ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

СТБ ГОСТ Р 51650-2001

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

Методы определения массовой доли бенз(а)пирена

ПРАДУКТЫ ХАРЧОВЫЯ

Метады вызначэння масавай долі бенз(а)пірэна

Издание официальное



Госстандарт

Минск

gost.e-ecolog.ru

УДК 663/664:543.9:006.354(476) МКС 67.040 (КГС Н09)

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

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Государственным научно-исследовательским институтом биосинтеза белковых веществ Министерства экономики Российской Федерации (ГОСНИИСИНТЕЗБЕЛОК), Институтом питания Российской академии медицинских наук (ИП РАМН), Всероссийским онкологическим научным центром Российской Академии медицинских наук (ВОНЦ РАМН)

2 ПОДГОТОВЛЕН к введению в качестве государственного стандарта научно-производственным республиканским унитарным предприятием "Белорусский государственный институт стандартизации и сертификации (БелГИСС)"

ВНЕСЕН Госстандартом Республики Беларусь

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ постановлением Госстандарта Республики Беларусь от 30 мая 2001 г. № 19

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Настоящий стандарт не может быть тиражирован и распространен без разрешения Госстандарта Республики Беларусь

Издан на русском языке

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Отбор проб 2
4 Метод низкотемпературной спектрофлуориметрии 2
4.1 Аппаратура, материалы и реактивы 2
4.2 Подготовка к испытанию 3
4.3 Проведение испытания 4
4.4 Обработка результатов 6
4.5 Контроль точности результатов анализа 6
5 Методы высокоэффективной жидкостной хроматографии и спектрофлуориметрии при комнатной температуре 7
5.1 Аппаратура, материалы и реактивы 8
5.2 Подготовка к испытанию 9
5.3 Проведение испытания 10
5.4 Обработка результатов 14
5.5 Контроль точности результатов анализа 14
6 Требования техники безопасности 15
7 Требования к квалификации оператора 16
Приложение А Библиография 17

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ
Методы определения массовой доли бенз(а)пирена

ПРАДУКТЫ ХАРЧОВЫЯ
Метады вызначэння масавай долі бенз(а)пірэна

FOOD STUFFS
Methods for determination of benz(a)pyren fraction of total mass

Дата введения 2002-11-01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на продовольственное сырье, пищевые продукты, пищевые и вкусовые добавки и устанавливает методы определения массовой доли бенз(а)пирена с применением спектрофлуориметрии при низкой и комнатной температуре и высокоэффективной жидкостной хроматографии.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы ссылки на следующие стандарты:

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

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

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

ГОСТ 427-75 Линейка измерительная металлическая. Технические условия

ГОСТ 1770-74 (ИСО 1042-83, ИСО 4788-80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 2603-79 Реактивы. Ацетон. Технические условия

ГОСТ 4204-77 Реактивы. Кислота серная. Технические условия

ГОСТ 5777-84 Калий марганцевокислый технический. Технические условия

ГОСТ 5789-78 Реактивы. Толуол. Технические условия

ГОСТ 5815-77 Реактивы. Ангидрид уксусный. Технические условия

ГОСТ 5955-75 Реактивы. Бензол. Технические условия

ГОСТ 6709-72 Вода дистиллированная. Технические условия

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

ГОСТ 9293-74 (ИСО 2435-73) 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

ГОСТ 20015-88 Хлороформ. Технические условия

ГОСТ 20289-74 Реактивы. Диметилформамид. Технические условия

ГОСТ 24104-88 Весы лабораторные общего назначения и образцовые. Общие технические условия

ГОСТ 24363-80 Реактивы. Калия гидроокись. Технические условия

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

ГОСТ 29224-91(ИСО 386-77) Посуда лабораторная стеклянная. Термометры жидкостные стеклянные лабораторные. Принципы устройства, конструирования и применения

Издание официальное

ГОСТ 29228-91(ИСО 835-2-81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 2. Пипетки градуированные без установленного времени ожидания

ГОСТ 29229-91(ИСО 835-3-81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 3. 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 $0,2 \times 10^{-7}$ – $5,0 \times 10^{-7}$ %. 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) °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 × 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 °С с ценой деления 1 °С по ГОСТ 29224.

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

Колбы мерные 2-100-2 по ГОСТ 25336.

---

* Стандарт находится в БелГИСС и будет вводиться в плановом порядке.

Капилляры стеклянные, палочки стеклянные.

н,октан, ч., по нормативному документу [1].

н.гексан, ч., по нормативному документу [2].

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

Эфир петролейный фракция 40 – 70 °С по нормативному документу [3].

Хлороформ по ГОСТ 20015.

Бензол по ГОСТ 5955.

Алюминия окись для хроматографии 2 степени активности по нормативному документу [4].

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) °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 4.2.4, 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 4.2.6, в мерных колбах с притертой пробкой вместимостью 100 $см^3$. Растворы хранят в холодильнике. Срок годности растворов не более одного месяца.

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 °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.

Для хроматографического разделения экстракта на стеклянную пластину размером 20 × 40 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.

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° – 25° 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 °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 × 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 (K) 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 c, мкг/см^3, вычисляют по формуле

$$c = c_{ст} \cdot K/K_{ст}, \quad (1)$$

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

K – 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:

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

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

где c – 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 $|X_1 - X_2| \le 0{,}01dX$, 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 $|X_1 - X_2| \le 0{,}01dX$, 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.

Таблица 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 если $|X_1 - X - c| \le 0{,}01\ K$, где X_1, X_2 и c – результаты контрольных анализов пробы с добавкой бенз(а)пирена, реальной пробы и величина добавки бенз(а)пирена, соответственно; K – норматив оперативного контроля точности.

Норматив оперативного контроля точности рассчитывают по формулам:

при проведении внутрилабораторного контроля (P = 0,90)

$$K = 0{,}84\sqrt{(\Delta_{X_1})^2 + (\Delta_X)^2}\ ; \qquad (4)$$

при проведении внешнего контроля (P = 0,95)

$$K = \sqrt{(\Delta_{X_1})^2 + (\Delta_X)^2}\ , \qquad (5)$$

где $\Delta_{X_1} + \Delta X$ – значения характеристики погрешности, соответствующие массовой концентрации бенз(а)пирена в пробе с добавкой и в реальной пробе;

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

Значение относительной погрешности $\delta_X(\delta_{X_1})$ 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 с последующим количественным определением выделенного бенз(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, Supelcosil 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-3М с электроподогревом.

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

Камера хроматографическая стеклянная $40 \times 40 \times 40$ см.

Пластинки стеклянные для тонкослойной хроматографии 5×20 и 20×20 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.

н.гексан, ч., по нормативному документу [2].

Спирт этиловый ректифико ванный 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 нормативному документу [5].
Калия гидроокись по ГОСТ 24363.
Целлюлоза микрокристаллическая порошковая по нормативному документу [6].
Бенз(а)пирен, содержание основного вещества не менее 98 %.
Бенз(в)хризен, содержание основного вещества не менее 98 %.
Сефадекс LH-20.
Силикагель марки АСКГ по нормативному документу [7].
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 × 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

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

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 $см^3$ этилового спирта и выливают ровным слоем на пластину 20 × 20 см.

5.2.3 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.

5.2.4 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.

5.2.5 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 бенз(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 мкг/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	0,10	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 помещают 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 °С.

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 5.2.5.

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 бенз(а)пирена и бенз(в)хризена, рассчитанное из трех хроматограмм.

Градуировочный коэффициент K 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 K 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 5.3.2.1, записывают хроматограммы раствора бенз(а)пирена массовой концентрации 100 мкг/см^3 и раствора бенз(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 по формуле

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

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

K – 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 по формуле

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

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, 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 спектрофлуориметрии при комнатной температуре

При определении содержания бенз(а)пирена методом спектрофлуориметрии одновременно с пробой продукта анализируют пробу контрольного опыта, в которую добавлено 50 мкл раствора бенз(а)пирена массовой концентрации 1 мкг/см^3.

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 дополнительной очистке в тонком слое ацетилированной целлюлозы.

Для этого пластинку 20 × 20 см, подготовленную, как указано в 5.2.2, 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. 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.

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:

$$X_1 = \frac{(m_1 - m_2) \cdot 100}{m \cdot 1000 \cdot 1000} = \frac{(m_1 - m_{2)} \cdot m_1 \cdot V}{m} \cdot 10^{-4}; \quad (10)$$

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

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 спектрофлуориметрии вычисляют по формулам:

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

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

где $c_{ст}$ – массовая концентрация бенз(а)пирена в рабочем растворе, приготовленного по 5.2.4 и добавленного в пробу контрольного опыта, мкг/см^3;
H – высота спектральной линии бенз(а)пирена на спектрограмме пробы продукта, мм;
$H_{ст}$ – 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;
T – 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 $|X_1 - X_2| \le 0{,}01\,DX$, 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 $|X_1 - X_2| \le 0{,}01\,DX$, 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

Таблица 3 – **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 (границы интервала, в котором погрешность находится с заданной вероятностью) ± δ, %	Нормативы 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_2 и c – результаты контрольных анализов пробы с добавкой бенз(а)пирена, реальной пробы и величина добавки бенз(а)пирена соответственно; K – норматив оперативного контроля точности.

Норматив оперативного контроля точности рассчитывают по формулам:

при проведении внутрилабораторного контроля (P = 0,90)

$$K = 0{,}84\sqrt{(\Delta_{X_1})^2 + \Delta_X)^2}\,; \qquad (14)$$

при проведении внешнего контроля (P = 0,95)

$$K = \sqrt{(\Delta_{X_1})^2 + \Delta_X)^2}\,, \qquad (15)$$

где Δ_{X_1} и Δ_X – значения характеристики погрешности, соответствующие массовой концентрации бенз(а)пирена в пробе с добавкой бенз(а)пирена и в реальной пробе;

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

Значения относительной погрешности $\delta_{X_1}(\delta_{X_1})$ 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 приостанавливают, 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 др. 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.

Приложение А
(справочное)

Библиография

[1]	ТУ 6-09-3748-85	н.Октан
[2]	ТУ 6-09-3375-85	н.Гексан
[3]	ТУ 6-09-3849-85	Эфир петролейный 40 – 70 °С
[4]	ТУ 6-09-3916-85	Алюминия окись для хроматографии 2 степени активности
[5]	ТУ 6-09-3534-84 или ТУ 6-09-06-1092-83	Ацетонитрил
[6]	ТУ 6-09-3575-84	Целлюлоза микрокристаллическая порошковая
[7]	ТУ 6-09-17-148-88	Силикагель марки АСКГ

gost.e-ecolog.ru