типа ММ-3 М с электроподогревом.

Осветитель ультрафиолетовый типа «Хроматоскоп» со спектральным диапазоном 250 – 700 нм и лампой типа БУВ-15 в качестве источника УФ-излучения.

Пластинки стеклянные для тонкослойной хроматографии 5 х 20 и 20 х 20 см.

Колонка стеклянная хроматографическая длиной 500 мм и диаметром 20 мм с оттянутым внизу концом и резервуаром вместимостью 50 – 60 $см^3$ ПШ 14/23.

Холодильник ХПТ-2-400-29/32 ХС или ХШ-1-400-29/32 ХС по ГОСТ 25336.

Алонж типа АИО-14/23-50 ТС или АИО-14/23-14/23-65 ТС по ГОСТ 25336.

Линейка измерительная с ценой деления 0,1 см по ГОСТ 427.

Дефлегматор 250-19/26-29/32 ТС или 300-19/26-29/32 по ГОСТ 25336,

Насадка П-1-19/26-14/23-14/23 ТС или Н-2-19/26-14/23 ТС по ГОСТ 25336.

Воронка делительная ВД-1-500 или ВД-3-500 по ГОСТ 25336.

Воронка ВФО-32-ПОР 100-14/23 ХС или ВФО-32-ПОР 160-14/23 ХС по ГОСТ 25336.

Цилиндры мерные 1-100, 1-250 или 3-100, 3-250 по ГОСТ 25336.

Стакан химический В-1-100 или В-1-150 по ГОСТ 25336.

Колба 1-500 по ГОСТ 25336.

Колба Гр 50-14/23 по ГОСТ 25336.

Колбы К-1-100-29/32 ТХС, К-1-25Р-29/32 ТХС, К-1-500-29/32 ТХС или П-1-500-29/32 ТХС по ГОСТ 25336.

Колбы $К_н$-1000-29/32 ТХС по ГОСТ 25336, $К_н$-250-34 ТХС по ГОСТ 25336.

Колбы мерные 2-100-2 по ГОСТ 25336.

Воронка Бюхнера 1 или 2, или 3 по ГОСТ 9147.

Стаканчики для взвешивания (бюксы) СВ-14/8 или СВ-19/9, или СВ-24/10, или СВ-34/12 по ГОСТ 25336.

Микрошприцы типов МШ-10, стеклянные капилляры.

Пипетки 1-1-1, 1-1-2, 2-1-5, 8-2-0,2 по ГОСТ 29228 или ГОСТ 29229.

Бумага индикаторная универсальная.

Бумага фильтровальная лабораторная по ГОСТ 12026.

Скальпель или тонкий шпатель по действующим нормативным документам.

н.гексан, ч., по действующим нормативным документам.

Спирт этиловый ректификованный по ГОСТ Р 51652 или спирт этиловый ректификованный технический по ГОСТ 18300.

Бензол по ГОСТ 5955.

Толуол по ГОСТ 5789.

Кислота серная по ГОСТ 4204.

Ацетон по ГОСТ 2603, ч. или ос. ч.

Ангидрид уксусный по ГОСТ 5815, ч.

Диметилформамид по ГОСТ 20289, ч. д. а.

Ацетонитрил по действующим нормативным документам.

Калия гидроокись по ГОСТ 24363.

Целлюлоза микрокристаллическая порошковая по действующим нормативным документам.

Бенз(а)пирен, содержание основного вещества не менее 98 %.

Бенз(в)хризен, содержание основного вещества не менее 98 %.

Сефадекс LH-20.

Силикагель марки АСКГ.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Допускается применение других средств измерений с метрологическими характеристиками и оборудования с техническими характеристиками, а также реактивов и материалов по качеству не ниже вышеуказанных.

5.2 Подготовка к испытанию

5.2.1 Подготовка растворителей

Растворители (н.гексан, этиловый спирт, ацетон, бензол) перегоняют общепринятым способом с дефлегматором

Диметилформамид перегоняют, добавив в перегонную колбу 120 $см^3$ бензола и 36 $см^3$ воды на 1 $дм^3$ растворителя.

5.2.2 Приготовление ацетилированной целлюлозы

(50,0±2,0) г микрокристаллической целлюлозы помещают в плоскодонную колбу вместимостью 500 $см^3$, добавляют приготовленную в отдельной колбе смесь 150 $см^3$ бензола или толуола, 70 $см^3$ уксусного ангидрида и 0,3 $см^3$ серной кислоты. Реакционную смесь перемешивают магнитной мешалкой в течение 6 – 8 ч, оставляют без перемешивания еще на 18 ч, после чего декантируют жидкую фазу, а остаток заливают 300 $см^3$ этилового спирта, перемешивают, оставляют в спирте на 24 ч, затем целлюлозу отфильтровывают на воронке Бюхнера, промывают 100 $см^3$ этилового спирта и дистиллированной водой до нейтральной реакции промывных вод (по индикаторной бумаге).

Затем проверяют хроматографическую активность ацетилированной целлюлозы. Для этого за 3 – 4 ч до проведения анализа готовят смесь этилового спирта, ацетона и воды, взятых в объемном отношении 60:25:15, и выливают ее в выстланную полосками фильтровальной бумаги хроматографическую камеру. Высота слоя растворителя должна составлять 1,5 – 2 см. 1,5 г ацетилированной целлюлозы суспензируют в 7 $см^3$ этилового спирта и выливают суспензию ровным слоем на стеклянную пластину 5 х 20 см, дают растворителю полностью испариться на воздухе и наносят на пластинку микрошприцем или стеклянным капилляром в точку 5 мкл раствора бенз(а)пирена массовой концентрации 1 $мкг/см^3$. Пластину помещают в хроматографическую камеру и оставляют в камере до тех пор, пока уровень растворителя поднимется не менее, чем на 100 мм от линии старта. По окончании хроматографии пластину вынимают, высушивают на воздухе и под лампой ультрафиолетового облучателя отмечают флуоресцирующее голубым цветом пятно бенз(а)пирена. Измеряют расстояние от стартовой линии до фронта растворителя и до середины пятна бенз(а)пирена, рассчитывают значение R_f оценивающую скорость перемещения бенз(а)пирена по пластинке, по формуле:

$$R_f = \frac{L}{L}, \qquad (6)$$

где $L_{БП}$ – расстояние от стартовой линии до середины пятна бенз(а)пирена, мм;

L – расстояние от стартовой линии до фронта растворителя, мм.

Значение R_f бенз(а)пирена должно составлять 0,1.

Для приготовления рабочей пластины 5 г ацетилированной целлюлозы суспензируют в 20 смі этилового спирта и выливают ровным слоем на пластину 20х20 см.

5.2.3 Приготовление рабочих пластин

5.2.3.1 Первый способ

Для приготовления рабочей пластины 5 г ацетилированной целлюлозы суспензируют в 20 $см^3$ этилового спирта и выливают ровным слоем на пластину 20х20 см.

5.2.3.2 Второй способ

Для приготовления рабочей пластины 16 г ацетилированной целлюлозы, 8 г окиси алюминия и 20 $см^3$ метанола интенсивно перемешивают в течение 1 мин и наносят кашеобразный раствор на пластинки 20х20 см слоем 0,25 мм. Пластинку высушивают сначала на воздухе, а затем 2 ч в сушильном шкафу при температуре 60°С и хранят в эксикаторе.

5.2.4 Приготовление стандартных растворов бенз(а)пирена и бенз(в)хризена

В стаканчики для взвешивания (бюксы) отвешивают по (10,0±0,2) мг бенз(а)пирена и бенз(в)хризена. Навески количественно переносят в мерные колбы вместимостью 100 $см^3$: бенз(а)пирен-бензолом, бенз(в)хризен-ацетонитрилом, затем объем раствора бенз(а)пирена доводят до метки бензолом, объем раствора бенз(в)хризена-ацетонитрилом. Полученные растворы имеют массовую концентрацию 100 мкг/$см^3$. Растворы хранят в холодном темном месте не более трех месяцев.

5.2.5 Приготовление рабочих растворов бенз(а)пирена и бенз(в)хризена

Рабочие растворы готовят разведением стандартных растворов, используя пипетки вместимостью 1, 5 и 10 $см^3$ и мерные колбы вместимостью 100 $см^3$, объем раствора доводят до метки соответствующим растворителем, перемешивают и хранят в холодном темном месте не более одного месяца.

Приготовление раствора бенз(а)пирена массовой концентрации 1,0 мкг/$см^3$ (для определения методом спектрофлуориметрии): из стандартного раствора отбирают 1,0 $см^3$ и переносят в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$; объем раствора доводят до метки бензолом.

Приготовление раствора бенз(а)пирена массовой концентрации 0,25: 1,0 и 5,0 мкг/$см^3$ (для определения методом высокоэффективной жидкостной хроматографии): из стандартного раствора отбирают 0,25; 1,0; 5,0 $см^3$, соответственно, и переносят в мерные колбы вместимостью 100 $см^3$; объем растворов доводят до метки ацетонитрилом.

Приготовление растворов бенз(в)хризена массовой концентрации 0,5 и 10 мкг/$см^3$: из стандартного раствора отбирают 0,5 и 10 $см^3$, соответственно, и переносят в мерные колбы вместимостью 100 $см^3$; объем каждого раствора доводят до метки ацетонитрилом.

5.2.6 Приготовление градуировочных растворов

Для приготовления градуировочных растворов смеси бенз(а)пирена и бенз(в)хризена в мерные колбы вместимостью 250 $см^3$ пипеткой вместимостью 1 $см^3$ переносят приведенные в таблице 2 объемы стандартного раствора бена(а)пирена массовой концентрации 100 мкг/$см^3$ и рабочего раствора бенз(в)хризена массовой концентрации 10 мкг/$см^3$, доводят объем до метки ацетонитрилом. Полученные растворы перемешивают и хранят в темном холодном месте не более одного месяца.

Таблица 2

Номер раствора	Объем исходного раствора, $см^3$		Массовая концентрация в градуировочном растворе, $мкг/см^3$	
	Бенз(а)пирена массовой концентрации 100 $мкт/см^3$	Бенз(в)хризена массовой концентрации 10 $мкг/см^3$	Бенз(а)пирена	Бенз(в)хризена
1	1,00	1,00	0,40	0,04
2	0,50	0,50	0,20	0,02
3	0,25	0,25	0,30	0,01
4	0,10	0,10	0,04	0,004

5.3 Проведение испытания

5.3.1 Выделение бенз(а)пирена из продукта

В круглодонную колбу или плоскодонную вместимостью 100 $см^3$ помешают навеску продукта массой 10 г, добавляют раствор, состоящий из 4 г гидроокиси калия в 50 $см^3$ 92 %-ного этилового спирта. Содержимое колбы перемешивают встряхиванием. Колбу соединяют с обратным холодильником и нагревают на водяной бане или на магнитной мешалке при кипении реакционной смеси в течение 3 ч. Затем в колбу через холодильник добавляют 100 $см^3$ дистиллированной воды. Реакционную массу охлаждают до комнатной температуры. После охлаждения реакционную массу переносят в делительную воронку вместимостью 500 $см^3$. В случае, если после гидролиза в реакционной массе остался твердый остаток, его отделяют на воронке Бюхнера, промывая остаток на фильтре 30 $см^3$ горячего этилового спирта. Жидкую фазу реакционной массы используют для экстракции. В делительную воронку добавляют 30 $см^3$ н.гексана. Содержимое воронки встряхивают и оставляют для расслаивания жидкостей. В случае образования эмульсии к смеси в делительной воронке добавляют 20 $см^3$ этилового спирта. После расслаивания нижнюю водно-спиртовую фазу сливают в колбу, а гексановый экстракт переливают в другую делительную воронку. Такую обработку реакционной массы проводят еще два раза, используя для экстракции н.гексан по 30 $см^3$ и этиловый спирт для расслаивания эмульсии порциями по 20 $см^3$.

По окончании экстракции объединенный гексановый экстракт промывают в делительной воронке дистиллированной водой три раза по 30 $см^3$, переносят экстракт в круглодонную колбу вместимостью 100 $см^3$, фильтруя через слой безводного сульфата натрия на воронке с пористым фильтром. Раствор упаривают на ротационном испарителе до объема 50 $см^3$ при температуре водяной бани не выше 60 ^0C.

Упаренный экстракт переносят в делительную воронку вместимостью 500 $см^3$ и добавляют к нему 50 $см^3$ смеси диметилформамида и воды, взятых в объемном соотношении 9:1. Интенсивно встряхивают смесь в течение 1 мин, после расслаивания фаз нижнюю сливают в плоскодонную колбу вместимостью 200 $см^3$, а из верхнего гексанового слоя снова проводят экстракцию 50 $см^3$ смеси диметилформамида и воды. Гексановый слой отбрасывают, объединенный в плоскодонной колбе диметилформамидный экстракт переносят в делительную воронку, добавляют 100 $см^3$ дистиллированной воды и проводят экстракцию из водной фазы гексаном трижды по 50 $см^3$. Водную фазу отбрасывают, а гексановый экстракт промывают водой трижды по 30 $см^3$, переносят в плоскодонную колбу, добавляют 10 г безводного сульфата натрия и выдерживают в течение одного часа. н.гексан упаривают на ротационном испарителе до объема 1,5 – 2,0 $см^3$, оставшийся растворитель удаляют потоком воздуха через вакуумный алонж, соединенный с водоструйным насосом, остаток в колбе растворяют в 0,5 $см^3$ этилового спирта.

В стакан вместимостью 100 $см^3$ отвешивают (2,5 ± 0,2) г сефадекса LH-20, добавляют 20 $см^3$ этилового спирта и оставляют для набухания на 3 – 4 ч. Затем гель переносят, смывая

небольшим количеством спирта, в стеклянную хроматографическую колонку, дают растворителю стечь таким образом, чтобы слой спирта над слоем сорбента оставался не ниже 2 мм. На подготовленную колонку наносят пипеткой остаток экстракта из колбы, трижды смывая его из колбы этиловым спиртом порциями по 0,5 $см^3$. Элюирование из колонки полициклических ароматических углеводородов, в том числе бенз(а)пирена, проводят 40 $см^3$ этилового спирта, первую фракцию объемом 12 $см^3$ отбрасывают, собирают вторую фракцию объемом 25 $см^3$. Скорость элюирования растворителя 0,5 $см^3$/мин обеспечивают, создавая небольшое избыточное давление потоком воздуха или азота через насадку, соединенную с воздуходувкой или газовым баллоном. Газ следует подавать через стеклянную трубку, заполненную силикагелем.

Колонку с сефадексом LH-20 можно использовать многократно. Для этого, не допуская высыхания сорбента после фракционирования, колонку промывают 25 $см^3$ этилового спирта и наносят следующую пробу.

Раствор второй фракции переносят в грушевидную колбу вместимостью 50 $см^3$, растворитель упаривают до объема 0,5 – 1,0 $см^3$, его остаток удаляют в потоке воздуха или азота.

Полученную фракцию, содержащую бенз(а)пирен, далее анализируют с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии или спектрофлуориметрическим методом.

Одновременно проводят контрольный опыт, проводя все стадии анализа с использованием реактивов согласно методике, но без навески продукта.

5.3.2 Определение содержания бенз(а)пирена методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

5.3.2.1 Условия хроматографии

Условия хроматографии подбираются в зависимости от вида применяемого жидкостного хроматографа и хроматографической колонки.

В качестве примера могут быть приведены следующие условия хроматографического определения бенз(а)пирена

Жидкостный хроматограф «Altex-334» с флуоресцентным детектором «Kratos FS-970».

Колонка Supelcosil LC-PAM зернением 5 мк, длиной 150 мм, диаметром – 4,6 мм.

Флуориметрический детектор: длина волны возбуждающего света 300 нм, эмиссионный фильтр – 418 нм.

Подвижная фаза: ацетонитрил и вода в объемном соотношении 8:2,

Скорость элюирования – 2,0 $см^3$/мин.

Объем вводимой пробы – 20 мкл.

Чувствительность усилителя подбирают таким образом, чтобы интенсивность сигналов бенз(а)пирена и внутреннего стандарта – бенз(в)хризена не превышала 95 % шкалы.

Время анализа – 15 мин; время удерживания бенз(а)пирена – 5 мин, бенз(в)хризена – 13 мин.

Анализируемые растворы хроматографируют дважды в одинаковых условиях. Площади пиков измеряют с помощью интегратора или вручную как произведение высоты пика и его ширины на половине высоты.

Определение содержания бенз(а)пирена проводят методом внутреннего стандарта или методом добавок.

5.3.2.2 Определение содержания бенз(а)пирена в растворе (экстракте), полученном по 5.3.1, методом внутреннего стандарта

При использовании такого способа количественной оценки предварительно проводят градуировку хроматографа, используя градуировочные растворы, приготовленные по 5.2.6.

В условиях, указанных в 5.3.2.1, записывают по три хроматограммы для каждого из приготовленных растворов и измеряют площади пиков бенз(а)пирена и бенз(в)хризена. Определяют среднеарифметическое значение площади пиков бензина)пирена и бена(в)хризена, рассчитанное из трех хроматограмм.

Градуировочный коэффициент К вычисляют по формуле

$$K = \frac{m_1 \cdot S_2}{m_2 \cdot S_1} \qquad (7)$$

где m_1 и m_2 – массы введенных в хроматограф бенз(а)пирена (m_1) и бенз(в)хризена (m_2),мкг;

S_1 и S_2 – площади пиков бенз(а)пирена (S_1)и бенз(в)хризена (S_2), $см^3$.

Градуировочный коэффициент К рассчитывают для каждого раствора.

Его значения не должны отличаться от среднеарифметического значения градуировочного коэффициента из всех результатов более чем на 10 %.

При длине волны возбуждающего света 300 нм и эмиссионном фильтре 418 нм значение градуировочного коэффициента составляет 9,5.

Перед началом анализа на стадии подготовки проб к щелочному гидролизу в пробу продукта и пробу контрольного опыта вносят по 50 мкл раствора бенз(в)хризена массовой концентрации 0,5 мкг/$см^3$. Обе пробы проводят через все стадии испытания, указанные в 5.3.1. Сухой остаток растворяют в 200 мкл ацетонитрила.

В условиях, указанных в 5.3.3.1, записывают хроматограммы раствора бенз(а)пирена массовой концентрации 100 мкг/$см^3$ и раствора бена(в)хризена массовой концентрации 100 мкг/$см^3$, отмечают время выхода бенз(а)пирена и бенз(в)хризена. Затем записывают хроматограммы пробы контрольного опыта с добавкой бенз(в)хризена и пробы продукта с такой же добавкой бенз(в)хризена. Измеряют площади пиков бенз(а)пирена и бенз(в)хризена на хроматограммах пробы продукта и пробы контрольного опыта.

Для каждой пробы записывают по две хроматограммы. Из двух хроматограмм рассчитывают среднеарифметическое значение площади пиков бенз(а)пирена и бенз(в)хризена.

На основании полученных данных определяют массу бенз(а)пирена, мкг, в пробе продукта m_1 и пробе контрольного опыта m_2:

$$m_1 = \frac{m \cdot S_1 \cdot K}{S_3}; \qquad m_2 = \frac{m \cdot S_2 \cdot K}{S_4}; \qquad (8)$$

где m_1– масса бенз(а)пирена в пробе продукта, мкг;

m_2 – масса бенз(а)пирена в пробе контрольного опыта, мкг;

m_{cm}– масса бенз(в)хризена, введенного в пробу продукта и пробу контрольного опыта, мкг;

S_1 и S_2 – площади пиков бенз(а) пирена на хроматограммах пробы продукта (S_1) и пробы контрольного опыта (S_2), $см^2$;

S_3 и S_4– площади пиков бенз(в)хризена на хроматограммах пробы продукта (S_3) и пробы контрольного опыта (S_4), $см^2$;

К – градуировочный коэффициент, установленный по 5.3.2.2.

5.3.2.3 Определение содержания бенз(а)пирена в растворе (экстракте), полученном по 5.3.1, методом добавок

Для количественной оценки при использовании метода добавок одновременно с пробой продукта анализируют пробу контрольного опыта. Фракции, выделенные из проб продукта и контрольного опыта по 5.3.1, растворяют в 400 мкл ацетонитрила. Полученные растворы делят на две части, отбирая меньшую часть (40 мкл) в пробирку или грушевидную колбу.

Записывают хроматограммы пробы продукта, пробы контрольного опыта и хроматограмму раствора бенз(а)пирена массовой концентрации 0,25 мкг/$см^3$. Отмечают время выхода бенз(а)пирена.

В оставшиеся части пробы продукта и контрольного опыта (360 мкл) делают добавку 10 – 20 мкл раствора бенз(а)пирена массовой концентрации 5 мкг/см^3. Полученные растворы вновь вводят в хроматограф.

Все хроматограммы записывают дважды. Измеряют площади пиков бенз(а)пирена. Из двух хроматограмм рассчитывают среднеарифметическое значение площади пика бенз(а)пирена.

На основании полученных данных определяют массу бенз(а)пирена, мкг, в пробе продукта m_1 и пробе контрольного опыта m_2:

$$m_1 = \frac{m \cdot S_1}{S_2 - 0{,}9S_1}; \qquad m_2 = \frac{m_k \cdot S_3}{S_4 - 0{,}9S_3}, \tag{9}$$

где m_{on} и m_k – масса бенз(а)пирена, добавленная к части экстракта из пробы продукта (m_{on}) и пробы контрольного опыта (m_k), мкг;

S_1 и S_2– площади пиков бенз(а)пирена на хроматограммах пробы продукта (S_1) и пробы продукта с добавкой бенз(а)пирена (S_2), см^2;

S_3 и S_4 – площади пиков бенз(а)пирена на хроматограммах пробы контрольного опыта (S_3) и пробы контрольного опыта с добавкой бенз(а)пирена (S_4), см^2;

0,9 – доля пробы, к которой делают добавку бенз(а)пирена.

5.3.3 Определение содержания бенз(а)пирена методом тонкослойной хроматографии

5.3.3.1 Качественное определение содержания бенз(а)пирена методом тонкослойной хроматографии

При определении содержания бенз(а)пирена методом тонкослойной хроматографии одновременно с пробой продукта анализируют пробу контрольного опыта, в которую добавлено 50 мкл раствора бенз(а)пирена массовой концентрации 1 мкг/см^3 (концентрацию и объем раствора бенз(а)пирена подбирают таким образом, чтобы полученная концентрация соответствовала ПДК бенз(а)пирена в анализируемом продукте).

Полученные по 5.3.1 фракции, содержащие бенз(а)пирен, из пробы продукта и пробы контрольного опыта с добавкой, растворяют в 0,5 см^3 бензола и далее подвергают хроматографированию в тонком слое.

Для этого пластину 20 х 20 см, подготовленную, как указано в 5.2.2 или пластину для ТСХ «Силуфол», делят на два поля: боковое – шириной 1,5 – 2 см и основное, проводя по слою сорбента скальпелем или тонким шпателем разделительную полосу. На основное поле сплошной полосой, отступив 2 см от нижнего края пластинки и по 1 см с боковых краев, наносят раствор фракции, выделенной по 5.3.1. Раствор наносят с помощью тонко оттянутого капилляра или микрошприца, размер пятен не должен превышать 5 мм. Для количественного переноса вещества его дважды смывают со стенок колбы небольшим количеством бензола (0,4 – 0,6) см^3. На стартовую линию бокового поля наносят в точку 5 мкл раствора бенз(а)пирена массовой концентрации 1 мкг/см^3. После полного испарения растворителя пластинку помещают в предварительно насыщенную хроматографическую камеру под углом 70° – 85° и проводят элюирование в смеси этилового спирта, ацетона и воды, взятых в соотношении 60:25:15. Когда фронт растворителя достигнет 2 см от верхнего края пластинки, ее вынимают из камеры, высушивают на воздухе и проявляют хроматографическую зону бенз(а)пирена под лампой ультрафиолетового облучателя при длине волны 366 нм. Оценивают ориентировочное количество бен(а)пирена в пятне экстракта путем сравнения интенсивности его флуоресценции со стандартом. Если в экстракте обнаружен бен(а)пирен, то необходимо провести количественное определение при помощи количественного метода тонкослойной хроматографии (5.3.3.2) или спектрофлуориметрии при комнатной температуре (5.3.4).

5.3.3.2 Количественное определение содержания бенз(а)пирена методом тонкослойной хроматографии.

Пластинку «Силуфол» размером 20х20 см размечают тонкими карандашными линиями согласно рисунку 1. В правом нижнем углу пластинки на расстоянии 1,5 см от краев наносят с помощью микрошприца 20 мкл экстракта пробы. В левом нижнем углу пластинки на расстоянии 1,5 см от краев наносят с помощью микрошприца 20 мкл рабочего раствора бен(а)пирена. В правом верхнем углу пластинки на расстоянии 1, 2 и 3 см от верхнего края пластинки наносят с помощью микрошприца соответственно 2,0, 4,0 и 6,0 мкл стандартного раствора бен(а)пирена.

Хроматографирование проводят в условиях, аналогичных п. 5.3.3.1. Сравнивая интенсивность флуоресценции пятна экстракта с интенсивностью флуоресценции различных количеств стандартного раствора бен(а)пирена определяют количество нанограмм (нг) бенз(а)пирена в пятне экстракта.

Проводят два параллельных определения.

Рассчитывают содержание бенз(а)пирена по п.5.4.2.

5.3.4 Определение содержания бенз(а)пирена методом спектрофлуориметрии при комнатной температуре.

Сорбент из зоны бенз(а)пирена с основного поля с помощью скальпеля или тонкого шпателя соскабливают с пластинки и переносят на стеклянный фильтр, с которого вещество элюируют в несколько приемов 50 $см^3$ бензола в колбы вместимостью 100 $см^3$, далее растворитель упаривают до небольшого объема, остаток растворителя удаляют потоком воздуха и добавляют в колбу 1 $см^3$ бензола.

На спектрофлуориметре при длине волны возбуждающего света 386 нм в диапазоне 400 – 440 нм при скорости сканирования 60 нм/мин записывают спектры флуоресценции пробы продукта и пробы контрольного опыта с добавкой бенз(а)пирена.

Спектры растворов записывают в одном режиме усиления, регулируя щель и коэффициент усиления по раствору контрольной пробы так, чтобы сигнал бенз(а)пирена при 406 нм составлял 0,4 – 0,6 шкалы прибора. Для каждого раствора спектр записывают дважды, добиваясь хорошей воспроизводимости. На полученных спектрограммах в максимуме при 406 нм измеряют в миллиметрах высоту спектральной линии бенз(а)пирена для пробы продукта и пробы контрольного опыта.

Рассчитывают среднее значение высот бенз(а)пирена по данным двух спектрограмм. При высоких уровнях содержания бенз(а)пирена в продукте пробы разбавляют бензолом и вновь записывают спектр в том же режиме усиления, что и для контрольной пробы.

Проводят два параллельных определения.

Рассчитывают содержание бенз(а)пирена по п.5.4.3.

5.4 Обработка результатов

5.4.1 Массовую долю бенз(а)пирена в продукте X_1, %, или X_2, мг/кг, при использовании метода высокоэффективной жидкостной хроматографии вычисляют по формулам:

$$X_1 = \frac{(m_1 - m_2)\cdot 100}{m\cdot 1000\cdot 1000} = \frac{(m_1 - m_2)}{m}\cdot 10^{-4} \qquad (10)$$

$$X_2 = \frac{(m_1 - m_2)}{m} \qquad (11)$$

где m_1 – масса бенз(а)пирена в пробе продукта, мкг;

m_2 – масса бенз(а)пирена в пробе контрольного опыта, мкг;

m – масса продукта, взятая для анализа, г.

5.4.2 Массовую долю бенз(а)пирена в продукте X_1, %, или X_2, мг/кг, при использовании метода тонкослойной хроматографии и использовании метода спектрофлуориметрии вычисляют по формулам

$$X_1 = \frac{c \cdot H \cdot V \cdot 100}{H \cdot m \cdot 1000 \cdot 1000} = \frac{c \cdot H \cdot V}{H \cdot m} \cdot 10^{-4} \quad (12)$$

$$X_2 = \frac{c \cdot H \cdot V}{H \cdot m} \quad (13)$$

где сст – массовая концентрация бенз(а)пирена в рабочем растворе, приготовленного по 5.2.5 и добавленного в пробу контрольного опыта, мкг/см^3;

Н – высота спектральной линии бенз(а)пирена на спектрограмме пробы продукта, мм;

H_{CT}– высота спектральной линии бенз(а)пирена на спектрограмме пробы контрольного опыта, мм;

V – объем рабочего раствора бенз(а)пирена, добавленного в пробу контрольного опыта, см^3;

m – масса навески продукта, взятого для испытания, г.

Результат округляют до второй значащей цифры.

За окончательный результат испытания принимают среднеарифметическое двух параллельных определений с тем же числом значащих цифр.

Если расхождение между результатами параллельных определений не превышает $|X_1 - X_2| \leq 0{,}01dX$, где X_1, X_2 и X – результаты параллельных определений и их среднее арифметическое, а d – норматив контроля сходимости, то среднее арифметическое X принимают за результат анализа. В противном случае анализ повторяют. Значение норматива d приведено в таблице 3.

По полученному результату анализа X и значению относительной погрешности δ, приведенной в таблице 3, рассчитывают абсолютную погрешность $\Delta = 0{,}01\ \delta X$

Результат анализа представляют в виде $(X \pm \Delta)$, мг/кг или % при P = 0,95.

5.5 Контроль точности результатов анализа

Внутренний оперативный контроль (ВОК) качества результатов анализа включает контроль сходимости, воспроизводимости и точности результатов анализа.

5.5.1 Сходимость параллельных определений контролируют для каждой анализируемой пробы согласно 5.3.

5.5.2 Для проведения контроля воспроизводимости используют рабочие пробы. Пробу делят на две равные части и анализируют в соответствии с методикой в разных лабораториях или в одной лаборатории, максимально варьируя условия проведения анализа, т. е используют разные наборы мерной посуды, анализы выполняют в разные дни или два различных аналитика.

Воспроизводимость контрольных анализов признают удовлетворительной, если $|X_1 - X_2| \leq 0{,}01DX$, где X_1, X_2 и X – результаты анализа одной и той же пробы, полученные в разных лабораториях или при варьирующих условиях в одной лаборатории и их среднее арифметическое значение, D – значение норматива внутреннего оперативного контроля воспроизводимости. Значение норматива D приведено в таблице 3.

Периодичность проведения контроля воспроизводимости – не реже одного раза в две недели.

Т а б л и ц а 3 – Диапазон измерений, значение характеристики относительной погрешности и нормативы оперативного контроля случайной составляющей относительной погрешности (сходимости и воспроизводимости) при доверительной вероятности Р = 0,95

Диапазон измерений, мг/кг	Характеристика погрешности (граница интервала, в котором погрешность находится с заданной вероятностью) ± δ, %	Норматив оперативного контроля сходимости $d_{отн}$, % (для двух результатов параллельных определений, n = 2)	Норматив оперативного контроля воспроизводимости $D_{отн}$, % (для двух результатов измерений, m = 2)
От 0,0001 до 0,001 включ.	42	40	60
Св. 0,001 до 0,002 включ.	29	28	42

5.5.3 Для проведения контроля точности используют рабочие пробы с известной добавкой бенз(а)пирена. Пробу делят на две равные части, первую из которых анализируют в соответствии с методикой, а во вторую вводят известную добавку бенз(а)пирена и затем также анализируют в соответствии с методикой. Величина добавки должна составлять 50 – 150 % содержания бенз(а)пирена в анализируемой пробе.

Точность контрольных анализов признают удовлетворительной, если $|X_1 - X - c| \le K$, где X_1, X и c – результаты контрольных анализов пробы с добавкой бенз(а)пирена, реальной пробы и величина добавки бенз(а)пирена соответственно; К – норматив оперативного контроля точности.

Норматив оперативного контроля точности рассчитывают по формулам:

при проведении внутрилабораторного контроля (Р = 0,90)

$$K = 0{,}84\sqrt{(\Delta_{X1})^2 + (\Delta_X)^2} \qquad (14)$$

при проведении внешнего контроля (Р = 0,95)

$$K = \sqrt{(\Delta_{X1})^2 + (\Delta_X)^2} \qquad (15)$$

где $\Delta_{X1} + \Delta_X$ – значения характеристики погрешности, соответствующие массовой концентрации хлоридов в пробе с добавкой бенз(а)пирена и в реальной пробе;

$\Delta_{X1} = 0{,}01\ \delta_{X1} X_1$ и $\Delta_X = 0{,}01\ \delta_X X$, где X_1 и X – массовая концентрация хлоридов в пробе с добавкой и в реальной пробе, мг/кг или %;

Значение относительной погрешности δx (δx1) приведены в таблице 3.

Контроль точности анализа проводят не реже одного раза в месяц, а также при смене реактивов после длительного перерыва в работе.

При превышении нормативов оперативного внутреннего контроля точности проводят повторные анализы. При повторном превышении указанных нормативов анализы приостанав-ливают, выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и устраняют их.

Результаты ВОК заносят в специальный журнал.

6 Требования техники безопасности

6.1 При выполнении измерений необходимо соблюдать требования безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007, требования пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004 и требования электробезопасности по ГОСТ 12.1.019, а также требования, изложенные в нормативном документе на спектрофлуориметр, жидкостный хроматограф, осветитель ультрафиолетовый и другие приборы и оборудование.

6.2 Помещение, в котором производится выполнение измерений, должно быть снабжено приточно-вытяжной вентиляцией. Работы необходимо проводить в вытяжном шкафу с использованием резиновых перчаток.

6.3 Растворы бенз(а)пирена, а также отработанные окись алюминия и ацетилированную целлюлозу после использования необходимо обработать крепким раствором марганцовокислого калия по ГОСТ 5777 для окисления бенз(а)пирена, после чего раствор сливают в канализацию большим количеством воды.

7 Требования к квалификации оператора

К выполнению измерений и обработке полученных результатов допускаются специалисты, имеющие высшее или специальное химическое образование или опыт работы в химической лаборатории и владеющие техникой хроматографического и спектрофлуориметрического анализа, освоившие методы анализа в процессе тренировки и уложившиеся в нормативы оперативного контроля при выполнении процедур контроля погрешности анализа.

УДК 663/664:543.9:006.354 **МКС 67.040**

Ключевые слова: пищевые продукты, продовольственное сырье, пищевые и вкусовые добавки, определение массовой доли бенз(а)пирена, метод низкотемпературной спектрофлуориметрии, метод жидкостной хроматографии, спектрофлуориметрия при комнатной температуре

Для заметок

gost.e-ecolog.ru