

664.95  
К 30



Министерство сельского хозяйства Российской Федерации  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО РЫБОЛОВСТВУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**Научно-технические и методические  
документы**

# **Качество, безопасность и методы анализа продуктов из гидробионтов**

**ВЫПУСК 2**

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ  
ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ СОДЕРЖАНИЯ ТОКСИКАНТОВ  
В ПРОДУКТАХ ИЗ ГИДРОБИОНТОВ**

**Издательство ВНИРО**

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО РЫБОЛОВСТВУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УНИТАРНОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ  
«ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ  
РЫБНОГО ХОЗЯЙСТВА И ОКЕАНОГРАФИИ» (ВНИРО)

Научно-технические и методические документы

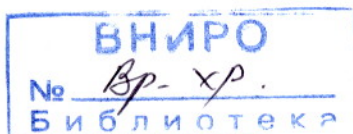
# **КАЧЕСТВО, БЕЗОПАСНОСТЬ И МЕТОДЫ АНАЛИЗА ПРОДУКТОВ ИЗ ГИДРОБИОНТОВ**

**Выпуск 2**

## **МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ СОДЕРЖАНИЯ ТОКСИКАНТОВ В ПРОДУКТАХ ИЗ ГИДРОБИОНТОВ**

**УТВЕРЖДЕНО**

Заместителем Руководителя Федерального агентства по рыболовству  
С.А. Подоляном



МОСКВА 2005 г.

Разработано Всероссийским научно-исследовательским институтом  
рыбного хозяйства и океанографии (ВНИРО)

Под редакцией канд. биол. наук *Л.Р. Копыленко*

К 12 **Качество, безопасность и методы анализа продуктов из гидробионтов. Вып. 2.**  
Методические рекомендации по определению содержания токсикантов в продуктах из  
гидробионтов. – М.: Изд-во ВНИРО, 2005. – 69 с.

В сборнике представлены методические рекомендации по определению неорганических и органических токсикантов, регламентированных требованиями СанПиН 2.3.2.1078-01, в продуктах из гидробионтов.

Методические рекомендации разработаны сотрудниками Испытательной лаборатории “ВНИРО-ТЕСТ” ФГУП ВНИРО. Методики по определению нитрозаминов и гистамина разработаны совместно с сотрудниками Института питания РАМН и Онкологического научного центра РАМН.

Сборник предназначен для испытательных лабораторий и предприятий отрасли.

# ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ХИМИЧЕСКИХ ЭЛЕМЕНТОВ МЕТОДОМ АТОМНОЙ АБСОРБЦИИ

(Кириченко С.Г., Галутва О.А., Полуяктов В.Ф.)

Рекомендации распространяются на атомно-абсорбционный метод определения некоторых химических элементов (кадмий, свинец, мышьяк, железо, цинк, хром, олово) в гидробионтах и продуктах, вырабатываемых из них.

## 1. СУЩНОСТЬ МЕТОДА

Метод основан на пламенной или беспламенной атомной абсорбции.

Атомы элементов способны возбуждаться под действием световой энергии, поглощая свет соответствующих частот, совпадающих с частотами излучения атомов этих элементов. Поглощение световой энергии прямо пропорционально концентрации элемента, присутствующего в атомном облаке. Для атомизации пробы используют тепловую энергию пламени или графитовую кювету.

## 2. АППАРАТУРА, МАТЕРИАЛЫ И РЕАКТИВЫ

- Спектрофотометр атомно-абсорбционный, пламенный или беспламенный.
- Анализатор мышьяка.
- Весы лабораторные 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г по ГОСТ 24104-88.
- Воронки по ГОСТ 25336-82, В-25-38ХС.
- Колбы конические по ГОСТ 25336-82, КН-2-100-2.
- Колбы мерные по ГОСТ 1770-74, 2-25-2, 2-100-2.
- Пипетки по ГОСТ 20292-74 4-2-1 или 5-2-1, 4-2-2 или 5-2-2, 6-2-10 или 7-2-10.
- Пробирки мерные от 10 до 20 см<sup>3</sup> по ГОСТ 1770-74, 11-2-10 и 11-2-20.
- Электропечь сопротивления по ГОСТ 13474-79.
- Стаканчики стеклянные по ГОСТ 25336-82, ВН-50 или НН-50.
- Ступки фарфоровые по ГОСТ 9147-80.
- Тигли кварцевые вместимостью от 50 до 100 г по ГОСТ 19908-80.
- Шкаф сушильный по ГОСТ 13474-79.
- Фильтры обеззоленные с белой или синей лентой.
- Вода дистиллированная или деминерализованная по ГОСТ 7609-72.
- Кислота азотная ОСЧ по ГОСТ 4461-77 или ХЧ по ГОСТ 4461-77.
- Кислота соляная ОСЧ по ГОСТ 14261-77 или ХЧ по ГОСТ 3118-77.
- Магний азотнокислый шестиводный ЧДА для анализа по ГОСТ 11088-75.

### 3. ПОДГОТОВКА К ИСПЫТАНИЮ

#### 3.1. Построение градуировочного графика

Готовят стандартные растворы для всех исследуемых элементов с различным содержанием металла в  $1 \text{ см}^3$  и фотометрируют при соответствующей длине волны.

Стандартный раствор кадмия: 16.3 мг хлористого кадмия, отвешенного с погрешностью не более 0.001 г, растворяют в дистиллированной воде в мерной колбе вместимостью  $1 \text{ дм}^3$ . Это – основной раствор. Рабочий раствор готовят разведением  $5 \text{ см}^3$  основного раствора дистиллированной водой в мерной колбе вместимостью  $100 \text{ см}^3$ .  $1 \text{ см}^3$  рабочего раствора содержит 0.5 мкг металлического кадмия.

Стандартный раствор свинца: 0.1598 г предварительно высушенного азотнокислого свинца, отвешенного с погрешностью не более 0.001 г, растворяют в азотной кислоте в мерной колбе вместимостью  $1 \text{ дм}^3$ . Это – основной раствор. Рабочий раствор готовят разведением  $1 \text{ см}^3$  основного раствора той же кислотой в мерной колбе вместимостью  $100 \text{ см}^3$ .  $1 \text{ см}^3$  рабочего раствора содержит 10 мкг свинца.

Стандартный раствор мышьяка: 0.4160 г двузамещенного мышьяковокислого натрия ( $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) растворяют в дистиллированной воде в мерной колбе вместимостью  $1 \text{ дм}^3$ .  $1 \text{ см}^3$  полученного раствора содержит 100 мкг мышьяка.

Стандартный раствор меди: 0.3939 г сульфата меди ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), отвешенного с погрешностью не более 0.001 г, растворяют в дистиллированной воде в мерной колбе вместимостью  $1 \text{ дм}^3$ .  $1 \text{ см}^3$  полученного раствора содержит 100 мкг меди.

Стандартный раствор цинка: 0.1 г химически чистого цинка, отвешенного с погрешностью не более 0.001 г, растворяют в  $10 \text{ см}^3$  соляной кислоты, разбавленной дистиллированной водой в соотношении 1:1. Полученный раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью  $1 \text{ дм}^3$  и доводят объем до метки дистиллированной водой.  $1 \text{ см}^3$  полученного раствора содержит 100 мкг цинка.

Стандартный раствор олова: 0.1 г измельченного металлического олова ХЧ, отвешенного с погрешностью не более 0.001 г, растворяют в  $10 \text{ см}^3$  соляной кислоты, добавляют  $2 \text{ см}^3$  350 г/дм<sup>3</sup> раствора перекиси водорода. Раствор умеренно нагревают, добавляют  $40 \text{ см}^3$  соляной кислоты. Полученный раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью  $1 \text{ дм}^3$  и доводят объем до метки дистиллированной водой.  $1 \text{ см}^3$  раствора содержит 100 мкг олова.

Стандартный раствор железа: 4.8267 г треххлористого железа ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), отвешенного с погрешностью не более 0.001 г, растворяют в соляной кислоте (1:100) в мерной колбе вместимостью  $1 \text{ дм}^3$ .  $1 \text{ см}^3$  полученного раствора содержит 1000 мкг железа.

Стандартный раствор хрома: 2.8289 г двуххромовокислого калия растворяют в соляной кислоте  $0.02 \text{ моль/дм}^3$  в мерной колбе вместимостью  $1 \text{ дм}^3$ .  $1 \text{ см}^3$  полученного раствора содержит 1000 мкг хрома.

### 3.2. Отбор проб

Пробы рыбы, продуктов из нее, морских млекопитающих и беспозвоночных отбирают по ГОСТ 7631-85, водорослей – по ГОСТ 20438-75, ГОСТ 13496.0-80, консервов и пресервов – по ГОСТ 8756.0-70.

Лабораторные пробы готовят в соответствии с ГОСТ 7636-85, ГОСТ 16290-70, ГОСТ 17206-71, ГОСТ 22455-77, ГОСТ 6730-75, ГОСТ 20438-75, ГОСТ 26185-84.

### 3.3. Подготовка образца

**Сухая минерализация.** Минерализовать пробы можно сухим и мокрым способом. При определении содержания мышьяка можно применять только сухое озоление с добавлением нитрата магния.

Навеску исследуемого образца, измельченного при помощи скальпеля, ножниц или путем растирания в фарфоровой ступке при исследовании консервов (использование мясорубки не допускается), массой от 5 до 40 г (конечная масса золы должна быть  $0.4 - 0.5 \text{ г}$ ), взятую с погрешностью не более  $0.01 \text{ г}$ , помещают в кварцевый тигель и высушивают при температуре  $105^\circ\text{C}$ . Затем осторожно обугливают и озоляют в муфельной печи, медленно повышая температуру от  $130$  до  $450^\circ\text{C}$ . Поднимают температуру до  $250 - 270^\circ\text{C}$  постепенно: на  $20 - 30^\circ\text{C}$ , далее на  $40 - 50^\circ\text{C}$ , при этом необходимо избегать «дымления», так как с дымом возможны потери металлов. Образец выдерживают при температуре  $450^\circ\text{C}$  до получения однородно окрашенной золы светлого цвета. Если полученная зола содержит темные вкрапления, после охлаждения смачивают ее азотной кислотой (1:1) и продолжают озоление до получения светлой золы. К охлажденной золе добавляют  $5 - 10 \text{ см}^3$  соляной кислоты (1:5), нагревают на электроплитке до полного растворения, переносят полученный раствор в мерную колбу вместимостью  $25 \text{ см}^3$  через обеззоленный фильтр и доводят объем дистиллированной водой до метки.

**Сухая минерализация для определения мышьяка.** Навеску гомогенизированного образца ( $1 - 4 \text{ г}$  для влажной рыбной ткани и  $0.5 \text{ г}$  для высушенной ткани), взятую с погрешностью не более  $0.01 \text{ г}$ , помещают в кварцевый тигель вместимостью  $50 - 100 \text{ см}^3$ , добавляют  $8 \text{ см}^3$  водного раствора нитрата магния  $500 \text{ г/дм}^3$  и тщательно перемешивают с образцом. Образец высушивают при температуре  $105^\circ\text{C}$ , затем осторожно обугливают и озоляют в муфельной печи, медленно повышая температуру до  $450^\circ\text{C}$ , избегая «дымления».

Выдерживают образец при 450°C в течение 12 ч. После охлаждения растворяют золу в 10 см<sup>3</sup> концентрированной соляной кислоты и доводят объем дистиллированной водой до 20 см<sup>3</sup>.

**Мокрая минерализация.** Навеску исследуемого образца, подготовленного как описано выше, массой от 1.5 до 2.0 г, взятую с погрешностью не более 0.001 г, помещают в предварительно взвешенную до постоянной массы широкогорлую коническую колбу вместимостью 50 – 100 см<sup>3</sup> и высушивают до постоянной массы в сушильном шкафу при температуре 100 - 105°C. Высушенную навеску заливают 5 см<sup>3</sup> концентрированной азотной кислоты, закрывают пробкой и оставляют на ночь. Азотную кислоту выпаривают из колбы до влажного состояния навески, затем трижды добавляют по 10 см<sup>3</sup> дистиллированной воды, каждый раз выпаривая до влажного состояния образца.

Используя дистиллированную воду, содержимое колбы переносят через фильтр в мерную колбу вместимостью 25 см<sup>3</sup>, объем жидкости доводят до метки и тщательно перемешивают.

#### 4. ПРОВЕДЕНИЕ ИСПЫТАНИЙ

Количество металла, соответствующее определенной высоте сигнала, находят по соответствующему градуировочному графику.

#### 5. ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Массовую долю исследуемого элемента (в мг/кг) определяют по формуле:

$$C_{обр.} = \frac{C_{ст.} \cdot V_{пр.}}{W_{обр.}},$$

где  $C_{обр.}$  - содержание металла в исследуемом образце, мг/кг;

$C_{ст.}$  - содержание металла, найденное по градуировочному графику, мкг/см<sup>3</sup>;

$V_{пр.}$  - объем исследуемой пробы, см<sup>3</sup>.

$W_{обр.}$  - навеска исследуемого образца, г;

За окончательный результат принимают среднее арифметическое значение результатов двух параллельных определений.

# ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ХЛОРОРГАНИЧЕСКИХ ПЕСТИЦИДОВ

(Копыленко Л.Р., Полуяктов В.Ф., Нестерова Л.М.)

Настоящая методика распространяется на определение содержания хлорорганических пестицидов в рыбе, морских млекопитающих, морских беспозвоночных и продуктах, вырабатываемых из них.

Краткая характеристика определяемых хлорорганических пестицидов.

Название пестицида	Эмпирическая формула	Молекулярная масса	Температура плавления, °С	Растворитель	
				Вода, мг/л	Органические растворители
α-НСН	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>6</sub>	291.0	158.0	1.000	Ацетон, гексан,
β-НСН	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>6</sub>	291.0	309.0	0.500	бензол, хлороформ,
γ-НСН (Lindane)	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>6</sub>	291.0	112.8	1.000	ксилол, дихлорэтан,
δ-НСН	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>6</sub>	291.0	138.5	-	метанол, эфир,
Heptachlor	C <sub>10</sub> H <sub>5</sub> Cl <sub>6</sub>	338.0	95.5	-	циклогексан, толуол,
Aldrin	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>6</sub>	365.0	104.5	-	дихлорметан,
Heptachlor Epoxide	C <sub>10</sub> H <sub>7</sub> Cl <sub>6</sub>	356.0	-	-	изооктан,
o,p-DDE	C <sub>14</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>4</sub>	318.0	56.5	-	изопропанол,
p,p-DDE	C <sub>14</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>4</sub>	318.0	56.5	-	дихлорбензол,
o,p-DDD	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>4</sub>	320.0	112.0	0.020	этанол,
p,p-DDD	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>4</sub>	320.0	112.0	0.020	четырёххлористый
o,p-DDT	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>5</sub>	355.5	108.5	0.001	углерод
p,p-DDT	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>5</sub>	355.5	108.5	0.001	

## 1. СУЩНОСТЬ МЕТОДА

Метод основан на извлечении пестицидов из пробы органическим растворителем, очистке экстракта и определении содержания пестицидов методом газовой хроматографии.

Чувствительность метода -  $5.0 \times 10^{-13}$  г (при определении Lindane).

## 2. АППАРАТУРА, МАТЕРИАЛЫ И РЕАКТИВЫ

- Газовый хроматограф, оснащенный детектором электронного захвата.
- Аппарат для встряхивания.
- Весы лабораторные 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г по ГОСТ 24104-88.
- Водоструйный лабораторный насос по ГОСТ 10696-75.
- Воронка для сыпучих веществ с нормальным шлифом №29 по ГОСТ 6662-56.
- Воронка химическая диаметром 3.5 - 4.5 см по ГОСТ 8613-64.
- Колбы мерные вместимостью 50, 100 и 250 см<sup>3</sup>.
- Колбы отгонные круглодонные со НШ 14 вместимостью 100, 150 и 500 см<sup>3</sup> по ГОСТ 1770-74.
- Микрошприц вместимостью 10 мкл.
- Насос вакуумный масляный.



- Палочки стеклянные.
- Пипетки объемом 1, 2, 5, 10, 20 и 25 см<sup>3</sup> по ГОСТ 20292-74.
- Пробирки мерные стеклянные вместимостью 5 и 10 см<sup>3</sup> по ГОСТ 10515-75.
- Ротационный испаритель.
- Стандарты хлорорганических пестицидов.
- Стаканы химические вместимостью 150 и 250 см<sup>3</sup> по ГОСТ 10494-72.
- Ступка фарфоровая по ГОСТ 9147-73.
- Цилиндры мерные вместимостью 25, 50, 100 и 150 см<sup>3</sup> по ГОСТ 1770-74.
- Ацетон ХЧ по ГОСТ 2603-71.
- Вода дистиллированная, не содержащая хлоридов по ГОСТ 6709-72.
- Гексан С<sub>6</sub>Н<sub>6</sub> ХЧ по ТУ 609-4521-77.
- Натрий сернокислый безводный ХЧ по ГОСТ 4166-66, высушенный при температуре +150°С в течение 5 часов.
- Кислота серная по ГОСТ 4204-77, ХЧ, концентрированная.

### 3. ПОДГОТОВКА К ИСПЫТАНИЮ

#### 3.1. Проверка чистоты растворителей

Чистоту гексана и ацетона, используемых в качестве растворителей, проверяют на газовом хроматографе. Для этого 100 см<sup>3</sup> растворителя упаривают до объема 5 см<sup>3</sup>, для анализа берут 1 мкл. Появление на хроматограмме дополнительного пика свидетельствует о недостаточной чистоте растворителя.

Очистку растворителей проводят перегонкой при температуре 60 - 70°С.

#### 3.2. Подготовка хроматографа к работе

При работе на хроматографе с детектором электронного захвата (ECD-детектор) используют кварцевую капиллярную колонку с неподвижной жидкой фазой SE-54 длиной 25 м, с внутренним диаметром 0.32 мм и толщиной неподвижной фазы 0.25 мкм.

Температура термостата колонки программируется в пределах от 50°С до 280°С, температура инжектора - 290°С, температура детектора - 320°С.

#### 3.3. Калибровка хроматографа

Для приготовления количественного стандартного раствора смеси хлорорганических пестицидов, применяемого для калибровки газового хроматографа, используют хлорорганические пестициды с известной степенью чистоты: α-НСН; β-НСН; γ-НСН; δ-НСН; Heptachlor; Aldrin; Heptachlor Epoxide; o.p-DDE; p.p-DDE; o.p-DDD; p.p-DDD; o.p-DDT; p.p-DDT.

Приготовление основного раствора: 10 мг каждого из вышеперечисленных хлорорганических пестицидов, взвешенного с точностью до 0.001 мг, количественно переносят в отдельную мерную колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup> и растворяют в гексане, доводя объем до метки. Концентрация пестицида в полученном растворе равна 100 мкг/см<sup>3</sup>.

Приготовление промежуточного раствора: 5 см<sup>3</sup> основного раствора каждого пестицида количественно переносят в мерную колбу на 100 см<sup>3</sup> и растворяют в гексане, доводя объем до метки. Полученный раствор содержит смесь пестицидов и концентрация каждого пестицида равна 5 мкг/см<sup>3</sup>.

Приготовление рабочего раствора: 2 см<sup>3</sup> промежуточного раствора смеси хлорорганических пестицидов количественно переносят в мерную колбу на 100 см<sup>3</sup> и растворяют в гексане, доводя объем до метки. В полученном растворе концентрация каждого хлорорганического пестицида равна 100 нг/см<sup>3</sup>.

Для расчета коэффициентов чувствительности ECD-детектора и предела обнаружения хлорорганических пестицидов в хроматограф вводят 1 мкл рабочего раствора, т.е. 100 пг каждого хлорорганического пестицида.

Пределом обнаружения пестицида считается высота пика, десятикратно превышающая уровень шума детектора.

### **3.4. Отбор проб**

Отбор проб проводят по ГОСТ 7631-85 «Рыба, морские млекопитающие, морские беспозвоночные и продукты их переработки. Правила приемки, органолептические методы оценки качества, методы отбора проб для лабораторных испытаний» и ГОСТ 8756.0-70 «Продукты пищевые консервированные. Отбор проб и подготовка их к испытанию».

### **3.5. Подготовка образца**

Рыбу очищают от чешуи, внутренних органов и разделяют на филе. Филе гомогенизируют.

Мясо, овощи, фрукты, грибы пропускают сначала через мясорубку, а затем гомогенизируют.

Навеску приготовленного образца (10 г), взвешенную с точностью до 0.01 г, помещают в фарфоровую ступку и растирают с безводным серноокислым натрием до получения гомогенной рассыпчатой массы. Затем содержимое ступки переносят в коническую колбу на 250 см<sup>3</sup>, приливают 30 см<sup>3</sup> ацетона и 30 см<sup>3</sup> гексана, помещают в аппарат для встряхивания, где экстрагируют в течение 1 часа. После этого содержимое колбы отфильтровывают под вакуумом в чистую колбу через стеклянный пористый фильтр №4.

Осадок с фильтра переносят в исходную колбу и повторяют экстракцию вышеописанным способом в течение 30 минут, после чего осадок на фильтре дважды промывают 5 см<sup>3</sup> гексана. Все экстракты объединяют, переносят в делительную воронку, приливают 250 см<sup>3</sup> дистиллированной воды, осторожно встряхивают в течение 5-7 мин и после полного расслоения гексановый слой сливают в колбу, а нижний водно-ацетоновый слой экстрагируют еще дважды: 15 и 10 см<sup>3</sup>.

Гексановые экстракты объединяют, пропускают через безводный сульфат натрия (30 – 40 г) для полного обезвоживания и концентрируют на роторном испарителе при температуре +35°C. Для очистки гексановых экстрактов применяют концентрированную серную кислоту: в делительную воронку к экстракту приливают H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (в соотношении 1:6 по объему) и осторожно встряхивают во избежание появления эмульсии на границе раздела. После расслоения кислотную фазу отбрасывают. Очистку повторяют до тех пор, пока кислота не перестанет окрашиваться и мутнеть. После этого гексановый экстракт 2 - 3 раза промывают равным количеством дистиллированной воды до нейтральной реакции по лакмусовой бумаге и пропускают через безводный сульфат натрия. Экстракт упаривают досуха, добавляют 2 – 4 см<sup>3</sup> ацетона для удаления следов воды и снова упаривают досуха.

Охлажденный остаток растворяют в 5 см<sup>3</sup> гексана.

#### 4. ПРОВЕДЕНИЕ ИСПЫТАНИЙ

Из пробирки микрошприцом, тщательно промытым гексаном, отбирают 1 мкл раствора пестицидов и вводят его в хроматограф, предварительно подготовленный к работе. В результате анализа получают хроматограмму.

Полихлорированные бифенилы в образце определяют по методике определения ПХБ.

#### 5. ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Концентрацию хлорорганических пестицидов в исследуемом образце рассчитывают по формуле:

$$C_{np.} = \frac{C_{см.} \cdot S_{np.} \cdot V_{np.}}{S_{см.} \cdot W_{обр.}}$$

где  $C_{np.}$  - концентрация *i*-го пестицида в образце, мкг/кг;  
 $C_{см.}$  - концентрация *i*-го пестицида в стандартном растворе, нг/см<sup>3</sup>;  
 $S_{np.}$  - площадь пика *i*-го пестицида в образце, усл. ед;  
 $S_{см.}$  - площадь пика *i*-го пестицида в стандартном растворе, усл. ед;  
 $V_{np.}$  - объем пробы, см<sup>3</sup>;  
 $W_{np.}$  - навеска исследуемого образца, г.

# ОПРЕДЕЛЕНИЕ 2,4-ДИХЛОРФЕНОУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ (2,4-Д) И АМИННОЙ СОЛИ 2,4-Д (2,4-ДА) МЕТОДОМ ГАЗОЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ (Копыленко Л.Р., Полуяков В.Ф.)

## 1. СУЩНОСТЬ МЕТОДА

Метод основан на экстракции и одновременном гидролизе 2,4-Д до свободной феноксикислоты 2,4-Д 1N раствором серной кислоты при одновременном перераспределении 2,4-Д в диэтиловый эфир, последующем перераспределении 2,4-Д в 1N раствор едкого натра, очистке последнего хлороформом, перераспределении 2,4-Д в кислый раствор, экстракции диэтиловым эфиром, концентрировании экстракта и этерификации сухого остатка с помощью этилового и (или) бутилового спиртов в присутствии концентрированной серной кислоты.

## 2. АППАРАТУРА, МАТЕРИАЛЫ И РЕАКТИВЫ

- Газовый хроматограф, оснащенный детектором электронного захвата.
- Аппарат для встряхивания.
- Весы лабораторные 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г по ГОСТ 24104-88.
- Воронка химическая с диаметром 3.5-4.5 см по ГОСТ 25336-82.
- Воронка для сыпучих веществ с НШ 29 по ГОСТ 25336-82.
- Воронка делительная вместимостью 25, 30 и 250 см<sup>3</sup> по ГОСТ 25336-82.
- Гомогенизатор.
- Колба плоскодонная коническая с притертой пробкой вместимостью 250 см<sup>3</sup> по ГОСТ 25336-82.
- Колба мерная вместимостью 25, 50 и 100 см<sup>3</sup> по ГОСТ 25336-82.
- Мерные цилиндры вместимостью 50 и 100 см<sup>3</sup>.
- Микропипетки вместимостью 0,2; 1; 2 и 5 см<sup>3</sup>.
- Микрошприц вместимостью 10 мкл.
- Насос вакуумный.
- Насос водоструйный лабораторный стеклянный по ГОСТ 25336-82.
- Пробирки градуированные с притертыми пробками вместимостью 10 и 20 см<sup>3</sup> по ГОСТ 25336-82.
- Ротационный испаритель.
- Вата обезжиренная, промываемая эфиром и гексаном.
- Кальция хлорид Ч., прокаленный.
- Кислота серная по ГОСТ 4204-77, ХЧ, концентрированная, 1N раствор.
- Натрия гидроксид (едкий натр) по ГОСТ 4328-77 Ч., 1N раствор.

- Сульфат натрия безводный ЧДА, 10%-ный раствор.
- Спирт бутиловый ЧДА, перегнанный.
- Хлороформ по ГОСТ 20015-77, перегнанный.
- Спирт этиловый ректификат по ГОСТ 5962-67, перегнанный.

### **3. ПОДГОТОВКА К ИСПЫТАНИЮ**

#### **3.1. Проверка чистоты растворителей**

Чистоту гексана, ацетона, хлороформа и диэтилового эфира проверяют на газовом хроматографе. Для этого 100 см<sup>3</sup> растворителя упаривают до объема 5 см<sup>3</sup>. Для анализа берут 1 мкл. Появление на хроматограмме дополнительного пика свидетельствует о недостаточной чистоте растворителя.

Очистку растворителей проводят перегонкой при температуре 60-70°C.

#### **3.2. Подготовка хроматографа к работе**

При работе на хроматографе с детектором электронного захвата (ECD-детектор) используют кварцевую капиллярную колонку с неподвижной жидкой фазой SE-54 длиной 25 м, с внутренним диаметром 0.32 мм и толщиной неподвижной фазы 0.25 мкм.

Температура термостата колонки программируется в пределах от 50°C до 280°C, температура инжектора - 290°C, температура детектора - 320°C.

#### **3.3. Приготовление растворов 2,4-Д**

Приготовление основного раствора: 1 г 2,4-Д, взвешенного с точностью до 0.0002 г, количественно переносят в отдельную мерную колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup> и растворяют в ацетоне, доводя объем до метки. Раствор хранят в течение полугода в холодильнике. Концентрация 2,4-Д в полученном растворе равна 10 мг/см<sup>3</sup>.

Приготовление рабочего раствора: 2 см<sup>3</sup> основного раствора каждого пестицида количественно переносят в мерную колбу на 100 см<sup>3</sup> и растворяют в ацетоне, доводя объем до метки. Хранят в холодильнике не более месяца. Концентрация 2,4-Д в полученном растворе равна 200 мкг/см<sup>3</sup>.

#### **3.4. Приготовление стандартных (градуировочных) растворов этилового и бутилового эфиров 2,4-Д**

В пробы продуктов из гидробионтов (3 навески по 20 г), помещенные в бюксы, вносят 4 см<sup>3</sup> дистиллированной воды. Бюксы закрывают и оставляют на 20-28 часов, после чего в каждый бюкс вносят с помощью микропипетки соответственно: 0.1, 1.0 и 10.0 см<sup>3</sup> стандартного рабочего раствора, получая концентрацию 1.0; 10; 100 мг/кг 2,4-Д. Содержимое бюксов перемешивают стеклянной палочкой в течение 2-3 мин и оставляют открытыми на 2 - 3 суток вдали от солнечных лучей и вентиляционных устройств до воздушно-сухого

состояния навесок образцов. После этого бюксы закрывают и навески выдерживают в темном месте не менее недели (но не более 2 недель), извлекают 2,4-Д, очищают экстракты, концентрируют их и проводят этерификацию.

Объединенные гексановые экстракты этилового или (и) бутилового эфира 2,4-Д, полученные после извлечения 2,4-Д из соответствующих навесок образцов и последующей этерификации, используют в качестве градуировочных (стандартных) растворов при определении методом ГЖХ.

Перед анализом в день хроматографирования отбирают по 2-3 см<sup>3</sup> растворов и очищают их концентрированной серной кислотой, добавляя ее по 0.5-0.8 см<sup>3</sup>.

Градуировочные растворы, не очищенные серной кислотой, хранят не более 2 месяцев в холодильнике. Градуировочные растворы, очищенные серной кислотой, хранению не подлежат.

При использовании в качестве эталонного эфира 2,4-Д, полученного после этерификации 2,4-Д, внесенной в образцы, аналогичные исследуемым, стандартное отклонение среднего значения определения не превышает 25%.

Пределом обнаружения 2,4-Д считается высота пика, десятикратно превышающая уровень шума детектора.

### 3.5. Отбор проб

Отбор проб проводят в соответствии с ГОСТ 7631-85 и 8756.0-70 и методическими указаниями Минздрава СССР № 2051-79.

### 3.6. Подготовка образца

**Экстракция образцов продуктов из гидробионтов.** Мышечную ткань гидробионтов гомогенизируют.

Навеску массой 20 г помещают в коническую колбу на 250 см<sup>3</sup>, приливают 30 см<sup>3</sup> 1N раствора серной кислоты. Затем вносят 1 см<sup>3</sup> ацетона, тщательно перемешивают, закрывают колбу и оставляют на 1 час. В течение этого времени ее 2-3 раза энергично встряхивают вручную в течение 1-2 мин. Затем добавляют 60 см<sup>3</sup> этилового эфира и устанавливают на аппарате для встряхивания на 30 мин. После этого содержимое колбы отфильтровывают под вакуумом в чистую колбу через стеклянный пористый фильтр №1, добавляя NaCl для разделения водной фазы. Остаток с пористого фильтра переносят в исходную колбу с помощью 10 см<sup>3</sup> 1N раствора серной кислоты и 1 см<sup>3</sup> ацетона, энергично встряхивают вручную в течение 1-2 мин, добавляют 20 см<sup>3</sup> эфира и встряхивают на аппарате Шуттеля 15 мин.

Содержимое делительной воронки осторожно встряхивают 1-2 мин, дают отстояться 10-15 мин. Водный слой отделяют и отбрасывают.

**Очистка экстрактов.** К эфирному экстракту в делительной воронке добавляют 25 см<sup>3</sup> 1N раствора гидроксида натрия и содержимое энергично встряхивают 1-2 мин. Эфирный слой отделяют и отбрасывают, а к водно-щелочному добавляют 20 см<sup>3</sup> хлороформа и энергично встряхивают в течение 1-2 мин. Нижний хлороформный слой удаляют. К очищенному экстракту добавляют 1 см<sup>3</sup> концентрированной серной кислоты, встряхивают, оставляют на 10-15 мин, добавляют 30 см<sup>3</sup> эфира, энергично встряхивают 1-2 мин и оставляют до разделения слоев. Водный слой сливают в колбу. Эфирный слой сливают через верх воронки, фильтруя через сульфат натрия (10-15 г), помещенный в химическую воронку с подложкой из обезжиренной ваты. Водный слой снова переносят в делительную воронку и экстрагируют 20 см<sup>3</sup> эфира, также отделяя эфирный слой и фильтруя его через ту же порцию сульфата натрия.

**Этерификация.** Осушенный эфирный экстракт концентрируют на ротационном испарителе до 2-3 см<sup>3</sup>. Остаток переносят в пробирку, колбу смывают 1-2 см<sup>3</sup> эфира и присоединяют к эфирному экстракту пробирки. С помощью пипетки с грушей эфир в пробирке удаляют, к сухому остатку добавляют сначала 1 см<sup>3</sup> спирта (этилового или бутилового), а затем - 0.5 см<sup>3</sup> концентрированной серной кислоты. Пробирку с реакционной смесью закрывают и помещают на кипящую водяную баню так, чтобы в кипящей воде находилась 1/2 часть пробирки, и нагревают при температуре около 100°C в течение 20 мин. Затем содержимое охлаждают. Во все пробирки добавляют по 4 см<sup>3</sup> гексана и энергично их встряхивают. Отделяют гексановый слой в делительной воронке, оставляя нижний слой, который встряхивают с новой порцией гексана (4 см<sup>3</sup>). К объединенным гексановым экстрактам (8 - 9 см<sup>3</sup>) приливают по 5 см<sup>3</sup> 10%-ного раствора сульфата натрия и энергично встряхивают. Гексановый слой в делительной воронке отделяют от водного. Во избежание появления на хроматограмме пиков, время удерживания которых близко или совпадает с временем удерживания этилового или бутилового эфиров 2,4-Д, гексановый экстракт эфиров очищают серной кислотой. Для этого к гексановому экстракту, помещенному в делительную воронку, приливают 23 см<sup>3</sup> концентрированной серной кислоты и осторожно встряхивают. Через 10-15 мин слой кислоты отделяют. Очистку гексанового экстракта проводят серной кислотой до тех пор, пока кислота не станет бесцветной. После этого гексановый экстракт 2 - 3 раза промывают равным или большим количеством дистиллированной воды до нейтральной реакции по лакмусовой бумаге. Гексановый экстракт сливают в пробирку, пропуская через безводный сульфат натрия.

Этерификацию различными спиртами проводят двумя способами: либо экстракт делят на две части и каждую часть этерифицируют этиловым или бутиловым спиртом, либо этерифицируют экстракты, полученные из двух параллельных навесок образца. В любом случае соответствующий спирт добавляют к сухому остатку после удаления из экстракта растворителя. Если проведена очистка гексанового экстракта эфира 2,4-Д (этилового или бутилового), полученного из исследуемой пробы, очистке должен быть подвергнут и соответствующий градуировочный раствор.

#### 4. ПРОВЕДЕНИЕ ИСПЫТАНИЙ

Из пробирки микрошприцом, тщательно промытым гексаном, отбирают 1 мкл гексанового экстракта эфира 2,4-Д (этилового или бутилового) и вводят его в хроматограф, предварительно подготовленный к работе. В результате анализа получают хроматограмму.

#### 5. ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Концентрацию 2,4-Д и аминной соли 2,4-Д в исследуемом образце рассчитывают по формуле:

$$C_{np.} = \frac{C_{ст.} \cdot S_{np.} \cdot V_{np.}}{S_{ст.} \cdot W_{обр.}}$$

- где  $C_{np.}$  - концентрация анализируемого эфира в образце, мг/кг;  
 $C_{ст.}$  - концентрация анализируемого эфира в стандартном растворе, мкг/см<sup>3</sup>;  
 $S_{np.}$  - площадь пика анализируемого эфира в образце, усл. ед;  
 $S_{ст.}$  - площадь пика анализируемого эфира в стандартном растворе, усл. ед;  
 $V_{np.}$  - объем пробы, см<sup>3</sup>;  
 $W_{np.}$  - навеска исследуемого образца, г.



# ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ПОЛИХЛОРИРОВАННЫХ БИФЕНИЛОВ

(Копыленко Л.Р., Хромых Н.Н. Катышкова Т.И.)

Методика предназначена для контроля за содержанием наиболее распространенных полихлорированных бифенилов (ПХБ) в гидробионтах с применением хромато-масс-спектрометрии. Предел обнаружения для отдельных ПХБ составляет 1нг при массе пробы 20 г.

## 1. СУЩНОСТЬ МЕТОДА

Метод основан на извлечении полихлорированных бифенилов из пробы органическим растворителем, очистке экстракта и определении содержания полихлорированных бифенилов с использованием хромато-масс-спектрометра.

## 2. АППАРАТУРА, МАТЕРИАЛЫ И РЕАКТИВЫ

- Хромато-масс-спектрометр, имеющий в режиме селективного детектирования ионов чувствительность по метилстеарату не менее 10 пг при соотношении сигнал/шум не менее 3:1.
- Кварцевая капиллярная колонка с неподвижной жидкой фазой DB-5 длиной 60 м, с внутренним диаметром 0.25 мм и толщиной неподвижной фазы 0.20 мкм.
- Аппарат ULTRASONIC или аналогичный.
- Аппарат для встряхивания.
- Весы лабораторные 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г по ГОСТ 24104-88.
- Прибор для перегонки растворителей, состоящий из перегонной колбы на 1 л, дефлегматора, обратного холодильника, аллонжа и приемной колбы на 100 мл.
- Баня масляная.
- Воронка Бюхнера по ГОСТ 9147.
- Насос водоструйный лабораторный по ГОСТ 25336-82.
- Делительная воронка вместимостью 250 см<sup>3</sup> по ГОСТ 25336-82.
- Делительная воронка вместимостью 50 см<sup>3</sup> по ГОСТ 25336-82.
- Колба коническая вместимостью 100 см<sup>3</sup> по ГОСТ 25336-82.
- Колба коническая вместимостью 50 см<sup>3</sup> по ГОСТ 25336-82.
- Колба Бунзена.
- Пробирки мерные вместимостью 10 см<sup>3</sup> по ГОСТ 25336-82.
- Ротационный испаритель.
- Термометр (0-100°С)
- Электроплитка бытовая с закрытой спиралью и регулятором нагревания по ГОСТ 14919.

- Шприц стеклянный вместимостью 1 см<sup>3</sup>.
- Цилиндр мерный вместимостью 100 см<sup>3</sup> по ГОСТ 25336-82.
- н-Гексан, ХЧ дополнительно очищенный перегонкой.
- Вода дистиллированная по ГОСТ 7609-72.
- Дихлорметан, ОСЧ дополнительно очищенный перегонкой.
- Кислота серная концентрированная, ОСЧ по ГОСТ4204-77.
- Натрий серноокислый безводный, ЧДА прогретый при 650 0С в течение 5 часов.
- Калия гидроксид, ХЧ по ГОСТ 5295-78.
- Натрий углекислый, ЧДА
- Стандартные растворы индивидуальных ПХБ или их смеси в н-гексане с концентрацией 0.5-15 нг/см<sup>3</sup>.

### **3. ПОДГОТОВКА К ИСПЫТАНИЮ**

#### **3.1. Подготовка хромато-масс-спектрометра к работе**

При работе на хромато-масс-спектрометре используют кварцевую капиллярную колонку с неподвижной жидкой фазой DB-5 длиной 60 м, с внутренним диаметром 0.25 мм и толщиной неподвижной фазы 0.20 мкм.

Температура термостата колонки программируется в пределах от 100°С до 280°С, температура инжектора - 280°С, температура ионного источника - 150°С, ионизирующее напряжение - 70В.

#### **3.2. Отбор проб**

Исследуемый образец в количестве 20 г, взвешенный с точностью до 0,01 г, измельчают на гомогенизаторе.

#### **3.3. Подготовка образца**

Измельченную пробу перемешивают в фарфоровой ступке с безводным сульфатом натрия в соотношении 1:4 до образования рассыпчатой массы. Смесь переносят в стеклянную колбу вместимостью 250 см<sup>3</sup>, добавляют 120 см<sup>3</sup> смеси растворителей гексан-дихлорметан в соотношении 1:1 и обрабатывают на аппарате ULTRASONIC в течение 10-20 минут. После этого смесь встряхивают на шуттель-аппарате не менее 2 часов. Далее раствор отфильтровывают на воронке Бюхнера, после чего остаток промывают небольшими порциями гексана и объединяют их с отфильтрованным экстрактом. Экстракт переносят в делительную воронку. Гексановый слой собирают в стеклянную колбу, а слой, содержащий дихлорметан, дополнительно дважды экстрагируют гексаном (20 мл и 15 мл).

Гексановые экстракты объединяют и переносят в перегонную колбу, гексан удаляют на ротационном испарителе при температуре водяной бани 35°С. Остаток в перегонной

колбе растворяют н-гексаном и переносят в делительную воронку, дважды ополоснув колбу гексаном.

В делительную воронку с гексановым экстрактом добавляют концентрированную серную кислоту (объем 1:4) и аккуратно встряхивают воронку. Обработку экстракта серной кислотой продолжают до тех пор, пока сернокислотный слой не будет оставаться прозрачным и совершенно бесцветным. Органический слой обрабатывают 0.5%-ным раствором углекислого натрия до нейтральной реакции промывных вод по универсальной индикаторной бумаге, переносят в колбу, добавляют безводный сульфат натрия и оставляют на 4-5 часов.

Раствор отфильтровывают в мерную пробирку, промывают осушитель гексаном и упаривают фильтрат до 100 мкл.

## 4. ПРОВЕДЕНИЕ ИСПЫТАНИЙ

### 4.1. Идентификация ПХБ

Идентификацию индивидуальных ПХБ проводят по селективным ионам 256, 292, 326, 360, 362 и 394, а так же с учетом хроматографических параметров удерживания этих соединений на выбранной колонке.

### 4.2. Количественное определение ПХБ

Количественное определение ПХБ проводят методом абсолютной калибровки по стандартным растворам индивидуальных ПХБ или их смеси в н-гексане.

## 5. ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Расчет концентрации индивидуальных ПХБ проводят по формуле:

$$C_{np.} = \frac{C_{ст.} \cdot S_{np.} \cdot V_{np.}}{S_{ст.} \cdot W_{обр.}}$$

где  $C_{np.}$  - концентрация i-го бифенила в образце, мкг/кг;  
 $C_{ст.}$  - концентрация i-го бифенила в стандартном растворе, нг/см<sup>3</sup>;  
 $S_{np.}$  - площадь пика i-го бифенила в образце, усл. ед;  
 $S_{ст.}$  - площадь пика i-го бифенила в стандартном растворе, усл. ед;  
 $V_{np.}$  - объем пробы, см<sup>3</sup>;  
 $W_{np.}$  - навеска исследуемого образца, г.

# **ОПРЕДЕЛЕНИЕ 2,3,7,8-ТЕТРАХЛОРДИБЕНЗОДИОКСИНА МЕТОДОМ ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ**

(Копыленко Л.Р., Шевцов В.К., Понамарев М.Ю., Хромых Н.Н.)

Определение полихлордибензодиоксина относится к числу наиболее сложных аналитических задач. Это обусловлено чрезвычайно низкой концентрацией диоксинов в пищевых продуктах (порядка 1 нг/кг - 1 ppt - часть/триллион). Низкий уровень концентраций, подлежащих определению, накладывает высокие требования к качеству подготовки проб к анализу, проведению анализа и обработки результатов анализа.

## **1. СУЩНОСТЬ МЕТОДА**

Данная методика предназначена для определения 2,3,7,8 - тетрахлордибензодиоксина методом хромато-масс-спектрометрии в диапазоне массовых концентраций 50-500 нг/кг при массе пробы 20 г.

## **2. АППАРАТУРА, МАТЕРИАЛЫ И РЕАКТИВЫ**

- Хромато-масс-спектрометр, имеющий в режиме селективного детектирования ионов чувствительность по метилстеарату не менее 10 пг при соотношении сигнал/шум не менее 3:1.
- Газовый хроматограф в системе ХМС, оборудованный инжектором и интерфейсом для капиллярных кварцевых колонок.
- Кварцевая капиллярная колонка с неподвижной жидкой фазой DB-5 длиной 60 м, с внутренним диаметром 0.25 мм и толщиной неподвижной фазы 0.20 мкм.
- Воронка делительная стеклянная, ГОСТ 25366-82.
- Колонки хроматографические.
- Шприцы на 1 и 10 мкл.
- Азот, ОСЧ., ГОСТ 9293-87.
- Ацетон, ЧДА, ГОСТ 2603-79.
- Бензол, ХЧ, ГОСТ 5955-75.
- Вода дистиллированная, ГОСТ 7602-72.
- Гелий ОСЧ., ТУ 51-940-80.
- н - Гексан, ХЧ, ТУ 609-4521-77.
- Изооктан.
- Калий гидроокись, ГОСТ 5295-78.
- Метанол для хроматографии, ОСЧ, ТУ 6-09-2192-85.
- Натрий сернокислый, ХЧ, ГОСТ 4166-76.
- Серная кислота, ОСЧ ГОСТ 14262-78.
- Силикагель марки 60, АСКГ, ГОСТ 3956-76.

- Тoluол, ХЧ, ТУ 6-09-4305-76.
- Уголь активированный.
- Флоризил, 60-100 меш.
- Хлористый метилен, ОСЧ, ТУ 6-09-14-2149-83.
- Целит 545, Baker.

Градуировочные растворы для количественного анализа, содержание основного вещества – 99%.

Стандарт	Раствор	Концентрация калибровочных растворов, пг/мкл в нонане				
		1	2	3	4	5
2,3,7,8 - ТХДД	(С)	100	200	400	600	1000
<sup>37</sup> CL <sub>4</sub> 2,3,7,8 - ТХДД	(В)	100	400	1000		
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> 2,3,7,8 - ТХДД	(А)	100	400	1000		

### 3. ПОДГОТОВКА К ИСПЫТАНИЮ

#### 3.1. Подготовка хромато-масс-спектрометра к работе

При работе на хромато-масс-спектрометре используют кварцевую капиллярную колонку с неподвижной жидкой фазой DB-5 длиной 60 м, с внутренним диаметром 0.25 мм и толщиной неподвижной фазы 0.20 мкм.

Температура термостата колонки программируется в пределах от 50°C до 290°C, температура инжектора - 250°C, температура ионного источника - 150°C, ионизирующее напряжение - 70В. Регистрируемые селективные ионы: 320, 322, 324 – для ТХДД, 332, 334 – для <sup>13</sup>C<sub>12</sub>-ТХДД и 328 – для <sup>37</sup>CL<sub>4</sub>-ТХДД.

#### 3.2. Калибровка хромато-масс-спектрометра

Калибровку хромато-масс-спектрометра проводят по стандартным смесям А.

#### 3.3. Подготовка реактивов

Сульфат натрия сушат 24 часа при 650°C. После охлаждения хранят в склянке из темного стекла.

Силикагель 60 меш очищают в аппарате Сокслета 8 часов метанолом. Сушат на воздухе 12 часов. Затем в течение 24 часов сушат под вакуумом при 25°C. Хранят в склянке из темного стекла. Перед использованием активируют 24 часа при 105°C.

5 см<sup>3</sup> серной кислоты смешивают в 250 см<sup>3</sup> колбе с 10 г целита 545 (Baker).

Подготовка силиката калия: 56 г высокочистого КОН растворяют в 300 см<sup>3</sup> метанола, добавляют к смеси 100 г силикагеля и перемешивают 1 час при 65°C. Можно перемешивать в круглодонных колбах вместимостью 1000 или 2000 см<sup>3</sup> на роторном испарителе без вакуума. Охлаждают смесь и удаляют растворитель. Силикат калия помещают в колонку со

стекловатой, промывают дважды  $100 \text{ см}^3$  метанола и один раз  $100 \text{ см}^3$  хлористого метилена, помещают на фольгу и оставляют на 2 часа в испарительной камере, затем переносят на ночь в сушильный шкаф и сушат ночь при температуре  $105^\circ\text{C}$ . Хранят в закрытой мензурке до использования при температуре  $120^\circ\text{C}$ .

Приготовление сорбента силикагель/уголь: 100 г силикагеля (60 - 100 меш) экстрагируют в аппарате Сокслета с метанолом ( $200 \text{ см}^3$ ) 24 часа, сушат под колпаком на воздухе 24 часа, затем под вакуумом (24 часа). Добавляют активированный уголь и мешают до ровного цвета. Помещают в закрытый сосуд и хранят при комнатной температуре.

Флоризил (60 – 100 меш) экстрагируют в аппарате Сокслета метанолом 24 часа, сушат на фольге воздухом. Хранят в закрытом виде. Перед использованием активируют 24 часа при температуре  $120^\circ\text{C}$ .

Приготовление сорбента силикагель/ $\text{H}_2\text{SO}_4$ : 44 г концентрированной серной кислоты смешивают с 56 г очищенной водной кремниевой кислоты. Встряхивают до получения однородного порошка.

### 3.4. Приготовление адсорбционных колонок

Колонка № 1: 30 см х 2,5 см, резервуар –  $300 \text{ см}^3$ .

Колонку заполняют в следующей последовательности: стекловата, 2 г силикагеля, 2 г сульфата натрия, 10 г силикагеля/  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 2 г сульфата натрия.

Колонка № 2: 1 см х 20 см (пипетка на  $10 \text{ см}^3$ ) с резервуаром вместимостью  $100 \text{ см}^3$ .

Колонку заполняют в следующей последовательности: верх и низ колонки – стеклянные шарики, далее 5,0 см (1,5 г) активированного флоризила.

Колонка № 3: микроколонка (4 мм х 200 мм).

Колонку заполняют 300 мг активированного угля, смешанного с силикагелем.

### 3.5. Отбор проб

Пробы рыбы, продуктов из нее, морских млекопитающих и беспозвоночных отбирают по ГОСТ 7631-85, водорослей – по ГОСТ 20438-75, ГОСТ 13496.0-80, консервов и пресервов – по ГОСТ 8756.0-70.

### 3.6. Подготовка образца

Замороженную рыбу измельчают. Хранят в растворителе при температуре минус  $20^\circ\text{C}$ .

20 г образца взвешенного с точностью до 0.01 г измельчают и смешивают в стеклянной посуде со 100 г ангидрида сульфата натрия. Если в образце большое содержание воды, смесь оставляют на ночь до образования твердой массы. Получившуюся сухую смесь тщательно перемешивают.

В аппарат Сокслета помещают образец, добавляют 40 мкл изотопного стандарта С с концентрацией 100 пг/мкл (из расчета концентрации 200 пг/г образца) и экстрагируют не менее 12 часов смесью гексан/хлористый метилен (1:1). Экстракт переносят в устройство Кудерна-Дениша, добавляют кипелки и помещают на водяную баню. Затем удаляют растворитель в мягкой струе воздуха, взвешивают устройство Кудерна-Дениша (К-Д), переносят остаток экстракта в хроматографическую колонку № 1, добавляют 40 мкл изотопного стандарта В и элюируют 100 см<sup>3</sup> гексана. Элюат отбрасывают. Затем элюируют колонку 5% смесью бензол/гексан в К-Д, добавляют 1 см<sup>3</sup> изооктана, элюат переносят в колонку № 2 с флоризилом, промывают 20 см<sup>3</sup> хлористого метилена и 10 см<sup>3</sup> гексана.

Образец и смыв (2 см<sup>3</sup> гексана) количественно переносят на колонку № 2, элюируют 20 см<sup>3</sup> 2% смеси хлористый метилен/гексан. Элюат отбрасывают.

Колонку № 3 промывают 10 см<sup>3</sup> толуола, затем 50 см<sup>3</sup> хлористого метилена, элюат переносят в колонку № 3, колонку промывают 10 см<sup>3</sup> хлористого метилена, подсоединяют резервуар для сбора элюата. Когда образец полностью элюирован из микроколонки, резервуар промывают дважды 2 см<sup>3</sup> 25% смеси бензол/хлористый метилен. После этого пропускают через колонку 11 см<sup>3</sup> 25% смеси бензол/хлористый метилен, подставляют приемный резервуар к колонке и ПХДД элюируют 25 см<sup>3</sup> толуола. Толуольную фракцию переносят в грушевидный флакон (25 см<sup>3</sup>), упаривают на водяной бане при температуре 60°C под мягкой струей очищенного на угле воздуха до 100 мкл. Образец переносят в микровиалу, используя толуол для ополаскивания, и упаривают до 50 мкл.

## 4. ПРОВЕДЕНИЕ ИСПЫТАНИЙ

### 4.1. Идентификация

**Ионный критерий.** Реконструированная по селективным ионам хроматограмма должна содержать все характеристические ионы, включая количественный (320) и подтверждающий (322) для ТХДД, а также ионы М-СОСL. Соотношение интенсивностей пиков ионов 320 и 322 для ТХДД должно находиться в интервале 0.65-0.89 (стандартное соотношение согласно табличных данных – 0.77).

**Критерий по относительным временам удерживания.** Относительное время удерживания 2,3,7,8-ТХДД (RRT) определяется как отношение времени удерживания стандарта А к времени удерживания стандарта С и составляет 0.999. Отклонение RRT должно быть не более 5.

## 5. ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Расчет концентрации 2,3,7,8-ТХДД в исследуемом образце проводят по формуле:

$$C_{обр.} = \frac{S_i \cdot C_{ст.} \cdot V_{обр.} \cdot 1000}{S_{ст.} \cdot V_{пр.} \cdot W_{пр.} \cdot K_{извл.}},$$

- где  $C_{обр.}$  - содержание 2,3,7,8-ТХДД в исследуемом образце, нг/кг;  
 $S_i$  - площадь пика 2,3,7,8-ТХДД, отн. ед;  
 $S_{ст.}$  - площадь пика количественного стандарта, отн. ед;  
 $V_{обр.}$  - объем органического экстракта, мкл;  
 $C_{ст.}$  - содержание 2,3,7,8-ТХДД, отн. ед.;  
 $V_{пр.}$  - объем пробы, вводимой для анализа, мкл;  
 $W_{пр.}$  - навеска исследуемого образца, г;  
 $K_{извл.}$  - коэффициент извлечения, определяемый по изотопному стандарту А.

$$K_{извл.} = \frac{C_{ТХДД_{извл.}}}{C_{ТХДД_{ввод.}}},$$

- где  $C_{ТХДД_{извл.}}$  и  $C_{ТХДД_{ввод.}}$  - содержание  $^{13}\text{C}_{12}$ -2,3,7,8-ТХДД (нг) в изотопном стандарте А до и после экстракции соответственно.

Коэффициент извлечения проверяется по изотопному стандарту А для трех концентраций с учетом погрешности определения  $K_{извл.} > 0,8$ .



# ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛЕТУЧИХ N-НИТРОЗАМИНОВ (МУК 4.4.1.011-93) (Тутельян В.А., Жукова Г.Ф., Хотимченко С.А., Грачева И.Н., Хесина А.Я., Головин А.Н., Волкова И.М.)

## ФЛЮОРИМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД

### 1. СУЩНОСТЬ МЕТОДА

Метод определения N-нитрозаминов в пищевых продуктах и продовольственном сырье состоит из выделения летучих N-нитрозаминов (НА) путем перегонки с паром или в вакууме; экстракции хлористым метилом НА из водного дистиллята; концентрации экстракта; денитрозирования НА бромистым водородом в уксусной кислоте; алкилирования образовавшихся аминов 8-метокси-5-хиолинсульфонилазиридином (КАЗ); разделения и количественного определения образовавшихся флуоресцирующих 8-метокси-5[N-(2-N-диэтиламино)] хиолинсульфонамидных производных (КАЭ-производные) в тонком слое силикагеля.

Идентификацию НА осуществляют сравнением подвижности в тонком слое силикагеля флуоресцирующих КАЭ-производных из образца с подвижностью соответствующих стандартных производных: диметиламина – КАЭ-ДМА, диэтиламина – КАЭ-ДЭА, дипропиламина – КАЭ-ДПА.

В основе полуколичественного определения лежит визуальное сравнение интенсивности флуоресценции пятен КАЭ-производных из образца с интенсивностью флуоресценции пятен стандартных соединений. При необходимости возможно также количественное определение путем измерения величины флуоресценции КАЭ-производных.

Нижний предел обнаружения НА – 1 мкг/кг продукта.

### 2. АППАРАТУРА, МАТЕРИАЛЫ И РЕАКТИВЫ

- Бани глицериновые, водяные.
- Весы технические по ГОСТ 19491-74 и весы аналитические по ГОСТ 24104-80.
- Делительные воронки емкостью 5 и 250 см<sup>3</sup> по ГОСТ 23932-79 и ГОСТ 25336-82.
- Дефлегматор елочный по ГОСТ 20729-75.
- Камеры для ТСХ с притертой крышкой, например, стеклянные четырехугольные сосуды 195 x 195 x 200 мм завода «Дружная горка».
- Колбы круглодонные на 1000, 500 и 5 см<sup>3</sup> по ТУ 48-52.
- Колбы мерные или пробирки мерные 2, 5, 25, 50 см<sup>3</sup> по ГОСТ 25366-82.
- Колбы плоскодонные вместимостью 250 см<sup>3</sup> по ГОСТ 25366-82.
- Контактные термометры по ГОСТ 9871-75.
- Микрошприц МШ-10 на 10 мкл или калиброванные стеклянные капилляры.

- Мясорубка или гомогенизатор по ГОСТ 15906-79.
- Насадка для паровика.
- Насос водоструйный по ГОСТ 10696-75.
- Пипетки вместимостью 1, 2 см<sup>3</sup> по ГОСТ 20292-74.
- Пластинки для ТСХ (без флуоресцентного индикатора).
- Прибор для флуоресцентного анализа витаминов в растворе (модель 833) МРТУ 64-1-1080-63 или диагностическая лампа ОЛД-41.
- Ротационный испаритель с ловушкой по ТУ 25-11-917-76.
- Спектрофлуориметр для анализа ТСХ-пластинок.
- Флуоресцентный спектрофотометр.
- Колбы мерные или пробирки мерные 2, 5, 25, 50 см<sup>3</sup> по ГОСТ 1770-74.
- Холодильник Либиха с аллонжем по ГОСТ 9499-70.
- Холодильник обратный по ГОСТ 23932-79 и 25336-82.
- Шкаф сушильный.
- Электронагреватель по ГОСТ 13268-83.
- Колбонагреватель или электроплитка по ГОСТ 14919-83).
- Штативы Бунзена.
- Цилиндры мерные вместимостью 50, 100, 200 см<sup>3</sup> по ГОСТ 1770-74.
- Эксикатор.
- Аммиак водный по ГОСТ 3760-79.
- Ацетонитрил по ТУ 6-09-3534-74.
- Бензол по ГОСТ 5955-75.
- Вода дистиллированная по ГОСТ 6709-72.
- н-Гексан по ТУ 6-09-5362-68.
- Кальций хлористый прокаленный.
- Кислота бромистоводородная по ГОСТ 2062-76.
- Кислота соляная по ГОСТ 3118-77, водный раствор 0.1N.
- Кислота серная по ГОСТ 4204-77, водный раствор 1N, 5N.
- Кислота уксусная ледяная по ГОСТ 61-75.
- Метилен хлористый, МРТУ 6-09-5362-68.
- Масло вазелиновое, парафиновое.
- Натрия гидроокись по ГОСТ 4328-77, ХЧ, водный раствор 0.1N.
- Натрий серноокислый прокаленный по ГОСТ 18344-78, ХЧ
- Натрий углекислый кислый по ГОСТ 4201-79.
- Натрий хлористый по ГОСТ 4233-77.

- Спирт этиловый по ГОСТ 18300-87.
- Сульфаминовая или сульфаниловая кислота по ГОСТ 5282-78.
- Стандартные и рабочие растворы:
- 8-метокси-5-хинолинсульфонилазиридин (КАЗ).
- 8-метокси-5-[N-(2-N-диэтиламино)]хинолинсульфонамидные производные аминов: диметиламина (КАЭ-ДМА), диэтиламина (КАЭ-ДЭА), дипропиламина (КАЭ-ДПА) – спиртовые растворы концентрации  $C_1$  – 1 мг/мл.
- 2-3% раствор газообразного бромистого водорода в ледяной уксусной кислоте (HBr/AcOH).
- Нитрозодипропиламин (НДПА) – гексановый раствор,  $C$  – 0.2 мг/мл.

### 3. ПОДГОТОВКА К ИСПЫТАНИЮ

#### 3.1. Подготовка реактивов

Пробу реактивов ( $Na_2SO_4$ , NaCl, NaOH и др.) каждой партии в количестве, используемом в эксперименте, выдерживают отдельно в течение 10 мин с 60-70 см<sup>3</sup> хлористого метилена, отфильтровывают, концентрируют до 1 см<sup>3</sup> и анализируют концентрат на наличие НА. При отсутствии НА реактивы используют в работе, при наличии НА – подвергают дополнительной очистке путем перекристаллизации или заменяют на новую партию.

Предназначенный для использования хлористый метилен предварительно подвергают фракционной перегонке. 60-75 см<sup>3</sup> хлористого метилена (количество, используемое при анализе) концентрируют до 1 см<sup>3</sup> и анализируют концентрат на содержание НА флуориметрическим или хемилюминесцентным методом. При отсутствии НА хлористый метилен может быть использован в работе, при обнаружении НА хлористый метилен подвергают дополнительной очистке. Для этого 500 см<sup>3</sup> хлористого метилена дважды промывают концентрированной серной кислотой (2 раза по 30 см<sup>3</sup>) и дистиллированной водой, затем 30% раствором гидроксида натрия и вновь дистиллированной водой до нейтрального pH, высушивают прокаленным хлористым кальцием и проводят фракционную перегонку, собирая фракцию при температуре 40°±0.2°С.

#### 3.2. Приготовление растворов

Рабочий раствор КАЗ. Содержимое ампулы (1 мг КАЗ/5 мл) переносят в мерную колбу на 50 см<sup>3</sup> и доводят до метки этиловым спиртом. Получают раствор КАЗ с концентрацией 0.02 мг/мл. Раствор можно хранить в темной посуде с пришлифованной пробкой в холодильнике не более 1 года.

Стандартный раствор НДПА с концентрацией 2 мкг/мл используют при анализе в качестве внутреннего стандарта. Раствор можно хранить в темной посуде с пришлифованной пробкой в холодильнике не более 1 года.

Стандартные растворы КАЭ-ДМА, КАЭ-ДЭА и КАЭ-ДПА. 2.5 см<sup>3</sup> содержимого каждой ампулы растворов КАЭ-ДМА, КАЭ-ДЭА и КАЭ-ДПА с концентрацией С<sub>1</sub> – 5 мг/5 мл переносят в мерные колбы на 25 см<sup>3</sup>, доводят до метки этиловым спиртом и получают растворы с концентрацией С<sub>2</sub> – 0.1 мг/мл.

Для получения смеси стандартов в мерную колбу вместимостью 25 см<sup>3</sup> переносят оставшуюся часть содержимого ампул (2.5 см<sup>3</sup> каждого КАЭ-производного), раствор доводят до метки этиловым спиртом. Концентрация раствора каждого стандартного производного в этой смеси равна С<sub>2</sub> – 0.1 мг/мл. Для получения смеси стандартов меньших концентраций С<sub>3</sub> и С<sub>4</sub> в мерные колбы на 25 см<sup>3</sup> помещают соответственно 2.5 и 1.25 см<sup>3</sup> стандартного раствора С<sub>2</sub> и растворы доводят до метки этиловым спиртом. Концентрация каждого стандарта в этих смесях соответственно равна С<sub>3</sub> – 10 нг/мкл и С<sub>4</sub> – 5 нг/мкл.

1% раствор кислого углекислого натрия: 1 г кислого углекислого натрия помещают в мерную колбу на 100 см<sup>3</sup> и доводят до метки дистиллированной водой.

2% раствор сульфаниловой (сульфаминовой) кислоты: 20 г сульфаниловой (сульфаминовой) кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 1 дм<sup>3</sup>, добавляют 600 - 800 см<sup>3</sup> дистиллированной воды, перемешивают и добавляют водой до метки.

### 3.3. Отбор проб

Навеску массой 100-300 г (или см<sup>3</sup>) отбирают из средней пробы, подготовленной в соответствии с ГОСТ 7636. Отобранные образцы можно хранить в морозильной камере при температуре минус 8 - 18°С от 1 до 3-х суток в зависимости от сроков реализации продукции.

### 3.4. Выделение нитрозаминов

*Выделение нитрозаминов путем перегонки паром.* Навеску (50-100 г), взятую с точностью 0,01г, измельченного в мясорубке или гомогенизаторе пищевого продукта, помещают в круглодонную колбу вместимостью 500 см<sup>3</sup>, соединенную с паровиком и прямым холодильником. К продукту добавляют 10 г хлористого натрия, 10 г сульфата натрия или магния, 25 - 50 см<sup>3</sup> дистиллированной воды (в зависимости от влажности продукта), 5 см<sup>3</sup> 2% раствора сульфаминовой (или сульфаниловой) кислоты, 5 – 10 см<sup>3</sup> 1N раствора серной кислоты до pH < 3.0, 1 мл гексанового раствора ДПНА. НА отгоняют с водяным паром, собирая 200 - 230 см<sup>3</sup> дистиллята. Если перегонка с паром сопровождается вспениванием массы (пиво, зерно, гидробионты и продукты, вырабатываемые из них),

добавляют 5 - 10 см<sup>3</sup> насыщенного раствора апиэзона в изопропиловом спирте, а в случае спекания продуктов в процессе дистилляции (хлеб, зерно и др.) – мелкие керамические крошки или кусочки стеклянных трубочек. Для наиболее полного выделения НА из алкогольных напитков необходимо разбавить образец водой до получения 20% концентрации в нем спирта. Дистиллят переносят в делительную воронку, и нитрозамины экстрагируют свежеперегнанным хлористым метиленом - 4-5 раз по 15 см<sup>3</sup>.

Примечание: использование других неполярных растворителей: эфир, этилацетат, гексан, хлороформ и др. не рекомендуется, т.к. степень извлечения нитрозаминов из водных растворов очень низка.

Объединенные хлорметиленовые экстракты высушивают прокаленным сульфатом магния, отфильтровывают, осушитель промывают небольшим количеством хлористого метилена, объединенные фильтраты помещают в круглодонную колбу на 100 - 150 см<sup>3</sup>, снабжают дефлегматором (или воздушным холодильником), помещают в водяную баню и упаривают хлористый метилен до 5-7 см<sup>3</sup> выдерживанием при температуре бани 55-65°C. Целесообразно пропускание тока инертного газа через хлорметиленовый раствор. По достижении объема раствора 5-7 см<sup>3</sup> дефлегматор смывают 2 см<sup>3</sup> гексана и продолжают концентрировать пробу до 1-2 см<sup>3</sup>.

**Выделение нитрозаминов перегонкой в вакууме.** Пробу исследуемого продукта массой 20 – 50 г, отвешенную с погрешностью 0.1 г, помещают в круглодонную колбу вместимостью 200 см<sup>3</sup>, добавляют 75 – 80 см<sup>3</sup> дистиллированной воды, 1 см<sup>3</sup> гексанового раствора N-нитрозодипропиламина (НДПА), 4 см<sup>3</sup> 0.1N раствора гидроксида натрия и 20 см<sup>3</sup> парафинового или вазелинового масла для предотвращения перебрасывания массы во время дистилляции и присоединяют к вакуумной системе.

Колбу с исследуемым продуктом помещают на песочную баню, под которой устанавливается газовая горелка; приемную колбу охлаждают смесью сухого льда и гексана (ацетона) или жидким азотом. Установив в системе вакуум до 1 атм., проводят дистилляцию около 1 часа при температуре бани 98-100°C до получения 50 см<sup>3</sup> дистиллята. Чтобы избежать потери НА желательно проводить дистилляцию в закрытой системе, как можно реже подключая ее к вакуумному насосу. Герметичность системы можно сохранить, используя чистую вакуумную смазку или тефлоновые манжеты для шлифов. После окончания дистилляции снимают обогрев, охлаждение, отсоединяют шланг вакуумной системы, наконечник приемника закрывают тефлоном или пробкой. После оттаивания приемной колбы систему перегонки разбирают, насадку ополаскивают несколькими миллилитрами дистиллированной воды, которые добавляют к дистилляту. В круглодонную колбу с дистиллятом добавляют 1-2 см<sup>3</sup> этанола, 0.5 см<sup>3</sup> 5N серной кислоты и экстрагируют

трижды по 7-10 см<sup>3</sup> хлористым метиленом. Последний собирают пипеткой со дна колбы и переносят в стаканчик емкостью 50 см<sup>3</sup> с 1-2 г безводного сульфата натрия. После подсушивания каждую порцию экстракта переносят в пробирку. Оставшийся в стаканчике сульфат натрия промывают 2 см<sup>3</sup> хлористого метилена, который также переносят в пробирку с экстрактом. Концентрирование экстракта проводят на водяной бане при температуре 40°C под током азота до 5-7 см<sup>3</sup>, затем экстракт переносят в центрифужную пробирку и концентрируют под током азота при комнатной температуре до 1 см<sup>3</sup> (не допускать полной отгонки экстракта!).

### 3.5. Проведение алкилирования

**Проведение денитрозования.** Полученный гексановый или хлорметиленовый раствор (2 см<sup>3</sup>) делят на две равные части (раствор А и раствор Б). К 1 см<sup>3</sup> раствора А добавляют 1 см<sup>3</sup> 2-3% раствора газообразного HBr в уксусной кислоте (HBr/AcOH) (НЕЛЬЗЯ ИСПОЛЬЗОВАТЬ БРОМИСТОВОДОРОДНУЮ КИСЛОТУ), и выдерживают этот раствор в течение 30 мин при комнатной температуре. Далее раствор упаривают досуха на роторном испарителе при 40-50°C и P – 10-15 мм. рт. ст.

**Получение КАЭ-производных.** К остатку после упаривания на роторном испарителе добавляют 0.2-0.3 см<sup>3</sup> раствора кислого углекислого натрия до pH > 8. 0.5 см<sup>3</sup> спиртового раствора КАЗ и кипятят 30 мин с обратным холодильником на глицериновой бане при температуре 100°C. При определении содержания нитрозаминов в солоде и пиве добавляют 2.5 см<sup>3</sup> рабочего раствора КАЗ. Смесь упаривают досуха, остаток растворяют в 0.3-0.5 см<sup>3</sup> этилового спирта. Этот раствор используют для анализа нитрозаминов. Полученные КАЭ-производные аминов, содержание которых эквивалентно количеству нитрозаминов в пробе, анализируют методом ТСХ в сравнении со стандартами (стандартный раствор НДПА). Для проведения «холостой пробы» ко второй части хлорметиленового экстракта (раствор Б) добавляют 0.1 см<sup>3</sup> рабочего раствора КАЗ, 0.2 см<sup>3</sup> раствора кислого углекислого натрия, кипятят 30 мин. и обрабатывают аналогично раствору А. При расчете содержания нитрозаминов учитывают результаты «холостой пробы», которую анализируют методом ТСХ.

### 3.6. Подготовка пластинок для хроматографического анализа

Пластинку помещают в камеру для хроматографии, в которую предварительно наливают смесь бензол-этилацетат-уксусная кислота (100:50:1) (система 1). Развитие хроматограмм проводят до достижения растворителем верхнего края пластинки. Затем пластинку извлекают из камеры, сушат 10 мин на воздухе, помещают в сушильный шкаф и активируют при 110-120°C в течение часа. Для анализа требуется несколько пластинок,

которые после активирования до использования хранят в закрытом эксикаторе над прокаленным хлористым кальцием.

#### 4. ПРОВЕДЕНИЕ ИСПЫТАНИЙ

На расстоянии 3 см от нижнего края пластинки проводят карандашом тонкую горизонтальную линию, на которую с интервалом 0.5-1 см наносят 10 точек. В первую точку наносят 20-30 мкл КАЭ-производную исследуемого раствора А, во вторую – 20-30 мкл «холостой пробы». В третью и четвертую точки наносят соответственно по 1 мкл растворов КАЭ-ДМА и КАЭ-КЭА в концентрации  $C_2$ ; в пятую, шестую и седьмую точки – соответственно по 1 мкл растворов КАЭ-ДМА, КАЭ-ДЭА и КАЭ-ДПА в концентрации  $C_3$ ; в восьмую и девятую точки – соответственно растворы КАЭ-ДМА и КАЭ-ДЭА в концентрации  $C_4$ . Пластинку поворачивают на  $180^\circ$  и помещают в хроматографическую камеру с системой 1. Развитие хроматограммы проводят до достижения фронтом верхнего края пластинки. Пластинку вынимают из камеры, сушат под тягой на воздухе 15 минут, срезают 2 см ниже фронта, тем самым удаляя липофильные примеси. Пластинку вновь поворачивают на  $180^\circ$  и помещают в хроматографическую камеру со смесью ацетонитрил-25% аммиак (9:1) (система 2). Уровень растворителя должен быть примерно на 1 см ниже нанесенных пятен. Развитие хроматограммы проводят до достижения растворителем верхнего края пластинки. Пластинку сушат на воздухе и вновь помещают в хроматографическую камеру с системой 1. Хроматографируют в том же направлении, сушат и рассматривают в УФ-свете (лампа ОЛД-41 или прибор для флуоресцентного анализа витаминов, модель 833). Сравнивая подвижность флуоресцирующих производных, которые обнаружены в образце, с подвижностью соответствующих КАЭ-производных стандартов, осуществляют идентификацию нитрозаминов.

Значения  $R_f$  КАЭ-производных

Соединения	$R_f$
КАЭ-ДЭА	0.21
КАЭ-ДМА	0.25
КАЭ-ДПА	0.62

Сравнивая интенсивность флуоресценции различных количеств стандартных нитрозаминов с интенсивностью флуоресценции образца и «холостой пробы», определяют количество нитрозаминов в пятне.

## 5. ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Содержание нитрозаминов в пробе продукта рассчитывают по формуле. При этом учитывается степень извлечения нитрозаминов из образца (%) путем сравнения интенсивности флуоресценции внутреннего стандарта (НДПА), вносимого в продукт (по п. 3.4.1.), с интенсивностью стандарта – НДПА ( $R_f - 0,62$ )

$$C = 2,4 \cdot \frac{W_1 \cdot V_1 \cdot 100}{W_2 \cdot V_2 \cdot K},$$

- где  $C$  - количество нитрозаминов в продукте, мкг/кг;  
 $W_1$  - количество нитрозаминов в пятне с учетом «холостого опыта», мкг;  
 $W_2$  - навеска продукта, кг;  
 $V_1$  - объем анализируемой пробы, мкл;  
 $V_2$  - объем нанесенной пробы, мкл;  
2,4 - поправочный коэффициент  
 $K$  - степень извлечения нитрозаминов из образца, %.

При необходимости количественное определение содержания нитрозаминов в продовольственном сырье и пищевых продуктах проводят на флуориметре. На двух или более пластинках (в зависимости от вязкости анализируемого раствора) на расстоянии 3 см от нижнего края пластинки наносят полосой в 6-7 см весь (100 мкл) анализируемый раствор и на тех же пластинках полосой в 3-4 см наносят по 100 мкл растворов стандартов с концентрацией, которая обнаружена в пробе. Аналогично наносят пробы «холостого опыта». Хроматографируют, как описано выше. Пластинку высушивают на воздухе и рассматривают в УФ-свете. Отмечают иглой или карандашом флуоресцирующие зоны исследуемого раствора и стандартов, объединяют их вместе с каждой пластинки, нарезают на мелкие кусочки, помещают в колбочки на 10 см<sup>3</sup>, заливают 4 см<sup>3</sup> 1N раствора HCl и, периодически встряхивая, выдерживают 30 минут при комнатной температуре. Раствор осторожно сливают в чистые колбочки (если попадают частицы силикагеля, пробы фильтруют), ополаскивают силикагель 3 раза по 1 см<sup>3</sup> 1N HCl, и промывные воды объединяют с основным раствором. Аналогично поступают с каждой флуоресцирующей зоной образцов, стандартов и «холостого опыта».

Величину флуоресценции полученных растворов (по 7 см<sup>3</sup> каждого) измеряют на спектрофлуориметре при длине волны возбуждения 340 нм и длине волны флуоресценции 480 нм.

Количество нитрозаминов в образце рассчитывают по формуле:

$$C = 2,4 \cdot \frac{W_1 \cdot F_1 \cdot 100}{W_2 \cdot F_2 \cdot K},$$

- где  $C$  - количество соответствующего нитрозамина в продовольственном сырье или пищевом продукте, мкг/кг,



- $W_1$  - количество нитрозаминов стандарта, мкг,
- $W_2$  - навеска продукта в кг,
- $F_1$  - флуоресценция нитрозаминов образца за вычетом флуоресценции «холостого опыта»,
- $F_2$  - флуоресценция соответствующего нитроаминового стандарта,
- 2,4 - поправочный коэффициент
- $K$  - степень извлечения нитроаминов из образца, %

Статистическая обработка результатов анализа продовольственного сырья и пищевых продуктов показала, что относительное стандартное отклонение колеблется от 20 до 30% (при  $n=2$ ,  $P=0.90$ ).

## **ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ МЕТОД (арбитражный метод анализа)**

### **1. СУЩНОСТЬ МЕТОДА**

Метод идентификации и количественного определения НА состоит в выделении летучих НА путем перегонки с паром или в вакууме, экстракции хлористым метилом НА из водного дистиллята, концентрации экстракта, разделении смеси методом газо-жидкостной хроматографии и количественном определении немодифицированных НА с помощью высокоселективного и высокочувствительного хемилюминесцентного (термоэнергетического) детектора ТЕА-502.

Идентификацию НА осуществляют по временам удерживания в сравнении с параметрами удерживания стандартных НА. Количественное определение проводят методом абсолютной калибровки с систематическим контролем калибровочного коэффициента.

Нижний предел обнаружения – 0.1 мкг/кг.

### **2. АППАРАТУРА, МАТЕРИАЛЫ И РЕАКТИВЫ**

К указанным выше в п. 2 методических указаний:

- Газовый хроматограф.
- Детектор хемилюминесцентный – анализатор термической энергии ТЕА-502 фирмы “Termo Electron Corporation” (США) или другой с аналогичными характеристиками. Самописец.
- Колонка газохроматографическая стеклянная длиной 3 м и диаметром 2 мм, заполненная 15% Carbowax – 20 М, нанесенном на Chromaton N-AW-DMCS (80-100 меш).
- Азот газообразный (ОСЧ или поверочный нулевой газ) по ГОСТ 9283-74.
- Кислород газообразный по ГОСТ 5583-78.
- Аргон газообразный по ГОСТ 16457-90.
- Азот жидкий.
- N – нитрозодиметиламин (НДМА) фирмы “Ferrak” (ФРГ).
- N – нитрозодиэтиламин (НДЭА) фирмы “Serva” (ФРГ).

- N – нитрозодипропиламин (НДПА) фирмы “Serva” (ФРГ).
- N – нитрозодибутиламин (НДБА) фирмы “Serva” (ФРГ).
- N – нитрозопиперидин (НПип) фирмы “Serva” (ФРГ).
- N – нитрозопирролидин (НПир) фирмы “Fluka” (Швейцария).
- Гексановый раствор НДПА (0Ю2 мкг/мл) – внутренний стандарт.
- Гексановый раствор смеси стандартных НА (НДМА, НДЭА, НДБА, НПип, Нпир) по 0.2 мкг каждого НА в 1 мл раствора.

### 3. ПОДГОТОВКА К ИСПЫТАНИЮ

#### 3.1. Отбор проб

Пробы рыбы, продуктов из нее, морских млекопитающих и беспозвоночных отбирают по ГОСТ 7631-85, водорослей – по ГОСТ 20438-75, ГОСТ 13496.0-80, консервов и пресервов – по ГОСТ 8756.0-70.

#### 3.2. Приготовление 33% раствора бромистого водорода в ледяной уксусной кислоте (HBr/AcOH).

В круглодонную колбу помещают 250 см<sup>3</sup> тетралина, несколько кусочков железной стружки и при перемешивании добавляют из капельной воронки небольшое количество брома (2 - 3 см<sup>3</sup>). Если реакция не началась (следить по выделению газа), необходимо прекратить добавление брома, содержимое колбы подогреть (до 30-40°С) и после того, как начнется выделение бромистого водорода, прекратить нагрев и продолжить прикапывание брома, регулируя добавление его скоростью выделения газа.

Пропускание бромистого водорода через уксусную кислоту проводят до насыщения и получают 33% HBr/AcOH (по контролю за привесом насыщенного раствора).

### 4. ПРОВЕДЕНИЕ ИСПЫТАНИЙ

Навеску массой 100-300 г (или см<sup>3</sup>) отбирают из средней пробы, подготовленной в соответствии с ГОСТ 7636. Отобранные образцы можно хранить в морозильной камере при температуре минус 8 - 18°С от 1 до 3-х суток в зависимости от сроков реализации продукции.

НА выделяют из анализируемых образцов продовольственного сырья, пищевых продуктов и кормов путем перегонки с паром или вакуумной перегонкой с последующим извлечением НА хлористым метиленом из водного дистиллята и концентрированием хлорметиленового экстракта до 1 см<sup>3</sup> в соответствии с п. 3.4 настоящих методических указаний. Анализ НА осуществляют газохроматографически без дополнительной обработки хлористометиленового или гексанового раствора при следующих условиях: колонка стеклянная (длина 3 м с диаметром 2 мм), заполненная 15% - 20 М, нанесенном на Chromaton

N-AW-DMCS (80-100 меш), газоноситель – азот (ОСЧ или ПНГ) или аргон, скорость – 20 мл/мин, температура колонки - 125°C (изотермический режим); температура испарителя - 220°C, температура каталитической печи - 450°C, давление азота – 0.5 атм (или расход – 40мл/мин), давление кислорода – 0.6 атм, температура охлаждающей ловушки – 110-130°C, объем вводимой в хроматограф пробы – 1-10 мкл.

Примечания: Может быть использована другая по размеру набивная колонка с содержанием Carbowax, например, 10%.

Измерения целесообразно проводить при одном значении аттенюатора, в обратном случае необходимо убедиться в линейности зависимости показаний аттенюатора и величины сигнала.

Записывают хроматограмму эталонной смеси НА и раствора внутреннего стандарта в начале и в конце каждой серии анализов. Идентификацию НА в пробе осуществляют по временам удерживания стандартов. Количество НА в пробе оценивают сравнением величины аналитических сигналов, полученных при анализе образцов и стандартных растворов.

Оценивается также полнота извлечения НА из продовольственного сырья, пищевых продуктов и кормов по внутреннему стандарту (НДПА), вносимому в продукт перед выделением НА.

## 5. ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Содержание НА в пробе рассчитывают по формуле:

$$C = \frac{(S_1 \cdot V_2 \cdot n \cdot 100)}{(S_2 \cdot V_1 \cdot m \cdot K)},$$

где  $C$  - содержание исследуемого НА в образце, мкг/кг,

$S_1$  - площадь по интегральной кривой, полученной при анализе образца мм<sup>2</sup>,

$S_2$  - площадь по интегральной кривой соответствующего стандартного НА мм<sup>2</sup>,

$V_1$  - объем пробы, введенной в хроматограф, мкл,

$V_2$  - объем анализируемого экстракта, мкл,

$N$  - количество стандартного НА, введенного в хроматограф, нг,

$M$  - масса пробы, взятой на анализ, г,

$K$  - степень извлечения внутреннего стандарта, %.

Применяемая методика дает возможность извлекать из анализируемых образцов летучие НА с выходом 70-95%.

Нижний предел определения –  $1 \times 10^{-13}$  мол/мкл.

Метод дает возможность определять 0.1 мкг НА/кг продукта и выше.

В интервале концентраций  $1 \times 10^{-10}$  -  $1 \times 10^{-13}$  мол/мкл аналитический сигнал прямо пропорционален количеству введенного в хроматограф НА.

Относительное стандартное отклонение – 15-20%.

# **ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГИСТАМИНА КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ**

(Исаев В.А., Головин А.Н., Галутва О.А., Тутельян В.А., Иваницкий А.М., Жукова Г.Ф., Крюкова Е.В.)

Дополнение к документу «Временные гигиенические нормативы и метод определения содержания гистамина в рыбопродуктах». СанПиН 42-123-4083-86.

Необходимость дополнения документа колориметрическим методом определения гистамина обусловлена недостаточной оснащенностью лабораторий рыбоперерабатывающих предприятий спектрофлуориметрами, которые требуются для осуществления контроля гистамина в рыбопродуктах флуориметрическим методом. Колориметрический метод выделения, идентификации и количественного определения гистамина в рыбных продуктах предполагает использование широко распространенных отечественных колориметров или спектрофотометров и прост в использовании.

## **1. СУЩНОСТЬ МЕТОДА**

В основе колориметрического метода определения гистамина лежит измерение величины абсорбции окрашенного производного, полученного при взаимодействии гистамина с диазореактивом. Предел обнаружения метода – 10 мг/кг, относительное стандартное отклонение при определении гистамина в интервале концентраций 20-175 мг/кг изменяется от 0.08 до 0.25. Степень извлечения добавленного к образцу стандарта гистамина – 94-99%.

## **2. АППАРАТУРА, МАТЕРИАЛЫ И РЕАКТИВЫ**

- Колориметр фотоэлектрический по ГОСТ 12083-78 или спектрофотометр, обеспечивающие анализ при  $\lambda=490$  нм.
- Весы лабораторные 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г по ГОСТ 24104-88.
- Весы лабораторные 3-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 1 кг по ГОСТ 24104-80.
- Баня водяная.
- Воронки В-100-150-ХС по ГОСТ 25336-82.
- Воронки делительные ВД-3-250-29/32 ХС по ГОСТ 25336-82.
- Колбы конические КН-1-100-29/32 ТС по ГОСТ 25336-82.
- Колбы мерные 1-100-2 или 2-100-2 по ГОСТ 1770-74.
- Микроизмельчитель тканей РТ-2 по МРТУ 64.1.-1505-63.
- Мясорубка по ГОСТ 4025-83.
- Пипетки 4-1-1 или 5-1-1, 7-1-5; 7-1-10 или 7-2-10 по ГОСТ 20292-74.

- Термометр (0-100°C) по ГОСТ 2045-71.
- Холодильник бытовой.
- Шкаф лабораторный сушильный.
- Цилиндры мерные 1-50 или 2-50 по ГОСТ 1770-74.
- Электроплитка бытовая по ГОСТ 14919-83.
- Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026-76.
- н-Бутанол по ГОСТ 6006-78, Ч.
- Вода дистиллированная по ГОСТ 6709-72.
- Гистамин или гидрохлорид гистамина.
- Кислота соляная по ГОСТ 3118-77, ХЧ, раствор 3.75 г/дм<sup>3</sup> (0.1N раствор).
- Кислота трихлоруксусная по ТУ 6-09-1926-77, раствор 50 г/дм<sup>3</sup> (5% раствор).
- Натрий азотисто-кислый по ГОСТ 4197-74, ЧДА, раствор 50 г/дм<sup>3</sup> (5% раствор).
- Натрия гидроокись по ГОСТ 4328-77, ЧДА, раствор 200 г/дм<sup>3</sup> (5N раствор).
- Натрий серно-кислый безводный по ГОСТ 4166-76, ХЧ, прокаленный.
- Натрий углекислый по ГОСТ 83-79, ХЧ, раствор 40 г/дм<sup>3</sup> (4% раствор).
- Пара-нитроанилин, ЧДА.
- Этилацетат по ГОСТ 22300-76, ЧДА.

### 3. ПОДГОТОВКА К ИСПЫТАНИЮ

#### 3.1. Приготовление растворов

Приготовление раствора пара-нитроанилина. Пара-нитроанилин очищают путем перекристаллизации в воде. Для этого растворяют его в горячей дистиллированной воде и охлаждают раствор до комнатной температуры. Выпавшие кристаллы отфильтровывают и высушивают при 80°C в течение 10-15 мин. 0.1 г пара-нитроанилина растворяют в 100 см<sup>3</sup> 0.1N соляной кислоты. Хранят раствор в холодильнике до момента употребления.

Приготовление диазореактива. Диазореактив получают непосредственно перед использованием путем смешивания 10 см<sup>3</sup> раствора 1 г/дм<sup>3</sup> пара-нитроанилина в 0.1N соляной кислоте и 1 см<sup>3</sup> раствора 50 г/дм<sup>3</sup> азотисто-кислого натрия и охлаждают до 0°C.

Приготовление н-бутанола, насыщенного водой. Для приготовления н-бутанола, насыщенного водой, встряхивают 50 см<sup>3</sup> н-бутанола и 20 см<sup>3</sup> дистиллированной воды в делительной воронке. После разделения фаз отделяют верхний слой растворителя.

#### 3.2. Построение калибровочной кривой

Готовят стандартные растворы гистамина с концентрацией 5, 10, 20 и 40 мкг/см<sup>3</sup> в 5% трихлоруксусной кислоте (5% ТХУ). Для приготовления основного раствора гистамина с концентрацией 40 мкг/см<sup>3</sup> 4.0 мг гистамина помещают в мерную колбу вместимостью 100

см<sup>3</sup>, растворяют в 5% ТХУ и доводят объем до метки. Рабочие растворы гистамина с концентрациями 20, 10, 5 мкг/см<sup>3</sup> получают путем разбавления 5% ТХУ основного раствора в 2, 4 и 8 раз соответственно. Основной раствор гистамина хранят в холодильнике неделю, рабочие растворы готовят в день проведения анализа.

5 см<sup>3</sup> каждого стандартного раствора помещают в пробирки с притертыми пробками, добавляют 1 см<sup>3</sup> 20% раствора гидроксида натрия и вносят в раствор при перемешивании безводный углекислый натрий до получения насыщенного раствора. Добавляют 5 см<sup>3</sup> н-бутанола, насыщенного водой, и энергично встряхивают пробирки в течение 30 сек. После разделения фаз отбирают пипеткой или шприцем 3 см<sup>3</sup> верхнего слоя растворителя и переносят в другую пробирку с притертой пробкой, содержащую 3 см<sup>3</sup> 0.1N раствора соляной кислоты. Встряхивают содержимое пробирки в течение 30 сек. После разделения фаз отбирают 2 см<sup>3</sup> нижнего водного слоя, переносят в другую пробирку, добавляют 2 см<sup>3</sup> 4% раствора углекислого натрия и выдерживают 5 мин при 0°C. К охлажденному раствору приливают 2 см<sup>3</sup> холодного свежеприготовленного диазореактива, встряхивают и вновь выдерживают 5 мин при 0°C. Добавляют 4 см<sup>3</sup> этилацетата и энергично встряхивают в течение 30 сек. После разделения фаз сухой пипеткой отбирают верхний слой и переносят в пробирку, содержащую безводный сульфат натрия (раствор окрашенного производного в этилацетате должен быть прозрачным). Измеряют величину абсорбции раствора при 495 нм в кювете толщиной 1 см. В качестве раствора сравнения используют этилацетат. На основании полученных данных строят калибровочную кривую зависимости величины абсорбции от концентрации гистамина в растворе.

### 3.2. Отбор проб

Отбор проб проводят по ГОСТ 7631-85 «Рыба, морские млекопитающие, морские беспозвоночные и продукты их переработки. Правила приемки, органолептические методы оценки качества, методы отбора проб для лабораторных испытаний» и ГОСТ 8756.0-70 «Продукты пищевые консервированные. Отбор проб и подготовка их к испытанию».

Образцы доставляют в лабораторию сразу же после отбора пробы. В случае длительной транспортировки (более 1 часа) рыбу-сырец транспортируют в охлажденном состоянии, а мороженую - в замороженном состоянии. Исследование образцов проводят в день доставки их в лабораторию. При отсутствии такой возможности образцы хранят при температуре не выше минус 8°C не более трех суток.

Доставку и хранение образцов консервов и другой продукции проводят с соблюдением режимов, предусмотренных НТД (действующими инструкциями и стандартами).

### 3.3. Экстракция

10 г образца, взвешенного с точностью до 0.01 г, помещают в сосуд микроизмельчителя тканей, добавляют 25 см<sup>3</sup> 5% ТХУ и перемешивают 5 мин. Полученную смесь переносят в плоскодонную коническую колбу на 100 см<sup>3</sup>, ополаскивают сосуд смесителя дважды 5-10 см<sup>3</sup> 5% ТХУ и растворы объединяют. Колбу снабжают воздушным холодильником и выдерживают на водяной бане при 60°C в течение 15 мин. Охлажденную смесь переносят количественно в цилиндр, доводят до 50 см<sup>3</sup> 5% ТХУ и фильтруют через складчатый бумажный фильтр (фильтрат 1).

5 см<sup>3</sup> фильтрата помещают в пробирку и проводят процедуру, описанную в пункте 3.1, начиная с добавления раствора гидроокиси натрия.

Если образцы содержат гистамина более 200 мг/кг, разбавляют полученный фильтрат 5% ТХУ.

## 4. ПРОВЕДЕНИЕ ИСПЫТАНИЙ

Для определения концентрации гистамина в экстракте используют калибровочную кривую.

## 5. ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Содержание гистамина в образце продукта  $C$  (мг/кг) вычисляют по формуле:

$$C = \frac{C_{ст.} \cdot V}{W \cdot \Phi},$$

где  $C_{ст.}$  - концентрация гистамина, найденная по калибровочной кривой, мкг/см<sup>3</sup>;

$V$  - объем экстракта, см<sup>3</sup>;

$W$  - навеска образца продукта, г;

$\Phi$  - фактор разбавления, где  $\Phi = \frac{V_{фильтрата} + V_{ТХУ}}{V_{фильтрата1}}$ .

Вычисление проводят до единиц. За окончательный результат принимают среднее арифметическое значение результатов трех параллельных определений. Допустимое расхождение между результатами параллельных определений не должно превышать 50% по отношению к среднему арифметическому значению.



# ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ УГЛЕВОДОРОДНЫХ КОМПОНЕНТОВ НЕФТЯНЫХ ЗАГРЯЗНЕНИЙ

(Писарева Н.А., Лапин Б.П., Рубцова Т.Е.)

## 1. СУЩНОСТЬ МЕТОДА

Метод позволяет качественно и количественно определить сумму углеводородов, фракций алканов и циклоалканов, нормальных алкенов, ненасыщенных углеводородов, сквалена, моно-, ди-, три- и полиядерных аренов в гидробионтах.

В зависимости от задач определения предлагаемые методические рекомендации можно использовать либо целиком, либо частично, например, для оценки суммарного содержания углеводородов или ароматической составляющей.

Подробный анализ содержания углеводородов в гидробионтах особенно важен при определении возможности использования данного продукта в пищевых целях. При этом необходимо учитывать, что нефтяные примеси попадают в живой организм гидробионтов, где возможны дальнейшие видоизменения привнесенных углеводородов по пути постоянно протекающих в живых клетках процессов биосинтеза и метаболизма.

К преимуществам метода относится полнота выделения углеводородов (до 80%), четкое разделение на фракции благодаря разработанным условиям колоночной и препаративной тонкослойной хроматографии, надежность - вследствие применения высокочувствительных методов ультрафиолетовой спектрофотометрии и газожидкостной хроматографии.

Предлагаемый метод позволяет оценить содержание суммы углеводородов, сумм алканов и циклоалканов - не менее 10 мг, содержание н-алкенов - не менее 0.5 мг, содержание олефинов - не менее 0.5 мг, содержание сквалена - не менее 0.5 мг, моноциклических аренов - не менее 0.15 мг, дициклических - не менее 0.005 мг, трициклических - не менее 0.0015 мг.

## 2. АППАРАТУРА, МАТЕРИАЛЫ И РЕАКТИВЫ

- Газожидкостной хроматограф с пламенно-ионизационным детектором.
- Носитель - хромосорб W , 80-100 меш. или хроматон.
- Жидкая фаза: полиэтилсилоксан SE-30.
- Колонка стальная длиной 2 м диаметром 0.3 см.
- Колонка капиллярная длиной 50 м диаметром 0.25 мм с апиэзоном L.
- Микрошприцы вместимостью 10 и 1 мкл.
- Спектрофотометр УФ-видимой области спектра.
- Кварцевые кюветы толщиной 1 см.
- Высокоэффективный жидкостной хроматограф, оснащенный UV- и RF-детектором.

- Колонка с обращенной фазой (C<sub>18</sub>), габариты колонки – 4.6x250 мм, размер частиц наполнительного материала 10 мк.
- Весы лабораторные 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г по ГОСТ 24104-88.
- Магнитная мешалка с переменной скоростью.
- Электрокипятильник ВПН-1.0 по ГОСТ 1405-69.
- Штатив Бунзена.
- Электромясорубка.
- Ротационный испаритель.
- Термометр (0-100°C) по ГОСТ 2045-71.
- Манометр ртутный.
- Пластинки из зеркального стекла толщиной 4 мм, 20x20 см, 9x12 см, 6x6 см.
- Хроматографическая стеклянная камера с шлифованной крышкой (цилиндрический кристаллизатор диаметром не менее 23 см, высотой 7 см или четырехугольный сосуд 24x24 см высотой 7 или 30 см).
- Экзикатор, внутренний диаметр 25 см.
- Шкаф лабораторный сушильный.
- Скалка для нанесения незакрепленного слоя сорбента.
- Реле контактное.
- Кусочки фарфора или керамические насадки типа колец Рашега.
- Шутгель-аппарат.
- Кювета эмалированная или кварцевая.
- Печь муфельная.
- Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026-76.
- Мельница шаровая.
- Колбы конические плоскодонные вместимостью 50, 100, 250, 500, 2000 см<sup>3</sup> по ГОСТ 25336-82.
- Обратный шариковый холодильник, НШ 29 по ГОСТ 25336-82.
- Цилиндры мерные вместимостью 100, 250, 500 см<sup>3</sup> по ГОСТ 25336-82.
- Стеклянная воронка для сыпучих веществ, НШ-29.
- Двугорлая Ч-образная насадка, НШ 29-кern, НШ 29-муфта, НШ 14,5-муфта.
- Насос водоструйный по ГОСТ 25336-82.
- Кран одноходовой, НШ 14.5-кern.
- Воронка делительная грушевидная вместимостью 1500 - 2000 см<sup>3</sup>, НШ 29 по ГОСТ 25336-82.
- Колбы круглодонные яйцевидные вместимостью 50, 100, 250, 500 см<sup>3</sup>, НШ 14,5.

- Воронка со стеклянным пористым фильтром №2, №4, НШ 14,5, снабженная вакуумным отводом.
- Насадка для вакуумной фильтрации с НШ 14,5-муфта и НШ 29-кern.
- Каплеуловитель НШ 29.
- Колонка хроматографическая (30x3.0 см) со стеклянным пористым фильтром, НШ 29.
- Колонка хроматографическая (250x10 мм) со стеклянным пористым фильтром №1, НШ 14.5.
- Пипетка на 5, 10 см<sup>3</sup> по ГОСТ 20292-74.
- Капилляр стеклянный на НШ 14.5.
- Палочка стеклянная.
- Пипетка Пастера.
- Чашка фарфоровая диаметром 5 см.
- Мерные колбы вместимостью 25, 50, 100 см<sup>3</sup>, НШ 14.5 с пробкой по ГОСТ 25336-82.
- Микропипетки вместимостью 0.1 и 0.2 см<sup>3</sup>.
- Насадка Вюрца, НШ 14,5.
- Холодильник Либиха 30-50 см, НШ 14,5.
- Аллонж НШ 14.5-муфта, НШ 29-кern.
- Слянка с притертой пробкой объемом 2000 см<sup>3</sup>.
- Колба Бунзена на 3000 см<sup>3</sup>.
- Воронка Бюхнера по ГОСТ 9147.
- Стаканы мерные вместимостью 250, 500, 2000 см<sup>3</sup> по ГОСТ 25336-82.
- Гипс ХЧ
- Магния сульфат безводный.
- Силикагель КСК 150-200 меш. для тонкослойной хроматографии.
- Натрий сульфат безводный по ГОСТ 4166-76.
- Окись алюминия для колоночной хроматографии IV ст. активности.
- Метанол по ГОСТ 6995-77.
- Хлороформ по ГОСТ 20015-74.
- n-Гексан, ХЧ по ТУ 609-4521-77.
- Эфир диэтиловый.
- Этанол, ректификат по ГОСТ 5962-67.
- Кислота серная концентрированная, ОСЧ по ГОСТ 4204-77.
- Калий перманганат кристаллический.
- Натрий едкий, ХЧ по ГОСТ 4328-77.
- Вода дистиллированная по ГОСТ 7602-72.
- Глицерин или масло силиконовое.

- Гептадецилбензол.
- Нафталин ХЧ.
- Фенантрен ХЧ.
- Нормальные алканы: тетрадекан, пентадекан, гексадекан, гептедекан, октадекан, нонадекан, эйкозан, гейэйкозан, докозан, трикозан, тетракозан.
- Серебро азотнокислородное ХЧ.
- Силикагель для тонкослойной хроматографии L 5/40μ.
- Йод кристаллический ЧДА.
- Азот нулевой очистки.

### 3. ПОДГОТОВКА К ИСПЫТАНИЮ

#### 3.1. Подготовка химической посуды

При проведении анализа необходимо тщательно мыть посуду хромовой смесью. Следует избегать загрязнения вакуумной смазкой шлифов и кранов, контактов с резиновыми или пластмассовыми пробками. Все работы проводятся в вытяжном шкафу.

#### 3.2. Подготовка реактивов

Перегонка растворителей. В круглодонную колбу объемом 2 дм<sup>3</sup>, помещенную в глицериновую баню, снабженную контактными термометром с нагревателем и контактными реле, наливают 1500 см<sup>3</sup> растворителя, вносят кусочки керамической насадки или фарфора. Колбу соединяют с дефлегматором со вставленной насадкой Вюрца, к которой присоединен термометр и нисходящий холодильник Либиха с аллонжем и приемной плоскодонной колбой на 250 см<sup>3</sup>. Глицериновую баню нагревают, устанавливая на контактном термометре температуру на 10–15°С выше температуры кипения перегоняемого растворителя. По достижении температуры кипения в приемную колбу на 250 см<sup>3</sup> собирают 50 см<sup>3</sup> растворителя и заменяют ее колбой на 2000 см<sup>3</sup>. Гексан собирают при температуре кипения – 68.7°, хлороформ – 61.2°, этиловый спирт (ректификат) – 73.4°, метанол – 64.7°С.

Диэтиловый эфир перед перегонкой оставляют над едким кали сутки, затем эфир декантируют с осадка в перегонную колбу и собирают фракцию при 34.6°С. Нельзя перегонять растворитель досуха, остаточный объем должен составлять не менее 100 см<sup>3</sup>.

Отсутствие алканов и аренов в растворителе проверяют, упаривая 200 см<sup>3</sup> растворителя, и анализируют остаток методом газожидкостной хроматографии, как описано в разделах 4.1 и 4.2, и УФС-анализом, как описано в разделе 4.5.

Приготовление гексана, не содержащего следов ароматических углеводородов. 1.5 дм<sup>3</sup> гексана и 150 см<sup>3</sup> концентрированной серной кислоты помещают в склянку с притертой пробкой и встряхивают на механической качалке 30 мин, прочно привязав пробку и завернув

склянку в полотенце. После встряхивания с каждой порцией кислоты смеси дают отстояться, после чего отделяют нижний кислотный слой в делительной воронке. Встряхивание со свежими порциями серной кислоты продолжают до прекращения окрашивания кислотного слоя в желтый цвет. Затем энергично встряхивают (в делительной воронке) с несколькими порциями концентрированного раствора перманганата калия в 10% серной кислоте, пока цвет такого раствора не перестанет изменяться.

Очищенный таким путем гексан промывают водой (2 раза по 200 см<sup>3</sup>), 10% раствором едкого натра (2 раза по 200 см<sup>3</sup>), снова водой (2 раза по 200 см<sup>3</sup>), каждый раз отделяя нижний слой в делительной воронке.

Способ перегонки гексана описан в начале этого раздела.

Очистка сульфата натрия, окиси алюминия и силикагеля. 1 кг окиси алюминия (или сульфата натрия или силикагеля) и 2 дм<sup>3</sup> смеси хлороформа и метанола 1:1 помещают в склянку с притертой пробкой и встряхивают на механической качалке 1 час.

Суспензию отфильтровывают на воронке Бюхнера, промывают каждую порцию осадка 200 см<sup>3</sup> смеси (хлороформ – метанол 1:1).

В эмалированную кювету помещают осадок, равномерно распределяя его по поверхности кюветы, и высушивают на воздухе. Высушенные на воздухе сульфат натрия или окись алюминия выдерживают 7 часов в муфельной печи при температуре 300-400°C, а силикагель - в сушильном шкафу при температуре 110°C.

Охлажденные вещества хранят в склянках с притертой пробкой.

Приготовление микропластинок из микрофракции силикагеля КСК. 1 кг (150-200 меш.) силикагеля помещают в шаровую мельницу и дополнительно перемешивают его в течение 8 часов. 180 г перемешенного силикагеля помещают в двухлитровый стакан, добавляют 2 дм<sup>3</sup> воды, хорошо перемешивают и оставляют на 40 мин. Раствор декантируют и помещают его в другой двухлитровый стакан, доводят объем до 2 дм<sup>3</sup> водой. Отстаивают 2 часа. Надосадочную жидкость сливают, к оставшемуся осадку добавляют равное по объему количество воды и используют его для микротонкослойной хроматографии.

В стакан на 500 см<sup>3</sup> наливают 200 см<sup>3</sup> хорошо перемешенного с водой силикагеля, добавляют 200 мг чистого гипса и перемешивают на магнитной мешалке.

Из стакана отбирают 1.2 см<sup>3</sup> силикагеля и наносят на пластинку 6х6 см, высушивают на воздухе, а затем активируют в сушильном шкафу при температуре 110°C.

Хранят приготовленные пластинки в эксикаторе с безводным сульфатом магния.

### 3.3. Отбор проб

Пробы рыбы, продуктов из нее, морских млекопитающих и беспозвоночных отбирают по ГОСТ 7631-85, водорослей – по ГОСТ 20438-75, ГОСТ 13496.0-80, консервов и пресервов – по ГОСТ 8756.0-70.

### 3.4. Щелочной гидролиз образцов

Навеску исследуемого образца мяса массой 50 г, взвешенную с точностью 0.01 г, пропускают через мясорубку.

Подготовленный образец помещают в плоскодонную колбу, добавляют 24 г едкого кали и 300 см<sup>3</sup> водного (92%) этилового спирта. Колбу присоединяют через Ч-образную насадку либо к обратному холодильнику и резиновой камере, либо к баллону с азотом. Кипятят на водяной бане при перемешивании 3 часа.

Реакционную смесь в горячем виде отфильтровывают на воронке Бунзена. Остаток на фильтре промывают 100 см<sup>3</sup> этилового спирта, нагретого до 60°C, и 200 см<sup>3</sup> гексана. Добавляют 500 см<sup>3</sup> дистиллированной воды.

### 3.5. Экстракция фракции неомыляемых липидов

Раствор реакционной смеси через стеклянную воронку переливают в делительную воронку, в которой не должны быть смазаны шлифы и кран. Неомыляемые липиды экстрагируют гексаном дважды по 100 см<sup>3</sup> и смесью гексана с эфиром (1:1) 150 см<sup>3</sup> - один раз.

В случае образования эмульсии при экстракции разделение слоев растворителя достигают добавлением небольших количеств (по 2–3 г) безводного сульфата натрия. Экстракты объединяют, промывают дистиллированной водой в делительной воронке (до нейтральной реакции промывных вод), переносят в плоскодонную колбу на 500 см<sup>3</sup>, добавляют 100 г безводного сульфата натрия, закрывают стеклянной пробкой и оставляют на ночь.

Высушенный таким образом экстракт отфильтровывают в круглодонную колбу на 500 см<sup>3</sup> при помощи воронки со стеклянным пористым фильтром в вакууме водоструйного насоса, остаток на фильтре промывают смесью гексана и эфира (1:1) по 25 см<sup>3</sup> дважды. Фильтрат упаривают на ротационном испарителе до объема 2–3 см<sup>3</sup> при температуре 30–35°C и остаточном давлении 20 - 30 мм. рт. ст.

### 3.6. Выделение из неомыляемых липидов суммы углеводов

Взвешенные на технических весах 50 г окиси алюминия помещают в колбу объемом 250 см<sup>3</sup>, добавляют 150 см<sup>3</sup> гексана, интенсивно встряхивают. Образовавшуюся взвесь постепенно переносят в хроматографическую колонку. Когда частицы окиси алюминия

осядут и высота растворителя над столбом сорбента достигнет 0.5 см, на колонку при помощи пипетки количественно переносят раствор фракции неомыляемых липидов в 5 см<sup>3</sup> гексана. Необходимо следить, чтобы над сорбентом, помещенным в колонку, всегда находился растворитель. Если между заполнением колонки и нанесением на нее смеси веществ образовался интервал, следует на выходной конец колонки надеть кусочек резинового шланга, закрытого с противоположной стороны кусочком сплошной стеклянной палочки. Когда шланг снимают, выходной конец колонки протирают ватой, смоченной в гексане.

С колонки сумму углеводов элюируют 500 см<sup>3</sup> смеси гексана и эфира в соотношении 9:1, собирают элюат в плоскодонную колбу на 1 дм<sup>3</sup>. При температуре 40°C в вакууме водоструйного насоса на ротационном испарителе элюат упаривают до объема 1 – 1.5 см, постепенно количественно перенося раствор суммы углеводов в предварительно взвешенную на аналитических весах яйцевидную колбу объемом 100 см<sup>3</sup>. В колбу вставляют капилляр на НШ 14.5, присоединенный к источнику азота (баллон или резиновая камера). Регулируют редуктором (в случае баллона с азотом) или зажимают (в случае камеры). Создают слабую струю над поверхностью растворителя. После удаления остатков растворителя колбу с суммарными углеводородами доводят до постоянной массы и определяют количественно сумму углеводов.

### **3.7. Выделение из суммы углеводов фракции алканов, циклоалканов и алкенов, моно-, ди- и триядерных аренов методом тонкослойной хроматографии**

В плоскодонную колбу объемом 100 см<sup>3</sup> помещают 24 г силикагеля и добавляют 50 см<sup>3</sup> гексана. Суспензию выливают на стеклянную пластинку размером 20x20 см и высушивают на воздухе. Пластинку помещают в хроматографическую камеру с предварительно налитой туда смесью хлороформа и метанола в соотношении 1:1. Когда элюирующий растворитель поднимется по всему слою силикагеля до конца, пластинку вынимают из камеры, высушивают на воздухе и удаляют верхние 2 - 2.5 см сорбционного слоя. Промытую таким образом пластинку помещают на один час в сушильный шкаф, нагретый до температуры 110°C. Пластинку охлаждают до комнатной температуры и, отступив по 2 см от нижней и боковых границ слоя силикагеля, пипеткой количественно переносят в виде сплошной полосы растворенную в 1.5 – 2.0 см<sup>3</sup> гексана фракцию суммы углеводов на пластинку, которую помещают (в зависимости от формы камеры вертикально или наклонно) в хроматографическую камеру с гексаном.

После того как элюирующий растворитель поднимется по сорбенту до высоты 16.5 см, пластинку вынимают из камеры, отмечают фронт растворителя и высушивают на воздухе до исчезновения запаха растворителя.

Зоны углеводородов проявляют парами йода, для чего пластинку помещают в эксикатор с кристалликами йода. Как только на пластинке начинают появляться окрашенные полосы, ее тут же вынимают из эксикатора, отмечают зоны с  $R_f$ , равными 1.0–0.75; 0.65–0.2, соответствующие, как показали предварительно проведенные опыты, фракциям алканов, циклоалканов, сквалена, алкенов и моно-, ди- и триядерных аренов.

Дождавшись полного удаления паров йода с пластинки, отмеченные на сорбенте зоны соскабливают с пластинки, помещают в воронки со стеклянным пористым фильтром №4, снабженные вакуумными отводами, и присоединяют к предварительно взвешенным на аналитических весах яйцевидным колбам, объемом  $100 \text{ см}^3$  каждая.

Углеводороды с силикагеля элюируют смесью гексана и эфира (1:1) по  $15 \text{ см}^3$  пять раз, дожидаясь окончательного удаления каждой порции элюата, что достигается использованием в конце фильтрования водоструйного насоса.

Растворитель отгоняют на ротационном испарителе до объема  $1 - 1.5 \text{ см}^3$ , удаляют остаток гексана в токе азота. Колбы с углеводородами доводят до постоянной массы и определяют массу соответствующих фракций, как описано в разделе 3.6.

### **3.8. Разделение суммы алканов, циклоалканов и алкенов на фракции насыщенных и ненасыщенных углеводородов методом колоночной хроматографии**

$20 \text{ г}$  силикагеля в  $6 \text{ см}^3$  насыщенного раствора  $\text{AgNO}_3$  в воде помещают в фарфоровую чашку и тщательно перемешивают. Смесь выдерживают в сушильном шкафу при  $130^\circ\text{C}$  до образования гомогенного порошка и затем еще  $1 \text{ час}$ .

Аргентированный таким образом силикагель помещают в плоскодонную колбу, добавляют  $50 \text{ см}^3$  гексана, смесь встряхивают и полученной взвесью заполняют колонку ( $100 \times 15 \text{ мм}$ ), как указано в разделе 3.6.

Растворенную в  $3 \text{ см}^3$  фракцию алканов, циклоалканов и алкенов пипеткой количественно переносят на колонку. Фракцию алканов элюируют  $75 \text{ см}^3$  гексана, а затем фракцию алкенов - смесью гексана и эфира в соотношении 1:1 в предварительно взвешенные грушевидные колбы на  $100 \text{ см}^3$ . Упаривают растворитель на ротационном испарителе до объема  $1.5 - 2.0 \text{ см}^3$ . Остаток растворителя удаляют в токе азота, доводят до постоянной массы и взвешивают как описано в разделе 3.6.

## **4. ПРОВЕДЕНИЕ ИСПЫТАНИЙ**

### **4.1. Идентификация и определение содержания n-алканов во фракции насыщенных алифатических углеводородов методом газожидкостной хроматографии**

Анализ фракций алканов и циклоалканов проводят методом газожидкостной хроматографии на газожидкостном хроматографе с пламенно-ионизационным детектором. Для оценки содержания n-алканов и их идентификации применяют колонку  $200 \text{ см} \times 0.3 \text{ см}$  с



5% метилсилоксана SE-30 на хромосорбе W. Для более тщательной идентификации отдельных компонентов фракции n-алканов и циклоалканов, позволяющей определить количество насыщенных изопреноидов и количество циклоалканов, применяют капиллярную колонку OV-1 (50м x 0.3мм с апиэзоном L).

Анализ методом газожидкостной хроматографии проводят при программировании температуры от 130°C до 310°C. Абсолютные количества n-алканов определяют по внутреннему стандарту - эйкозану, содержание которого в природных объектах не превышает 1 - 3% от суммы алифатических углеводов.

В мерной колбе на 100 см<sup>3</sup> приготавливают гексановый раствор, содержащий 1.4 - 1.5 мг/см<sup>3</sup> эйкозана (навеску эйкозана берут на аналитических весах с точностью до 0.2 мг). Мерную колбу с раствором эйкозана хранят в бытовом холодильнике.

Фракцию алканов и циклоалканов, выделенную, как указано в разделе 3.8, и находящуюся в грушевидной колбе объемом 100 см<sup>3</sup>, растворяют в отобранном калиброванной пипеткой 250 - 300 мкл стандартного раствора эйкозана при охлаждении на ледяной бане. Микрошприцем вносят 2 - 4 мкл полученного раствора в хроматограф. После проведения анализа методом газожидкостной хроматографии пики n-алканов идентифицируют сравнением времен удерживания n-алканов и удерживания стандартов n-алканов, анализированных методом газожидкостной хроматографии в тех же условиях. Определяют площади пиков ( $S_x$ ) индивидуальных алканов и площадь пика внутреннего стандарта (эйкозана) по формуле:

$$S_x = H_x \cdot W_x$$

где:  $H_x$  - высота пика;

$W_x$  - ширина пика в середине высоты пика.

Абсолютные количества алканов определяют по формуле:

$$M_x = S_x \cdot A_{cm}$$

где:  $A_{cm}$  - коэффициент, выражающий отношение массы внутреннего стандарта ( $M_{cm}$ ) к его площади, т.е.  $A_{cm} = \frac{M_{cm}}{S_{cm}}$ .

#### 4.2. Определение содержания ненасыщенных углеводов методом газожидкостной хроматографии

Определение содержания ненасыщенных углеводов проводят методом газожидкостной хроматографии в условиях, описанных в разделе 4.1, по внутреннему стандарту - тетракозану, так как ненасыщенные углеводороды многих гидробионтов практически не содержат соединения с эквивалентной длиной цепи C<sub>23.5</sub> - C<sub>24.5</sub>. В противном

случае следует выбрать стандарт углеводорода, содержание которого в природной смеси не превышает 1 - 3%.

#### **4.3. Определение содержания сквалена методом газожидкостной хроматографии**

Сквален определяют методом газожидкостной хроматографии на набивной колонке 2м x 0.3см с 5% метилсилоксана SE-30 при температуре 270°C по внутреннему стандарту тетракозану. Количественное содержание рассчитывают по формуле (см. выше).

#### **4.4. Разделение выделенных на фракции моно-, ди- и триядерных ароматических углеводородов методом тонкослойной хроматографии**

Методом ультрафиолетовой спектрофотометрии в описанных ниже условиях проводят приблизительную оценку содержания моноядерных аренов, обычно доминирующих (по литературным данным) во фракциях суммарных ароматических углеводородов природных объектов и горючих ископаемых.

Суммарную фракцию аренов растворяют в 3 см<sup>3</sup> гексана, записывают УФ-спектр раствора в диапазоне 210-360 нм, помещая в кювету для сравнения такое же количество гексанового раствора веществ, выделенных при проведении холостого опыта в результате процедур, описанных в разделах 3.4 - 3.8, но без образца. Измеряют величину поглощения  $D$  в максимуме спектра при 268 - 270 нм. Значение  $D$  используют для грубой приблизительной оценки содержания фракции ароматических углеводородов. Значение  $D$  больше 0.5 свидетельствует о довольно высоком содержании ароматических углеводородов - 5 мг/кг. В этом случае разделение ароматических углеводородов на фракции проводят, как описано в разделе 4.4.1. Если по предварительной оценке содержание аренов составляет 5 мг/кг, их фракционируют способом, описанным в разделе 4.4.2.

##### **4.4.1. Разделение суммарных ароматических углеводородов на фракции моно-, ди- и триядерных аренов при содержании моноядерных аренов более 5 мг/кг**

На стеклянную пластинку 9x12 см выливают суспензию 10 г окиси алюминия марки «Вельм» в гексане. Пластинку высушивают на воздухе, далее сорбционный слой промывают смесью хлороформа и метанола, удаляя верхнюю часть окиси алюминия, и высушивают, как описано в разделе 3.8. для пластинок с силикагелем.

Фракцию ароматических углеводородов, растворенную в 1 см<sup>3</sup> гексана, переносят на пластинку с сорбентом, хроматографируют в гексане и обнаруживают зоны, как описано в разделе 3.7.

Дождавшись полного удаления паров йода с пластинки, выделяют фракции аренов: моноядерных ( $R_f = 0.8 - 0.66$ ), диядерных ( $R_f = 0.5$ ) и триядерных ( $R_f = 0.4 - 0.3$ ).

#### 4.4.2. Разделение суммарных ароматических углеводородов на фракции моно-, ди- и триядерных аренов при содержании моноядерных аренов менее 5 мг/кг.

Так как, по предварительным данным, при содержании основной фракции суммы моноядерных аренов менее 5 мкг/кг зоны плохо обнаруживаются на сравнительно больших по площади слоях сорбента, что приводит к большим потерям, а, иногда, и к невозможности разделения на фракции, применяют микротонкослойную хроматографию на силикагеле КСК 150-200 меш (приготовление микропластинок см. п.3.2.). На пластинку (6 см x 6 см) наносят растворенную в 0.5 см<sup>3</sup> фракцию суммарных аренов, как описано в разделе 3.7, и пропускают через нее гексан в той же последовательности и по тем же направлениям, которые показаны на рисунке 1. Пластинку высушивают, обнаруживают зоны - пятна различной формы (см. рис.1), выделяют фракции аренов способом, описанным в разделе 3.8 Rf равно 0.8-0.65, 0.5 и 0.4-0.3 для моно-, ди и триядерных аренов соответственно.

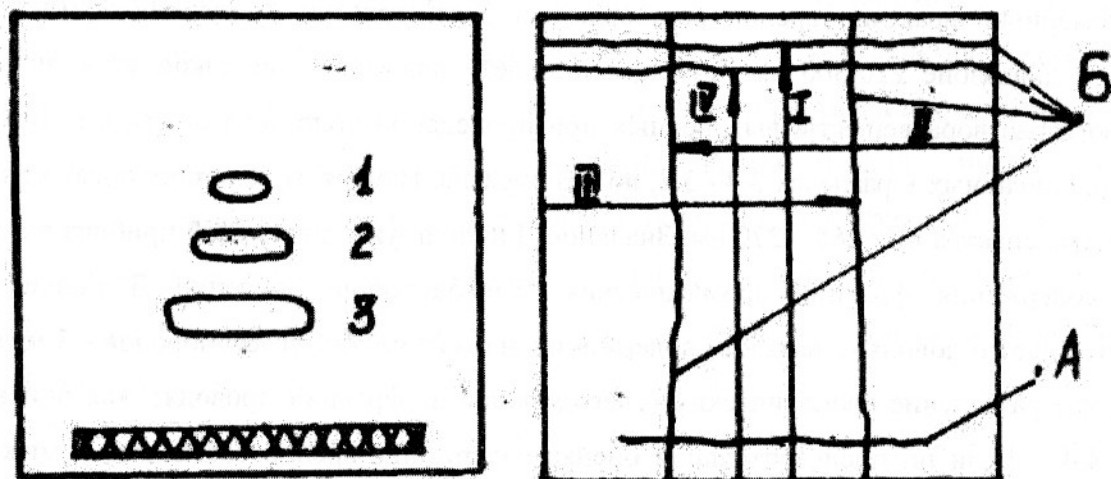


Рис. 1. Многомерная микротонкослойная хроматография моно-, ди- и триядерных аренов (1 - моноядерные, 2 - диядерные, 3 - триядерные). Стрелками указаны направления элюента: А - стартовая линия; Б - линия фронта элюента

#### 4.5. Оценка содержания фракций моно-, ди- и триядерных аренов методом ультрафиолетовой спектрофотометрии

В упаренные досуха фракции, находящиеся в грушевидных колбах на 50 см<sup>3</sup>, добавляют по 3 см<sup>3</sup> гексана. Растворы переносят в кварцевые кюветы и измеряют оптическую плотность раствора в интервале длин волн 210 - 360 нм. В кювету сравнения помещают раствор в 3 см<sup>3</sup> гексана веществ, содержащихся в «холостом опыте».

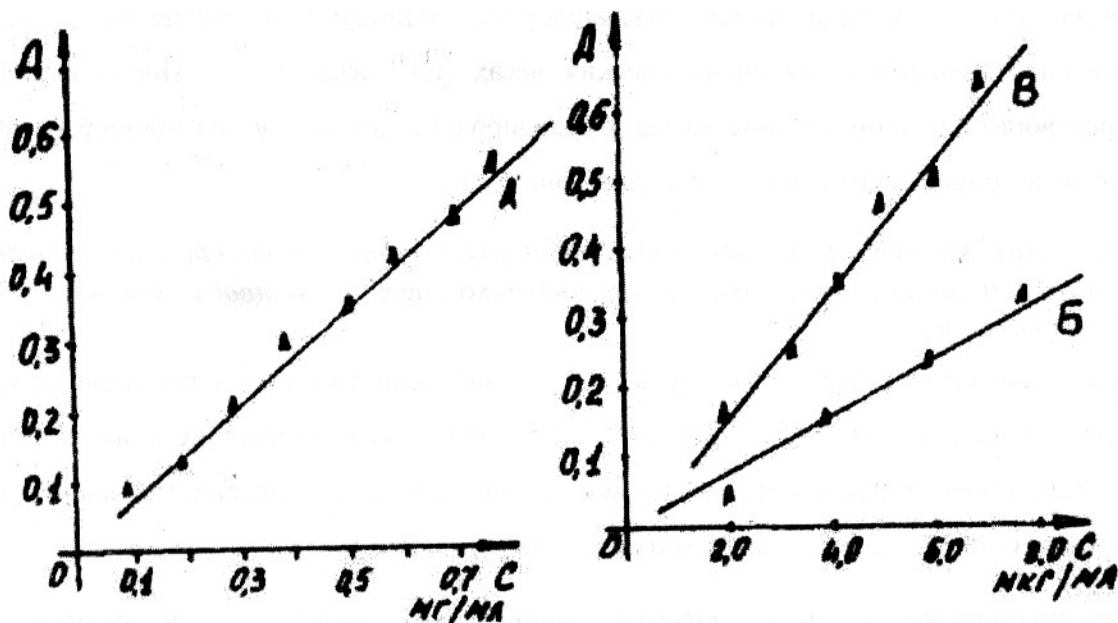


Рис. 2. Зависимость величины оптической плотности  $D$  от концентрации гексановых растворов: А - гептадецилбензола, Б - нафталина, В - фенантрена

В полученном УФ-спектре фракции моно-, ди- и триядерных аренов измеряют оптические плотности при  $\lambda = 268 - 270, 270 - 280$  и  $291 - 295$  нм соответственно. Оценку содержания аренов в образцах проводят по калибровочным графикам зависимости оптической плотности тестовых растворов гептадецилбензола, нафталина и фенантрена от концентрации (рис.2). Если в указанных максимумах поглощения оптическая плотность раствора  $D > 1$ , к соответствующей фракции ароматических углеводородов добавляют точно отмеренное количество гексана, добиваясь величины плотности  $D \leq 1$ .

#### 4.6. Определение ароматических углеводородов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Щелочной гидролиз образца и экстракцию неомыляемых липидов проводят так, как описано в разделах 3.4. и 3.5.

##### 4.6.1. Выделение суммы углеводородов методом тонкослойной хроматографии в незакрепленном слое окиси алюминия

На одной или двух стеклянных пластинках  $20 \text{ см} \times 20 \text{ см}$  в горизонтальном положении равномерно распределяют при помощи скалки  $25 - 30$  г окиси алюминия. На стартовую линию при помощи пипетки количественно наносят в виде полосы раствор фракции неомыляемых липидов в  $1 \text{ см}^3$  гексана. Пластинку помещают в горизонтальную хроматографическую камеру, насыщенную гексаном, после хроматографирования (фронт растворителя на  $2 \text{ см}$  не доходит до верхнего края пластинки) сушат на воздухе до полного удаления растворителя и затем тщательно счищают зону с  $R_f = 1,0 - 0,2$  от старта до фронта

растворителя без проявления йодом. Углеводороды элюируют в яйцевидную колбу, предварительно взвешенную на аналитических весах (см. разделе 3.7). После удаления остатков растворителя колбу с суммарными углеводородами доводят до постоянной массы и гравиметрически определяют сумму углеводородов.

#### **4.6.2. Выделение из суммы углеводородов фракций алканов, циклоалканов, алкенов, сквалена и моно-, ди-, три- и полиядерных аренов методом тонкослойной хроматографии**

Анализ проводят согласно разделу 3.7. В случае использования силикагеля других фирм вырезают две зоны с  $R_f = 1,0...0,6$  и  $0,55...0,2$ , соответствующие (как показали предварительно проведенные опыты) фракциям алканов, алкенов, сквалена, циклоалканов и моно-, ди-, три- и полициклическим ароматическим углеводородам.

#### **4.6.3. Идентификация и количественное определение моно-, ди- и триядерных углеводородов; качественная идентификация полиароматических углеводородов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии**

Разделение суммарной фракции ароматических углеводородов проводят как указано в разделе 3.7. Дополнительно к трем фракциям с тонкослойной пластинки элюируют зону с  $R_f = 0,3 - 0,2$ , соответствующую фракции полиядерных ароматических углеводородов; без снятия спектральной характеристики ее упаривают и разводят в  $1 \text{ см}^3$  метанола.

После предварительной оценки содержания ароматических углеводородов в образце, выделенные фракции упаривают и разводят метанолом до концентраций, примерно соответствующих приведенным далее концентрациям стандартов. В хроматограф вводят 1 - 10 мкл образца (в таком же объеме вводят и растворы стандартов).

Из-за нестабильности растворов аренов для получения надежных и достоверных результатов анализ в жидкостном хроматографе необходимо проводить в день выделения фракции ароматических углеводородов.

Анализ фракций ароматических углеводородов проводят методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием двухканального детектирования: спектрофотометрическим (т.е. с переменной длиной волны) детектором или фотометрическим (т.е. неизменной длиной волны, обычно 254 нм) детектором и флуориметрическим детектором с двумя монохроматорами (длины волн выбирают соответственно интересующим соединениям).

При использовании колонки с фазой  $C_{18}$  порядок выхода углеводородов следующий: бензол, диядерные арены, фенантроновые производные, диметилнафталин, антраценовые производные, полиядерные арены, бензолы с тяжелыми радикалами. Для регистрации компонентов от бензола до перилена длину волны спектрофотометрического детектора устанавливают на 260 нм при чувствительности 0.04 ед. абсорбции. Для обнаружения

соединений бензпиренового ряда и бензолов с тяжелыми радикалами длину волны иногда приходится устанавливать на 210 нм (при той же чувствительности), чтобы обеспечить обнаружение на уровне концентраций порядка сотых долей мкг на 1 кг. Чувствительность фотометрического детектора выбирают такой же. Обычный вариант настройки флуориметрического детектора: возбуждающая длина волны 252 нм, возбужденная длина волны 360 нм, чувствительность  $\times 4$  (при такой настройке обеспечивается достаточная чувствительность к соединениям нафталина, к фенантрону и антрацену).

Условия хроматографического разделения зависят от технических возможностей жидкостного хроматографа. Если нет возможности изменить состав подвижной фазы в ходе разделения, в качестве подвижной фазы используют метанол при скорости потока  $1 \text{ см}^3/\text{мин}$ . При этих условиях обеспечивается разделение компонентов от бензола до соединений бензпиренового ряда включительно. Если хроматограф позволяет изменять состав системы растворителей, при работе используют линейные изменения - от смеси метанола с водой (70:30) до чистого метанола за 40 мин при скорости протока  $1 \text{ см}^3/\text{мин}$ . Для анализа содержания бензолов с длинноцепочечными радикалами C10–C25 и бенз(а)пирена в качестве подвижной фазы применяют смесь метанола с изопропанолом (1:1) при скорости потока до  $1,5 \text{ см}^3/\text{мин}$ .

Такой режим дает возможность сократить продолжительность анализа до 15 мин, но не позволяет определить содержание соединений нафталина, фенантрена и антрацена (которые на колонке не удерживаются).

Перед количественным анализом необходимо проверить стабильность работы колонки по воспроизводимости времени удерживания стандартов.

Для идентификации и количественного определения перед разделением образцов производят калибровку по соответствующим стандартам моно-, ди-, три- и полиядерных аренов. В мерной колбе на  $25 \text{ см}^3$  готовят растворы стандартов в метаноле. Концентрация стандартов в растворе должна быть следующей: моноядерные -  $10,0 \text{ мкг}/\text{см}^3$ ; диядерные -  $10,0 \text{ мкг}/\text{см}^3$ ; триядерные -  $1,0 \text{ мкг}/\text{см}^3$ ; полиядерные -  $0,1 \text{ мкг}/\text{см}^3$ .

## **5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЗАПАХА И ПРИВКУСА НЕФТЕПРОДУКТОВ ОРГАНОЛЕПТИЧЕСКИМ МЕТОДОМ**

### **5.1. Отбор пробы**

Для определения запаха и привкуса нефтепродуктов в свежевыловленном сырье на рыбообрабатывающих судах необходимо проводить контрольную варку рыбы («Проба на варку»), отобранной от каждой партии. Перед сдачей рыбы каждой партии

рыбодобывающим судном на рыбообработывающее предприятие контрольную варку рыбы проводят не менее трех раз ( в начале, середине и конце выгрузки).

В период приема сырца рыбодобывающими базами от транспортных и добывающих судов пробы образцов для проведения контрольной варки с целью установления возможного наличия нефтепродуктов в рыбе отбирают в зависимости от массы нетто доставленной рыбы, руководствуясь таблицей 1.

Таблица 1

Масса нетто рыбы, ц	Число выемок	Масса выемки (пробы), кг
10-50	2-5	1,0
51-100	5-7	0,5
101-300	9-10	0,5
301-500	10-12	0,5
501 и более	15-20	0,5

1. При приеме сельди-иваси и других видов рыб от рыбодобывающего или транспортного судна береговыми рыбокомбинатами и рыбозаводами отбор образцов рыбы и контрольные варки проводят трижды: в начале выгрузки, после выгрузки половины всей массы рыбы и, наконец, от последней части в соответствии с таблицей 1, или технологической инструкцией.

2. При приемке сельди-иваси от мотоботов отбор образцов и контрольные варки рыбы проводят от каждой партии рыбы, доставленной мотоботом на борт рыбообработывающего судна.

Смешивать партию анализируемой рыбы с ранее принятой рыбой разрешается только после проведения анализа и отсутствия в ней нефтепродуктов.

3. При приемке мороженой сельди-иваси рыбообработывающими предприятиями (судами) из разных мест доставленной партии рыбы отбирают неповрежденные единицы транспортной упаковки в количестве 5% от их общего количества.

Количество отбираемых единиц транспортных упаковок при приеме других видов рыб (охлажденная, мороженая, соленая, копченая рыба, консервы и др.) определяется согласно ГОСТ 7631-73 и ГОСТ 8756.0-70.

## 5.2. Составление общей пробы

1. Общую пробу свежельвленной сельди-иваси составляют из нескольких отдельных выемок, количество и массу которых определяют по таблице 1. Масса общей пробы не должна превышать 10 кг. Пробы рыбы-сырца других видов отбирают согласно технологической инструкции.

2. Общую пробу мороженой сельди-иваси составляют следующим образом. Из каждой вскрытой единицы транспортированной упаковки, из разных мест отбирают несколько

упитанных рыб (от 2 до 5) массой до 0,5 кг. Масса общей пробы не должна превышать 10 кг.

Общую пробу от других видов рыб и продукции (охлажденная, мороженая, соленая, копченая рыба, консервы и др.) составляют согласно ГОСТ 7631-73 и ГОСТ 8756.0-70.

### 5.3. Составление средней пробы

Из общей пробы свежедобытой или мороженой сельди-иваси составляют среднюю пробу не менее 1 кг, отбирая наиболее упитанных рыб.

Среднюю пробу для других видов рыб и продукции (охлажденная, мороженая, соленая, копченая рыба, консервы и др.) составляют в соответствии с требованиями ГОСТ 7631-73 и ГОСТ 8756.0-70.

### 5.4. Анализ пробы

Среднюю пробу исследуемого объекта или ее часть направляют на анализ - контрольную варку («Проба на варку»).

Техника проведения анализа. Неразделанную рыбу (сельдь-иваси или другую массой не более 200 г) или куски крупной рыбы отваривают в закрытой кастрюле в течение 10 мин предпочтительно на пару или в несоленой воде при слабом кипении. Соотношение рыбы и воды 1:2.

В процессе варки и после ее окончания определяют запах пара, бульона и отварного образца продукта.

Запах бульона и продукта вторично оценивают при пробе на вкус.

### 5.5. Результаты анализа

Результаты химического и органолептического анализов заносят в таблицу (табл.2).

Рыбу с наличием нефтепродуктов следует направлять на производство кормовой муки.

Таблица 2

Результаты органолептического и химического анализов продуктов из гидробионтов.

№ № п/п	Объект исследования	Район лова (с указанием координат)	Название (номер) судна	Время добычи (число, месяц, год)	Количество добытого сырья, т



продолжение таблицы

№ № п/п	Время выработки продукции (число, месяц, год)	Наименование продукции	Предприятие- изготовитель (судно)	Количество выработанной продукции, т (руб.)

продолжение таблицы

№ № п/п	Органолептическая оценка				
	запах <sup>1</sup>			вкус <sup>2</sup>	
	Пара	бульона	продукта	Бульона	продукта

продолжение таблицы

№ № п/п	Содержание нефтепродуктов, мк/кг						
	алканы	алкены	арены			суммарные арены	суммарные углеводороды
			моноядерные	диядерные	триядерные		

<sup>1</sup> Запах нефтепродуктов не обнаружен; слабый запах нефтепродуктов; четко выраженный, устойчивый запах нефтепродуктов.

<sup>2</sup> Привкус нефтепродуктов не ощущается; слабый привкус нефтепродуктов; четко выраженный привкус нефтепродуктов.

# ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ 3,4-БЕНЗ(α)ПИРЕНА (Копыленко Л.Р., Хромых Н.Н., Полуяктов В.Ф., Рубцова Т.Е.)

Методика предназначена для контроля за содержанием 3,4-бенз(α)пирена в продуктах из гидробионтов. Определение массовой доли бенз(α)пирена осуществляют с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) или хромато-масс-спектрометрии.

## 1. СУЩНОСТЬ МЕТОДА

Сущность метода заключается в экстракции углеводородов, в том числе 3,4-бенз(α)пирена, н-гексаном из продукта, предварительно обработанного спиртовым раствором едкого калия, выделении фракции полициклических ароматических углеводородов, содержащей 3,4-бенз(α)пирен, колоночной хроматографии на окиси алюминия и количественном определении в полученной фракции 3,4-бенз(α)пирена с использованием хромато-масс-спектрометрии или высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Диапазон определяемых величин массовой доли 3,4-бенз(α)пирена в анализируемых объектах составляет 0.2-5.0 мкг/кг.

Степень извлечения 3,4-бенз(α)пирена определяется методом внутреннего стандарта, в качестве которого используется дейтерированный антрацен Д-10.

## 2. АППАРАТУРА, МАТЕРИАЛЫ И РЕАКТИВЫ

- Хромато-масс-спектрометр, имеющий в режиме селективного детектирования ионов чувствительность по гексахлорбензолу не менее 40 фг, а в режиме сканирования - не менее 2 пг при соотношении сигнал/шум не менее 3:1.
- Весы лабораторные 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200г по ГОСТ 21104-80.
- Дефлегматор 250-19/26-29/32 ТС или 300-19/26-29/32 ТС по ГОСТ 25336-82.
- Колонка кварцевая капиллярная с неполярной неподвижной жидкой фазой типа SE-54 (30м x 0,25мм x 0,25мкм).
- Колонка стеклянная хроматографическая длиной 500 мм и диаметром 20мм с оттянутым внизу концом и резервуаром вместимостью 50-60 см<sup>3</sup> ПШ 14/23.
- Хроматограф жидкостной, колонка хроматографическая Zorbax ODS.
- Аллонж АИО-14/23-50 ТС по ГОСТ 25336-82.
- Насадка П-1-19/26-14/23 ТС или Н-2-19/23 по ГОСТ 25336-82.
- Баня водяная.
- Баня масляная.
- Воронка Бюхнера 1 или 2, или 3 по ГОСТ 9147.

- Воронка ВФО-32 ПОР 100-14/23 ХС или ВФО-32-ПОР 160-14/23 ХС по ГОСТ 25336-82.
- Воронка делительная ВД-1-500 или ВД-3-500 по ГОСТ 25336-82.
- Гомогенизатор типа АМ-11.
- Испаритель ротационный ИР-1М.
- Колбы мерные 2-100-2 по ГОСТ 25336-82.
- Колба 1-500 по ГОСТ 25336-82.
- Колбы К-1-250-29/32 ТХС, К-1-100-29/32 ТХС, К-1-500-29/32 ТХС или П-1-500-29/32 ТХС по ГОСТ 25336-82.
- Насос водоструйный лабораторный по ГОСТ 25336-82.
- Скальпель или тонкий шпатель.
- Стаканчики для взвешивания (бюксы) СВ-14/8 или СВ-19/9, или СВ-24/10, или СВ34/12 по ГОСТ 25336-82.
- Термометр с пределами измерения температуры 0-250°С и ценой деления 1°С по ГОСТ 29224.
- Цилиндры мерные 1-100, 1-250, 1-500 или 3-100, 3-250, 3-500 по ГОСТ 25336-82.
- Холодильники ХПТ-1-300-14/23 ХС или ХПТ-1-400-14/23 ХС по ГОСТ 25336-82.
- Холодильники ХПТ-2-400-29/32 ХС и ХПТ-1-300-29/32 или ХПТ-400-29/32 ХС по ГОСТ 25336-82.
- Азот ОСЧ по ГОСТ 9293-87.
- Электроплитка бытовая с закрытой спиралью и регулятором нагревания по ГОСТ 14919.
- Аллюминия окись для хроматографии 4-ой степени активности.
- Антрацен дейтерированный (Д-10), содержание основного вещества не менее 98%.
- Бенз(α)пирен, содержание основного вещества не менее 98%.
- Бумага фильтровальная лабораторная по ГОСТ 12026-76.
- Бумага индикаторная универсальная.
- Вода дистиллированная по ГОСТ 6709-72.
- н-Гексан по нормативному документу.
- Гелий марки А.
- Калия гидроокись по ГОСТ 24363.
- Спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 18300-87.
- Хлороформ по ГОСТ 20015-74.
- Эфир диэтиловый.

Допускается применение других средств измерений и оборудования с метрологическими и техническими характеристиками, а также реактивов и материалов, по качеству не ниже указанных.

### **3. ПОДГОТОВКА К ИСПЫТАНИЮ**

#### **3.1. Подготовка реактивов.**

Растворители (гексан, хлороформ) перегоняют общепринятым способом с дефлегматором.

#### **3.2. Приготовление внутреннего стандарта.**

Для приготовления исходного раствора содержимое ампулы ( $1\text{ см}^3$  раствора Д-10 в хлороформе с содержанием основного вещества  $1\text{ мг/мл}$ ) количественно переносят в мерную колбу вместимостью  $100\text{ см}^3$  и доводят объем до метки хлороформом. Хранят раствор в холодильнике.

#### **3.3. Отбор проб.**

Отбор проб проводят по ГОСТ 7631-85 «Рыба, морские млекопитающие, морские беспозвоночные и продукты их переработки. Правила приемки, органолептические методы оценки качества, методы отбора проб для лабораторных испытаний» и ГОСТ 8756.0-70 «Продукты пищевые консервированные. Отбор проб и подготовка их к испытанию».

#### **3.4. Щелочной гидролиз образца.**

Исследуемый образец в количестве  $50\text{ г}$ , взвешенный с точностью  $0,01\text{ г}$ , измельчают на гомогенизаторе и переносят его в круглодонную колбу, добавляют  $24\text{ г}$  едкого кали,  $300\text{ см}^3$  этилового спирта (92%) и  $100\text{ мкл}$  внутреннего стандарта Д-10. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и кипятят на водяной бане в течение  $3\text{ часов}$ .

Реакционную смесь в горячем виде отфильтровывают на воронке Бюхнера. Остаток на фильтре промывают  $100\text{ см}^3$  этилового спирта, нагретого до  $60^\circ\text{C}$ , а затем  $200\text{ см}^3$  н-гексана, после чего в колбу Бунзена добавляют  $500\text{ см}^3$  дистиллированной воды.

#### **3.5. Экстракция фракции неомыляемых липидов**

Реакционную смесь из колбы Бунзена через стеклянную воронку переливают в делительную воронку с тefлоновым краном. Неомыляемые липиды экстрагируют дважды  $100\text{ см}^3$  гексана, а затем смесью гексана с эфиром в соотношении  $1:1$  в количестве  $150\text{ см}^3$ .

В случае образования эмульсии при экстракции для лучшего разделения слоев добавляют небольшое количество ( $2,0\text{--}3,0\text{ г}$ ) безводного сульфата натрия. Экстракты объединяют, промывают дистиллированной водой до нейтральной реакции промывных вод и переносят в плоскодонную колбу на  $500\text{ см}^3$ . Добавляют  $100\text{ г}$  безводного сульфата натрия, закрывают стеклянной пробкой и оставляют на ночь.

Высушенный таким образом экстракт отфильтровывают в круглодонную колбу и упаривают на ротаторном испарителе до объема  $4,0\text{--}5,0\text{ см}^3$ .

### 3.6. Выделение из неомыляемых липидов суммы углеводов

Оксид алюминия в количестве 50 г помещают в колбу объемом 250 см<sup>3</sup>, добавляют 150 см<sup>3</sup> н-гексана и интенсивно встряхивают. Образовавшуюся суспензию постепенно переносят в стеклянную колонку. Когда частицы окиси алюминия осядут и высота растворителя над сорбентом достигнет 0.5 см, на колонку количественно переносят раствор фракции неомыляемых липидов. С колонки углеводороды элюируют 500 см<sup>3</sup> смеси гексана и эфира в соотношении 9:1 (над сорбентом, помещенным в колонку, всегда должен находиться растворитель).

Элюат собирают в плоскодонную колбу на 1 дм<sup>3</sup>, а затем упаривают при температуре 40°C на роторном испарителе до объема 1,0-1,5 см<sup>3</sup>.

## 4. ПРОВЕДЕНИЕ ИСПЫТАНИЙ

### 4.1. Количественное определение содержания 3,4 бенз(α)пирена с использованием метода хромато-масс-спектрометрии.

Определение 3,4 бенз(α)пирена проводят на хромато-масс-спектрометре.

Колонка кварцевая капиллярная с неполярной неподвижной жидкой фазой типа SE-54 (30м x 0,25мм x 0,25мкм).

Температура термостата колонок: начальная – 50°C, конечная – 300°C.

Температура инжектора – 280°C.

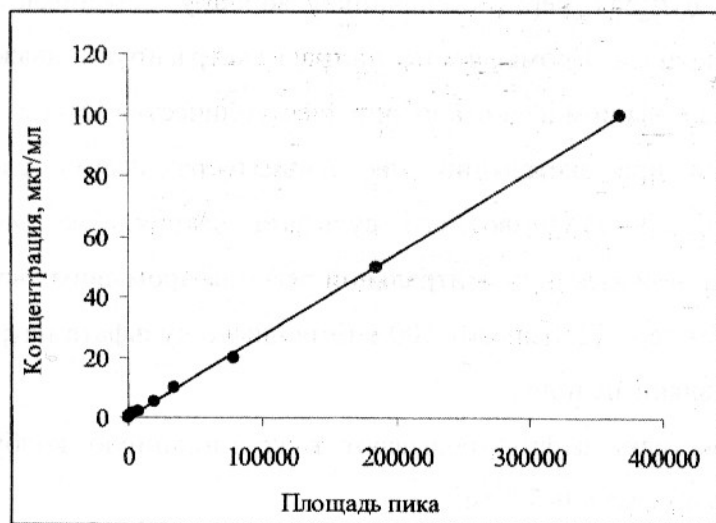
Объем вводимой пробы – 1мкл.

Скорость сканирования – 1 спектр/сек.

Диапазон регистрируемых масс 50-450 в режиме полного ионного тока.

Ионизирующее напряжение-70 В.

### 4.2. Построение калибровочной кривой для определения 3,4-бенз(α)пирена методом ХМС.



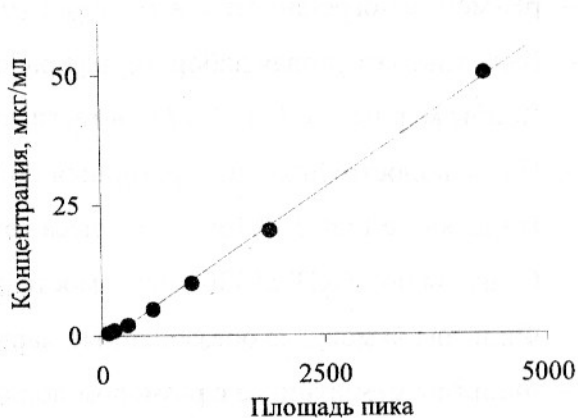
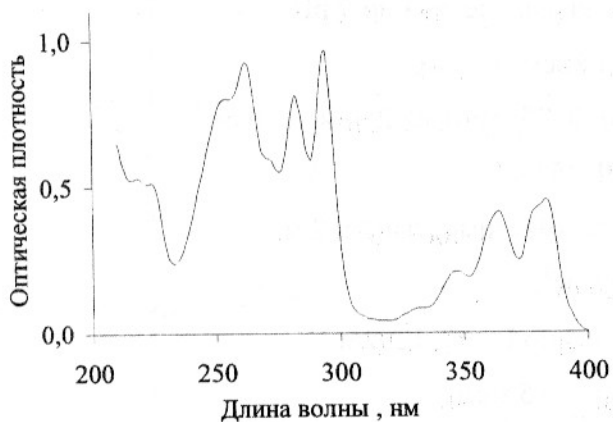
Нормируемое содержание 3,4-бенз(α)пирена в гидробионтах и продуктах из них составляет 0.001 мг/кг. В связи с этим для построения градуировочной кривой готовят стандартные растворы 3,4-бенз(α)пирена с концентрациями от 0.1 до 100 мкг/мл.

### 4.3. Количественное Определение содержания 3,4-бенз( $\alpha$ )пирена с использованием ВЭЖХ.

При рутинных анализах 3,4-бенз( $\alpha$ )пирена при контроле качества и безопасности гидробионтов можно применять метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Используемое при этом оборудование состоит из стандартных блоков, применяемых в жидкостной хроматографии:

- насос для жидкостной хроматографии, обеспечивающий давление до 400 атм.;
- колонка для жидкостной хроматографии с фазой ZORBAX ODS;
- система для ручного ввода образца типа RHEODYNE 7125 с петлей на 10 мкл;
- микрошприц на 25-50 мкл;
- УФ-детектор, обеспечивающий измерение при длине волны ( $\lambda$ ) 295 нм;
- система обработки хроматографических данных, обеспечивающая математическую обработку результатов анализа и построение калибровочной кривой.

Кроме того, для проведения анализа необходим раствор элюента, состоящий из смеси ацетонитрила и воды в соотношении 80:20.



## 5. ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Массовую долю 3,4-бенз( $\alpha$ )пирена в исследуемых образцах в мкг/кг вычисляют по калибровочным кривым, построенным на стандартных образцах.

# ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕНЗОЙНОЙ И СОРБИНОВОЙ КИСЛОТ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

(Полуяктов В.Ф., Митешова Т.С.)

Метод позволяет проводить определение массовой доли бензойной и сорбиновой кислот в диапазоне от 250 до 12500 мг/кг методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

## 1. СУЩНОСТЬ МЕТОДА

Метод основан на экстракции бензойной и сорбиновой кислот из пробы буферным раствором ацетата аммония, содержащим ацетонитрил, и количественном определении бензойной и сорбиновой кислот в экстракте методом ВЭЖХ.

## 2. АППАРАТУРА, МАТЕРИАЛЫ И РЕАКТИВЫ

- Весы лабораторные общего назначения по ГОСТ 24104 с пределом взвешивания 200 г. 2-го класса точности.
- Весы лабораторные общего назначения по ГОСТ 24104 с пределом взвешивания 500 г. 4-го класса точности.
- рН-метр с погрешностью измерения  $\pm 0.05$  в диапазоне от 4 до 9 рН.
- Баня ультразвуковая лабораторная рабочим объемом 2 дм<sup>3</sup>.
- Колбы мерные по ГОСТ 1770 вместимостью 10, 25, 50, 100, 250 и 1000 см<sup>3</sup>.
- Насос водоструйный лабораторный по ГОСТ 25336.
- Пипетки по ГОСТ 29169 1-го класса точности вместимостью 1 и 2 мл.
- Стаканы по ГОСТ 25336 вместимостью 1000 см<sup>3</sup>.
- Фильтры бумажные обеззоленные марки ФОМ по ГОСТ 12026.
- Фильтры мембранные с размером пор не более 0.5 мкм.
- Жидкостной хроматограф, состоящий из:
  - насоса высокого давления;
  - колонок для ВЭЖХ размером 250 x 4.6 мм, заполненной обращенно-фазовым сорбентом с привитыми октадецильными группами (например, Zorbax-ODS);
  - спектрофотометрического детектора для жидкостной хроматографии с диапазоном длин волн 200-350 нм;
  - устройства для ввода пробы объемом 10 мкл;
- Микрошприц для ввода пробы вместимостью 25-50 мкл.
- Ацетонитрил для жидкостной хроматографии, ХЧ.
- Ацетонитрил, ЧДА.
- Аммоний уксуснокислый по ГОСТ 3117, ЧДА.
- Бензойная кислота по ГОСТ 10521, ЧДА.

- Сорбиновая кислота по ТУ 6-38-05800142-117-0-93, фармакопейная.
- Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.
- Калий железистосинеродистый 3-водный по ГОСТ 4207, ХЧ, раствор концентрацией 150 г/л (раствор Карреза I).
- Уксусная кислота по ГОСТ 61, ЧДА.
- Цинк уксуснокислый 2-водный по ГОСТ 5823, ЧДА, раствор концентрацией 300 г/л (раствор Карреза II).

### 3. ПОДГОТОВКА К ИСПЫТАНИЮ

#### 3.1. Калибровка хроматографа

Перед проведением хроматографического анализа с применением спектрофотометрического детектора необходимо провести сканирование растворов бензойной и сорбиновой кислот в диапазоне 200-300 нм для установления максимума поглощения для каждого компонента (рис. 1).

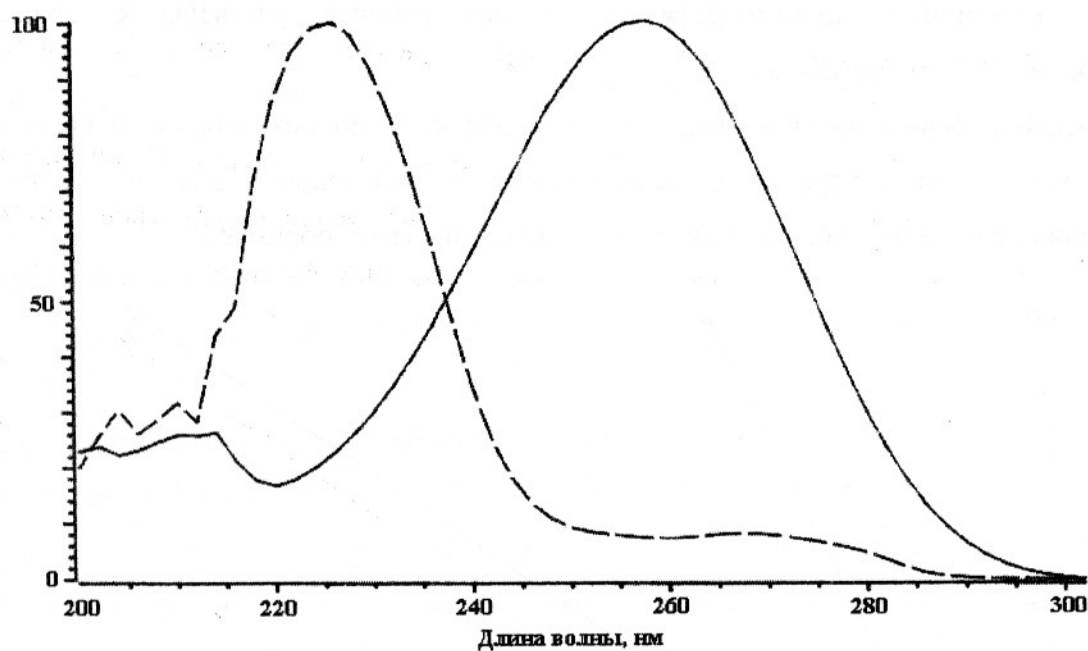


Рис. 1 Спектры поглощения бензойной и сорбиновой кислот.

Бензойная кислота имеет максимум поглощения при 225 нм (пунктирная кривая), а сорбиновая кислота – при 260 нм (сплошная кривая).

Хроматографический анализ содержания бензойной и сорбиновой кислот проводят при выбранных длинах волн для получения максимальной чувствительности хроматографической системы. Результаты анализа представлены на рис. 2.



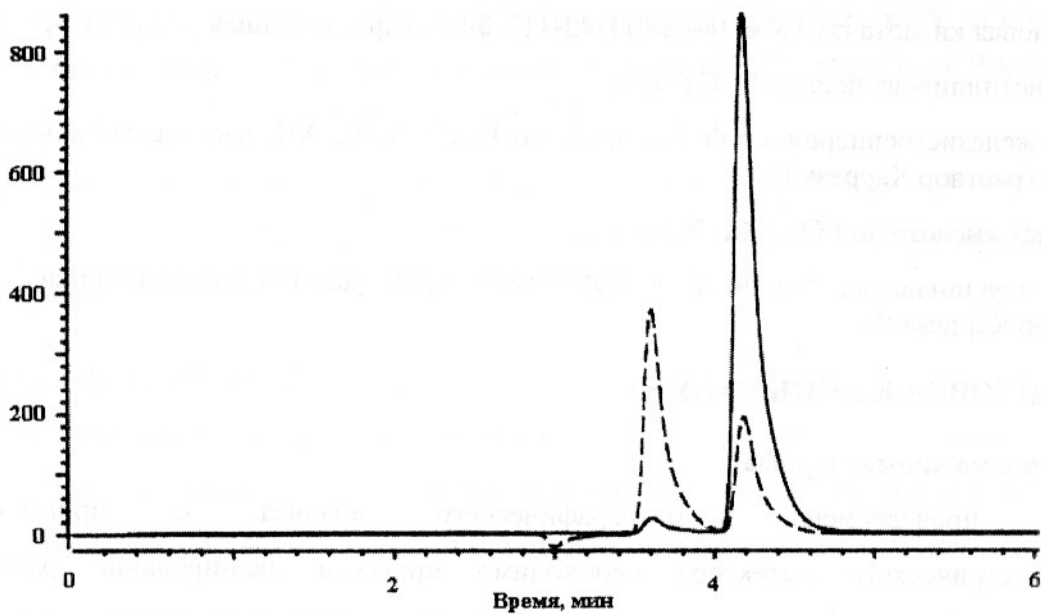


Рис. 2 Хроматограммы бензойной кислоты при 225 нм (пунктирная линия) и сорбиновой кислоты при 260 нм (сплошная линия).

Для калибровки хроматографа используют рабочие растворы с диапазоном концентраций от 1 до 200 мкг/мл.

Каждый рабочий раствор вводят в хроматограф и по результатам анализа строят калибровочные кривые (рис. 3), используемые в дальнейшем для количественного определения бензойной и сорбиновой кислот в анализируемых образцах.

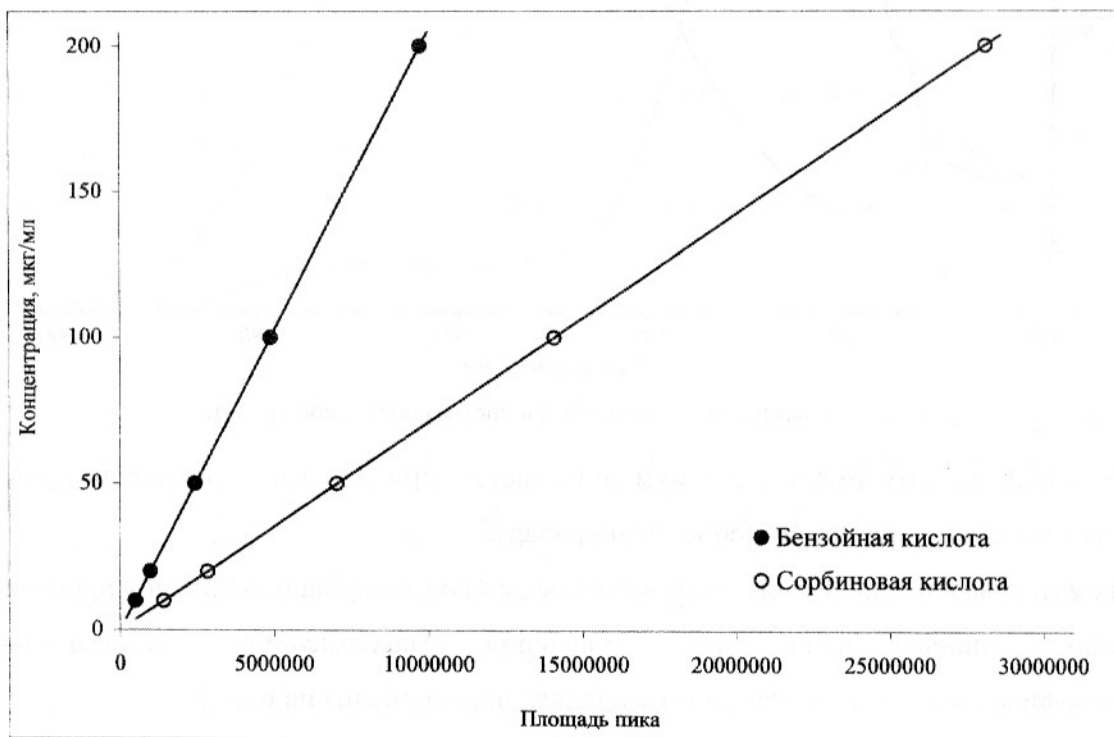


Рис. 3 Калибровочные графики бензойной и сорбиновой кислот

### 3.1. Подготовка реактивов

Для приготовления экстрагирующего раствора используют дистиллированную воду и ацетонитрил чда. Для приготовления подвижной фазы для ВЭЖХ используют бидистиллированную воду и ацетонитрил категории «для жидкостной хроматографии».

#### 3.1.1. Приготовление экстрагирующего раствора и подвижной фазы для жидкостной хроматографии.

Готовят водный раствор ацетата аммония концентрации 0.8 г/л. Величину рН раствора доводят до значения 4.2-4.3 путем добавления по каплям уксусной кислоты. Полученный раствор смешивают с ацетонитрилом в объемном соотношении 65:35. Срок годности раствора – 1 неделя при хранении в плотно закрытой емкости.

#### 3.2.2. Приготовление стандартных растворов бензойной и сорбиновой кислот.

Навески бензойной и сорбиновой кислот массой по 10 мг помещают в мерные колбы емкостью 50 см<sup>3</sup> и растворяют в экстрагирующем растворе. Полученные концентрации бензойной и сорбиновой кислот составляют 200 мг/дм<sup>3</sup>.

Срок годности раствора – 3 месяца при хранении при температуре 4°C в плотно закрытой емкости.

### 3.2. Отбор проб

Пробы рыбы, продуктов из нее, морских млекопитающих и беспозвоночных отбирают по ГОСТ 7631-85, водорослей – по ГОСТ 20438-75, ГОСТ 13496.0-80, консервов и пресервов – по ГОСТ 8756.0-70.

**Проведение испытаний.** Навеску пробы массой 10 г, взвешенную с точностью 0.01г, переносят в мерную колбу емкостью 100 см<sup>3</sup> и добавляют до метки дистиллированную воду. В течение 3 часов образец выдерживают при комнатной температуре для перехода бензойной или сорбиновой кислот в раствор, затем проводят фильтруют его через бумажный складчатый фильтр в колбу на 100 см<sup>3</sup>, в фильтрат добавляют по 2 см<sup>3</sup> растворов Карреза I и Карреза II для осаждения белков. Полученный раствор фильтруют через бумажный складчатый фильтр, к фильтрату добавляют экстрагирующий раствор, доводя им общий объем до 250 см<sup>3</sup>. Полученный раствор используют для хроматографического анализа.

## 5. ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Концентрацию бензойной или сорбиновой кислот в образце вычисляют по формуле:

$$C_{обр.} = \frac{C_{хр.} \times V_{обр.}}{W_{обр.}}, -$$

где  $C_{обр.}$  – концентрация бензойной или сорбиновой кислоты в анализируемом образце, мг/кг;

$C_{хр.}$  – концентрация бензойной или сорбиновой кислоты по результату

хроматографического анализа, мкг/мл;  
 $V_{обр.}$  – общий объем образца, мл;  
 $W_{обр.}$  – навеска образца, взятого на анализ, гр.;

Статистическая обработка результатов образцов с различным уровнем добавок бензойной и сорбиновой кислот показала, что потери бензойной и сорбиновой кислот при выделении и подготовке образца к анализу в большой степени зависят от концентраций этих кислот в объекте исследований и в среднем составляют 5.0% - для бензойной и 9.0% - для сорбиновой кислот.

Графически эти зависимости представлены на рисунке 4.

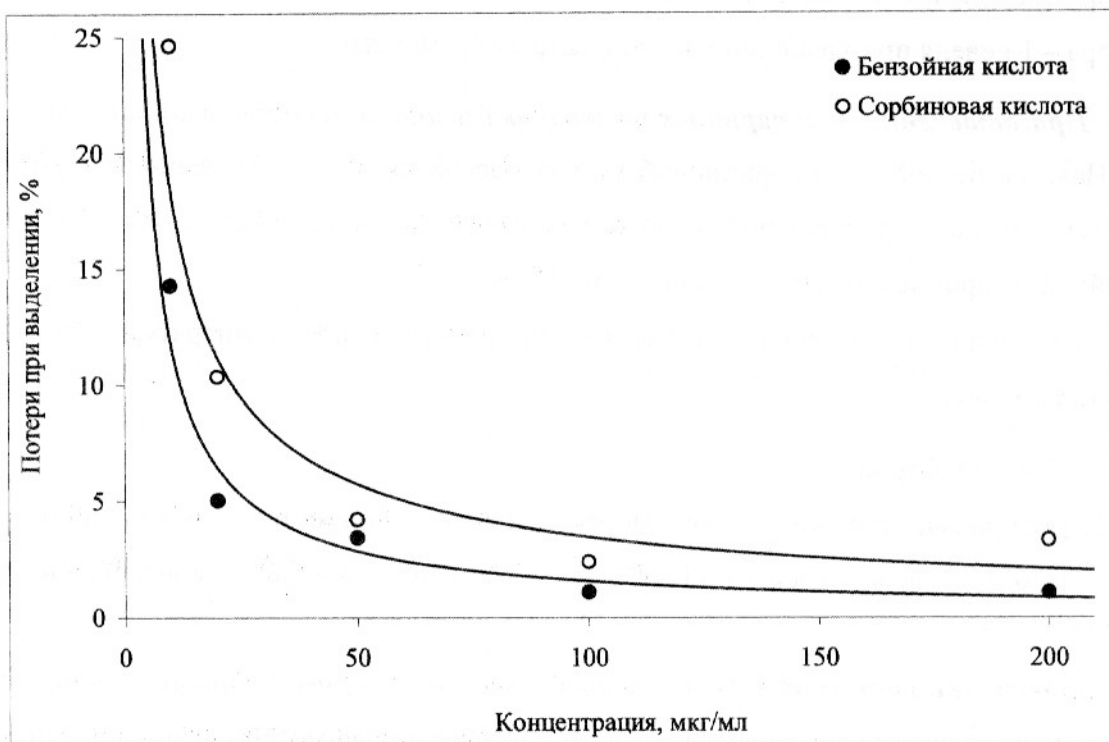


Рис. 4 Потери при выделении бензойной и сорбиновой кислот в зависимости от их концентраций в исследуемом образце

Значения величины потерь бензойной и сорбиновой кислот могут быть описаны математически и рассчитываться по формулам:

$$P_{БК} = 89.202 \times C_{БК}^{-0.8767} \text{ и } P_{СК} = 98.603 \times C_{СК}^{-0.7263},$$

где  $P_{БК}$  - потери при выделении бензойной кислоты, %  
 $C_{БК}$  - концентрация бензойной кислоты в образце, мкг/мл  
 $P_{СК}$  - потери при выделении сорбиновой кислоты, %  
 $C_{СК}$  - концентрация сорбиновой кислоты в образце, мкг/мл

Точность метода – не ниже  $\pm 0.60$  мкг/мл и зависит от концентрации бензойной и сорбиновой кислот в анализируемом образце.

# **ТРЕБОВАНИЯ ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ИСПЫТАНИЙ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ТОКСИКАНТОВ В ПРОДУКТАХ ИЗ ГИДРОБИОНТОВ**

При выполнении исследований по определению токсичных элементов и экстракции органических токсикантов необходимо соблюдать меры безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007, требования пожарной безопасности - по ГОСТ 12.1.004 и требования электробезопасности - по ГОСТ 12.1.019, а также требования, изложенные в нормативной документации на хроматомасс-спектрометр, спектрофлуориметр, газо-жидкостной и жидкостной хроматографы, осветитель ультрафиолетовый и другие приборы и оборудование

Помещение, в котором проводят определение токсикантов, обязательно должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией.

Работу со стандартами, другими химическими соединениями и растворителями проводят в вытяжном шкафу с использованием индивидуальных средств защиты (очки, перчатки и др.).

В лаборатории, где проводят работы с канцерогенными летучими НА, необходимо всегда иметь 2-3% раствор газообразного  $\text{NH}_3$  в уксусной кислоте для разрушения НА при попадании их на рабочие места и пол. В целях разрушения летучих НА в воздухе по окончании работы помещение необходимо обработать ультрафиолетовым светом.

Растворы бенз(а)пирена, а также отработанные окись алюминия и ацетилованную целлюлозу после использования необходимо обработать крепким раствором марганцевокислого калия по ГОСТ 5777 для окисления бенз(а)пирена, после чего раствор сливают в канализацию большим количеством воды.

Транспортировку и хранение токсикантов осуществляют в стеклянных запаянных ампулах, обернутых в асбестовую ткань и укупованных в металлическую тару.

Все стандартные растворы токсикантов хранят в специальном холодильнике в отсутствии анализируемых проб.

## **ТРЕБОВАНИЯ К КВАЛИФИКАЦИИ ОПЕРАТОРА**

К выполнению измерений и обработке полученных результатов допускаются специалисты, имеющие высшее или специальное химическое образование или опыт работы в химической лаборатории и владеющие техникой хроматографического и спектрофлуориметрического анализа, освоившие методы анализа в процессе тренировки и уложившиеся в нормативы оперативного контроля при выполнении процедур контроля погрешности анализа.

## СОДЕРЖАНИЕ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ХИМИЧЕСКИХ ЭЛЕМЕНТОВ МЕТОДОМ АТОМНОЙ АБСОРБЦИИ .....	3
ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ХЛОРОРГАНИЧЕСКИХ ПЕСТИЦИДОВ .....	7
ОПРЕДЕЛЕНИЕ 2,4-ДИХЛОРФЕНОУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ (2,4-Д) и АМИННОЙ СОЛИ 2,4-Д (2,4-ДА) МЕТОДОМ ГАЗОЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ .....	11
ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ПОЛИХЛОРИРОВАННЫХ БИФЕНИЛОВ.....	16
ОПРЕДЕЛЕНИЕ 2,3,7,8-ТЕТРАХЛОРДИБЕНЗОДИОКСИНА МЕТОДОМ ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ.....	19
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛЕТУЧИХ N-НИТРОЗАМИНОВ (МУК 4.4.1.011-93) .....	24
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГИСТАМИНА КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ.....	36
ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ УГЛЕВОДОРОДНЫХ КОМПОНЕНТОВ НЕФТЯНЫХ ЗАГРЯЗНЕНИЙ .....	40
ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ 3,4-БЕНЗ( $\alpha$ )ПИРЕНА .....	57
ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕНЗОЙНОЙ И СОРБИНОВОЙ КИСЛОТ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ.....	62
ТРЕБОВАНИЯ ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ИСПЫТАНИЙ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ТОКСИКАНТОВ В ПРОДУКТАХ ИЗ ГИДРОБИОНТОВ.....	67
ТРЕБОВАНИЯ К КВАЛИФИКАЦИИ ОПЕРАТОРА.....	67

**КАЧЕСТВО, БЕЗОПАСНОСТЬ И МЕТОДЫ АНАЛИЗА  
ПРОДУКТОВ ИЗ ГИДРОБИОНТОВ**

**Выпуск 2**

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ  
ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ СОДЕРЖАНИЯ ТОКСИКАНТОВ  
В ПРОДУКТАХ ИЗ ГИДРОБИОНТОВ**

Подписано в печать 27.12.2005 г. Формат 60 x 84<sup>1</sup>/<sub>8</sub>.  
Печ. л. 9,0. Тираж 200 экз. Заказ № 91.

Издательство ВНИРО  
107140, Москва, ул. Верхняя Красносельская, 17

Тел.: (095) 264-65-33  
Факс: (095) 264-91-87