МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР

ГЛАВНОЕ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ УПРАВЛЕНИЕ

КОМИТЕТ ПО КАНЦЕРОГЕННЫМ ВЕЩЕСТВАМ И МЕРАМ ПРОФИЛАКТИКИ

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

по определению канцерогенного углеводорода бенз(а)пирена в некоторых продуктах питания и упаковочных материалах

МОСКВА - 1976г.

gost.e-ecolog.ru

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР

ГЛАВНОЕ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ УПРАВЛЕНИЕ

КОМИТЕТ ПО КАНЦЕРОГЕННЫМ ВЕЩЕСТВАМ И МЕРАМ ПРОФИЛАКТИКИ

УТВЕРЖДАЮ:

Заместитель Главного Государственного

санитарного врача СССР

В.Ковшило

" 12 " мая 1976г.

№ 1425-76

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

по определению канцерогенного углеводорода бенз(а)пирена в некоторых продуктах питания и упаковочных материалах

МОСКВА - 1976г.

Авторы - составители:

В.Ю.Гвильдис (МосводоканалНИИпроект),

А.Я.Хесина (Онкологический Научный Центр АМН СССР),

Т.Я.Гаевая (Институт охраны труда ВЦСПС),

П.П.Дикун, Л.Д. Костенко (НИИ онкологии им. Н.Н.Петрова МЗ СССР)

Методика определения бенз(а)пирена в полимерных материалах.

Полимерные материалы представляют собой сложную композицию, состоящую из высоко и низкомолекулярной частей. Из-за невозможности непосредственного анализа столь сложного объекта представляется целесообразным отделение низкомолекулярной части от высокомолекулярной, учитывая, что примеси и побочные продукты полимеризации находятся в низкомолекулярной части. Отделение низкомолекулярной фракции полимера от высокомолекулярной можно производить различными способами, в зависимости от физических и химических свойств полимера. При этом необходимо руководствоваться требованиями соблюдения сохранности анализируемого вещества, т.к. перевод БП в связанное состояние или его деградация могут привести к искажению результатов исследования. Необходимо также учитывать, что с сокращением количества операций при извлечении низкомолекулярной фракции уменьшается потеря анализируемого вещества и увеличивается точность определения.

При анализе полимерных материалов можно рекомендовать следующую очередность операций: отделение(извлечение) низкомолекулярной части от высокомолекулярной, концентрирование низкомолекулярной части и фракционирование ее с целью получения спектрально чистой фракции БП, пригодной для анализа.

Ввиду большого разнообразия полимерных материалов, трудно предложить какую-либо универсальную методику извлечения из них БП. Однако, существуют общие принципы отделения низкомолекулярной части, в которой возможно присутствие БП, от высокомолекулярной.

Ниже рассматривается несколько конкретных способов извлечения БП из полимера, а также даются примеры того, как в зависимости от состава анализируемого полимера используются те или иные способы фракционирования низкомолекулярной части,

выделенной из объекта исследования, чтобы сделать возможным спектральный анализ.

При анализе полимеров на БП необходимо руководствоваться этими основными положениями, разрабатывая модификации предложенных методов всякий раз, когда исследуются новые материалы.

I. Извлечение низкомолекулярной части полимера

Выделение (извлечение) низкомолекулярной части полимера можно производить тремя способами: а) экстракция растворителем, б) переосаждение полимера в горячем растворителе, в) растворение полимера, его дальнейшее осаждение и отделение от маточного раствора.

а. Экстракция

Экстракции подвергают трудно и совсем нерастворимые полимеры. Экстрагирование обычно проводят в аппарате Сокслета. В качестве растворителя часто применяют бензол. Продолжительность экстракции определяется временем полного исчезновения люминесценции в погоне бензола или другого применяемого растворителя. Экстракт концентрируют и подвергают спектральному анализу. Если спектральный анализ затруднен или невозможен, то производят фракционирование концентрата (см. ниже).

Остановимся подробно на способах, позволяющих полнее отделить низкомолекулярную часть полимера от высокомолекулярной.

б. Переосаждение полимера в кипящем растворителе

Этот способ успешно был применен при анализе целого ря-

да полиолефинов - полиэтилен высокого и среднего давления, полипропилен, зарубежные марки полиэтиленов.

Ранее *G Grummer* (1960), при исследовании низкомолекулярных парафинов использовал метод селективных растворителей, основанный на способности нитрометана избирательно извлекать ПАУ из раствора циклогексана. Используя это свойство нитрометана, можно извлечь из раствора циклогексана также БП.

Выше указывалось, что для извлечения БП из полиолефинов необходимо вначале отделить высокомолекулярную часть от низкомолекулярной. Эта операция осуществляется переосаждением полимера в кипящем циклогексане. Навеска полимера весом в 1-3 г (гранулы или измельченная пленка) помещается в круглодонную колбу с обратным холодильником, содержащую 300 мл очищенного циклогексана. При переосаждении полиэтилена высокого давления с температурой плавления 105-110°С через некоторое время весь полимер растворяется. В случае полиэтилена среднего давления, имеющего температуру плавления 130° С, растворение его в низкокипящем растворителе циклогексане (температура кипения 80,5°С) необходимо производить в запаянных ампулах, нагревая их в термошкафу немного выше температуры плавления полимера. Это же относится и к полипропилену (Т пл. =165°С). После того, как расплав полимера полностью переходит в раствор, его медленно охлаждают до комнатной температуры. Полимер выпадает в осадок в виде хлопьев, которые отделяют от маточного раствора на воронке Бюхнера. Осадок промывают небольшими порциями циклогексана 5-6 раз. Промывные растворы соединяют с маточным и упариваются с целью концентрирования выделенной низкомолекулярной фракции под вакуумом при +50°С до 10 мл. Полученный таким образом концентрат переводят в делительную воронку и экстрагируют нитрометаном (трижды по 10 мл). Нитрометановые экстракты упариваются под вакуумом аналогично циклогексановому, а оставшееся на дне колбы вещество переводят

в нормальный октан для последующего качественного и количественного спектрального анализа. Таким образом получают первую вытяжку ароматики и полимера.

Переосаждением полимера в растворителе невозможно добиться полного извлечения БП, так как образующийся хлопьевидный осадок затрудняет извлечение из него низкомолекулярных примесей. Для более полного извлечения БП производят второе, третье и четвертое переосаждение этого осадка в циклогексане с повторением вышеописанных операций.

Сумма четырех вытяжек дает полное количество БП в полиолефине. Для быстрого проведения анализа можно провести одно переосаждение, имея в виду, что оно позволяет извлечь от 40% (для полиэтилена среднего давления) до 70% /для полиэтилена высокого давления/ БП.

в. Осаждение полимера из раствора

Полиолефины /ненаполненные/ представляют собой наиболее однородные по химическому составу полимеры. Условия синтеза диктуют требования высокой чистоты исходных мономеров. Более сложными являются нефтеполимерные и инден-кумароновые смолы, получаемые из кубовых остатков переработки и ректификации нефти, угля и сланцев. Поэтому целесообразно рассмотреть примеры анализа этих полимеров.

Общим остается требование максимального отделения (извлечения) низкомолекулярной части из полимера. Чем богаче химический состав исследуемого объекта, чем шире ассоримент веществ, в него входящих, тем более высокие требования предъявляются в фракционированию низкомолекулярной части. Ниже будет рассмотрена комбинация метода селективных растворителей с тонкослойной хроматографией на примере анализа следующих смол: инден-кумароновой, "Корс", получаемой в результате полимеризации кубовых остатков ректификации стирола, и "СШ" -

– нефтеполимерная смола, получаемая полимеризацией из вторичных продуктов пиролиза нефти.

Как и в предыдущем примере, первым этапом анализа является наиболее полное выделение низкомолекулярной фракции.

Извлечение ароматики из смол производят несколькими операциями. Все перечисленные смолы хорошо растворяются в бензоле. Осаждение полимера из раствора бензола лучше всего производить нормальным гексаном. Навеску смолы(5–10г) растворяют в 300мл бензола. Затем при непрерывном помешивании через делительную воронку добавляют осадитель – нормальный гексан. После начала хлопьеобразования(раствор начинает мутнеть) необходимо резко уменьшить подачу осадителя, чтобы предотвратить образование сгустков полимера. Добавление осадителя прекращают после того, как очередное добавление уже не вызывает хлопьеобразования. Затем добавляют еще 20–30 мл н-гексана и осадок с маточным раствором оставляют на 3–4 часа.

Осажденный полимер представляет собой однородную массу, легко отделяемую от маточного раствора. Маточный раствор после осаждения н-гексаном остается прозрачным, чего не происходит при применении других осадителей.

Маточный раствор после отделения его от полимера упаривают на водяной бане под вакуумом до появления маслянистого остатка, который переводят в 10 мл циклогексана. Полициклическую ароматику извлекают равным объемом нитрометана(трехкратное экстрагирование). Затем нитрометан отгоняют под вакуумом на водяной бане и остаток переводят в небольшое количество бензола для последующего фракционирования.

Сложность и разнообразие химического состава изучаемого объекта предполагает высокие требования к фракционированию извлеченного концентрата ароматики.

Наиболее перспективным и широко распространенным способом фракционирования сложных смесей как с аналитической, так и с препаративной точки зрения, является тонкослойная хроматография(ТСХ).

Фракционирование с помощью тонкослойной хроматографии в данном случае целесообразно проводить на пластинках с закрепленным слоем в С-камере или в микрокамере насыщения. Закрепленный слой состоит из смеси окиси алюминия и гипса, замешанных в 10% растворе метанола в воде. Окись алюминия целесообразно применять с размером зерен 0,1-0,09 мм. Активирование слоя сорбента производят в течение часа при температуре +110°С. В качестве элюента применяют дифференцирующую смесь н-гексан: бензол=10:1.

Хроматографирование производят со свидетелем - БП. Проявление хроматограмм осуществляют ультрафиолетовым светом. Фракцию, остановившуюся против свидетеля, снимают с пластины на фильтр Шотта № 4 и элюируют бензолом для дальнейшего количественного анализа.

Полноту извлечения БП из смол проверяют следующим образом. Бензольный раствор смолы делят на две равные части. В одну из них вводят известное количество БП, соответствующее, примерно, его содержанию в смоле. Затем проводят все операции по извлечению БП и если анализ показывает полное извлечение вещества - продолжают дальнейшие исследования.

II. ИССЛЕДОВАНИЕ МИГРАЦИИ БЕНЗ/а/ПИРЕНА ИЗ ПОЛИМЕРНЫХ МАТЕРИАЛОВ

Большое разнообразие полимерных материалов и изделий на их основе, применяющихся в быту, затрудняет создание единой методики определения БП, мигрирующего в среду из полимера.

Приведем два примера, руководствуясь которыми можно провести аналогичные исследования других объектов. В случае использования полимера в пищевой промышленности выбирается такая модельная среда, которая по способности растворять, извлекать из полимера БП была бы близка к пищевому продукту, находящемуся в контакте с изучаемым материалом в реальных условиях.

В случае же использования изделий из пластмасс в строительстве в различных предметах обихода и т.п. необходимо исследовать возможность миграции канцерогена в воздушную среду и на поверхность изделия.

а. Миграция в жидкие среды

Приступая к изучению возможности миграции БП из полимерного изделия в пищевой продукт, необходимо прежде всего установить в этом продукте компонент, обладающий наибольшей способностью элюировать из полимера низкомолекулярную фракцию и, в частности, БП. Устанавливаются сроки контакта полимера со средой, имитирующей этот продукт, соотношение полимера (по площади или объему) и среды, и условия термостатирования. Время контакта выбирается, исходя из сроков службы полимера и условий хранения продукта.

Важным моментом является выбор метода извлечения БП из модельной среды. Этому должно предшествовать изучение полноты извлечения канцерогена из среды. С этой целью в модельную среду вводится определенное количество БП, соответствующее примерно тому количеству, которое содержится в полимере, и производится его извлечение. В зависимости от сложности объекта (среды) возможны различные методы извлечения - экстракция, использование селективных растворителей, тонкослойная хроматография, вариация того и другого и т.п. (см. выше). Если метод извлечения выбран удачно /извлекается 95-100% вещества/, производится основное исследование.

Так, например, в настоящее время находит широкое применение в производстве сыров комбинированный пленочный материал полиэтилен - целлофан (ПЦ-1 и ПЦ-2). Эти пленки применяются при созревании и парционировании сыров.

Исходя из условий эксплуатации, выбирают условия термостатирования объекта исследования. В то время как плав-

ление сыра происходит при 70–90°С, расфасовку его в пленочные оболочки проводят в горячем состоянии при температуре 50–70°С. Твердые сыры с содержанием жира в сухом веществе от 45 до 60% созревают при 20–25°С в течение 25–25°С в течение 25–30 дней. При этом происходит частичное выделение жира на поверхность сыра под пленку и длительный контакт с ней. Эти условия и определяют схему эксперимента, суть которого заключается в выяснении возможности перехода БП в молочный жир. Жир является великолепным растворителем БП в данном продукте.

Из полиэтилена соответствующей марки изготавливают пакеты, имеющие поверхность контакта 50см^2, в которые помещается 25 граммов жира.

Для ускорения процесса миграции БП в жир выбираются жесткие условия опыта: термостатирование пакетов с жиром при температуре +50°С в течение 4-х недель. В первую неделю эксперимента анализ жира, извлеченного из пакета, а также самого пакета производят ежедневно. В дальнейшем жир и полиэтилен анализируют раз в неделю.

Полиэтилен анализируют методом, описанным в разделе Iб. Для анализа жира так же применяется метод селективных растворителей. Предварительно его проверяют на искусственной смеси. Для этого 25 г молочного жира смешивают с I9 мл циклогексана и I мл раствора БП в нормальном октане, имеющего концентрацию $I.I0^{-9}$г/мл. Экстракцию БП производят тремя порциями нитрометана по 20 мл.

Полученные данные сводят в таблицу, из которой видна динамика миграции вещества из полиэтилена в жир при данной температуре.

Таким образом устанавливают возможность миграции БП в одну из пищевых сред. При анализе других жидких сред суть эксперимента остается прежней, меняются лишь условия, при которых происходит миграция.

6. Миграция в воздушную среду

При исследовании строительных полимерных материалов в модельных условиях следует создавать реальное соотношение поверхности исследуемого материала и объема помещения. Например, в случае материалов, используемых в качестве покрытия пола, это соотношение, т.е. "насыщенность" рассчитывается путем деления единицы площади испытуемого материала на высоту помещения в метрах, так как над каждым квадратным метром площади пола имеется пространство, равное 2,5 $м^3$ (при высоте 2,5 м). В реальном случае насыщенность равна $1:2,5=0,4 м^2/м^3$. Учитывая то обстоятельство, что содержание БП в этих материалах (см. выше) находится на уровне субмикроколичеств, принимаем насыщенность в описываемом эксперименте в 10 раз большую, т.е. $4,0 м^2/м^3$.

Изучение материала или смолы проводят в эксикаторе объемом 1,7 л, т.е. $1,7 \cdot 10^{-3} м^3$. Следовательно, в эксикатор необходимо загрузить $6,8 \cdot 10^{-3} м^2$ материала плиток или линолеума, или 5,44 г смолы (исходя из рецептуры изделия).

Отбор проб воздуха из эксикатора производят аспиратором или водоструйным насосом через три последовательно соединенных U-образных поглотителя с пористой пластинкой № 1. Наиболее подходящим растворителем ПАУ является бензол, которым и заполняют каждый поглотитель (по 10 мл). Окружающий воздух в эксикатор поступает через хлоркальциевую трубку.

Определяющими условиями при анализе воздушной среды в эксикаторе являются: время насыщения, кратность воздухообмена и скорость отбора насыщенного воздуха.

Подготовка к исследованию начинается с того, что образец смолы тщательно измельчают, перемешивают и помещают в герметический сосуд, из которого и производится отбор соответствующих навесок, которые помещают затем в эксикатор.

Каждый анализ необходимо проводить два-три раза, а затем брать средний результат.

При определении оптимального времени насыщения образцы помещают в эксикатор на 1,2 и 6 часов, 1,3 и 5 суток, при комнатной температуре. По истечении заданного времени из эксикатора отбирают 10-кратный объем воздуха(17 литров), со скоростью 0,2 л/мин.

Результаты анализа показывают, что насыщение эксикатора парами БП наблюдается через 6 часов после помещения в него смолы* . Анализ смолы после 3-х суток насыщения несколько затруднен ввиду того, что выделяющиеся из смолы летучие люминесцирующие вещества мешают проведению количественного определения БП. Через пять суток анализ становится невозможным без фракционирования бензольного экстракта, так как область спектра, характерная для БП, оказывается совершенно закрытой фоном люминесцирующих примесей. Таким образом, оптимальное время насыщения смолы является 6 часов.

При определении оптимальной кратности воздухообмена /1,3,5 и 10 объемов воздуха/ образцы выдерживают в эксикаторе одни сутки, после чего отбирают соответствующий объем воздуха. Оптимальным объемом воздуха для анализа является объем, равный 4-5 объемам эксикатора или 6,8 - 8,5литрам.

Для определения оптимальной скорости отбора воздуха образцы в эксикаторе выдерживают в течение суток при комнатной температуре, а затем отбирают пятикратный объем воздуха со скоростями 0,2; 0,4 и 0,5 л/мин. Данные эксперимента свидетельствуют о том, что оптимальной скоростью прососа порции воздуха можно принять 0,5 л/мин.

Таким образом, оптимальными параметрами отбора воздуха из эксикатора при насыщении его парами инден-кумароновых и нефтеполимерных смол и материалами на их основе являются

---

* Изучалось содержание БП в нефтеполимерных и инден-кумароновых смолах, а также материалах, выполненных на их основе.

следующие:
Термостатирование при комнатной температуре - 6 часов

Кратность воздухообмена	- 4-5объемов эксикатора
Скорость отбора	- 0,5 л/мин

При проведении описанного исследования необходимо обратить особое внимание на проведение холостого опыта и подготовку растворителей.

Методика определения бенз(а)пирена в парафиновых композициях и их составных компонентах

В связи с все более широким применением в пищевой промышленности высокоочищенных парафинов и композиций на их основе возникла необходимость в разработке метода определения в них БП.

I. Общая часть

I. Метод основан на измерении относительной интенсивности флуоресценции н-октанового раствора, замороженного при температуре - I96°С.

2. Минимально определяемое количество БП - 5×10^{-11} г.

3. Предельно допустимая концентрация БП в пищевых парафинах по ГОСТ I35-77-7I - практическое отсутствие, что означает в соответствии с методом испытания возможное содержание БП в парафине не выше 0,5 мкг/кг(5×10^{-7} г/кг или 5×10^{-11} г/г).

Содержание БП во всех компонентах парафиновых композиций для пищевой промышленности не должно превышать это значение (5×10^{-7} г/кг).

II. Реактивы и аппаратура.

4. Применяемые реактивы и растворы.

Н-октан, МРТУ-6-09-4534-67.

Н-гексан, МРТУ-6-09-2937-66, перегнанный.

Бензол, ГОСТ 5955-66, перегнанный.

Циклогексан, МРТУ 6-09-3112-66, перегнанный.

Нитрометан, ТУ ГХКОРУ 129-59.

Окись алюминия II степени активности для хроматографии МРТУ 6-09-5296-68.

Бенз(а) пирен. Стандартные растворы концентрацией 1×10^{-10} г/мл или 1×10^{-9} г/мл готовят растворением I мг БП в 100 мл н-октана с последующим разбавлением н-октаном.

Бенз(а) пирен. Стандартный раствор концентрацией 1×10^{-5} г/мл в нитрометане готовят растворением I мг БП в 100 мл нитрометана.

5. Применяемые посуда и приборы.

Колбы мерные, емкостью 100 мл с притертыми пробками, ГОСТ 1770-59,

Воронки делительные, ГОСТ 10054-59, емкостью 100 мл.

Цилиндры мерные, ГОСТ 1770-59, емкостью 100 мл.

Колбы круглодонные, емкостью 100 мл.

Пластины стеклянные, 90×120 мм, для хроматографии.

Окись алюминия насыпают на поверхность стеклянной пластины и разравнивают, раскатывая стеклянной палочкой с резиновыми ободками на концах, так, чтобы толщина слоя была 1-1,5мм. Отмечают линию старта на расстоянии 15 мм от нижнего слоя пластины. По длине пластины отделяют с правой стороны полосу шириной 20 мм для нанесения свидетеля.

Воронки стеклянные с пористой пластинкой № 2.

Воронки Бюхнера, ГОСТ 1770-59 емкостью 1,2,5 и 10 мл.

Колбы плоскодонные емкостью 100 мл с притертыми пробками.

Пленочный испаритель.

Пробирки из бесцветного стекла с внутренним диаметром 15мм и высотой 150 мм.

Хроматографическая камера.

Спектрометр ДФС-12 или спектрограф ИСП-51 с фотоэлектрической

приставкой ФЭП-I.
Ртутно-кварцевая лампа ПРК-4.
Ртутно-кварцевая лампа СВДШ-500.
Светофильтры кобальто-никелевые УФС-2 или УФС-6
Конденсоры стеклянные или кварцевые.
Сосуды Дьюара посеребренные, емкостью до I л.
Сосуды Дьюара емкостью до I л стеклянные.
Сосуды Дьюара металлические емкостью I5 л.
Колба круглодонная емкостью 0,5 л со шлифом № 29.
Обратный холодильник со шлифом № 29.
Баня водяная.

III. Описание определения.

Для каждого продукта необходимо проводить 2 параллельных анализа.

6. Определение БП в парафине - по ГОСТ I3677-7I.

7. Определение БП в церезине и парафиновых композициях.

Пять граммов исследуемого материала растворяют в 50 мл циклогексана при нагревании на водяной бане. Затем переносят раствор в делительную воронку с 50 мл. нитрометана и энергично встряхивают в течение 5 минут. После разделения слоев нижний, нитрометановый, сливают в колбу, а циклогексан обрабатывают подобным же образом еще 3 порциями нитрометана. Объединенные нитрометановые экстракты концентрируют под вакуумом на пленочном испарителе до объема 2,5 мл. 0,5 мл концентрированного нитрометанового экстракта наносят на стартовую линию широкой части пластины. На стартовую линию узкой пластины наносят 0,I мл стандартного раствора БП в нитрометане. После испарения нитрометана, пластину помещают в хроматографическую камеру. Развитие хроматограммы проводят смесью гексана и бензола, взятых в соотношении 4:I. После того, как растворитель достигнет верхнего края пластины, ее вынимают и просматривают в УФ свете лампы ПРК-4, со светофильтром УФС-6, отмечая зону БП в пробе на уровне флуоресценции БП-свидетеля. Ширина БП-зоны в пробе, снятой на уровне свидетеля, должна быть не ме-

нее 20 мм. Переносят сорбент с зоной БП в пробе в воронку с пористым фильтром и элюируют БП бензолом 50 мл. Бензольный элюат концентрируют до объема 5 мл и проводят количественное определение БП.

8. Определение бенз(а) пирена в полиэтиленовой пленке.

5 г полиэтиленовой стружки заливают 500 мл циклогексана и кипятят в колбе с обратным холодильником в течение двух часов на водяной бане. Такую обработку проводят дважды. Остывший циклогексановый экстракт отфильтровывают на воронке Бюхнера и концентрируют до 20 мл. Затем концентрированный циклогексановый экстракт переносят в делительную воронку с 20 мл нитрометана и встряхивают в течение 5 минут. Сливают нижний нитрометановый слой в колбу, а циклогексан обрабатывают такими же объемами нитрометана еще 3 раза. Объединенный нитрометановый экстракт концентрируют до объема 2,5 мл на пленочном испарителе и 0,5 мл из него хроматографируют, как указано выше. Бензольный элюат зоны БП пробы, сконцентрированный до 5 мл, подвергают качественному и количественному анализу на содержание БП.

Количественное определение БП проводят методом добавок с предварительной установкой прибора по фону. Концентрацию БП в исследуемом продукте (C_x, мкг/кг) вычисляют по форме:

$$Cx = \frac{X \cdot У_I \cdot У \cdot 10^3}{У_0 \cdot m}$$

где: x – концентрация БП в анализируемом растворе (мкг/мл)

$У_I$ – объем бензольного элюата (мл)

У – объем сконцентрированного нитрометанового экстракта (мл)

$У_0$ – объем нитрометанового экстракта, взятый для хроматографии (мл)

m – навеска образца, взятая для анализа (кг).

Предел чувствительности определения БП в продукте или чувствительность определения БП во фракции $0,5 \times 10^{-10}$ г/мл

составляет, исходя из расчета: $\frac{0,5 \cdot 10^{-10} \cdot 2,5 \cdot 5 \cdot 10^{8}}{0,5 \cdot 5} = 0,25$ мкг/кг.

При найденной по графику концентрации БП в исследуемой фракции X, меньшем 1×10^{-10} г/мл, содержание БП в образце не превышает 0,5 мкг/кг, что можно считать его практическим отсутствием.

Определение бенз(а)пирена в мясных и рыбных продуктах

Описываемый ниже метод предназначен для контроля за содержанием БП в копченой рыбе и в мясных изделиях, подвергавшихся воздействию древесного коптильного дыма или продуктов сгорания других видов топлива. Метод может быть применен для анализа всех пород рыбы горячего и холодного копчения, шпрот, балыков, колбас твердокопченых, полукопченых и вареных, сосисок, сарделек и т.д. Этим методом можно производить анализы свежей рыбы и сырого мяса, а также тканей животных.

Метод состоит из четырех последовательных операций: омыление (щелочной гидролиз), экстракция неомыляемой части, хроматография на окиси алюминия и флуоресцентно-спектральный анализ.

При исследовании рыбных изделий необходимо производить контрольные анализы исходного сырья, т.е. свежей, соленой, мороженой рыбы, используемой для копчения. Это связано с тем, что в свежей рыбе, не имевшей контакта с дымом, иногда присутствует некоторое количество БП. Анализы исходного сырья одновременно являются контролем на чистоту растворителей и реактивов.

При выбранном размере пробы продукта (100 г) чувствительность метода количественного определения БП составляет не менее 0,1 мкг/кг.

Точность метода может варьировать в некоторых пределах в зависимости от ряда факторов, в первую очередь от концентрации в исследуемом продукте БП. При содержании БП около 0,1 мкг/кг и выше средняя погрешность не превышает ± 10%(при снижении концентрации точность несколько уменьшается). Однако следует помнить, что крайние отклонения при такой точности могут достигать ± 30%. В связи с этим, если исследование имеет целью строгое количественное сопоставление, необходимо производить,по крайней мере,по 3 параллельных анализа каждой пробы.

Аппаратура и оборудование

I. Спектральная установка с фотоэлектрической регистрацией спектров флуоресценции при температуре жидкого азота: спектрометр ДФС-I2 или спектрограф ИСП-5I с фотоэлектрической приставкой ФЭП-I, источник ультрафиолетового света, ультрафиолетовые фильтры УФС-2 или УФС-6, кварцевая и стеклянная конденсорные линзы,дьюаровские сосуды большой емкости для перевозки и хранения жидкого азота, а также небольшие дьюаровские сосуды для манипуляции с жидким азотом во время работы, прозрачный кварцевый дьюаровский сосуд, стационарно установленный в установке.

2. Установки для омыления щелочного гидролиза)продукта, экстрации неомыленной фракции, отгонки растворителя из экстракта(а также перегонки растворителей): колбы круглодонные на I л с обратным холодильником на шлифе, колбы на шлифах круглодонные и плоскодонные емкостью 750,500,250 мл,холодильники Либиха на шлифах, делительные воронки на 2 л, водяные бани на I00°С и на 45–50°С.

3. Установки для колоночной и тонкослойной хроматографии: хроматографические колонки стеклянные диаметром 60–80 мм и высотою 200–250 мм, колбы Бунзена на 0,75 – I,0 л, пластинки

стеклянные I20 X 200 мм, устройство для нанесения на пластинку незакрепленного слоя окиси алюминия, пипетки для нанесения пробы на пластинку, кювета для развития хроматограммы, приспособления для разделения зон и сбора с них адсорбента, хроматографические колонки стеклянные диаметра I5 и высоты I20–I80 мм.

4. Установка для выделения из окиси алюминия фракции с размерами частиц 0,05–0,08 мм.

5. Фонарь, дающий ультрафиолетовый свет.

6. Вытяжные шкафы для размещения и работы установок, перечисленных в пунктах 2 и 3.

7. Посуда химическая разная, колбы плоскодонные на I00мл 750 мл, I л, 3 л, стаканы химические 50, I00 и 500мл, стаканы фарфоровые I00 мл, мерная посуда, пробирки.

Материалы, реактивы и растворители

I. Окись алюминия для хроматографии.
2. Безводный сернокислый натрий Х.Ч.
3. Калиевая щелочь х.ч.
4. Соляная кислота х.ч.
5. Спирт этиловый ректификат.
6. Диэтиловый(серный) эфир х.ч. или медицинский.
7. Бензол х.ч.
8. Н-октан х.ч.
9. Н-гексан х.ч.
I0. Бенз(а) пирен и бенз(ghi)перилен х.ч.
II. Жидкий азот.
I2. Дистиллированная вода.

Методика анализа

Размер, способ отбора и предварительный обработки проб.

В пробу берут I00 г исследуемого продукта. Такой размер

пробы обеспечивает получение достаточно точных количественных результатов при концентрации БП в пробе 0,I мкг/кг и выше. Материал в пробу желательно брать так, чтобы он в наибольшей степени усреднял свойства исследуемого продукта, т.е. при анализе колбы берут кусочки из нескольких батонов, из крупной рыбы вырезают кусочки из нескольких рыбин из различных частей тела и т.д. Взятый в пробу продукт тщательно измельчают с помощью мясорубки или ножом. Колбасные изделия в оболочке животного происхождения измельчают вместе с оболочкой. Продукцию в оболочке из синтетических материалов перед измельчением освобождают от оболочки.

Омыление. Измельченную пробу помещают в круглодонную колбу со шлифом емкостью 0,5 л, заливают I00 мл перегнанного этилового спирта ректификата и добавляют туда же свежеприготовленный раствор 20 г КОН в 20 мл дистиллированной воды. Содержимое колбы тщательно перемешивают, а затем в той же колбе с обратным холодильником нагревают на водяной бане до кипения и кипятят в течение 2 часов.

Экстракция. Остывший гидролизат разводят дистиллированной водой в соотношении 3 объема воды на I объем гидролизата. При анализе рыбы в гидролизате иногда остаются нерастворившимися крупные кости, которые оседают на дно сосуда. В таком случае гидролизат осторожно сливают, кости промывают водой, присоединяя ее к гидролизату, а кости отбрасывают. Разведенный гидролизат экстрагируют диэтиловым(серным) эфиром. Для этого в делительную воронку емкостью 2 л вливают 250 мл эфира и в него выливают гидролизат, полученную смесь осторожно, но тщательно встряхивают несколько раз. После разделения водной и эфирной фаз сливают сперва нижнюю водную часть, а затем верхнюю эфирную. Так как часть эфира растворяется в гидролизате, объем собранной первой эфирной фракции оказывается меньшим, чем объем первоначального залитого эфира. Экстракцию эфи-

ром повторяют еще 3–4 раза*), добавляя каждый раз по 250мл свежего эфира. При повторных экстракциях объем эфирной фракции бывает равен объему добавленного эфира. Проэкстрагированный гидролизат выбрасывают, а эфирные экстракты объединяют и промывают в делительной воронке (при осторожном, но тщательном встряхивании) 100 мл 5% раствора HCl и затем 3–4 раза дистиллированной водой (по 100 мл) до нейтральной реакции (по универсальной индикаторной бумаге). Промытый эфирный экстракт высушивают безводным Na_2SO_4, через фильтровальную бумагу заливают в перегонную колбу и растворитель отгоняют на водяной бане, температура которой не должна превышать 50–60°С. Остаток, полученный после отгонки растворителя, переносят, смывая несколько раз небольшими порциями свежего эфира, в стаканчик емкостью 100 мл и упаривают на водяной бане до полного устранения эфира (присутствие остатков эфира может неблагоприятно отразиться на прохождении следующего этапа анализа).

Очистка неомыляемой фракции на окиси алюминия. Приготовляют колонку из хроматографической окиси алюминия размером высота 9–10 см, диаметр 7–8 см, путем осаждения адсорбента из бензола. Каких-либо принципиальных ограничений в отношении размеров частиц адсорбента не имеется. Практически удобно, однако, применять для этой цели адсорбент с размерами частиц выше 0,08 мм, т.е. тот, который остается после выделения фракции с размерами частиц 0,08 – 0,05 мм, необходимой для тонкослойной хроматографии. Неомыляемую фракцию, полученную после отгонки эфира, растворяют в 20–30 мл бензола и постепенно наносят на колонку. Колонку промывают 1,0 л бензола. Из собранного элюата бензол отгоняют, остаток из отгонной колбы переносят в стаканчик (споласкивание колбы можно производить эфиром) и упаривают досуха.

---

*) Последний экстракт практически не должен флуоресцировать при освещении в темноте ультрафиолетовым светом.

Тонкослойная хроматография. Тонкослойная хроматография производится на незакрепленном слое окиси алюминия с размерами частиц 0,05–0,08 мм. Окись алюминия наносят на стеклянные пластинки размером 120 х 200 мм. Толщина слоя адсорбента 1–1,5мм. Пробу растворяют в эфире (4–5 мл) и с помощью глазной пипетки наносят каплями на стартовую линию(полосу) пластинки*). Стартовая линия отстоит на 20–25 мм от нижнего края пластинки. Стаканчик с пробой несколько раз промывают свежими порциями эфира(которые затем также наносят на старт пластинки) до тех пор,пока смыв перестанет флуоресцировать. Развитие хроматограммы производится н-гексаном или петролейным эфиром. При этом летучий петролейный эфир(температура кипения до 60°С) не удобен в работе, так как он требует высокой герметичности кюветы, в которой производится развитие хроматограммы.При недостаточной герметичности не устанавливается насыщение объема кюветы парами растворителя и поэтому его фронт не поднимается до верха пластинки. В случае применения н-гексана или петролейного эфира с температурой кипения 70–100°С тонкослойная хроматография вполне удовлетворительно производится в обычных металлических эмалированных фотографических кюветах размером 250 х 300 мм, накрытых стеклом.

После достижения фронтом растворителя верхней части пластинки ее вынимают из кюветы и освещают ультрафиолетовым светом. Если развитие хроматограммы еще недостаточно(флуоресцирующие полосы еще недалеко отошли от старта), то пластинку оставляют под тягой до испарения растворителя (15–20 минут) и затем снова повторяют хроматографию. Развитие хроматограммы можно считать законченным после того, когда флуоресцирующие полосы распространяться по крайней мере на 3/4 длины пластинки. После этого пластинку делят иглой под ультрафиолетом или тонкой проволокой на флуоресцирующие полосы. Адсорбент с каждой из выделенных зон тщательно собирают в небольшие стеклянные колонки и элюируют эфиром в колбочки емкостью 50 мл.

*) Для получения четкого разделения полос на хроматограмме стартовую линию следует делать очень узкой. Если при нанесении пробы стартовая линия получается в виде широкой расплывчатой полосы то ее можно сузить, подогнав расплывшуюся смесь к верхнему краю полосы с помощью серного эфира.

Качественный спектральный анализ. В колбочки с эфирным элюатом адсорбента флуоресцирующих зон добавляют по 1-1,5 мл н-октана и эфир выпаривают.(Выпаривание эфира без н-октана связано с опасностью частичной потери БП). Остаток из колбочек переносят в пробирки, споласкивая колбочки свежими порциями н-октана таким образом, чтобы смыв в пробирке не превышал 5-6 мл*). Пробирки поступают на спектральную установку (рис. 1): спектрограф ИСП-51 с фотоэлектрической приставкой ФЭП-1 или спектрометр ДСФ-12. Записывают область 4000-4100А°, в которой расположены 2 характерных пика квазилинейчатого спектра флуоресценции БП: сильный пик 4030,5 А° и слабый 4085,2 А°(рис.2). При настройке прибора нулевое положение устанавливается на участке 4010-4015 А° изменением сперва ширины щелей на входе прибора и перед фотоумножителем, иногда также усилением, а затем установкой пробирки в оптимальном положении наибольшего отклонения пера самописца (не выходящего за пределы шкалы) в области пика 4030,5 А°. Наличие на записи характерной структуры из двух пиков спектров БП является доказательством присутствия этого соединения в соответствующей фракции(рис.3).

При идентификации БП необходимо иметь в виду, что в исследуемых пробах иногда могут присутствовать другие полициклические углеводороды, в частности, бенз(к) флуорантен. Это соединение при хроматографии трудно отделяется от БП и часто оказывается в одной с ним фракции. Между тем в области 4030,5А° спектр флуоресценции бенз(к) флуорантена очень похож на спектр БП. Бенз(к)флуорантен имеет сильный пик 4034,5А°, по общему виду очень похожий на пик 4030,5А° спектра БП. В случае присутствия в пробе обоих этих веществ, вследствие наложения друг на друга их спектров флуоресценции, на записи наблюдается

*) Объем фракций 5-6 мл оказался оптимальным. Уменьшение объема, а следовательно, и размера замороженного раствора может привести к тому, что сфокусированный пучок возбуждающего света не весь будет попадать на исследуемый раствор. Это приведет к уменьшению чувствительности установки. Больший объем фракций связан с излишним расходом н-октана и с уменьшением концентрации БП в растворе, что также приведет к уменьшению чувствительности анализа.

сдвоенный пик (рис. 4). Опасность представляют случаи, когда БП совсем отсутствует (или имеется в небольшом количестве), а бенз(к) флуорантена много. Тогда одиночный пик бенз(к) флуорантена (4034,5 A^{o}) может быть ошибочно принят за пик 4030,5 Å спектра БП. Чтобы избежать подобной ошибки, необходимо, во-первых, фиксировать положение (длину волны) интенсивного пика в области 4030–4034 A^{o}, во вторых, записывать область 4085 A^{o}, где в спектре БП имеется пик, а в спектре бенз(к) флуорантена он отсутствует.

После записи спектров фракций отбирают те, в которых присутствует БП и передают их для проведения количественного анализа. При этом, если одна и та же проба имеет несколько бензпиреновых фракций, то перед количественным анализом их объединяют.

При всех записях спектров необходимо записывать на ленте. Рис I. Схема спектральной установки: I – источник возбуждающего света, 2 – кварцевая конденсорная линза, 3 – стеклянный фильтр, выделяющий ультрафиолетовый свет, 4 – кварцевый прозрачный дьюаровский сосуд, 5 – пробирка с замороженной исследуемой пробой, 6 – стеклянная конденсорная линза, 7 – щель спектрального прибора, 8 – спектральный прибор.

Рис. 2 Участок квазилинейчатого спектра бенз(а)пирена в н-октане.

Рис. 3. Участок квазилинейчатого спектра бензпиреновой фракции из копченой рыбы в н-октане.

Рис. 4. Участок квазилинейчатого спектра бензпиреновой фракции в н-октане, содержащей бенз(к)флуорантен (БФ) и (БП).

Рис. 5. Графическое построение на записи спектра бензпиреновой фракции с дооавкой БП.

Рис. 6. График зависимости $\frac{S_{оп}}{S_{обп}}$ от $\frac{l}{e}$.

самописца данные о ширине щелей *) и усилении, при которых произведена запись. Эти данные могут быть полезными при коли-

*) Ширину входной и выходной щелей устанавливают приблизительно одинаковыми.

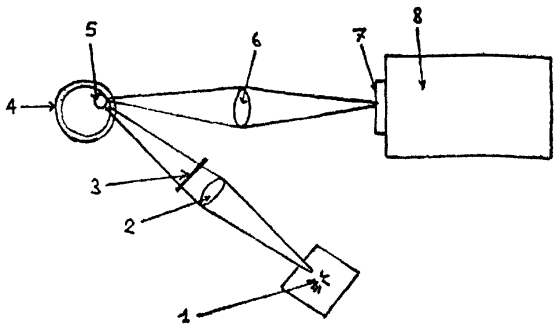


Рис.1 . Схема спектральной установки

1.-Источник возбуждающего света,
2.-Кварцевая конденсорная линза,
3.-Стеклянный фильтр,выделяющий ультр. свет,
4.-Кварцевый прозрачный дьюаровский сосуд,
5.-Пробирка с замороженной исследуемой пробой,
6.-Стеклянная конденсорная линза,
7.-Щель спектрального прибора,
8.-Спектральный прибор.

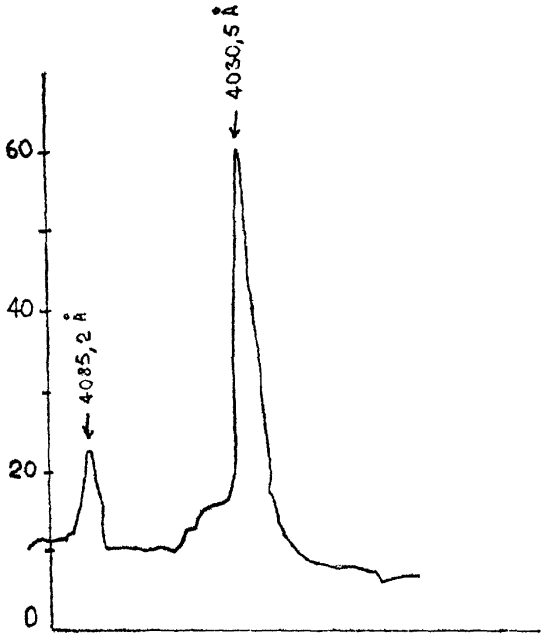


Рис. 2. Участок квазилинейчатого спектра -бенз(а)пирена в Н-актане

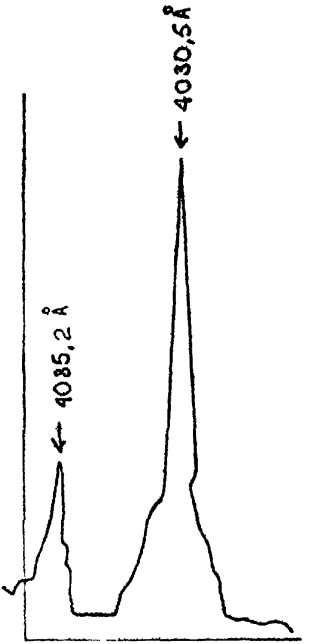


Рис. 3. Участок квазилинейчатого спектра бенз(а)пиреновой фракции из копченой рыбы в Н-октане.

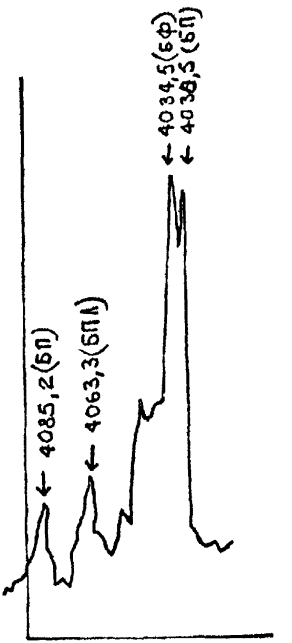


Рис. 4. Участок квазилинейчатого спектра бензпиреновой фракции в Н-октане, содержащей бенз(к)флуорантен (БФ) и БПЛ.

чественном анализе.

Количественный спектральный анализ. В настоящее время описано несколько способов количественного определения БП с помощью квазилинейчатых спектров флуоресценции. Все они основываются на принципе внутреннего стандарта или на принципе добавок(как правило в комоинации с принципом внутреннего стандарта). Мы здесь даем описание метода, использующего принцип внутреннего стандарта.

В принятом методе в качестве внутреннего стандарта применяется ЦПЛ. Количественное определение производится в н-октане при температуре жидкого азота на той же спектральной установке, что и при качественном анализе. Аналитическими в спектре БП служат линии 4030,5A^0 и 4085,2A^0, а в спектре ЦПЛ - 4063,3 A^0.

Порядок проведения количественного определения применяется следующий.

Производится запись спектра объединенной бензпиреновой фракции на участке 4000-4100A^0с обязательной регистрацией ширины щелей установки и усиления.(В случае, если весь БП сосредоточен в одной фракции, может быть использована последняя ее запись, полученная при качественном анализе). При некотором опыте по виду записи и по данным о ширине щелей в усилении можно ориентировочно оценить количество БП во фракции.*)I

---

*)I

Соотношение между концентрацией БП во фракции и шириной входной и выходной щелей спектральной установки зависит от ряда факторов: чувствительности фотоумножителя, источника возбуждающего ультрафиолетового света, характеристики светофильтра или монохроматора, светосилы оптики, применяемой в возоуждающем пучке и ее юстировки и т.д. В разных спектральных установках эти характеристики могут сильно различаться. Поэтому указанные соотношения могут быть установлены только на основании опыта работы на каждой конкретной установке.

Если концентрация БП выше, чем 0,2-0,3 мкг/мл, то необходимо произвести разбавление раствора.*)2 Для этого измеряют объем фракции, берут от нее определенную часть (в зависимости от того, во сколько раз необходимо произвести разведение)и доводят ее н-октаном до объема приблизительно 5 мл. Производят запись соответствующего участка спектра этой разбавленной части фракции. Если окажется, что сделанное разведение недостаточно, то операцию повторяют.

Таким образом, первым этапом количественного анализа является получение первичной записи спектра фракции или такой части фракции, в которой ориентировочно определенная концентрация БП не превышает 0,2-0,3 мкг/мл.Далее в эту фракцию (или часть фракции) добавляют определенное количество БП,растворенного в н-октане.*) Раствор БПД добавляют из такого расчета, чтобы количество его приблизительно в 10 раз превышало количество БП, присутствующего во фракции. Затем снова делают запись того же участка спектра.

Если полученная запись окажется удовлетворительной, то приступают к ее графической обработке и вычислению количества БП. Для этого делают графическое построение, показанное

---

*)2 Разбавление необходимо в связи с тем, что при более высоких концентрациях распределение интенсивности в квазилинейчатом спектре БП становится зависимым от концентрации. Следовательно,интенсивность аналитических линий спектра перестает быть пропорциональной концентрации определяемого вещества. Распределение интенсивности в спектре БПД не меняется до концентрации 100 мкг/кг.

*) Для этого используется заранее приготовленный эталонный раствор БПД в н-октане(концентрация 1 мкг/мл).

на рис.5. Соединяют прямой вершины пиков БП 4030,5А° и 4085,2 А° и проводят линию основания пика БПЛ 4063,3 А°. Далее через вершину пика БПЛ проводят вертикальную прямую так, чтобы она пересекала как линию основания этого пика, так и прямую, соединяющую вершины пиков БП. По этой вертикальной прямой измеряют расстояния от линии основания до прямой, соединяющей вершины пиков БП (L) и от линии основания до вершины пика БПЛ (ℓ). Величина L характеризует интенсивность линий спектра флуоресценции БП, а величина ℓ – интенсивность флуоресценции БПЛ. Отношение $\frac{L}{\ell}$, следовательно, выражает соотношение интенсивностей флуоресценции определяемого вещества и внутреннего стандарта. Изменение этого отношения пропорционально изменению отношений концентраций этих соединений.

Количество БП во фракции определяют по следующей формуле:

$$S_{бп} = A\frac{L}{\ell} S_{бпл}$$

где $S_{бп}$ – количество БП во фракции или в той ее части, для которой получена запись спектра и произведено графическое построение. (в мкг)

$S_{бпл}$ – количество БПЛ, добавленное в фракцию (в мкг)

A – соотношение интенсивностей флуоресценции БП и БПЛ при одинаковой их концентрации. Численное значение величины А может зависеть от спектральной характеристики источника возбуждающего света, а при определенных условиях и от его интенсивности. Поэтому эта величина должна определяться экспериментально для каждой конкретной спектральной установки (см. приложение 2).

Найденное количество БП во фракции ($S_{бп}$) пересчитывают на концентрацию его в продукте К:

Этой формулой учитывается разведение фракции. Величина n – исходный объем фракции до разведения, m – объем, взятый из исходного сырья для разведения(если разведение производили несколько раз, то в формулу, соответственно, в числитель и знаменатель, входят исходный и взятый для разведения объемы для каждого случая разведения), а– вес продукта, взятого в пробу в граммах.

Пример. При анализе 100 г кильки горячего копчения первоначальная объединенная бензпиреновая фракция имела объем 18 мл(n_1). Из нее взяли 2 мл (m_1), разбавили эту часть фракции приблизительно в три раза и произвели запись спектра. Из записи спектра выяснилось, что разведение недостаточно. Измерили точно объем разбавленной части фракции n_2 – он оказался равным 6,4 мл. Из этого объема взяли 1,5 мл(m_2) и разбавили его приблизительно в 4 раза. Произвели еще запись спектра и установили, что разведение все еще недостаточно. Измерили объем этой части фракции n_3. Он оказался равным 5,8 мл. Взяли из него 2,5 мл (m_3) и разбавили приблизительно в 2 раза.Произвели запись спектра. Разведение на этот раз оказалось удовлетворительным. Добавили в последний объем раствора 0,5 мкг БП. Произвели запись спектра и установили, что добавленного количества БП мало, т.е.его пик мало выделяется на фоне спектра БП. Добавили еще 0,5 мкг БП и снова произвели запись. На этот раз запись оказалась удовлетворительной. После графической ее обработки нашли отражение $\frac{L}{l}$ = 0,8. Произвели вычисление количества БП в данной части фракции (в нашей установке A = 0.081):

$$S_{БП} = A\frac{L}{l} \cdot S_{БПА} = 0.081 \times 0,8 \times 1 = 0,065 \text{мкг}$$

Вычислили концентрацию БП в продукте:

$$K = S_{БП}\frac{n_1 \cdot n_2 \cdot n_3}{m_1 \cdot m_2 \cdot m_3} \cdot \frac{1000}{a} = 0,065\frac{(9 \cdot 6,4 \cdot 5,8) \cdot 1000}{(2 \cdot 1,5 \cdot 2,5) \cdot 100} = 29\frac{\text{мкг}}{\text{кг}}$$

Рассмотренный пример представляет собой исключительный случай трехкратного разведения фракции и двухкратного добавления БПЛ. В подавляющем большинстве случаев удается обходиться одним разведением(или даже без разведения) и однократным добавлением БПЛ. В таких случаях сильно уменьшается трудоемкость процесса количественного определения и вычисления.

Следует учитывать, что на характер записи спектра могут влиять различные случайные причины, в частности, колебания напряжения в электросети. Поэтому окончательную запись спектра для количественного определения необходимо делать дважды. Значение отношения $\frac{L}{\ell}$ в формуле следует брать среднее из двух величин, найденных по двум параллельным записям спектров.

Приложение № I

Описание спектральной установки.

Основой спектральной установки может служить спектрометр ДФС-I2 или спектрограф ИСП-5I с фотоэлектрической приставкой ФЭП-I. Однако в выпускаемые промышленностью комплекты этих приборов не входит оборудование, необходимое для флуоресцентноспектрального анализа, особенно для анализа по квазилинейчатым спектрам флуоресценции.

Кроме собственно спектрального прибора, в установку входят следующие узлы.

I. Источник возбуждающего света с комплектом электропитания.

В качестве вполне удовлетворительного источника света может служить ртутно-кварцевая лампа ПРК-2 с электрооборудованием для питания, входящим в комплект спектрографа ИСП-5I. Ртутно-кварцевые лампы сверхвысокого давления типа СВД менее пригодны для этой цели. Дело в том, что эти лампы имеют корот-

кий, но очень яркий светящийся шнур. Сфокусированный на замороженной пробе, он может создать условия насыщения светом при которых интенсивность флуоресценции перестает быть пропорциональной интенсивности возбуждающего света. Все это приводит к тому, что коэффициент А, используемый при количественных определениях, приобретает зависимость от интенсивности возбуждающего света. В таких условиях необходимо строго следить, чтобы интенсивность возбуждающего света оставалась постоянной. При использовании ламп типа ПРК, благодаря их конструктивным особенностям, условия насыщения обычно не достигаются. Поэтому с этими лампами можно работать с меньшими предосторожностями, в частности, в отношении постоянства интенсивности возбуждающего света.

Ртутно-кварцевую лампу помещают в кожух, назначение которого - предотвращение проникновения ультрафиолетового света в рабочее помещение. В то же время наличие кожуха не должно приводить к перегреванию лампы.

Для выделения из общего излучения ртутно-кварцевой лампы ультрафиолетовой части применяются фильтры или монохроматоры. В описываемой здесь методике вполне достаточно стеклянных ультрафиолетовых фильтров УФС-2(толщина стекла 3-4 мм).

Возбуждающее излучение фокусируется на замороженную пробу с помощью кварцевого конденсора желательно большей светосилы, доступной в данной установке.

Ртутно-кварцевые лампы дают довольно сильное тепловое излучение, которое приводит иногда к растрескиванию стеклянных фильтров, особенно сделанных из нетермостойкого стекла(фильтры УФС-2 – термостойкие, УФС-3 нетермостойкие). Поэтому фильтры следует ставить после кварцевого конденсора. Кроме того, желательно иметь водяные, охлаждающие пучок света, фильтры с кварцевыми стенками.

2. Узел, в котором производится возбуждение флуоресценции.

Это наиболее ответственный узел всей установки. В принципе здесь ставится простая задача. Необходимо охладить пробу до температуры жидкого азота (- 196°С) и, сохраняя эту температуру, возбудить флуоресценцию и направить ее должным образом в спектральный прибор. Для этой цели пробирку с пробой погружают в дьюаровский кварцевый сосуд с прозрачными стенками (внутренний диаметр около 60 мм, наружный - около 80 мм, высота около 140 мм) с жидким азотом и удерживают там в течение всего периода записи спектра. В случае применения описанного выше возбуждающего ультрафиолетового света для возбуждения используются практически только группа ртутных линий 3650 А°. Свет этой длины волны не очень сильно ослабляется тонким слоем стекла. Поэтому запись спектров можно производить в стеклянных пробирках, хотя применение кварцевых пробирок может дать некоторый выигрыш в чувствительности анализа. На том же основании в крайнем случае работу можно производить не в кварцевом, а в стеклянном прозрачном дьюаре, хотя это будет связано с уменьшением чувствительности анализа. Следует отметить, что применение кварцевых дьюаров желательно также из-за их большой устойчивости при резких изменениях температуры.

Конденсорная линза, фокусирующая свет флуоресценции на щель спектрального прибора, может быть стеклянной. Единственное требование к ней - обеспечение максимальной светосилы установки.

Основное требование, которое предъявляется к этому узлу - это обеспечить возможно установки пробирки всегда в одно и то же положение, причем в такое, в котором возбуждается наиболее интенсивная флуоресценция и она наилучшим образом направляется в спектральный аппарат. Обычно место для пробирки выбирают так, чтобы центр флуоресцирующего пятна на замороженном образце находился на оптической оси спектрального прибора и достигалось наибольшее использование его светосилы. Так как

исследуемый раствор замерзает в виде мелких кристаллов, сильно рассеивающих падающий на замороженный раствор возбуждающий свет, то возбуждающее излучение должно падать на пробирку со стороны, обращенной к спектральному прибору. Возбуждающий пучок, таким образом, направлен под острым углом к оптической оси спектрального прибора. Это создает определенные трудности в фиксации строго определенного места установки пробирки.

Приложение 2

Определение коэффициента А

Постоянная величина А, входящая в формулу для количественного определения, представляет собой коэффициент, посредством которого связываются переменные величины Sбп (количество БП), Sбпл (количество добавленного БПЛ) и $\frac{L}{\ell}$ (соотношение интенсивностей флуоресценции БП и БПЛ). Смысл коэффициента А и способ его нахождения становятся ясными, если в указанной формуле предположить S бп $= S$ бпл. Тогда $A = \frac{\ell}{L}$. Следовательно, коэффициент А представляет собой соотношение интенсивностей БПЛ и БП при одинаковых количествах их в растворе. Для каждой данной установки численное значение коэффициента А остается постоянным. Поэтому его величину определяют после настройки установки и пользуются найденным значением все время, пока в установке не произойдут существенные изменения, которые могут отразиться на ее настройке (например, смена ртутно-кварцевой лампы, измененле положения конденсора и т.п.).

Способ нахождения численного значения величины А мы продемонстрируем на примере определения его для нашей установки. Была приготовлена серия из 9 пробирок с раствором в н-октане смеси чистых БП и БПЛ. Объем раствора в каждой пробирке был 5 мл. Количество БП во всех пробирках было одинаковым - по 0,04 мкг. Количество БПЛ было, соответственно, 0,3; 0,4; 0,48;

0,60; 0,72; 0,80; I,2; I,6; и 2,0 мкг. Далее произвели запись соответствующих участков спектров всех растворов так, как это делается обычно по описываемой здесь методике, сделали графическую обработку записей и нашли для каждого случая отношение $\frac{L}{\ell}$. Затем на миллиметровой бумаге построили график, на котором откладывали для каждого раствора по горизонтальной оси найденное из записи спектра отношение $\frac{L}{\ell}$, а по вертикальной – отношение количества БП к количеству БПЛ $\frac{S_{оп}}{S_{опл}}$ (рис. 6).

При этом исходили из следующих соображений.

Формулу для определения количества БП можно записать в следующем виде:

$$\frac{S_{оп}}{S_{опл}} = A\,\frac{\ell}{L}$$

Такая формула представляет собой уравнение прямой, в котором переменными величинами являются отношения $\frac{S_{оп}}{S_{опл}}$ и $\frac{L}{\ell}$, а величина А представляет собой постоянный коэффициент, характеризующий угол наклона прямой. Следовательно, экспериментальные точки на построенном графике должны укладываться на прямой.

Из полученного графика легко найти численное значение коэффициента А, если полученные экспериментальные точки действительно соответствуют указанной формуле, т.е. лежат на прямой, проходящей через начало координат. Тогда из формулы мы видим, что при $\frac{L}{\ell} = I$ $A = \frac{S_{оп}}{S_{опл}}$. Следовательно, для нахождения численного значения коэффициента А достаточно взять на полученной прямой отсчет при значении $\frac{L}{\ell} = I$. Полученной величиной можно пользоваться в процессе последующей работы.

На практике дело обстоит иногда несколько сложнее. Из рис. 6 видно, что в нашем случае экспериментальные точки действительно достаточно хорошо укладываются на прямую линию, однако, она не проходит через начало координат. Следовательно, найденное по описанному выше способу значение коэффициента А будет справедливым только в сравнительно небольшой области соотношений количеств БП и БПЛ, в которой отношение $\frac{L}{\ell}$ не очень

сильно отличается от I. В нашей установке это область значении от 0,5 до 2,0, что соответствует области отношений количества БПЛ к количеству БП приблизительно от 6 до 20.

Однако для тех случаев, когда построенная прямая не проходит через начало координат, в более широкой области изменений отношении $\frac{L}{l}$ (следовательно, и соотношения концентраций) правильные результаты могут быть получены при графическом учете значения коэффициента А. Учитывая это, мы считаем целесообразным рекомендовать пользоваться графическим способом во всей повседневной работе.

Практическая работа по этому способу сводится к следующему.

После настройки установки строят прямую по типу приведенной на рис. 6 представляющую собой соотношение величин $\frac{S_{оп}}{S_{опл}}$ и $\frac{L}{l}$. Этим графиком пользуются при всей дальнейшей практической работе.

При проведении определения содержания БП ($S_{оп}$) в бензпиреновой фракции, выделенной из неизвестного продукта, для нее находят, по описанному выше способу, отношение $\frac{L}{l}$. На графике рис. 6 находят величину $\frac{S_{оп}}{S_{опл}}$ для этого значения $\frac{L}{l}$. Далее по формуле:

$$S_{оп} = \left(\frac{S_{оп}}{S_{опл}}\right)_2 \cdot S_{опл}$$

находят количество БП в пробе (в мкг). В этой формуле $\left(\frac{S_{оп}}{S_{опл}}\right)_2$, взятое из графика (рис. 6) значение отношения $\frac{S_{оп}}{S_{опл}}$ при найденной для данной фракции величине отношения $\frac{L}{l}$, $S_{опл}$, – количество добавленного в пробу БП (в мкг).

Следует подчеркнуть, что пропорциональность между величинами $\frac{S_{оп}}{S_{опл}}$ и $\frac{L}{l}$ сохраняется лишь в определенном интервале соотношения концентраций БП и БПЛ.

Ротапринт Центрального научно-исследовательского института санитарного просвещения,
Тираж - 2000 экз., объем - 2,75 п.л.
Д-77805 от 10.06.77г. Зак.№ 516
Цена 17 коп.

gost.e-ecolog.ru