«УТВЕРЖДАЮ»
Главный государственный санитарный врач РФ
Первый зам.Министра здравоохраненияРФ

Г.Г.Онищенко

«13» 02 2004 г.

МУК 4.1. 1838-04
Дата введения: 1 мая 2004 г.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ИЗМЕРЕНИЮ УРОВНЯ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ НАФТАЛИНА В ОРГАНАХ И ТКАНЯХ ЖИВОТНЫХ МЕТОДОМ ГАЗО-ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

I. Вводная часть

НАЗНАЧЕНИЕ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДИКИ

Настоящие методические указания предназначены для органов и учреждений санитарно-эпидемиологического надзора России, а также ветеринарных, агрохимических, контрольно-токсикологических лабораторий Минсельхозпрома и лабораторий других министерств и ведомств, занимающихся анализом остаточных количеств пестицидов в продуктах питания, кормах и объектах внешней среды.

Настоящие методические указания устанавливают метод газо-жидкостной хроматографии для определения содержания остаточных количеств нафталина в биологических объектах (органах и тканях) овец и крупного рогатого скота после купки их в 2% растворе водной эмульсии бесфенольного креолина.

gost.e-ecolog.ru

КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АНАЛИЗИРУЕМОГО ПРЕПАРАТА

Нафталин был открыт в 1819 году как составная часть каменноугольной смолы. Продуктами переработки каменноугольной смолы являются каменноугольные масла, которые по химическому составу представляют собой сложные смеси органических соединений, в основном ароматического характера. С давних пор (с 1887г) на основе каменноугольных масел готовят акарицидный препарат – бесфенольный креолин, широко используемый в ветеринарной практике. В состав этого препарата входят до 60% масел, до 25% канифольного мыла и вода. Содержание нафталина в бесфенольном креолине составляет 9-12%.

Препарат креолин бесфенольный каменноугольный (регист.номер в списке разрешенных к применению пестицидов № 01-774-0004-1) выпускается на основе действующего вещества масла каменноугольного.Препарат применяется для текущей, заключительной и профилактической дезинфекции, дезодорации и ароматизации объектов животноводства и транспортных средств, используемых для перевозки животных. Агрегатное состояние препарата - однородная, маслообразная жидкость, прозрачная в тонком слое, от темно-коричневого до черно-бурого цвета, с запахом каменноугольного масла.Содержание влаги не более 16%, нафталина не более 12,5%, фенола не более 2-3%, не летуч, 5%-ная водная эмульсия препарата устойчива в течение 48 часов.

Токсиколого-гигиеническая характеристика препарата представлена по материалам ряда отечественных и иностранных литературных источников, (документы ВОЗ, монографии, справочники). Острая пероральная токсичность:

ЛД 50 крысы 6200 мк/кг ЛД 50 мыши 2009 мк/кг

Клинические проявления интоксикации: головокружение, головная боль, тошнота, общая слабость. Оказывает раздражающее действие на верхние дыхательные пути, кожу, слизистые. Острая дермальная токсичность:

ЛД 50 крысы 15520 мг/кг ЛД 50 овцы 9500 мг/кг

ПДК в воздухе рабочей зоны:

Фенола	0,3 мг/м ^{3}
Нафталина	20 мг/м ^{3}
Аценафтена	10 мг/м ^{3}

Креолин бесфенольный каменноугольный обладает широким спектром антимикробной активности (в отношении неспоро-образующих грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов).

При работе с препаратом соблюдать рекомендуемые меры предосторожности в соответствии с «Гигиеническими требованиями к хранению, применению и транспортировке пестицидов и агрохимикатов. Санитарные правила и нормы СаНиН 1.2.1077-01 от 31.10.01»

Производит бесфенольный креолин ОАО завод «Ветеринарные препараты» по ТУ 9392-023-00483079-98.

Нафталин – белое кристаллическое вещество, брутто-формула $C_{10}H_8$, м.м.128. Структурная формула :



Т.плавления - 80,3°С, т. кипения - 218°С, хорошо растворяется в горячем спирте, этиловом эфире, бензоле, хлороформе. Нафталин (раствор в изооктане) поглощает в УФ-области спектра при 220нм, довольно летуч, отгоняется с парами воды, легко окисляется, сублимируется при 50°С/760 мм рт.ст.

Применяется в качестве инсектицида (против моли).

Содержание остаточных количеств нафталина в биологических объектах (органах и тканях) овец и крупного рогатого скота и определяет предлагаемая методика.

II. Методика определения остаточных количеств нафталина в органах животных методом газо-жидкостной хроматографии

ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Принцип метода

Метод основан на извлечении нафталина путем экстракции этиловым эфиром из биологических объектов (печень, почки, селезенка, сердце, легкое, мышечная и жировая ткани и т.п.) животных, очистки экстрактов сублимацией (возгонкой) нафталина из экстрактов с улавливанием нафталина адсорбентами с силикагелем, последующим вымыванием нафталина этиловым эфиром из адсорбентов и измерении сигнала нафталина методом газо-жидкостной хроматографии на неподвижной фазе 5% ХЕ-60 на хроматоне N-AW-DMCS (0,125 – 0,160 мм). Очистка экстрактов пробы обеспечивается методом подготовки пробы и селективной способностью нафталина сублимироваться при пониженной температуре.

Метрологические характеристики метода

Метрологические характеристики газо-хроматографического метода приведены в таблицах 1,2 и 3.

Табл.1.

Характеристики измерений

Определяемое вещество	Наименование объекта	Диапазон определяемых концентраций,нг	Нижний предел обнаружения,мг/кг
нафталин	биологич.органы животных	0.85 – 13,6	0,03

При разработанных условиях мешающих определению нафталина примесей не обнаружено.

Приведенные в настоящих методических указаниях оптимальные аппаратурные параметры и условия проведения измерений относятся к газо-жидкостному хроматографу «Цвет-110». При использовании хроматографов других марок эти параметры должны быть согласованы с требованиями Руководства по эксплуатации фирмы-изготовителя.

Минимально детектируемое количество (чувствительность определения) - 1нг .Линейный диапазон детектирования 0.85 –13.6 нг. Характеристики измерений приведены в табл.1.

Предел обнаружения массовых долей нафталина в биологических объектах составляет величину 0.03 мг/кг.

Настоящая методика с вероятностью P=0.95 обеспечивает получение результатов анализа с погрешностью, не превышающей значений, приведенных в табл.2.

Табл. 2.

Метрологические характеристики погрешностей измерений

Определяемое вещество и концентрация,нг	Среднее значение, нг	Стандартное отклонение S	Доверительные границы суммарной погрешности, P=0.95, n=5
нафталин 0,85	0,85	0,02	0,85± 0,12
нафталин 1,70	1,71	0,04	1,71± 0,16
нафталин 6,80	6,80	0,06	6,80± 0,14
нафталин 13,60	13,62	0,07	13,62± 0,22

Табл.3.

Доверительный интервал и полнота определения нафталина в биологических объектах овцы (на примере печени,почек и сердца)

Биолог.объект овцы	Добавлено нафталина, мг/кг	Обнаружено нафталина, мг/кг	Доверит. интервал ±	Полнота определения. %
печень	0,03	0,0221	0.003	73,8
	0,09	0,0682	0,004	75,8
	0,12	0,0890	0,006	74,2
	0,15	0,1130	0,006	75,5
почки	0,03	0,0225	0.002	75,1
	0,09	0,0680	0,002	75,6
	0,12	0,0896	0,004	74,7
	0,15	0,1110	0,004	74,1
сердце	0,03	0,0224	0.003	74,6
	0,09	0,0682	0,003	75,8
	0,12	0,0908	0,004	75,7
	0,15	0,1126	0,005	75,1

Средства измерений, вспомогательные устройства и материалы, реактивы

Средства измерений

Газо-жидкостный хроматограф ЦВЕТ 110 или любой другой с пламенно-ионизационным детектором

Колонка хроматографическая, стеклянная, длиной 2 м, внутр. диаметром 3,5мм

Самописец типа КСП 4 или аналогичный

Весы лабораторные общего назначения 2го класса точности с пределом взвешивания 200г ГОСТ 24104

Колбы мерные 2-50-2, 2-100-2 ГОСТ 1770

Цилиндры 1-50, 1-100 ГОСТ 1770

Градуированные пробирки с притертыми пробками 2-5-14/23 ГОСТ 1770

Пипетки мерные 2-2-1-2, 2-2-1-5, 2-2-1-10 ГОСТ 29927

Линейка измерительная ГОСТ 427

Допускается использовать другие средства измерений с метрологическими характеристиками не хуже указанных.

Вспомогательные устройства и материалы

Магнитная мешалка ММ 3М ТУ 25-110-834-73

Насос водоструйный

Роторный испаритель

Термостат водяной типа mlm 8 (Польша) с пределами температур – 60 - +150°С

Колбы конические Кн 2-100-29, Кн 2-250-29 ГОСТ 25336

Колбы круглодонные 1-100 ГОСТ 1770

Пробирки с притертой пробкой емкостью 5 $см^3$ ГОСТ 1770

Адсорбционные трубки, стеклянные, заполненные мелкодисперсным силикагелем для газовой хроматографии, фирма Waters,тип SEP-PAK® ,размер трубок 30 *4мм. , размер частиц 0,100 – 0,125мм (см. рис.4)

Шприцы стеклянные емк.500,100 и 10 мкл

Мясорубка или микроразмельчитель ткани РТ-2 МРТУ 42 1505-63

Реактивы

Диэтиловый (этиловый) эфир ОСТ 84-2006-88

Ацетон осч ГОСТ 2603

Сульфат натрия, безводный, чда ГОСТ 4166

Нафталин для хроматографии ТУ 6П-56-68

Азот баллонный ,ос.ч ГОСТ 9293

Водород балонный ГОСТ 3033 или генераторный

Воздух баллонный ГОСТ 11882 или компрессорный

Наполнитель для колонки хроматон N-AW-DMCS (размер частиц 0.125-0,160мм), пропитанный 5% ХЕ-60

Допускается применение других вспомогательных устройств и материалов и реактивов с техническими характеристиками не хуже указанных.

Приготовление растворов и построение градуировочного графика.

Растворы нафталина с массовой концентрацией 0.01мг/1 $см^3$ и 3,4 мкг/$см^3$.

В мерную колбу емкостью 1000 $см^3$ взвешивают на микровесах 10 мг нафталина (точность взвешивания ± 0,02мг), добавляют 100 см³ гексана, растворяют навеску полностью и доводят до метки ацетоном. Перемешивают.

Получают раствор А с концентрацией нафталина 0,01мг/$см^3$. В мерную колбу емкостью 100 $см^3$ вносят цилиндром 34 $см^3$ раствора А, получают раствор В с концентрацией нафталина 3,4 мкг/$см^3$, который используют для

приготовления растворов при построении градуировочного графика. Срок хранения растворов А и В - два месяца при условии хранения их в холодильнике.

Растворы нафталина для построения градуировочного графика.

а) В пробирку с притертой пробкой вносят шприцем 20 мкл раствора В, добавляют 180 мкл ацетона. Перемешивают.

б) В пробирку с притертой пробкой вносят шприцем 40 мкл раствора В, добавляют 160 мкл ацетона. Перемешивают.

в) В пробирку с притертой пробкой вносят шприцем 80 мкл раствора В, добавляют 120 мкл ацетона. Перемешивают.

г) В пробирку с притертой пробкой вносят шприцем 160 мкл раствора В, добавляют 40 $см^3$ ацетона. Перемешивают.

д) В пробирку с притертой пробкой вносят шприцем 54,4 мкл раствора А, добавляют 45,6 мкл ацетона. Перемешивают.

Срок хранения этих растворов составляет одну неделю при условии хранения их в холодильнике.

Построение градуировочного графика.

Градуировочный график строят, откладывая на оси ординат высоту сигнала нафталина в мм, на оси абсцисс – массовую концентрацию в нг.

Для получения данных для построения графика в хроматограф вводят 2,5мкл растворов а-д. Каждый объем пробы вводят по 3 раза, относительное СКО результатов параллельных измерений сигналов нафталина для каждого вводимого объема не должно превышать 5%. В табл.4 приведены данные, полученные для построения градуировочного графика.

Приготовленных объемов растворов для построения градуировочных графиков хватает для проведения построения графиков в течение , по крайней мере, недели.

Табл. 4.

Данные,полученные для построения градуировочного графика

№№	Высота сигнала, мм	Вводимый объем, мкл	Концентрация нафталина, нг
1	0,50	2,5	0,85
2	1,07	2,5	1,70
3	2,15	2,5	3,40
4	4,32	2,5	6,80
5	8,70	2,5	13,60

Типичный градуировочный график для нафталина, полученный при проведении испытаний, приведен на рис.1. Стабильность градуировочной характеристики контролируют не реже, чем через каждые 20 вводов аналитических проб. Хроматограммы,полученные при построении градуировочного графика, приведены на рис.2. Время выхода сигнала нафталина составляет 3,2 мин.

Подготовка к определению

Отбор проб

Отбор проб проводят в соответствии с «Унифицированными правилами отбора проб сельскохозяйственной продукции, продуктов питания и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов», утв. №2051-79 от 21.09.1979г.. Для каждого биологического объекта отбирают 2 параллельных пробы . Для каждой пробы выполняют одну экстракцию.

Подготовка хроматографической колонки

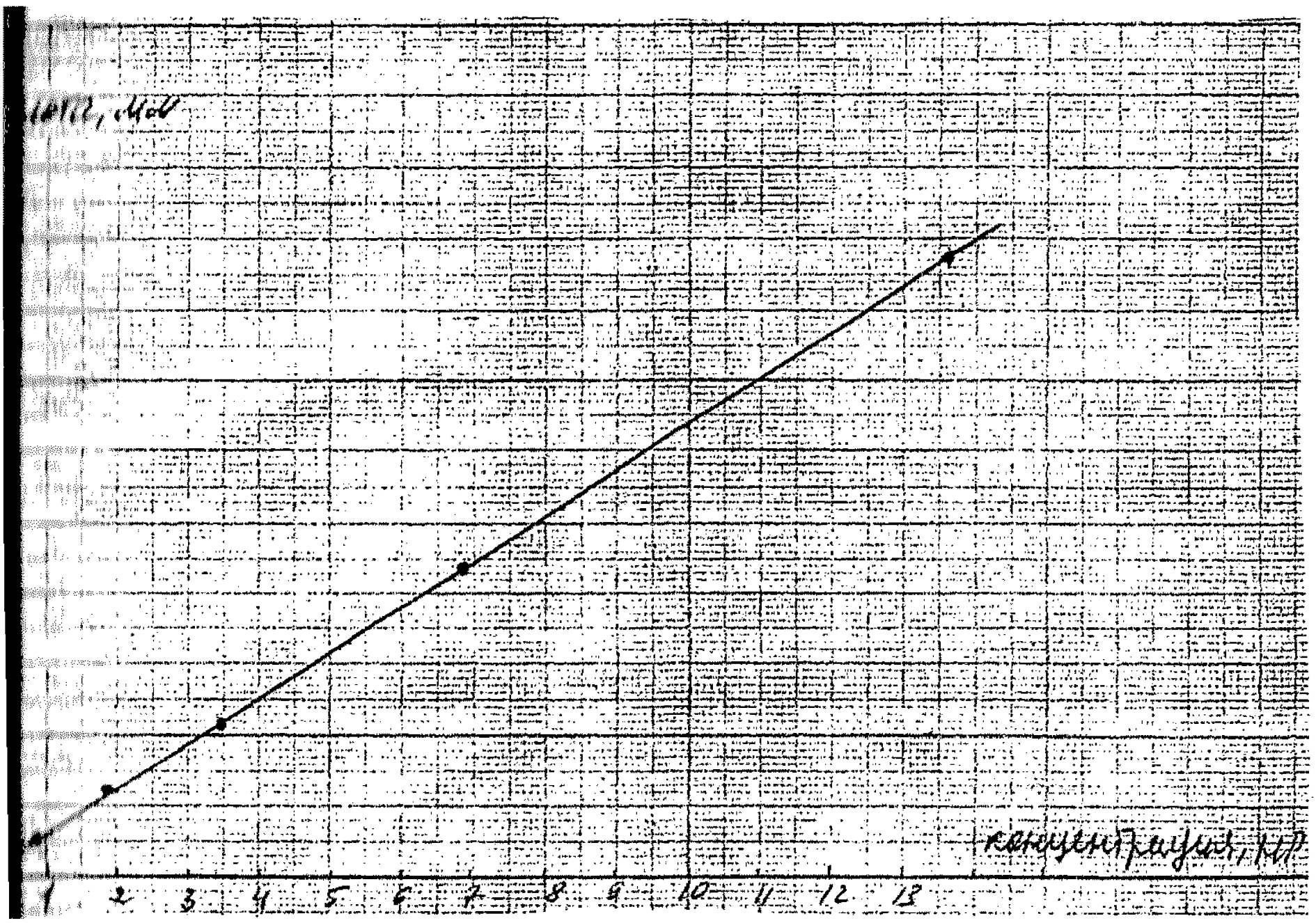
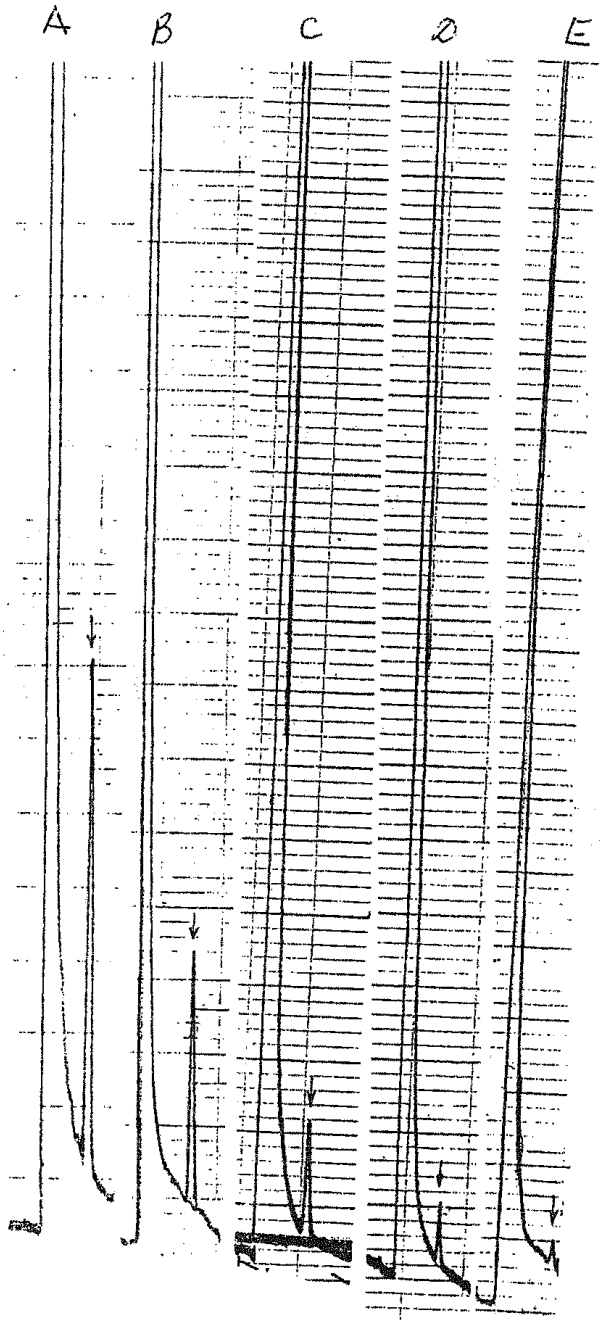


Рис.1. Градуировочный график для нафталина



Условия хроматографирования:
Хроматогрф "ЦВЕТ-110"
Колонка стеклянная,длина 2м
Детектор - ПИД
Неподвижная фаза - 5% ХЕ на хр
не N-AW-DMCS (0,125-0,160мм)
Температура: термостата
колонки 135°С,
испарителя 160°С
детектора 200°С
Расход: азота 60
в мл/мин водорода 30
воздуха 300
Объем вводимой пробы: 2,5мкл
Чувст.электрометра,мА 5х10

Рис.2. Хроматограммы стандартных растворов нафталина:
А-ст.нафталина 13,60нг, В-ст.нафталина 6,8нг, С-ст.нафталина 3,4нг,
Д-ст.нафталина 1,7нг, Е-ст.нафталина 0,85нг

Хроматографическую колонку промывают, сушат и заполняют адсорбентом. Заполнение производят малыми дозами при легком постукивании по колонке. Для обеспечения плотной упаковки конец колонки присоединяют к вакуумному насосу. Концы заполненной колонки закрывают комочками стекловаты.

Колонку устанавливают в термостат хроматографа, продувают газом-носителем (азотом) при температуре 230°С в течение 6-8 часов. Затем колонку присоединяют к детектору.

После окончания работы каждый день температура термостата колонки должна быть повышена до 230°С и колонка должна быть откондиционирована в течение 1 часа при включенном детекторе. После 3-дневной работы рекомендуется заменить 3-4 см наполнителя с конца колонки, подсоединенного к испарителю.

Условия выполнения измерений

При выполнении измерений необходимо соблюдать следующие условия.

Монтаж, наладку и вывод хроматографа на рабочий режим проводят в соответствии с инструкцией, прилагаемой к прибору.

Температура термостата колонки, °С	135
Температура испарителя, °С	160
Температура детектора, °С	200
Расход азота, см³/мин	60
Расход водорода, см³/мин	30
Расход воздуха, см³/мин	300
Скорость диаграмной ленты, см/ч	15
Объем вводимой пробы,мкл	2-9
Чувствительность электрометра,mA	$5*10^{-12}$

Для достижения оптимального разделения компонентов смеси, вводимой в хроматограф, допускается изменять условия проведения измерений и состав наполнителя колонки.

Требования к квалификации персонала

К работе на газо-жидкостном хроматографе допускается персонал, прошедший соответствующий курс подготовки.

К работе по подготовке проб пищевых продуктов допускается персонал, имеющий навыки работы в химической лаборатории и прошедший обучение работе с аналитическими приборами и посудой.

Проведение определения .

Образец биологических проб (печень, почки, селезенка. л егкое, сердце, мышечная или жировая ткань и т.п.) измельчают на мясорубке или микроразмельчителе ткани РТ-2, после измельчения пробу тщательно перемешивают, разравнивают и шпателем отбирают из разных мест навеску пробы массой 10 грамм (точность взвешивания 0,02г). Навеску помещают в коническую колбу с притертой пробкой емкостью 250 ³см . Добавляют 20 см³ этилового эфира и проводят экстракцию нафталина путем перемешивания содержимого колбы на магнитной мешалке в течение 1 часа. Эфирный экстракт сливают декантацией в коническую колбу с притертой пробкой емкостью 100 см³, в которую предварительно помещают 40 грамм безводного сульфата натрия. Экстракцию повторяют еще дважды, добавляя к анализируемой пробе по 15 см³ этилового эфира, перемешивают на магнитной мешалке содержимое колбы по 30 минут каждую экстракцию. Экстракты соединяют и концентрируют до объема 10 см³, удаляя этиловый эфир с помощью водоструйного насоса при

Условия хроматографирования:
Хроматограф"ЦВЕТ-110"
Колонка стеклянная,длина 2м
Детектор-ПИД
Неподв.фаза:5%ХЕ-60 на хроматоне N-Aw-DMCS
Температура: колонки 135°С
испарителя 160°С
детектора 200°С
Расход в мл/мин: азота 60
водорода 30
воздуха 300
Объем вводим.пробы 2,5мкл
Чувст.электрометра,мА 5×10^{-12}

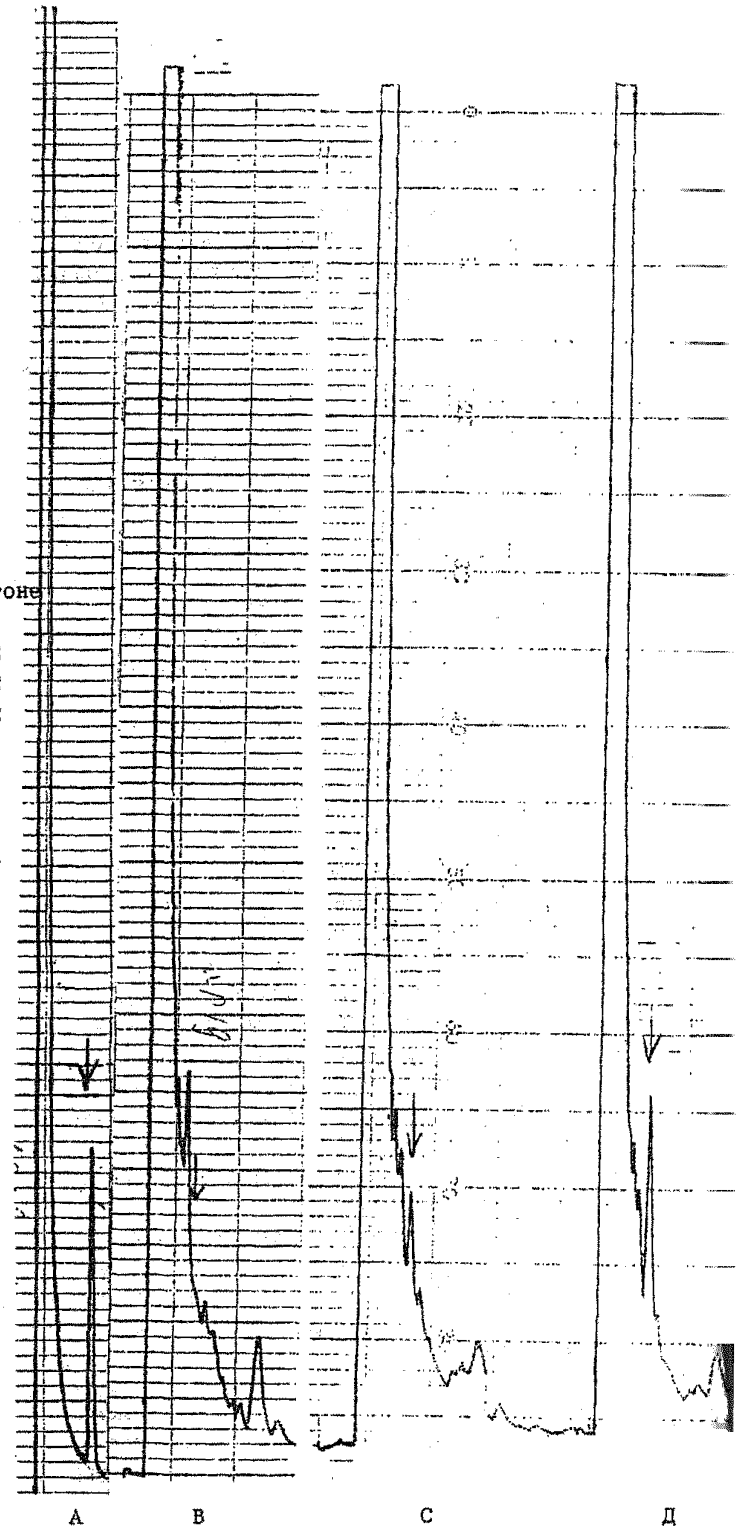


Рис.3. Хроматограммы образцов печени овцы на содержание нафталина:
А - аналитический стандарт нафталина 8,2нг
В - контроль без внесения
С - внесено нафталина 2,2 нг
Д - внесено нафталина 5,3 нг

комнатной температуре с подсоединенными 3-мя адсорбционными ловушками с силикагелем SEP-PAK ® фирмы Waters Associates.(рисунок ловушки приведен на рис.4). Затем емкость с эфировым экстрактом помещают в водяную баню, нагретую до 65 °С, и подключают водоструйный насос. Осторожно отгоняют остатки этилового эфира в течение 7 мин., при этом нафталин сублимируется и адсорбируется на силикагельных поглотителях. После охлаждения всей системы поглотители отсоединяют от колбы и промывают каждый поглотитель с помощью шприца 5 см³ этилового эфира для извлечения нафталина. Экстракт отгоняют на роторном испарителе досуха при температуре 0°С, затем добавляют 1,5 см³ этилового эфира. (V2).Из пробирки отбирают необходимый объем(V1)и вводят его в хроматограф. Объем вводимой в хроматограф пробы составляет 2-9 мкл в зависимости от содержания нафталина.Ввод каждой пробы повторяют дважды. Определяют с помощью линейки высоту сигнала нафталина в параллельных вводах (X1 и X2). За результат измерения принимают среднее арифметическое значение: X=(X1 + X2)/2.

Расхождение между измеренными высотами сигналов не должны отличаться более, чем на 5%, т.е. (X1 – X2)/X < 0,05.В противном случае ввод пробы повторяют.

На рис.3. приведены хроматограммы, полученные при проведении анализа печени овцы с добавлением известного количества нафталина.

Массовую долю нафталина в пробах биологических объектов рассчитывают по формуле:

$$m = \frac{A * V2}{K * н * V1}, \quad \text{где} \qquad (1)$$

m – массовая концентрация нафталина в анализируемом растворе, после приведения всех размерностей в соответствие, выраженная в мг/кг

А - количество нафталина в пробе, найденное по калибровочному графику, нг

К – степень извлечения нафталина из биологической пробы, определенная экспериментальным путем и равная 0,75

н – масса навески,г

V2 – объем экстракта, см³

V1 – объем вводимой в хроматограф пробы, мкл

За результат анализа принимают среднее арифметическое значение двух параллельных определений m1 и m2.

$$m = (m1 + m2)/2 \qquad (2)$$

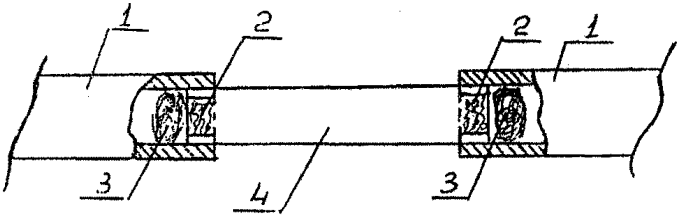


Рис.4. Адсорбционная трубка с силикагелем

1. Резиновый шланг
2. Стекловата в трубке
3. Комочки из проволоки для предотвращения выброса силикагеля
4. Трубка стеклянная размером 30х4мм

III. Требования безопасности

При выполнении анализов необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТу 12.1.007.

Помещение, в котором проводят измерения, должно быть оборудовано общей приточно-вытяжной вентиляцией.

Электробезопасность при работе с электроустановками по ГОСТу 12.2.007.

Организация обучения персонала безопасности труда по ГОСТу 12.0.004.

Помещение лаборатории должно соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТу 12.1.004 и иметь средства пожаротушения по ГОСТу 12.4.009.

Содержание вредных веществ в воздухе рабочей зоны не должно превышать норм, установленных ГН 2.2.5.686-98 «Предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны».

При эксплуатации сжатых газов следует соблю7дать «Правила устройства и безопасносной эксплуатации сосудов, работающих под давлением» (ПБ 10-115-96), Госгортехнадзор России, ГОСТ 12.2.085.

IV. Разработчики

В разработке методики определения остаточных количеств нафталина в органах и тканях животных методом газо-жидкостной хроматографией принимал участие авторский коллектив Испытательного Центра «Пестицид» под руководством доктора химических наук, профессора Головкина Геннадия Васильевича, в составе к.х.н., ст.н.с. Егоровой Т.А., докт.ветерен.н., проф. Тимофеева Б.А., Горлова И.Ф., Гиченкова С.Г.

gost.e-ecolog.ru