ГОСУДАРСТВЕННОЕ
САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ НОРМИРОВАНИЕ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СБОРНИК

МЕТОДИЧЕСКИХ ДОКУМЕНТОВ, НЕОБХОДИМЫХ ДЛЯ ОБЕСПЕЧЕНИЯ ПРИМЕНЕНИЯ ФЕДЕРАЛЬНОГО ЗАКОНА ОТ 12.06.08 №88-ФЗ

«Технический регламент на молоко и молочную продукцию»

Часть 13

МОСКВА 2010

gost.e-ecolog.ru

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Сборник методических документов, необходимых для обеспечения применения Федерального закона от 12 июня 2008 г. № 88-ФЗ «Технический регламент на молоко и молочную продукцию»

Часть 13

ББК 51.23
С23

С23 **Сборник** методических документов, необходимых для обеспечения применения Федерального закона от 12 июня 2008 г. № 88-ФЗ «Технический регламент на молоко и молочную продукцию».—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010.—78 с.

ISBN 5—7508—0771—1

В сборник включены методические документы, содержащие правила и методы исследований (испытаний) и измерений, а также правила отбора образцов для проведения исследований (испытаний) и измерений, в соответствии с постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации Г. Г. Онищенко от 08.12.2008 № 67.

ББК 51.23

© Роспотребнадзор, 2010
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010

Утверждено 27.11.84 № 3151-84

Методические указания по избирательному газохроматографическому определению хлорорганических пестицидов в биологических средах (моче, крови, жировой ткани и грудном женском молоке)*

Краткая характеристика препаратов. *Альдрин* – белое кристаллическое вещество. Растворимость при 20 °С в 100 мл растворителя (г): воде – 2×10^{-5}, этиловом спирте – 9, ацетоне – 159, бензоле – 350, *н*-гексане – 98, четыреххлористом углероде – 105. Стабилен к действию щелочей. Термически устойчив. Выпускается в форме 50 %-ного смачивающегося порошка. Альдрин применяют за рубежом (в СССР применение запрещено) в качестве инсектицида для борьбы с саранчовыми и почвообитающими вредителями, а также с вредителями хлопчатника и в качестве протравителя семян.

γ-Изомер гексахлорциклогексана (линдан) – белое кристаллическое вещество без запаха. Растворимость при 20 °С в 100 мл растворителя (г): воде – 7×10^{-4}, ацетоне – 43,5, бензоле – 28,9, этиловом спирте – 6,4, диэтиловом эфире – 20,8, петролейном эфире – 3,5. Стабилен к действию сильных кислот. Под действием щелочей превращается в трихлорбензол. Выпускается в форме смачивающегося порошка, концентрата эмульсии и гранулированного препарата. Линдан применяют в качестве инсектицида комплексного действия.

α-Изомер гексахлорциклогексана – белое кристаллическое вещество, при 288 °С разлагается. Практически нерастворим в воде. Растворим в бензоле, хлороформе, этиловом спирте, этиловом эфире.

Гептахлор – белое кристаллическое вещество со слабым камфорным запахом. Практически нерастворим в воде. Хорошо растворим в бензоле, ксилоле, толуоле, этиловом спирте. Стабилен при воздействии влаги, света, высокой температуры. Выпускается в виде 25 %-ного концентрата эмульсии. Применяют в качестве инсектицида при обработке семян.

Кельтан – бесцветное, кристаллическое вещество. Практически нерастворим в воде. Растворим в бензоле, метиловом и этиловом спиртах, *н*-гексане. В щелочной среде при нагревании разлагается. Устойчив к

---

* Разработаны В.Ф. Демченко (ВПИИГИПТОКС).

действию концентрированной серной кислоты. Выпускается в виде 20 %-ного концентрата эмульсии и 18,5 %-ного смачивающегося порошка. Применяют в качестве контактного акарицида.

ДДТ – белое кристаллическое вещество. Практически нерастворим в воде. Растворимость при 24 °С в 100 мл растворителя (г): ацетона – 40,3, бензола – 44, диэтилового эфира – 27,5, четыреххлористого углерода – 18, *н*-гексана – 97, этилового спирта – 2,2. Стабилен в кислой среде, разрушается под действием щелочей.

ДДД – белое кристаллическое вещество без запаха. Практически нерастворим в воде, хорошо растворим в бензоле, ацетоне, метаноле, *н*-гексане.

ДДЭ – белое кристаллическое вещество. Растворимость в воде 0,014 мг/100 мл. Хорошо растворим в ацетоне, *н*-гексане, бензоле.

Характеристики препаратов приведены в таблице 1.

1. Краткая характеристика хлорорганических пестицидов

Препарат	Брутто-формула	Химическое название	Молекулярная масса	Температура плавления, °С	ПДК в воде водоемов, мг/л	Упругость паров при 20 °С, Па
Альдрин	$C_{12}H_8Cl_6$	1,2,3,4,10,10-Гексахлор-1,4,4а,5,-8,8а-гексагидро-1,4-эндоэкзо-5,8-диметанонафталин	364,94	104,5—105	0,002	8×10^{-4} (при 25 С)
Линдан (γ-изомер гексахлорциклогексана) α-изомер гексахлорциклогексана (α-бензолгекса-хлорид)	$C_6H_6Cl_6$	1,2,3,4,5,6-Гексахлорциклогексан 1,2,3,4,5,6-Гексахлорциклогексан (α-изомер)	290,86	111,8—112,2 157—158,5 (при 228 С разлагается)	0,02	– 12×10^{-4}
Гептахлор	$C_{10}H_5Cl_{17}$	1,4,5,6,7,7-Гептахлор-4,7-эндометилен-3а,7,7а-тетрагидроиндин	373,35	95—96	0,05	$533,2 \times 10^{-4}$
Кельтан	$C_{14}H_9OCl_5$	1,1-Бис-(п-хлорфенил)-2,2,2-трихлорэтанол	370,43	78,5—79	0,02	–
ДДТ	$C_{14}H_9Cl_5$	4,4′-Дихлордифенилтрихлорэтан		108,5—109	0,002	19×10^{-6}
ДДД	$C_{14}H_{10}Cl_4$	4,4′-Дихлордифенилдихлорэтан	329,0	112		
ДДЭ	$C_{14}H_9Cl_4$	4,4′-Дихлордифенилтрихлорэтилен	318,0	88	0,002	–

Принцип метода. Методика основана на газохроматографическом (с ДЭЗ) определении действующих веществ ХОП, их изомеров, продуктов превращения при совместном присутствии в биосубстратах человека. Избирательность определения хлорорганических соединений в гексановых экстрактах из биологических жидкостей и жировых тканей достигается газохроматографическим анализом на колонках различной полярности в два этапа:

1) экспресс-хроматографирование на колонке длиной 1 м с 5 % SE-30, позволяющее установить ориентировочные уровни содержания ХОП в пробе;

2) хроматографирование на колонке длиной 2 м, содержащей смесь неподвижных фаз (1,5 % OV-17 и 1,95 % QF-1), позволяющее идентифицировать индивидуальные компоненты и провести количественную оценку их содержания в пробе.

Метрологическая характеристика метода приведена в таблице 5.

Избирательность метода. Метод избирателен в присутствии кельтана, гептахлорэпоксида, дилора, митрана, эфирсульфоната, даконила, дихлорбензофенона, 2,4-дихлорфенола, 2,4,5-трихлорфенола, 1,2,4,5-тетрахлорбензола.

Реактивы и растворы. Ацетон х.ч., перегнанный. *н*-Гексан ч., очищенный концентрированной серной кислотой, отмытый дистиллированной водой, высушенный кристаллическим едким кали и перегнанный с дефлегматором. Спирт этиловый ректиф. Хлороформ х.ч. Оксалат калия (5 %-ный водный раствор). Гидроксид калия, расфасованный в стеклянную тару. Кислота серная х.ч. (плотность 1,84). Сульфат натрия х.ч., безводный (прокаленный). Бикарбонат натрия х.ч. (0,5 н. водный раствор). Хлорид натрия х.ч. (насыщенный водный раствор). Азот газообразный особой чистоты. Носитель инертный: хроматон N-AW-HMDS (0,125—0,160 мм). Насадка готовая: хроматон N-AW-DMCS (0,12—0,16 мм), содержащий 5 % SE-30. Фазы неподвижные: фенилметилсиликоновое масло OV-17, трифторпропилметилсиликоновый каучук OF-1.

5. Метрологическая характеристика метода избирательного газохроматографического определения ХОП в биологических средах

Пестицид	Предел определения, мкг/л, мкг/кг	Среднее значение определения, %	Стандартное отклонение, ±%	Относительное стандартное отклонение, ±	Доверительный интервал, ±%
1	2	3	4	5	6
В моче					
ГХБ	0,1	74,94	13,27	0,18	21,10
α-ГХЦГ	0,1	82,61	17,28	0,21	27,48

Продолжение

1	2	3	4	5	6
γ-ГХЦГ	0,1	88,24	13,36	0,15	16,58
β-ГХЦГ	0,4	99,21	11,20	0,11	13,89
δ-ГХЦГ	0,1	99,09	14,42	0,15	17,88
2,4′-ДДЭ	2,5	86,48	11,77	0,14	14,59
4,4′-ДДЭ	0,1	98,00	5,63	0,06	6,98
2,4′-ДДД	0,5	99,28	4,03	0,04	5,00
2,4′-ДДТ	0,6	95,46	16,54	0,17	20,51
4,4′-ДДД	0,5	99,23	6,57	0,07	8,15
4,4′-ДДТ	0,6	71,80	25,46	0,35	31,60
В жировых тканях					
ГХБ	2,0	77,47	9,11	0,12	9,56
α-ГХЦГ	2,0	74,73	12,37	0,17	12,98
γ-ГХЦГ	2,0	88,69	10,75	0,12	11,28
β-ГХЦГ	8,0	71,80	14,32	0,20	15,01
δ-ГХЦГ	2,0	74,75	12,46	0,17	13,08
2,4′-ДДЭ	50,0	91,22	12,53	0,14	13,13
4,4′-ДДЭ	4,0	79,45	14,97	0,19	15,70
2,4′-ДДД	10,0	71,65	8,53	0,12	8,94
2,4′-ДДТ	12,0	86,84	17,22	0,20	18,07
4,4′-ДДД	10,0	76,05	8,55	0,11	8,97
4,4′-ДДТ	12,0	97,88	10,26	0,10	12,73
В крови					
ГХБ	0,5	79,06	17,66	0,22	21,92
α-ГХЦГ	0,5	75,32	14,50	0,19	26,65
γ-ГХЦГ	0,5	87,49	9,95	0,11	12,35
β-ГХЦГ	2,0	88,94	21,11	0,24	38,80
δ-ГХЦГ	0,5	73,33	23,68	0,32	43,53
2,4′-ДДЭ	12,5	73,98	8,97	0,12	6,88
4,4′-ДДЭ	1,0	71,58	12,22	0,17	11,30
2,4′-ДДД	2,5	81,48	10,92	0,13	10,10
2,4′-ДДТ	3,0	70,43	8,17	0,12	6,26
4,4′-ДДД	2,5	85,84	13,17	0,15	10,10
4,4′-ДДТ	3,0	71,32	13,24	0,19	10,15
В грудном молоке					
ГХБ	0,2	69,03	6,70	0,10	8,32

Продолжение

1	2	3	4	5	6
α-ГХЦГ	0,2	78,75	19,48	0,25	20,43
γ-ГХЦГ	0,2	83,92	24,80	0,30	30,78
β-ГХЦГ	0,8	84,89	12,85	0,15	15,95
δ-ГХЦГ	0,2	73,54	7,41	0,10	9,20
2,4′-ДДЭ	5,0	77,70	13,27	0,17	12,27
4,4′-ДДЭ	0,4	81,37	13,97	0,17	14,65
2,4′-ДДД	1,0	69,06	5,40	0,08	5,66
2,4′-ДДТ	1,2	85,42	10,87	0,13	10,05
4,4′-ДДД	1,0	75,35	12,41	0,16	10,39
4,4′-ДДТ	1,2	83,33	24,12	0,29	29,93

Подготовка к определению. *Приготовление хроматографической колонки.* Для приготовления 20 г набивки, содержащей 1,5 % OV-17 и 1,95 % QF-1 на хроматоне N-AW-HMDS (0,125—0,160 мм), взвешивают в бюксе 0,3 г OV-17 и 0,39 г QF-1, которые растворяют в 40 мл ацетона. Полученную смесь выливают в круглодонную колбу на шлифе вместимостью 500 мл, содержащую 19,31 г носителя. Содержимое колбы тщательно перемешивают путем встряхивания для равномерной пропитки носителя неподвижными фазами, после чего растворитель отгоняют на ротационном испарителе до исчезновения запаха ацетона. Для наиболее полного удаления растворителя набивку переносят количественно в бюкс и в течение 2—3 ч выдерживают в сушильном шкафу при 100 ± 5 °С.

Стеклянную хроматографическую колонку, предварительно промытую хромовой смесью, дистиллированной водой, этанолом и затем диэтиловым эфиром, высушенную досуха и содержащую прокладку из стекловаты, заполненную набивкой, устанавливают в термостат колонок и, не присоединяя к детектору, термостатируют 12—18 ч при 200—220 °С к слабом потоке газа-носителя. После продувки колонку подсоединяют к детектору.

Проверка чистоты реактивов. Реактивы не должны содержать ХОП. Необходимо проводить контроль на чистоту растворителей.

Отбор и хранение проб. Пробы отбирают в клинических условиях. Отбирают 1—2 мл цельной крови, 2—5 мл грудного молока, 5—10 мл мочи, 0,1—0,5 г жировой ткани. Если анализ нельзя провести сразу после отбора, пробы замораживают в испарительной камере холодильника или с помощью жидкого азота. Хранят не более 5 сут.

Ход анализа. *Экстракция.* Пробу *мочи* (5—10 мл) помещают в колбу на 50 мл с пришлифованной пробкой и приливают равный объем *н*-гексана. Перемешивают со средней интенсивностью на аппарате для встряхивания в течение 10 мин. После отстаивания содержимое колбы осторожно переносят в делительную воронку на 50—75 мл и после полного разделения слоев отделяют экстракт. При образовании устойчивой эмульсии на границе фаз для полноты расслаивания жидкостей в делительную воронку приливают по капле 0,1—0,5 мл этанола. Пробу через кран делительной воронки сливают в ту же колбу, которая была использована для первоначальной экстракции.

Гексановый экстракт через верх сливают на слой безводного сульфата натрия, помещенного в коническую воронку для фильтрования, содержащую подложку из обезжиренной ваты. Собирают экстракт в колбу на шлифе. Экстракцию повторяют. Экстракты объединяют, сульфат натрия тщательно промывают тремя порциями гексана, растворитель отжимают, присоединяют к экстракту.

Цельную *кровь* (1—2 мл), помещенную в пробирку на шлифе, экстрагируют со средней интенсивностью 5 мл гексана на аппарате для встряхивания в течение 10 мин, используя приспособление для фиксации пробирок.

После разделения слоев гексановый экстракт тщательно отбирают с помощью пипетки, соединенной с грушей, и фильтруют через безводный сульфат натрия. При затрудненном разделении фаз поступают так же, как при экстракции мочи.

При повышенной свертываемости крови сыворотку и сгусток экстрагируют раздельно. Сгусток отделяют от сыворотки, декантируя последнюю в пробирку на шлифе, затем растирают в фарфоровой ступке с избыточным количеством безводного сульфата натрия (до сыпучего состояния). Гомогенат переносят в колбу на шлифе и заливают 1,5-кратным по объему количеством гексана. Фарфоровую ступку дважды споласкивают гексаном (по 2 мл), который присоединяют к содержимому колбы.

Экстракцию проводят путем настаивания при периодическом перемешивании в течение 15—20 мин. Растворитель декантируют в колбу на шлифе вместимостью 100 мл, дополнительно фильтруя через слой безводного сульфата натрия. Экстракцию повторяют, экстракты объединяют. Содержимое колбы дополнительно промывают два раза гексаном (по 3—5 мл), присоединяя последний к основному экстракту.

С сывороткой поступают так же, как с цельной кровью. Экстракты из сгустка и сыворотки крови объединяют.

К 2—5 мл пробы *грудного молока* в делительной воронке на 50—75 мл прибавляют 1 мл 5 %-ного раствора оксалата калия и 5 мл этанола. Встряхивают в течение 1 мин. Прибавляют 10 мл диэтилового эфира, встряхивают 1 мин, добавляют 5 мл гексана и снова встряхивают 1 мин. Отстаивают 15 мин, отделяют эфирный слой, упаривают на ротационном испарителе под вакуумом при 35—40 °С до тех пор, пока в колбе не останется чистый жир, который затем растворяют в 10—15 мл гексана и количественно переносят в плоскодонную колбу на шлифе вместимостью 50—70 мл.

Жировую ткань (0,1—0,5 г) измельчают скальпелем или ножницами в фарфоровой ступке, тщательно растирают с избыточным количеством безводного сульфата натрия до сыпучего состояния. Экстракцию проводят так же, как при анализе сгустка крови.

Очистка экстрактов. Объединенные экстракты очищают в плоскодонных колбах на шлифе путем 5—7-минутного встряхивания с 5—10 мл насыщенного раствора безводного сульфата натрия в концентрированной серной кислоте. Экстракт после отстаивания осторожно декантируют в другую колбу. Содержимое колбы с кислотой после первичной очистки споласкивают 1—2 мл гексана, который присоединяют к основному экстракту. Очистку повторяют несколько раз до тех пор, пока слой кислоты после перемешивания не станет бесцветным.

Очищенный экстракт переносят в делительную воронку, приливают 2—5 мл 0,5 н. раствора бикарбоната натрия, затем встряхивают 1—2 мин, водный раствор отбрасывают и далее экстракт промывают дистиллированной водой (2—3 раза по 10—15 мл) до нейтральной реакции промывных вод. Конечный экстракт фильтруют через безводный сульфат натрия в колбу для отгонки растворителя.

Растворитель упаривают на ротационном испарителе при температуре водяной бани 35—40 °С под вакуумом до небольшого объема (5—7 мл), затем в токе азота особой чистоты до объема 0,5—1,0 мл и анализируют ГЖХ.

Хроматографирование. Газохроматографический анализ проводят на колонке длиной 1 м с 5 % SE-30 на хроматоне N-AW-HMDS (0,12—0,16 мм). Гексановый экстракт (5 мкл) анализируют с ДЭЗ на колонке 1 с 5 % SE-30 с использованием стандартной смеси хлорорганических препаратов № 1.

Условия хроматографирования приведены в таблице 6.

6. Условия газохроматографического определения ХОП в биологических средах

Характеристика хроматографической колонки				Скорость потока азота, мл/мин	
неподвижная фаза	твердый носитель	длина, м	внутренний диаметр, мм	через колонку	на продувку детектора
Вариант I					
5 % SE-30	Хроматон N-AW-DMCS (0,16—0,20 мм)	1	3	60	160
Вариант II					
1,5 % OV-17 + 1,95 % QF-1	Хроматон N-AW-HMCS (0,125—0,160 мм)	2	3	50	160

Продолжение

Температура, °С			Скорость движения диаграммной ленты, мм/ч	Шкала чувствительности электрометра, А
термостата колонки	термостата детектора	испарителя		
Вариант I				
190	220	220	240	20×10^{-12}
Вариант II				
185	240	220	240	20×10^{-12}

Анализ, результаты которого рассчитывают по общепринятым формулам, может быть проведен повторно после дополнительного разбавления экстракта гексаном или, при необходимости, концентрирования в токе азота особой чистоты, источником которого служит автономный баллон с азотом.

Таким образом получают предварительные данные об уровне и характере содержания ХОП в биологическом материале, так как в указанных условиях не достигается полной избирательности определения отдельных компонентов (см. табл. 7) и возможно получение данных лишь по суммарному содержанию изомеров ГХЦГ и гексахлорбензола, а также 2,4'- и 4,4'-изомеров ДДТ, ДДД и ДДЭ.

Конечным результатом газохроматографического определения содержания ХОП в биосубстратах являются данные, полученные в варианте II (см. табл. 6) с применением колонки длиной 2 м, содержащей смесь 1,5 % OV-17 и 1,95 % QF-1.

7. Характеристики удерживания ХОП при различных условиях газохроматографического разделения

Пестицид	Вариант I*	Вариант II*	Пестицид	Вариант I*	Вариант II*
ГХБ	0,45	0,45	4,4'-ДДЭ	1,82	2,44
α-ГХЦГ	0,41	0,49	2,4'-ДДД	1,86	2,90
γ-ГХЦГ	0,48	0,65	2,4'-ДДТ	2,57	3,53
β-ГХЦГ	0,45	0,77	4,4'-ДДД	2,32	3,18
δ-ГХЦГ	0,50	0,91	4,4'-ДДТ	3,03	4,73
2,4'-ДДЭ	1,16	1,57			

Относительная продолжительность удерживания индивидуальных компонентов смеси ХОП (время удерживания альдрина условно принято равным 1,0) приведена в таблице 7.

Обработка результатов анализа. Расчет содержания каждого из идентифицированных веществ в пробе (X, мг/л, мг/кг) ведут по формуле:

$$X = \frac{H V_1}{K V_2 P}, \text{ где}$$

H – высота хроматографического пика компонента в пробе, мм; V_1 – конечный объем экстракта, мл; V_2 – объем аликвоты экстракта, введенный в испаритель хроматографа, мкл; P – объем (масса) пробы, взятой для анализа, мл (г); K – калибровочный коэффициент соответствующего вещества, рассчитанный из результатов серии анализов стандартной смеси по формуле

$$K = \frac{1}{n}\left(\frac{H_1}{C_1 V_{cm}^1} + \frac{H_2}{C_2 V_{cm}^2} + \ldots + \frac{H_n}{C_n V_{cm}^n}\right), \text{ где}$$

n – число проведенных анализов стандартного раствора смеси ХОП; H_n – высота пика n-ного компонента стандартного раствора смеси

* Условия газохроматографического анализа приведены в таблице 6.

ХОП, мм; C_n – концентрация n-ного компонента в стандартном растворе, нг/мкл; $V_{ст}$ – объем стандартного раствора ХОП, взятый для анализа, мкл.

Требования безопасности. Необходимо соблюдать общепринятые правила безопасности при работе с органическими растворителями и токсичными веществами, концентрированными кислотами. Работа с биологическим материалом требует соблюдения дополнительных предосторожностей. Работать нужно в резиновых хирургических перчатках, проводить обеззараживание перчаток и рук этиловым спиртом после контакта с биологическими средами.

Содержание

Временные методические указания по определению байгона методом газожидкостной хроматографии в молоке.....3
Методические указания по определению дифоса (аббата) в продуктах животного происхождения методом тонкослойной хроматографии (дополнение к № 1350-75).....11
Методические указания по избирательному газохроматографическому определению хлорорганических пестицидов в биологических средах (моче, крови, жировой ткани и грудном женском молоке).....16
Методические указания по обнаружению, идентификации и определению содержания Т-2 токсина в пищевых продуктах и продовольственном сырье.....26
Унифицированная методика определения остаточных количеств фосфорорганических пестицидов.....33

Сборник методических документов, необходимых для обеспечения применения Федерального закона от 12 июня 2008 г. № 88-ФЗ «Технический регламент на молоко и молочную продукцию»

Часть 13

Технический редактор Е. В. Ломанова

Подписано в печать 26.01.10

Формат 60x88/16 Печ. л. 5,0

Тираж 200 экз. Заказ 1

Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
127994, Москва, Вадковский пер., д. 18, стр. 5, 7

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
отделом издательского обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а
Отделение реализации, тел./факс 952-50-89

gost.e-ecolog.ru