МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР

ГЛАВНОЕ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ УПРАВЛЕНИЕ

КОМИТЕТ ПО КАНЦЕРОГЕННЫМ ВЕЩЕСТВАМ И МЕРАМ ПРОФИЛАКТИКИ

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

по качественному и количественному определению канцерогенных полициклических ароматических углеводородов в продуктах сложного состава

МОСКВА - 1976 г.

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.

№ 1423-76

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

по качественному и количественному определению канцерогенных полициклических ароматических углеводородов в продуктах сложного состава

МОСКВА - 1976г.

Авторы - составители:

П.П.Дикун, И.А.Калинина, В.А.Коноваленко, Л.Д.Костенко, Н.Д.Красницкая (НИИ онкологии им.Н.Н.Петрова МЗ СССР)

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

У. Методы качественного и количественного определения канцерогенных полициклических ароматических углеводородов в некоторых продуктах сложного состава

Качественное и количественное определение ряда полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) в продуктах сложного состава с помощью квазилинейчатых спектров флуоресценции.

В данном разделе изложены практические приемы достоверного качественного и достаточно точного количественного определения ряда наиболее часто встречающихся ПАУ при использовании минимального количества элементов структуры квазилинейчатых спектров флуоресценции фракций, т.е. при минимальной затрате времени. Эти приемы основаны как на опыте ранее опубликованных работ, так и на позже приобретенном практическом опыте исследования объектов различного характера: загрязнений атмосферного воздуха, выхлопных газов автотранспорта, продуктов пиролиза древесины, подсолнечного масла.

Хроматографический анализ

Следующим этапом после получения экстракта[x)] из изучаемого объекту является этап хроматографического фракционирования на окиси алюминия методом колоночной и тонкослойной хроматографии.

Применяется обычная окись алюминия для хроматографии II степени активности без специальной ее обработки и без строгих требований в отношении активности. Для тонкослойной хроматографии используется адсорбент с размерами частиц 0,05-

x) Методику отбора проб и их предварительной обработки см. в соответствующих разделах данной книги.

-0,08 мм, поскольку более крупные частицы могут необратимо задерживать некоторое количество ПАУ. При колоночной хроматографии размер частиц существенной роли не играет, поэтому для нее можно использовать адсорбент с размером частиц 0,08-0,125 мм, т.е. оставшийся после отсеивания фракции с размерами частиц 0,05-0,08 мм.

Растворителем для колоночной хроматографии (для приготовления колонки и нанесения пробы) служит н-гексан. Элюирование колонки производится сперва чистым н-гексаном, а позже смесью н-гексана и бензола (на последних стадиях элюирования соотношение н-гексана и бензола достигает 1:1). Выбор растворителей определяется тем, что в н-гексане или смеси его с бензолом можно получать квазилинейчатые спектры фракций, взятых непосредственно с колонки, без перевода их в другой растворитель. В то же время н-гексан имеет преимущество перед более высококипящими растворителями (н-гептаном и н-октаном) в том, что из него легче, при необходимости, переводить фракции в другой растворитель.

Колоночную хроматографию следует применять для первичного фракционирования пробы. Высота столба адсорбента составляет в зависимости от величины пробы, от 150 до 250 мм, диаметр колонки 25 мм. Колонка приготовляется осаждением адсорбента из растворителя. Проба наносится на колонку, пропитанную растворителем. Нанесение пробы на сухой адсорбент связано с опасностью частичной потери ПАУ. Выходящие из колонки фракции объемом от 5 до 10 мл собираются с помощью автоматического коллектора.

Колоночная хроматография не обеспечивает полного разделения ПАУ: как правило, с ее помощью удается выделить только относительно узкие фракции, содержащие по несколько соединений. Для дополнительного их разделения применяют тонкослойную хроматографию на стеклянных пластинках (приблизительно 120х180 мм) с незакрепленным слоем адсорбента толщиной 1,5-2,0 мм.

Нанесение пробы на пластинку при тонкослойной хроматографии производят с помощью диэтилового эфира, хорошо растворяющего ПАУ и быстро испаряющегося. Развитие хроматограммы на пластинке производится чистым циклогексаном или циклогексаном с небольшой примесью (до 3%) бензола или хлороформа. Добавление одного из этих растворителей, во-первых, ускоряет развитие хроматограммы, во-вторых, улучшает разделение ПАУ. Так, при развитии хроматограммы чистым циклогексаном (а также н-гексаном или петролейным эфиром) практически не удается отделить БП от 11,12-бензфлуорантена (бенз/к/-флуорантена). Смесь же циклогексана с 3% хлороформа или бензола хорошо разделяет эти вещества (добавление хлороформа или бензола в н-гексан или петролейный эфир не улучшает разделение ПАУ).

Флуоресцентно-спектральные установки

При определении ПАУ следует применять две спектральные установки: установку с фотографической регистрацией спектров для качественного анализа и установку с фотоэлектрической записью спектров, используемую главным образом для количественного анализа.

В качестве источника ультрафиолетового излучения, необходимого для возбуждения люминесценции, часто используют ртутно-кварцевые лампы. Они очень удобны при определении БП, БПЛ, бенз(б)флуорантена и бенз(к)флуорентена и др.ПАУ, имеющих сильное поглощение в области 360-370 нм. Однако многие ПАУ имеют интенсивное поглощение только в более коротковолновой области (290-320 нм), в которой излучение ртути относительно слабо. Поэтому более удобным при определении ряда ПАУ является источник ультрафиолетового света с непрерывным спектром, например, ксеноновые лампы ДКсШ-1000.

В силу различных условий работы источников ультрафиолетового света в установках для качественного и количественного анализа, в конструктивном отношении они несколько отличаются. В установке для качественного анализа (с фотографической регистрацией спектра) лампа работает лишь кратковременно (экспозиции не превышают 2-3 минут) с включением на время смены пробы. В этом случае ограничиваются воздушным охлаждением лампы, разместив ее в обычном металлическом фонаре. Применяется также сравнительно простая схема зажигания и электропитания лампы.

В установке для количественного анализа лампа работает без выключения сравнительно длительное время. Во избежание ее перегрева должно быть предусмотрено водяное охлаждение фонаря. Кроме того, при количественном анализе важно постоянство режима работы лампы. Поэтому в данном случае должна быть применена другая, более сложная схема блока питания.

Необходимая для возбуждения люминесценции область излучения ксеноновой лампы выделяется стеклянными фильтрами УФС-2 или комбинацией этих фильтров с жидкими фильтрами. В установке с фотографической регистрацией спектров применяются только стеклянные фильтры. В установке с фотоэлектрической записью при анализе веществ, имеющих заметное поглощение в области 360-370 нм и относительно длинноволновые спектры флуоресценции,также пользуются только фильтрами УФС-2 (общая толщина фильтра 14 мм). Для вещества с более коротковолоновой областью возбуждения (и флуоресценции) используют раствор смеси сернокислого никеля (7 г) и сернокислого кобальта (5 г) в 100 мл воды при толщине слоя 35 мм и стеклянный фильтр УФС-2 (2 мм). Такая комбинация жидкого фильтра со стеклянным при использовании ксеноновой лампы дает возможность записывать сектры флуоресценции вплоть до 370 нм без помех за счет прохождения возбуждающего излучения (при возбуждении флуоресценции фильтрованным светом ртутно-кварцевых ламп в спектральной области ниже 400 нм

трудно избежать появления на записи линий ртутного спектра).

В остальном спектральные установки существенно не отличаются от описанных ранее (П.П.Дикун, Вопросы онкологии, 1959, № 12, стр. 672-677).

Качественный спектральный анализ

Первичный качественный анализ производится на спектральной установке с фотографической регистрацией спектров (спектрограф ИСП-51). На фотопластинку фотографируют подряд спектры (при температуре жидкого азота) всех фракций, полученных при колоночной хроматографии (в том растворителе, в котором они выходят из колонки, т.е. в н-гексане или в смеси его с бензолом). По общему виду фотографий этих спектров можно сразу выделить фракции, содержащие следующие соединения: пирен, БП, ПРЛ, БПЛ, ортофениленпирен, а часто также коронен, БА, бенз(е)-пирен, бенз(б)флуорантен и бенз(к)флуорантен. Дело в том, что обычно в спектрах соответствующих фракций проявляется практически вся структура спектров таких веществ, как пирен, БП, ПРЛ, БПЛ и ортофениленпирен. При этом характерные квазилинейчатые спектры флуоресценции этих веществ легко запоминаются. Поэтому указанные соединения могут быть достоверно идентифицировать при первичном просмотре фотопластинки с фотографиями спектров фракций.

В результате колоночной хроматографии, как правило, большинство веществ распределяется по многим фракциям, причем в большинстве фракций наблюдаются спектры (или элементы спектров) нескольких соединений. Ориентируясь по фотоснимкам спектров фракций, следует объединять группы фракций, в которых преобладает спектр какого-либо соединения. Таким образом получаются относительно узкие объединенные фракции, идущие приблизительно в приведенном ниже порядке.

I) Вещества, идущие при фракционировании раньше пирена (идентифицировать их не удалось из-за отсутствия стандартов).

2) Пиреновая фракция (в ней обычно отчетливо проявляется только спектр пирена без заметных признаков спектров других веществ).

3) От I до 3 фракций веществ, которые можно условно назвать "пиреноподобными". Основанием для такого названия служит сходство их с пиреном по хроматографическим и спектральным свойствам (спектры их флуоресценции начинаются и распространяются приблизительно в той же области, что и у пирена). Идентифицировать их не удалось также из-за отсутствия стандартов. Следует отметить, что число таких фракций и интенсивность их спектров тем больше, чем ниже температура получения исследуемого продукта.

4) Бензантраценовая фракция. В ее спектре могут наблюдаться, кроме головной группы спектра БА, также некоторые, наиболее сильные линии спектра пирена или пиреноподобных веществ, головная линия бенз(е)пирена, и головная группа линий бенз(б)флуорантена.

5) Бензпиреновая фракция. В спектре этой фракции на фоне длинноволновой части спектра БП (в случае присутствия его в исследуемом продукте) отчетливо видна характерная структура спектра перилена. Разделить эти соединения не удавалось. В бензпиреновой фракции часто оказываются, частично или полностью, также вещества, которые можно выделить из нее при дополнительной хроматографии. В спектре фракции на фоне спектра БП иногда наблюдаются характерные черты спектра бенз(к) флуорантена или даже вся структура спектра БПЛ. Несколько впереди (в коротковолновой стороне) спектра БП бывает видна характерная головная группа спектра бенз(б)флуорантена, а еще впереди - головная линия бенз(е)пирена. Нередко в ней присутствует также БА.

6) Бензфлуорантеновая фракция, кроме бенз(к)флуорантена, может содержать примеси БП, БПЛ, ортофенилленпирена и иногда ДБА и дибенз(а,е)пирена.

7) Бензериленовая фракция всегда содержит, в случае

присутствия его в исследуемом продукте, также ортофениленпирен. Полностью разделить эти вещества не удавалось, однако, выделить практически в чистом виде часть каждого из них не представляет особого труда, так как ортофениленпирен несколько отстает при хроматографии от БПЛ. Присутствие этих веществ в одной фракции не мешает идентификации (и количественному определению) каждого из них, поскольку их спектры пространственно почти полностью разделяются. В бензпериленовой фракции может присутствовать ряд других соединений, в частности, ДБА и дибенз(а,е)пирен).

8) Короненовая фракция может частично перекрываться с бензпериленовой.

Как видно из изложенного выше, в объединенных, относительно узких фракциях содержится, как правило, несколько веществ. Часть из них может быть иногда идентифицирована по фотографиям суммарных спектров фракций (до объединения). Однако нередко для надежной идентификации требуется дополнительное фракционирование. Кроме того, дополнительное фракционирование в некоторых случаях необходимо, а в других случаях желательно для последующего количественного анализа.

Дополнительное фракционирование объединенных фракций производится с помощью тонкослойной хроматографии. После развития хроматограммы пластинка освещается ультрафиолетовым светом и делится на флуоресцирующие полосы, наблюдаемые при этом. Адсорбент с каждой из этих зон собирают в отдельную колонку и элюируют флуоресцирующее вещество эфиром. Эфир удаляют и пробу переводят в н-гексан. Затем снова производят фотографирование квазилинейчатых спектров флуоресценции всех фракций, полученных после тонкослойной хроматографии, и идентифицируют присутствующие в них вещества просмотром фотоснимков спектров.

Перечисленные выше вещества, спектры которых могут проявляться лишь частично, не всегда удается обнаружить по фотографиям спектров, даже после тонкослойной хроматографии.

Поэтому второй этап качественного спектрального анализа производили на установке с фотоэлектрической записью спектров (спектрометр ДФС-12), которая обладает более высокой чувствительностью.

Ниже приведено описание конкретных признаков, по которым производится качественная идентификация различных ПАУ. Перечень веществ приведен в порядке прохождения их при хроматографии.

Пирен. Квазилинейчатый спектр флуоресценции пирена начинается в ультрафиолетовой области (3718Å). Первые группы его линий при фотографировании спектра в описанной выше установке иногда сильно маскируются фоном. Однако структура спектра этого вещества настолько богата и характерна, что даже по неполному спектру его легко идентифицировать при визуальном сравнении спектра фракции со снимком спектра чистого вещества.

Бенз(а)антрацен (1,2-бензантрацен). Это вещество имеет достаточно характерный квазилинейчатый спектр. Однако при хроматографии не всегда удается выделить его отдельной фракцией. На фотографии иногда наблюдается только первая, особенно характерная группа спектра этого соединения – слабая линия 3836,2 Å и сильная 3840,6 Å. Наличие этой группы в фракциях, предшествующих бензпиреновой, однозначно свидетельствует о присутствии БА. При малых концентрациях БА его присутствие фотографическим способом иногда совсем не удается обнаружить. В таких случаях качественное определение БА производится фотоэлектрической записью той же группы линий. Чувствительность фотоэлектрического определения БА – не менее 0,003 мкг/мл.

Фотоэлектрический поиск БА в случае отсутствия фотографических признаков его спектра производится в спектре бензпиреновой фракции и фракций, непосредственно ей предшествующих.

Бенз(а)пирен (3,4-бензпирен). Квазилинейчатый спектр флуоресценции этого соединения очень хорошо и достаточно полно проявляется на фотопластинке даже при очень низких концентрациях его в фракции (около 0,001 мкг/мл). Поэтому присутствие БП может быть достоверно установлено визуальным сравнением квазилинейчатых спектров флуоресценции соответствующих фракций с фотоснимками чистого вещества.

В бензпиреновой фракции могут присутствовать также другие ПАУ, трудно поддающиеся разделению, в частности, перилен, бенз(е)пирен, бенз(б)флуорантен и бенз(к)флуорантен. Благодаря тому, что квазилинейчатые спектры флуоресценции первых трех из этих соединений сдвинуты друг относительно друга и относительно спектра БП и к тому же сильно различаются по своей структуре, эти вещества легко могут быть идентифицированы, несмотря на присутствие их в одной фракции.

Бенз(е)пирен (1,2-бензпирен). При наших условиях хроматографии это соединение находится в бензпиреновой фракции, однако благодаря особенностям своего спектра легко определяется. Наиболее интенсивной линией спектра 1,2-бензпирена является линия 3878 Å, лежащая далеко впереди начала спектра БП, бензфлуорантенов и перилена. Линия 3878 Å 1,2-бензпирена используется нами в качестве аналитической при его определении. Следует иметь в виду, что приблизительно в этом месте спектра имеется линия также у пирена. Поэтому вывод о присутствии в фракции 1,2-бензпирена можно сделать только в случае отсутствия на записи ее спектра линий 3872 Å и 3885 Å.

Бенз(б)флуорантен (3,4-бензфлуорантен). Это вещество легко определяется в бензпиреновой фракции благодаря некоторому сдвигу головных групп их спектров. В качестве показателя присутствия этого соединения используется характерная головная линия его спектра 3956 Å, расположенная впереди спектра БП на участке, где бенз(е)пирен (и БА) не имеют линий.

Перилен. Спектр перилена обычно бывает хорошо виден на фотопластинке на фоне длинноволновой части спектра бензпиреновой фракции. Он может быть также достаточно полно записан фотоэлектрически.

Бенз(к)флуорантен (II,I2-бензфлуорантен). Спектры флуоресценции бенз(к)флуорантена и БП расположены в одной области. Несмотря на это оба соединения могут быть достоверно идентифицированы по квазилинейчатым спектрам в н-гексане, а еще лучше в н-октане, как в случае присутствия их в разных фракциях, так и в одной фракции. В случае одновременного присутствия в одной фракции БП может быть обнаружен по наличию характерной группы линий в области (в н-гексане) 4075 Å, где спектр бенз(к)флуорантена ничего не имеет, а бенз(к)флуорантен может быть обнаружен по наличию полосы с резким началом в области 4100 Å, где в спектре БП имеется провал. Бенз(а)пирен и бенз(к)флуорантен могут быть относительно легко разделены хроматографически.

Бенз(*g,h,i*)перилен (I,I2-бензперилен). Это вещество имеет очень характерный квазилинейчатый спектр, легко появляющийся на фотопластинке при очень низких его концентрациях.

Дибенз(а,в)антрацен (I,2,5,6-дибензантрацен). В бензперилленовой, а также идущих непосредственно после нее фракциях удается идентифицировать несколько веществ, в частности, дибенз (а,*в*)антрацен. Доказательством присутствия этого соединения можно считать наличие в спектре фракции характерной головной линии его спектра – 3931 Å.

Дибенз(а,е)пирен (I,2,4,5-дибензпирен). Это соединение при хроматографии лишь немного отстает от БПЛ и ДБА и поэтому часто оказывается в одной фракции с этими веществами. Доказательством присутствия дибенз(а,е)пирена считается наличие в спектре фракции характерной головной группы его спектра, состоящей из нескольких линий: 3936 Å (средней интен-

сивности), 3951 Å (очень сильная, широкая двойная линия) и 3960 Å (не очень сильная линия).

О-фениленпирен. Спектр этого соединения хорошо виден на фотопластинке на фоне длинноволновой части спектра бензперилено-вой фракции. Однако в н-гексане его спектр имеет не очень хорошо выраженную квазилинейчатую структуру. Поэтому для достоверной идентификации о-фениленпирена мы считаем необходимым использовать также его спектр в н-гептане, имеющий более характерную квазилинейчатую структуру.

Коронен. Три наиболее характерные линии спектра этого вещества (4455 Å очень сильная, 4437 Å и 4332 Å немного слабее) легко проявляются иногда даже при первичном фотографировании спектров фракций. Поэтому коронен идентифицируется по фотографии спектра фракции или по записи главных линий.

Таким образом, часть веществ, образующих после колоночной хроматографии относительно узкие объединенные фракции, могут быть идентифицированы благодаря тому, что их спектры почти полностью проявляются в суммарных спектрах хроматографических фракций. Другие соединения идентифицируются только по части их спектра, проявляющегося в суммарном спектре фракций. В этих случаях в качестве дополнительного критерия при идентификации соединения служит также порядок его следования при хроматографии (по отношению к основным объединенным фракциям). Например, наличие в спектре бензпиреновой фракции отдельной линии 3878 Å однозначно свидетельствует о присутствии в фракции бенз(е)пирена. Наличие такой линии в спектре бензантраценовой фракции или в фракции бензпиреноподобного вещества может свидетельствовать о присутствии следов пирена.

В некоторых случаях достоверную идентификацию не удается осуществить даже после неоднократной повторной хроматографии из-за сильного искажения характерной спектральной струк-

туры данного вещества линиями примесей, не поддающихся отделению. В таких случаях полезным иногда оказывается перевод фракции в другой растворитель, в котором это соединение также имеет характерную, но иную структуру соответствующей группы спектра (с помощью такого приема мы доказывали присутствие, например, ДБА и дибенз(а,е)пирена в загрязнениях атмосферного воздуха).

Количественный спектральный анализ

Методы количественного определения с помощью квазилинейчатых спектров первоначально были разработаны и внедрены в широкую практику при определении БП.

При анализе выбирают одну или, реже, две аналитические линии определяемого вещества, и количество его в пробе находят по измерениям относительной интенсивности этой линии (или этих линий). Методы количественного определения строятся либо на принципе внутреннего стандарта, либо на принципе добавок.

В случае определения по принципу внутреннего стандарта в анализируемую фракцию вводят определенное, заранее известное количество другого вещества – внутреннего стандарта. Это вещество выбирается таким образом, чтобы в его квазилинейчатом спектре можно было выбрать аналитическую линию, удобно расположенную по отношению к аналитическим линиям определяемого вещества. Аналитическая линия внутреннего стандарта должна быть расположена по возможности ближе к аналитическим линиям определяемого вещества и в то же время наложение аналитических линий этих веществ должно быть минимальным. Кроме того, в области аналитической линии спектра внутреннего стандарта должны отсутствовать линии спектра определяемого вещества и наоборот. По измеренному соотношению интенсивности (высот пиков на фотоэлектрической записи) аналитических линий определяемого вещества и вещества – внутреннего стандарта находят количество искомого соединения.

Общий вид расчетной формулы при пользовании методом внутреннего стандарта следующий:

$$S_{on} = A \cdot \frac{I}{e} \cdot S_{вс} \qquad (I)$$

где S_{on} – количество определяемого вещества во фракции (в мкг),

$S_{вс}$ – количество добавленного вещества – внутреннего стандарта (в мкг),

$\frac{I}{e}$ – соотношение интенсивностей аналитических линий искомого вещества и вещества – внутреннего стандарта (определяется из фотоэлектрической записи спектра анализируемой фракции после добавки в нее внутреннего стандарта),

A – коэффициент, выражающий соотношение интенсивностей аналитических линий при одинаковой концентрации определяемого вещества и внутреннего стандарта.

Коэффициент А определяется заранее, путем проведения серии анализов проб, в которых присутствуют известные количества как вещества-внутреннего стандарта, так и определяемого соединения. Тогда по найденному из записи спектра пробы отношению $\frac{I}{e}$ и известным величинам S_{on} и $S_{вс}$ (из формуля /I/) легко определить коэффициент А. Серию таких анализов (при различных отношениях $\frac{S_{on}}{S_{вс}}$) производят для того, чтобы, во-первых, выяснить, в каких пределах может варьироваться соотношение $\frac{I}{e}$ без снижения точности анализа, во-вторых, произвести достаточно точное определение коэффициента А (иметь достаточное усреднение).

Усреднение экспериментально полученных значений коэффициентов А можно произвести двумя способами:

I) арифметическим усреднением величин, аналитически полученных по формуле (I);

2) графическим путем (величина А определяется углом наклона прямой, получаемой при нанесении на график по горизонтальной оси найденных из записей спектров отношений $\frac{L}{e}$, а по вертикальной оси – соответствующих им отношений $\frac{S_{on}}{S_{ec}}$).

Следует иметь в виду, что определение значения коэффициента А арифметическим усреднением иногда приводит к снижению точности анализа. В этом авторы методики убедились на примере анализа БП. Дело здесь в следующем.

Формула (I), выведенная, исходя из предположения о прямой пропорциональности между интенсивностью флуоресценции и концентрацией излучающего вещества для каждого из присутствующих в фракции соединений, представляет собой уравнение прямой, проходящей через начало координат. Если при экспериментальном изучении зависимости $\frac{S_{on}}{S_{ec}}$ от $\frac{L}{e}$ получается такая прямая (проходящая через начало координат), то при всех значениях соотношения $\frac{S_{on}}{S_{ec}}$ формула (I) должна давать одну и ту же величину коэффициента А.

Для пары веществ БП–БПЛ, используемой в качестве внутреннего стандарта при определении БП, многократно производили анализы проб с известными количествами БП и БПЛ. Отношение в этих случаях $\frac{S_{on}}{S_{ec}}$ менялось примерно в 20 раз. Значение коэффициента А определяли арифметическим усреднением и пользовались затем формулой (I). Специальные проверочные опыты показали, что при таких условиях точность анализа составляет ± 8%. Для тех же серий опытов были построены графики зависимости $\frac{S_{on}}{S_{ec}}$ от $\frac{L}{e}$. Все они дали, в большом интервале значений отношения $\frac{S_{on}}{S_{ec}}$, очень хорошие прямые, однако проходящие не через начало координат, а несколько выше его. Оказалось, следовательно, что действительная зависимость $\frac{S_{on}}{S_{ec}}$ от $\frac{L}{e}$ выражается уравнением прямой, не проходящей через начало координат. При таких условиях пользование формулой (I) и коэффициентом А, вычисляемым арифметически, дает точные результаты только в некоторой узкой области величин $\frac{L}{e}$.

Учитывая изложенное, в дальнейшем пришлось отказаться от пользования формулой (I) и арифметического коэффициента А при определении БП. В настоящее время используется градуировочный график, на котором нанесено по оси ординат отношение $\frac{S_{оп}}{S_{вс}}$ для БП и БПЛ, а по оси абсцисс соответствующие им значения $\frac{L}{e}$. Градуировочный график строится по серии анализов проб, содержащих известные количества БП и БПЛ при различных соотношениях концентраций этих веществ. Соответствующее соотношение выражается прямой, проходящей выше начала координат. При проведении анализа фракций с неизвестным содержанием БП из записи спектра находят отношение $\frac{L}{e}$, по градуировочной прямой определяют отношение $\frac{S_{оп}}{S_{вс}}$; умножение этого отношения на количество добавленного внутреннего стандарта дает количество искомого вещества. Специальные проверочные опыты показали, что при таком способе расчета содержания БП точность анализа повышается до ± 3-4%.

Случаи, когда градуировочная прямая не проходит через начало координат, как показали опыты с другими парами веществ, по-видимому, встречаются редко. Описанное явление характерно только для тех пар соединений, в которых присутствует БП. В тех же случаях, когда градуировочная прямая проходит через начало координат, можно пользоваться формулой (I).

При использовании метода добавок количество определяемого вещества находят, исходя из изменений интенсивности аналитических линий, возникающих в результате добавления в пробу известных количеств искомого вещества (дополнительно к уже содержащемуся неизвестному количеству этого соединения). Следует, однако, отметить, что в практике метод добавок применяют обычно в комбинации с принципом внутреннего стандарта.

В практике можно использовать как принцип внутреннего стандарта, так и комбинацию его с принципом добавок. При этом принцип добавок авторы используют в модификации, несколько отличающейся от первоначально описанной и применяемой в дру-

гих работах. В работе Мюэля и Лакруа (B.Muel, G.Lacroix 1960), в которой впервые было описано применение принципа добавок для определения БП, анализируемую пробу делили на четыре части. В три из них добавляют определенные (в каждую последующую больше, чем в предыдущую) количества БП. Затем в идентичных условиях записывали спектры всех 4 частей пробы. Из каждой записи определяли интенсивность аналитической линии БП, строили график зависимости ее от количества добавленного вещества и из полученного построения графически находили неизвестное количество искомого вещества. Авторы настоящей методики лишь один раз добавляют в аналитическую пробу известное количество определяемого вещества и затем аналитически определяют его искомое количество, присутствующее в пробе. Общий вид формулы для этого случая может быть представлен следующим образом:

$$S_{on} = \frac{\left(\frac{e}{L}\right)_0}{\left(\frac{e}{L}\right)_1 - \left(\frac{e}{L}\right)_0} = S_{доб} \qquad (2),$$

где S_{on} – искомое количество определяемого вещества (мкг),

$S_{доб}$ – добавленное количество этого вещества (мкг),

$\left(\frac{e}{L}\right)_0$ – соотношение интенсивностей аналитических линий определяемого вещества (e) и внутреннего стандарта (L) до добавки.

$\left(\frac{e}{L}\right)_1$ – соотношение интенсивностей аналитических линий после добавки определяемого вещества.

Во всех случаях, как при пользовании принципом внутреннего стандарта, так и при использовании его вместе с принципом добавок, очень важно соблюдать строго постоянную систему определения относительной интенсивности аналитических линий. Отклонения от постоянства в способе определения интенсивностей линий приводят к увеличению погрешностей анализа.

При выборе способа определения интенсивности линий авторы всегда используют принцип линии основания. На практике этот принцип может применяться во многих вариантах.

Ниже приведены практические приемы определения отдельных соединений.

Пирен. - Это единственное соединение, при количественном определении которого используют не головные линии его спектра. Количественное определение пирена производят по квазилинейчатому спектру его в н-гексане. Определение производится методом внутреннего стандарта. Для анализа пирена используют участок его спектра 3810-3900 А, в середине которого в области 3850 Å, имеется довольно глубокий провал. В качестве внутреннего стандарта использовали 8-метил-БА, имеющий резкую линию 3854 Å, расположенную в области провала в спектре пирена. В качестве аналитических выбраны линия пирена 3832 А и линия 3854 Å 8-метил-БА. Вычисление количества пирена в фракции производится по формуле (I)[x]

Бенз(а)антрацен. Количество этого вещества определяют методом внутреннего стандарта по квазилинейчатому спектру в н-гексане. В качестве внутреннего стандарта применяется бенз(е) пирен. Аналитические линии: 3841 Å БА и 3878 Å бенз(е) пирена. Расчетная формула (I).

Бенз(е)пирен. Если это вещество удается выделить в виде отдельной фракции, то количественное определение его производится по спектру в н-гексане методом внутреннего стандарта, при использовании БА в качестве внутреннего стандарта. Аналитические линии: 3841 Å БА и 3878 Å бенз(е) пирена. Расчетная формула (I).

Бенз(е)пирен и бенз(б)флуорантен. Эти соединения обычно присутствуют в одной фракции. В таком случае их количество определяется по одной фотоэлектрической записи спектра пробы в н-гексане. В качестве внутреннего стандарта при опреде-

x) Численное значение коэффициента А как в случае пирена, так и для других веществ не приводится, так как оно очень сильно зависит от параметров спектральной установки и должно определяться для каждой установки на месте.

ление бенз(к)флуорантена производится только с помощью принципа внутреннего стандарта, а при определении бенз(е)пирена используется также принцип добавок. Аналитическими линиями служат линия 3878 Å бенз(е)пирена и линия 3956 Å бенз(б)флуорантена.

Порядок количественного определения этих веществ следующий. Производится запись спектра фракции в н-гексане в области 3800-4000 Å (таким образом, чтобы были записаны головные группы обоих соединений). По этой записи вычисляется соотношение интенсивностей аналитических линий этих соединений ($\frac{L}{l}$)$_0$. Затем в фракцию добавляется определенное количество бенз(е)пирена и снова производится запись спектра. По этой записи также вычисляют соотношение интенсивностей аналитических линий ($\frac{L}{l}$). Этих двух отношений интенсивностей достаточно для определения количеств обоих соединений. Количество бенз(е)пирена находят по формуле (2), а количество бенз(б) флуорантена по следующей формуле:

$$S_{оп} = A \times \frac{\left(\frac{L}{l}\right)_0 \times \left(\frac{L}{l}\right)_1}{\left(\frac{L}{l}\right)_0 - \left(\frac{L}{l}\right)_1} \times S_{доб} \qquad (3)$$

где $S_{оп}$ – искомое количество бенз(б)флуорантена в фракции (в мкг).

$S_{доб}$ – добавленное количество бенз(е)пирена (в мкг).

$\left(\frac{L}{l}\right)_0$ – соотношение интенсивностей аналитических линий бенз(б)флуорантена и бенз(е)пирена в исходной фракции (до добавления бенз(е)пирена).

$\left(\frac{L}{l}\right)_1$ – то же соотношение, вычисленное после добавления бенз(е)пирена.

A – постоянный коэффициент, характеризующий соотношение аналитических линий

бенз(б)флуорантена и бенз(е)пирена при одинаковых их концентрациях.

Бенз(а)антрацен, бенз(е)пирен и бенз(б)флуорантен. В некоторых случаях в одной фракции оказываются все 3 названных соединения. Это не препятствует количественному определению каждого из них. При этом часто анализ может быть произведен по общей записи спектров в н-гексане всех трех соединений. Бенз(а)-антрацен и бенз(б)флуорантен определяются методом внутреннего стандарта по формуле (3) при использовании в качестве внутреннего стандарта бенз(е)пирена. Бенз(е)пирен определяется методом добавок по формуле (2), причем в качестве внутреннего стандарта для него может служить как БА, так и бенз(б)флуорантен.

Бенз(а)пирен. Количественное определение этого соединения, так же как бенз(к)флуорантена и БП производят по квазилинейчатым спектрам в н-октане. Причина применения в этих случаях н-октана связана с тем, что квазилинейчатые спектры БП и бенз(к)-флуорантена в этом растворителе имеют очень резкие и интенсивные головные линии, благодаря чему существенно упрощается анализ и повышается его чувствительность.

В бензпиреновой фракции часто присутствуют также бенз(е)-пирен и бенз(б)флуорантен, а иногда и БА. Количественное определение этих соединений производится в таком случае в н-гексане по методике, описанной выше, после чего фракцию переводят в н/октан. В качестве внутреннего стандарта при определении БП используют БПЛ. Аналитическими линиями служат линии 4030 Å и 4085 Å БП и линия 4060 Å БПЛ. Расчет количества БП производится с помощью градуировочной прямой (см.выше).

Бенз(*g,h,i*)перилен. Определение этого соединения производится также методом внутреннего стандарта (БП). Аналитические линии те же, что и в случае анализа БП. Расчет количества производится с помощью той же градуировочной прямой.

Бенз(к)флуорантен. В случае, если это вещество выделяется в виде отдельной фракции, то его количество легко определяется при использовании в качестве внутреннего стандарта БПЛ. Аналитические линии: 4034 Å бенз(к)флуорантена и 4060 Å БПЛ. Расчетная формула (I).

Бенз(а)пирен и бенз(к)флуорантен. Эти 2 соединения могут оказаться в одной фракции вместе с бенз(б)флуорантеном и бенз(е)-пиреном. В таком случае бенз(е)пирен и бенз(к) флуорантен, как уже было указано, определяются по спектру фракции в н-гексане, БП и бенз(к)флуорантен - по спектру в н-октане. Сложность совместного определения этих двух соединений вытекает из того, что очень сильные головные линии их спектров, которые удобно применять в качестве аналитических, очень близки по длине волны (4030 Å и 4034 Å) и поэтому на записи спектра фракции они налагаются друг на друга. Несмотря на это, авторы иногда используют их в качестве аналитических и производят одновременное количественное определение обоих соединений методом внутреннего стандарта. (БПЛ - -аналитическая линия 4060 Å). Расчет количества производится по градуировочной кривой. При этом, как показали оценочные опыты, за счет частичного наложения аналитических линий погрешность определений может достигать ± I0-I5%. Другой прием совместного определения этих веществ связан с использованием в качестве аналитических линий пространственно очень хорошо разделенных, но значительно более слабых линий: 4085 Å БП и 4126 Å бенз(к)флуорантена. В этом случае производится добавка одного из этих веществ (в зависимости от соотношения интенсивностей аналитических линий). Определение производится аналогично методике, описанной для случая совместного определения бенз(е)пирена и бенз(б)флуорантена. В этом случае чувствительность, а также точность анализа существенно снижается в связи с тем, что в качестве аналитических взяты не самые сильные линии спектров определяемых веществ.

Учитывая эти обстоятельства, целесообразно добиваться полного разделения при хроматографии БП и бенз(к)флуорантена.

Дибенз(а, *h*)антрацен. Определение производится методом внутреннего стандарта в н-гексане. Внутренним стандартом служит бенз(е)пирен. Аналитические линии: 3931 Å ДБА и 3878 Å бенз(е)-пирена. Расчет производится по формуле (I).

Дибенз(а,е)пирен. Определение производится методом внутреннего стандарта (бенз(е)пирен). Аналитические линии: 3951 Å бенз(а,е)пирена и 3878 Å бенз(е) пирена. Расчет производится по формуле (I).

Изложенные выше принципы могут быть применены для количественного определения и других ПАУ.

Количественное определение бенз(а)пирена (БП) и пятнадцати других полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) по квазилинейчатым спектрам люминесценции комбинированным методом добавок и внутреннего стандарта.

Разработана методика количественного определения шестнадцати ПАУ с использованием квазилинейчатых спектров люминесценции.

Названия исследованных ПАУ в старой и новой номенклатуре, а также принятые в нашей работе условные обозначения представлены в таблице I.

Известно, что метод внутреннего стандарта требует получения индивидуальных фракций исследуемого вещества и что наименьшие требования к чистоте исследуемых фракций предъявляются при использовании метода добавок. Именно этот принцип был положен в основу всех разработанных нами методик определения ПАУ. Однако, применение метода добавок с предварительной установкой по фону ограничено требованием линейного фона люминесценции примесей в области аналитической линии, обладающего интенсивностью, сравнимой с интенсивностью аналитической линии. Избежать этого ограничения можно введением внутреннего стандарта в равных концентрациях во все растворы серии, приготовленной для анализа методом добавок. При этом предварительная установка прибора производится по аналитической линии вещества-стандарта.

Этот комбинированный метод добавок и внутреннего стандарта был положен в основу методик количественного определения.

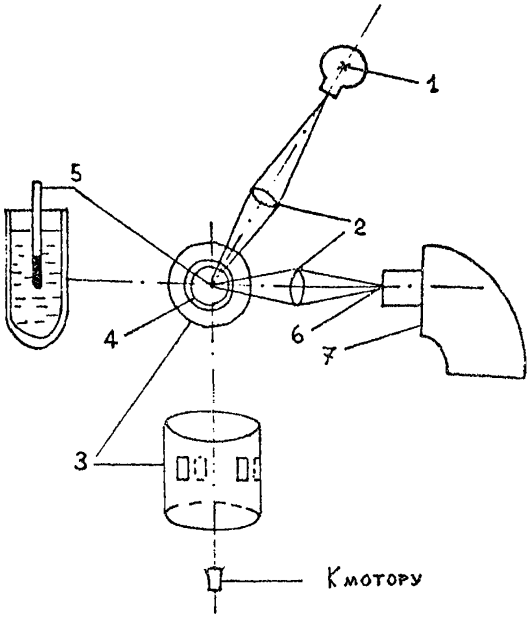


Рис.I. Схема установки для получения квазилинейчатых спектров флуоресценции и фосфоресценции.

I. Источник возбуждающего света – лампа ДСКЖ-I000 или ДРШ-500 со светофильтром УФС-2.

2. Кварцевые конденсоры, фокусирующие возбуждающий свет на пробирке с раствором и свет люминесценции – на входной щели спектрометра.

3. Фосфороскоп (для получения спектров фосфоресценции).

4. Кварцевый прозрачный сосуд Дьюара с жидким азотом.

5. Пробирка с исследуемым раствором.
6. Входная щель спектрометра.
7. Спектрометр с фотоэлектрической регистрацией спектра.

БП; Б(е)П (по спектру флуоресценции), пирена; БПЛ; ДБА и ДМБА, которые были разработаны совместно с Г.Е.Федосеевой (Федосеева Г.Е., Хасина А.Я., 1968). Методики определения остальных ПАУ, перечисленных в таблице I, разработаны совместно с Т.Л.Гаевой и применены к исследованию ПАУ в многокомпонентном смешанном растворе.

Возбуждение люминесценции на различных установках осуществлялось либо светом ртутно-кварцевой лампы сверхвысокого давления (ДРШ - 500), либо светом ксеноновой лампы ДКСШ - - I000, имеющей в области до 400 нм непрерывный спектр испускания.

Оба источника применяли в сочетании со светофильтром УФС - 2, пропускающим свет в области от 240 - 250 нм до 370-400 нм в зависимости от толщины стекла.

Для фотоэлектрической регистрации применяли:

а) Дифракционный спектрометр ДФС - I2 фирмы ЛОМО (Ленинград) с высокой светосилой и разрешающей способностью. Осветительная система прибора была изменена. На рельс для осветителя устанавливали в специальном держателе кварцевый сосуд Дьюара, в котором укрепляли кварцевую пробирку с исследуемым раствором. Под углом 60° к рельсу прибора укрепляли дополнительный рельс, на котором устанавливали сменный (ДРШ - 500 или ДКСШ - I000) источник света (I) со светофильтром УФС - 2 и кварцевый конденсор (2) с фокусным расстоянием = 75 мм, фокусировавший свет от источника на пробирке с раствором. Оптическая схема представлена на рис. I.

б) Экспериментальная установка, собранная на базе монохроматора, изготовленного СКБ АМН СССР с дифракционной решеткой I200 штрихов/мм. Сигнал поступал на фотоумножитель

ФЭУ-17А, усиливался усилителем РЛУ и регистрировался на самопишущем потенциометре ПСР - 1, питание ФЭУ - 17А осуществлялось от высоковольтного стабилизатора ВС - 22.

Механическая часть установки позволяла записывать спектры с большой скоростью в двух направлениях. Наблюдалась хорошая воспроизводимость спектрограмм. Система освещения использовалась та же, что и на ДФС - 12. Возбуждение люминесценции осуществлялось ксеноновой лампой ДКСШ - 1000 со светофильтром УФС - 2.

Для получения спектров фосфоресценции был сконструирован фосфороскоп (рис.1), представляющий собой вращающийся цилиндр с окнами, ось вращения которого совпадала с пробиркой с исследуемым раствором. Скорость вращения мотора 1000об/мин. Для возбуждения фосфоресценции также использовали фильтрованный свет лампы ДКСШ - 1000, фосфороскоп полностью исключал попадание на щель монохроматора как света флуоресценции образца, так и рассеянного света лампы.

Установка представляла большие удобства для исследования индивидуальных растворов и чистых фракций в связи с хорошей светосилой, высокой скоростью регистрации спектров и хорошей воспроизводимостью при повторных записях спектрограмм в разных направлениях.

в) Спектрограф ИСП - 51 с фотоэлектрической приставкой ФЭП - 1 /Использовался, в основном, при определении БП/.

Исследование смешанных растворов и сложных фракций мы производили на спектрометре ДФС-12 с высокой разрешающей способностью, позволяющем разделять квазилинии, различающиеся на несколько ангстрем.

По спектру (фотографии и спектрограмме) выбирали в качестве аналитической одну из наиболее интенсивных квазилиний. При этом выбирали такие линии, чтобы их длина волны не совпадала с длиной волны аналитической линии другого соединения. Например, для антрацена аналитической могла быть выбрана линия λ = 402,7 нм, но в связи с близостью ее к

линии БП λ = 403,0 нм была выбрана линия 386,7 нм, имеющаяся только в спектре антрацена. Длины волн аналитических линий приведены в таблице 2.

Растворитель выбирали из малолетучих н-парафиновых углеводородов (н-гептан, н-октан, н-нонан и др.), с тем, чтобы концентрации растворов не изменялись в процессе проведения количественного анализа. Из перечисленных н-парафинов использовали тот, в котором ПАУ имел наиболее резкий квазилинейчатый спектр, состоящий из одиночных квази-линий. Для всех исследованных нами ПАУ оптимальным растворителем оказался н-гептан (при анализе антрацена, фенантрена, хризена, флуорантана, трифенилена) или н-октан (при анализе остальных ПАУ).

Вещество-стандарт выбирали путем сопоставления спектрограмм различных соединений.

При выборе вещества "стандарта" к нему предъявляли ряд требований. Стандарт должен иметь квазилинейчатый спектр в том же растворителе, что и исследуемый углеводород и при тех же условиях возбуждения. В спектре стандарта должна существовать одиночная интенсивная линия, отчетливо выступающая над фоном люминесценции исследуемого раствора, которую можно использовать в качестве аналитической. Вещество-стандарт указано в таблице 2.

Таблица I

Наименование ряда полициклических ароматических углеводородов по старой и новой номенклатуре.

№№ пп	Наименование по старой номенклатуре	Наименование по новой номенклатуре	Условные обозначения
I	2	3	4
I.	Антрацен	Антрацен	А
2.	Фенантрен	Фенантрен	Фн
3.	Флуорантен	Флуорантен	Фл
4.	Хризен	Хризен	Х
5.	Трифенилен	Трифенилен	ТФЛ
6.	Пирен	Пирен	П
7.	I,2 бензантрацен	бенз(а)антрацен	БА
8.	9,I0-диметил I,2 бензантрацен	7,I2-диметил бенз(а)антрацен	ДМБА
9.	3,4 бензпирен	бенз(а)пирен	БП
I0.	I,2 бензпирен	бенз(е)пирен	Б(е)П
II.	Перилен	Перилен	ПЛ
I2.	I,2,5,6-дибенз-антрацен	дибенз(а, *h*) антрацен	ДБА
I3.	I,2,3,4-дибенз антрацен	дибенз (а,с) антрацен	ДБ(а,с)А
I4.	I,I2 бензперилен перилен	бенз (*g,h,i*) перилен	БПЛ
I5.	3,4,9,I0 дибенз-пирен	бенз (*r,s,t*) пентафен	ДБП
I6.	Коронен	Коронен	К

Условия количественного анализа смеси ПАУ

№№ пп	Исследуемое вещество	Длины волн, нм аналитической линии	Длины волн, нм линии стандарта	Вещество стандарт	Концентрация стандарта при концентрации вещества $I.IO^{-6}$ г/мл	Условия измерения интенсивности аналитической линии при анализе многокомпонентных растворов.
I	2	3		4	5	6
I	А	386,7	4I9,5	БПЛ	$I.IO^{-6}$	Не определяется в смеси безв выделения антраценовой фракции
2	ФН	46I,6 (ФОСФ)	537,0 (ФОСФ)	Б(е)П	$I.IO^{-6}$	Не определяется в смеси без хроматографического отделения ачтраценфенантреновой фракции
3	ФЛ	534,0 (ФОСФ)	537,0 (ФОСФ)	Б(е)П	$I.IO^{-6}$	Интенсивность измеряется над фоном со стороны длинных волн,а интенсивность линии стандарта со стороны коротких волн
4	Х	498,6 (ФОСФ)	537,0 (ФОСФ)	Б(е)П	$I.IO^{-6}$	Интенсивность измеряется над линией основания
5	ТФЛ	46I,8	537,0	Б(е)П	$3.IO^{-6}$	Б(е)П дополнительно вводится в смесь в концентрации в два раза выше, чем концентрация определяемого вещества. Измерение интенсивности

1	2	3	4	5	6
					ТФЛ со стороны длинных волн, а Б(е)П со стороны коротких.
6	П	382,4	419,5	БПЛ	1.10^{-6} Интенсивность измеряется над фоном со стороны коротких волн, так как длинноволновое крыло может искажаться БА
7	БА	384,6	419,5	БПЛ	1.10^{-6} Интенсивность измеряется над фоном со стороны длинных волн, так как коротковолновое крыло искажено спектром пирена
8	ДМБА	397,6	419,5	БПЛ	1.10^{-6} Интенсивность измеряется над фоном со стороны коротких длин волн.
9	БП	483,0	419,5	БПЛ	1.10^{-5} Интенсивность измеряется над линией основания
10.	Б(е)П	537,0 (ФОСФ)	461,8 (ФОСФ)	ТФЛ	2,5.10 Интенсивность измеряется над линией основания
11.	ПЛ	451,1	419,5	БПЛ	1.10^{-6} Интенсивность измеряется над линией основания
12.	ДБА	394,1	419,5	БПЛ	1.10^{-6} Интенсивность измеряется над фоном со стороны длинных волн, так как коротковолновое крыло искажено спектром пирена
13	ДБ(a,c)А	366,2	419,5	БПЛ	1.10^{-6} Интенсивность измеряется над линией основания

1	2	3	4	5	6
14	БШ	419,5	408,5	БП	1.10^{-6}	Интенсивность измеряется над линией основания
15	ДБП	431,7	419,5	БШ	1.10^{-6}	Интенсивность измеряется над линией основания
16	К	443,8-444,6	419,5	БШ	1.10^{-6}	Интенсивность измеряется над линией основания дублета по коротковолновой компоненте

При используемых в опыте концентрациях стандарта его спектр не должен искажать спектр определяемого углеводорода в области аналитической линии.

Концентрация эталонного раствора стандарта, указанная в табл.2 при условии концентрации определяемого ПАУ 1.10^{-6} г/мл подбиралась таким образом, чтобы интенсивность аналитической линии стандарта была близка к интенсивности аналитической линии исследуемого соединения в растворе с большой добавкой.

Методика эксперимента была единой при количественном определении всех ПАУ.

Кварцевую пробирку с раствором исследуемого углеводорода помещали в кварцевый сосуд Дьюара, наполненный азотом, и закрепляли в держателе в стандартном положении. Световой сигнал от пробирки с раствором фокусировали на щели спектрометра кварцевым конденсором.

Для выполнения анализа составляли серию из трех растворов, содержащих по I мл исследуемого раствора или экстракта, по I мл эталонного раствора определяемого соединения в концентрации 0 ; 0,5а и I,0а, где концентрация раствора-добавки выбиралась равной ожидаемой концентрации исследуемого раствора. Ориентировочное определение концентрации исследуемого раствора производили путем предварительной записи спектра в области аналитической линии и сравнения со спектрами эталонных растворов различных концентраций при одинаковых условиях эксперимента.

В каждый из трех растворов добавляли по I мл эталонного раствора вещества-стандарта в концентрации "в", где "в" выбирали в соответствии с требованиями к веществу - стандарту.

Перед началом фотоэлектрической записи спектров всех растворов серии, составленной для проведения одного анализа, после того, как раствор окончательно заморожен, показание пера самописца выводилось по перу (длина волны аналитической линии стандарта) в стандратное положение при одинаковом тем-

новом токе. Выполнение этого условия может быть заменено произвольной записью спектров всех растворов серии, но при этом вместе абсолютной интенсивности аналитической линии в максимуме, измеренной над фоном по спектрограмме, следует брать отношение интенсивностей аналитических линий определяемого вещества к стандарта.

Запись начинают со спектра раствора с большой добавкой, подбирая усиление и ширину входной и выходной щели так, чтобы сигнал при длине волны аналитических линий вещества и стандарта достигал 70-80 деления шкалы. Спектры остальных растворов серии записываются при тех же экспериментальных условиях.

Некоторая возможная невоспроизводимость условий эксперимента компенсируется использованием при расчете относительной интенсивности аналитической линии (по отношению к линии стандарта).

Определение неизвестной концентрации исследуемого соединения в анализируемом растворе или экстрате производили по графику.

По оси абсцисс откладывали в определенном масштабе концентрацию добавляемого эталонного раствора определяемого соединения (0;0,5 а и I,0а). По оси ординат откладывали отношение интенсивностей в максимумах аналитических линий определяемого вещества и стандарта.

По трем полученным экспериментальным точкам строили график абсцисса точки пересечения которого с осью X давала в выбранном масштабе концентрацию исследуемого соединения в растворе или экстракте. При существовании линейной зависимости интенсивности аналитической линии вещества, от его концентрации в растворе все три экспериментальные точки должны лежать на одной прямой (график-прямая линия).

Для иллюстрации в табл.3 приведен пример составления серии растворов при определении ДМБА.

Таблица 3

Схема составления серии растворов для определения ДМБА

№ пробирки (добавка 0.10^{-6} г	Исследуемый раствор (мл)	I,I2 БП в концентрации $I.10^{-6}$ г/мл (мл)	'Эталонный' раствор ДМБА в концентрации $I.10^{-6}$ г//мл (мл)	н-октан (мл)
I (добавка) 0.10^{-6} г	I	I	-	I
2 (добавка) $0,5.10^{-6}$ г	I	I	0,5	0,5
3 (добавка) $I.10^{-6}$ г	I	I	I,0	-

Спектрограммы I,2 и 3 растворов при анализе эталонного раствора $C=I.10^{-6}$ г/мл и график для определения искомой концентрации представлены на рис.2.

ДМБА - соединение, не обнаруженное до настоящего времени в загрязнениях окружающей человека среды, однако оно представляет исключительный интерес в силу своей высокой бластомогенной активности при изучении в модельных опытах некоторых вопросов этиологии и патогенеза злокачественных новообразований. В связи с этим приходится ставить большие серии опытов с ДМБА (например, опыты с клетками в монослойных куль-

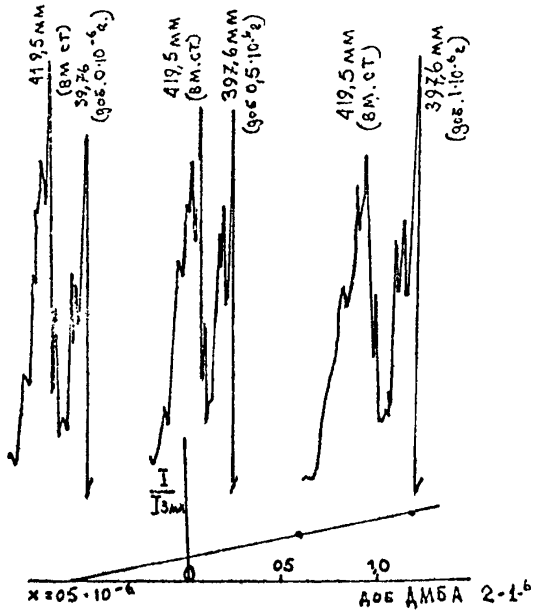


Рис.2. Спектрограммы и график при анализе эталонного растворителя ДМБ с концентрацией $C=0,5.10^{-6}$ г//мл.
397,6 нм – аналитическая линия ДМБА
419,5 нм – аналитическая линия стандарта – I,I2 БПЛ.
(Установка с дифракционной решеткой I200 гутр/мм).

турах), в результате которых мы имеем различные концентрации ДМБА в экстратах в контроле и в опыте.

В этих случаях целесообразно для снижения случайной погрешности, связанной с разведением растворов для одного анализа, делать одновременное разведение для всей серии экстрактов. Каждая из пробирок (для I анализа) содержит при этом 1мл исследуемого экстракта и 2 мл раствора соответственно с добавкой 0;0,5 и $I(x)10^{-7}$ или $x\ 10^{-6}$ г - в зависимости от концентрации ДМБА в контроле). При этом растворы с добавками 0;0,5 и $I.10^{-6}$ г (в расчете на 50 анализов) приготовляют по следующей схеме:

Таблица 4

	Эталонный раствор ДМБА $c=I.10^{-5}$ г/мл (мл)	Эталонный раствор БП $c=I.10^{-5}$ г/мл (мл)	н-октан (мл)
Раствор с добавкой 0.10^{-6}	-	5	95
Раствор с добавкой $0,5.10^{-6}$	2,5	5	92,5
Раствор с добавкой $I.10^{-6}$	5	5	90

При использовании одного раствора с готовыми добавками при анализе большой серии контрольных и опытных экстрактов значительно снижается случайная погрешность и ее роль при оценке различий в контроле и опыте. Одинаковый тангенс угла наклона полученного графика к оси абсцисс может служить дополнительным критерием правильности каждого анализа.

По аналогичным схемам могут быть составлены серии растворов для проведения одного анализа или большой группы с

одинаковыми добавками при определении других ПАУ с учетом параметров из табл.2. В частности, для БП максимальная добавка не должна превышать 1.10^{-7} г/мл, при этом концентрация раствора стандарта 1.10^{-6} г/мл. Соответственно при приготовлении "готовых добавок" должен быть использован эталонный раствор БП концентрации 1.10^{-6} г/мл.

В связи с тем, что использование метода добавок предполагает линейную зависимость интенсивности аналитической линии (I) от концентрации исследуемого вещества в растворе (с), нами был исследован характер этой зависимости для всех ПАУ (I-I6 табл.I) и выбран участок с линейной зависимостью I аналитической линии от С, в пределах которого возможно применение разработанных методик анализа.

Величина концентрации, начиная с которой нарушается линейный характер зависимости интенсивности аналитической линии от концентрации, различна для исследованных ПАУ, однако опыт показал, что при концентрациях ниже 1.10^{-6} г/мл для выбранных нами аналитических линий такая линейность сохраняется. Исключение составляет БП, для которого эта зависимость для линии 4030 Å линейна при концентрациях не выше 1.10^{-7} г/мл. Параметры, приведечные в таблице 2 для каждого ПАУ, позволяют определять их в растворах с коэффицентом вариации не выше ±I0% /получено при десятикратных измерениях/. Спектрограммы растворов /в записи на установке с монохроматором решетка I200 штр/мл/ приведены на рис.3 и 4.

Количественное определение БП методом добавок с установкой прибора по фону, созданному люминисцирующими примесями, присутствующими в исследуемом экстракте

При определении БП в тех случаях, когда примеси создают линейный фон в области линии 4030 Å, сравнимый по интенсивности с аналитической линией БП, для анализа может быть использован метод добавок с предварительной установкой прибора по фону. Ниже приведен вариант такой методики, разработанный на-

ми на основе метода Мюэлл и Лакруа.

В три пробирки наливают по I мл анализируемой бензпиреновой фракции, растворенной в н-октане. Затем в первую пробирку доливают 2 мл чистого н-октана. Во вторую пробирку добавляют I,5 мл- н-октана и 0,5 мл эталонного раствора БП в концентрации $I.IO^{-7}$ г/мл (можно также $I.IO^{-8}$ г/мл или $I.IO^{-9}$ г/мл - в зависимости от ожидаемой концентрации исследуемого раствора). В третью пробирку доливают I мл н-октана и I мл эталонного раствора той же концентрации, что и во вторую.

Заморозив третью пробирку, помещают ее в сосуд Дьюара перед входной щелью спектрометра, выводят прибор на аналитическую линию БП-4030 А и регулировкой усиления и раскрытием щели добиваются отклонения пера самописца до 50-80 деления шкалы, после чего записывают спектрограмму аналитической линии в области 4040-4015°А. При этом отмечают положение пера самописца на длине волны 4015 А, т.е. в области, где люминесценция БП практически равна 0 и фон создают люминесцирующие примеси, находящиеся в экстракте. Запись повторяют дважды, добиваясь хорошей воспроизводимости. Затем последовательно замораживают вторую и третью пробирки и дважды записывают спектр в области аналитической линии.

Практически, однако, невозможно точно воспроизвести условия эксперимента при последовательной записи спектров трех растворов серии. Для компенсации ошибок, связанных с такой невоспроизводимостью, запись спектра второго и первого растворов начинают с установки прибора по фону /на длине волны 4015 А / в то же положение, которое занимало перо самописца при записи спектра раствора с большой добавкой (третьей пробирки). Добиться этого можно незначительными изменениями щели или усиления.

Пример анализа по такой методике приведен на рис.5. Определение концентрации раствора производят по графику, На оси X откладывают величину добавки БП в граммах (в примере на рис.5 - 0г; $0,5.IO^{-8}$; $I.IO^{-8}$ г и $2.IO^{-8}$г, по оси У - вы-

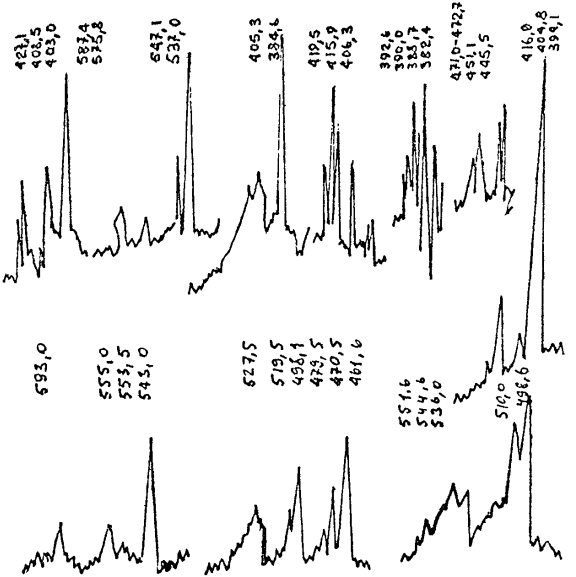


Рис.3. Спектрограммы флуоресценции (фл) и фосфоресценции (фос) ряда ПАУ
а - 3,4 БП (фл); б - 1,2 БП (фос); в - 1,2 БА (фл); г - 1,12 БПЛ (фл); д - пирен (фл); е - ПЛ (фл); ж - 1,2,5,6 ДБА (фл); з - фл (фос); и - фн (фос); к - хризен (фос).

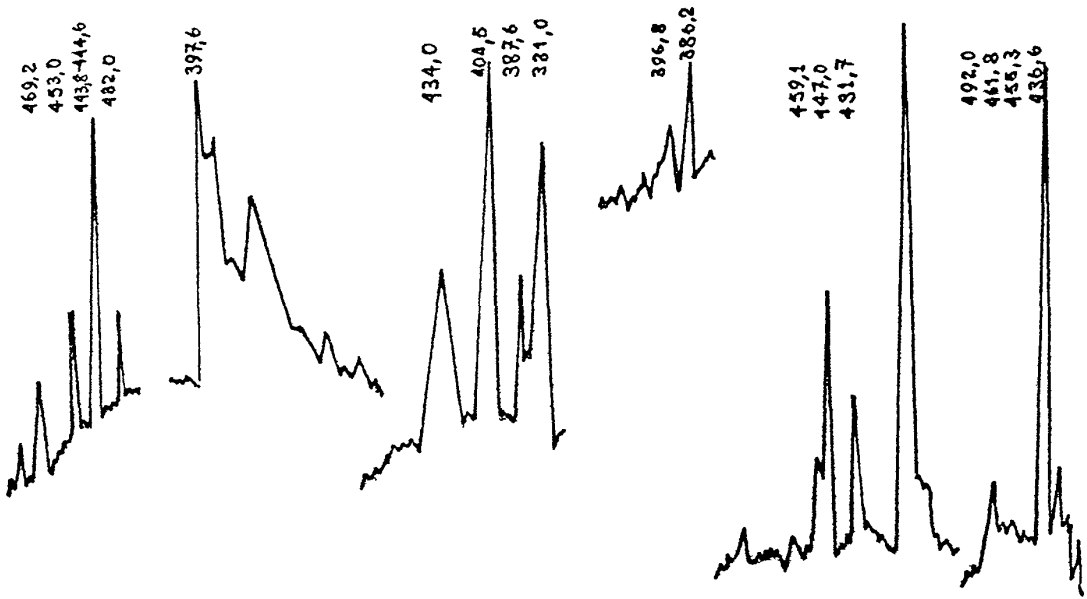


Рис.4. Спектрограммы флуоресценции (фл) и фосфоресценции (фос) ряда ПАУ
л – К (фл) м – ДМБА (фл); н – антрацен (фл); О – I,2, 3,4 -ДБА (фл); п – 3,4,9,I0 – ДБП (фл):р – тфл (фос).

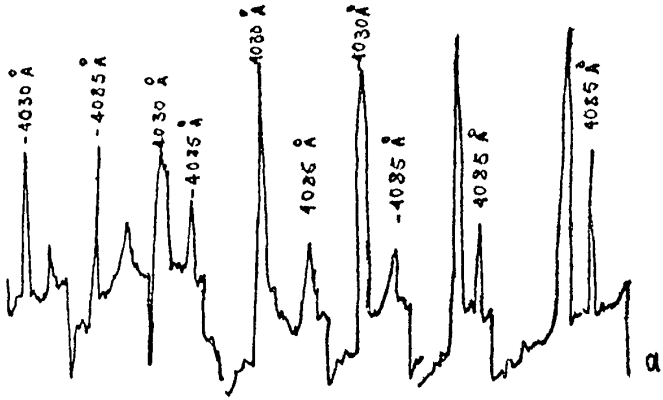
сота над фоном максимума линии БП 4030 Å, измеренная в мм по спектрограмме. Если концентрация исследуемого раствора попадает в область, пригодную для измерений, т.е. интенсивность аналитической линии пропорциональна концентрации, то полученные экспериментальные точки лежат на одной прямой (рис.5). Экстраполяция этой прямой до пересечения с осью X на оси X дает отрезок, соответствующий в выбранном масштабе содержанию БП в растворе с нулевой добавкой, т.е. - в I мл исследуемого экстракта. В приведенном выше примере концентрация БП в экстракте составляла $3,5\ 10^{-9}$ г/мл.

Исследование многокомпонентных смешанных растворов ПАУ

Наибольшую сложность для количественного определения ПАУ представляют экстракты из различных промышленных и природных продуктов и загрязнений окружающей человека среды. Примеси, присутствующие в экстракте наряду с исследуемым соединением, оказывают решающее влияние на результат анализа, а в ряде случаев - на возможность его проведения в характер предварительной обработки экстракта.

Мы уже отмечали, что количественное определение БП в экстракте без предварительной хроматографии возможно лишь при использовании метода добавок или его комбинации с методом внутреннего стандарта и при условии, что аналитическая линия БП отчетливо выступает над фоном, создаваемом люминесценцией примесей.

Однако, даже при этих условиях выборочно для одной-двух проб из серии анализов производится хроматография на колонках или в тонком слое на окиси алюминия и сравниваются результаты анализа без хроматографии и с ее применением. При совпадении результатов для остальных образцов серии анализа производится без предварительного фракционирования.



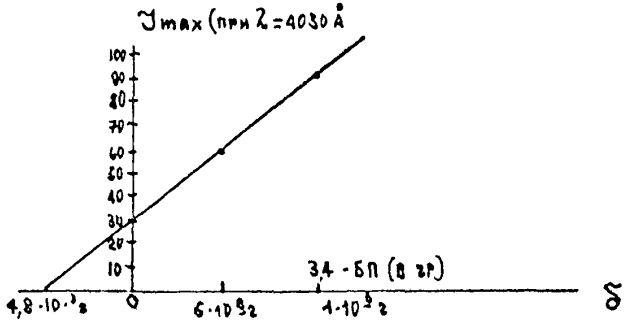


Рис.5. Спектрограммы и график при определении концентрации 3,4 БП в экстракте методом добавок с установкой по фону.

Опыт показывает, что количественное определение в сложном экстракте без предварительной хроматографии возможно в ряде случаев лишь для БП, в связи с его высоким квантовым выходом и избирательным возбуждением группой интенсивных ртутных линий в области λ = 366 нм.

Определение других ПАУ неизбежно связано с предварительным фракционированием.

Количественное определение ряда ПАУ в сложном экстракте.

а) Хроматографическое фракционирование экстракта и проверка баланса при хроматографии.

Возможность применения разработанных методик для количественного определения ряда ПАУ в сложном экстракте была проверена на ряде примеров, в частности, при анализе загрязнений сточных вод одного из промышленных предприятий и загрязнений атмосферного воздуха.

Бензольный экстракт отгоняли под вакуумом на вращающемся пленочном испарителе (роторе) до объема 10 мл, добавляли 10 мл н-октана и отгоняли оставшийся бензол. Таким образом, вся ароматика, содержащаяся в экстракте, была переведена в 10мл н-октана.

Полученный н-октановый экстракт подвергали хроматографическому фракционированию на окиси алюминия. Использовали колонку высотой 200 мм и диаметром 15 мм. Разделение (в течение трех часов) проводили с использованием н-гексана, а затем перегнанного бензола. Одновременно был поставлен контрольный опыт по разделению смешанного раствора чистых веществ.

В колонку заливали 10 мл смешанного н-октанового раствора с концентрацией каждого ПАУ 1×10^{-7} г/мл, таким образом каждое соединение вводилось в количестве 1 мкг. Наблю-

дение за контрольной колонкой под ртутно-кварцевой лампой с фильтром 336 нм показывало, что нормальный гексан не способствует значительному продвижению ПАУ вниз по колонке за три часа хроматографии, однако происходит разделение зон.

В связи с этим гексановая фракция не исследовалась. После начала фракционирования бензолом как в опытных, так и в контрольных колонках отбирались по 15 фракций в пробирки с притертыми пробками. Объем каждой фракции составлял 15 мл.

Для проверки сохранения баланса вещества при хроматографии было определено количество БП, пирена и БПЛ во фракциях, полученных при хроматографии контрольного раствора. Суммарное количество каждого из этих соединений, полученное после хроматографии, составляло 1,04 мкг, 1,05 мкг и 0,99мкг соответственно. Определение проводили по методике, предложенной для смешанных растворов, и показало, что хроматография проходит практически без потерь.

б) Определение ряда ПАУ во фракциях, полученных при хроматографии экстракта

Вначале фракции подвергали качественному спектрально - флуоресцентному анализу, цель которого была в установлении в спектре каждой фракции основных аналитических линий тех ПАУ, линии которых удавалось обнаружить в спектре данной фракции. Для анализа из каждой фракции отбирали 1 мл и добавляли 2 мл нормального октана (или н-гептана - при записи фосфоренции). Исследование спектров показало, что распределение ПАУ по фракциям весьма близко к их распределению по фракциям контрольного смешанного раствора.

Следующим этапом было количественное определение в каждой фракции идентифицированных ПАУ.

В проведенном исследовании экстракта из воды, прежде чем отнонять экстракт и проводить хроматографию, три мил-

лилитра бензольного экстракта были взяты для количественного определения БП без хроматографии. Анализ показал, что количество БП в литре воды составляет 0,52 мкг, что близко совпало с результатом, полученным после фракционирования (0,5 мкг/литр). Это исследование подтвердило возможность получения правильных результатов для БП в отдельных случаях без предварительной хроматографии. Однако определить какие-либо другие ПАУ таким образом не удается - необходимо проведение хотя бы простейшего фракционирования.

Ротапринт Центрального научно-исследовательского института санитарного просвещения. Тираж-2000 экз., объем - 3,25 п.л.
Л- 77804 от 10.06.76 г. Зак.№ 515
Цена 18 коп.

gost.e-ecolog.ru