

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

«УТВЕРЖДАЮ»

Главный государственный
санитарный врач Республики Беларусь

_____ М.И. Римжа

« 28 » декабря 2005 г.

Регистрационный № 216-1205

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛИХЛОРИРОВАННЫХ ДИБЕНЗО-*n*-
ДИОКСИНОВ И ДИБЕНЗОФУРАНОВ В МЯСНЫХ, МОЛОЧНЫХ,
РЫБНЫХ ПРОДУКТАХ, А ТАКЖЕ В КОРМАХ МЕТОДОМ ХРОМАТО-
МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ**

Инструкция по применению

Учреждения-разработчики: Республиканский научно-практический центр гигиены Минздрава РБ, Российский научно-исследовательский центр чрезвычайных ситуаций Минздрава РФ, Научно-производственное объединение «Тайфун» Роскомгидромета, Институт проблем эволюции и экологии им. А.Н. Северцова РАН

Авторы: И.А. Застенская, Н.И. Марусич, Н.П. Лешошук, Ю.А. Присмотров, Н.Н. Турко, С.Ю. Семенов, В.Н. Смирнов, Г.В. Зыкова, Ю.Н. Дубров, Г.Г. Финаков, А.Д. Орлянский, Р.И. Первунина, Д.П. Самсонов, В.П. Кирюхин, Н.П. Жирюхина, Т.В. Рахманова, В.Е. Соколов, Н.А. Клюев, Е.С. Бродский, В.Г. Жильников, В.С. Сойфер, Е.И. Соболева

1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Настоящая Инструкция устанавливает метод идентификации и выполнения измерений массовых концентраций (далее концентраций) 17 высокотоксичных замещенных полихлорированных дибензо-*n*-диоксинов (ПХДД), дибензофуранов (ПХДФ) и их изомеров: 2,3,7,8-ТетраХДД; 1,2,3,7,8-ПентаХДД; 1,2,3,4,7,8-ГексаХДД; 1,2,3,6,7,8-ГексаХДД; 1,2,3,7,8,9-ГексаХДД; 1,2,3,4,6,7,8-ГептаХДД; ОктаХДД; 2,3,7,8-ТетраХДФ; 1,2,3,7,8-ПентаХДФ; 2,3,4,7,8-ПентаХДФ; 1,2,3,4,7,8-ГексаХДФ; 1,2,3,6,7,8-ГексаХДФ; 2,3,4,6,7,8-ГексаХДФ; 1,2,3,7,8,9-ГексаХДФ; 1,2,3,4,6,7,8-ГептаХДФ; 1,2,3,4,7,8,9-ГептаХДФ; ОктаХДФ - в мясных, молочных, рыбных продуктах, а также в кормах с использованием хромато-масс-спектрометрии.

Предел обнаружения тетра-, пента-, гекса-, гепта- и октахлорированных ПХДД и ПХДФ составляет соответственно 0,5; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0 нг/кг при массе анализируемой пробы 10-200 г. Точная навеска анализируемой пробы зависит от чувствительности прибора, а также от содержания жира в пробе и определяется предварительными испытаниями с применением внутреннего стандарта. Диапазон определяемых концентраций указан в Прил. 1.

Настоящая Инструкция предназначена для органов и учреждений, осуществляющих государственный санитарный надзор, для научно-исследовательских организаций и других заинтересованных ведомств.

2. КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИССЛЕДУЕМЫХ ВЕЩЕСТВ

Всего существуют 75 различных ПХДД и 135 ПХДФ, отличающихся количеством и местом присоединения атомов хлора. Наиболее токсичные 17 изомеров ПХДД и ПХДФ. Из них самым токсичным является 2,3,7,8-тетрахлордибензо-*n*-диоксин (2,3,7,8-ТетраХДД), который представляет собой кристаллическое вещество с температурой плавления 305-307° С, растворимостью в воде $2 \times 10^{-8}\%$, химически инертное, термостойкое, не разлагаемое кислотами и щелочами. 2,3,7,8-ТетраХДД высоко токсичен даже в малых концентрациях. Токсичность других ПХДД и ПХДФ выражается в эквивалентах токсичности (диоксиновых эквивалентах, ДЭ)- долях от

токсичности 2,3,7,8-ТетраХДД, принятой за единицу (см. Прил. 5).

3. ЗНАЧЕНИЯ ХАРАКТЕРИСТИК ПОГРЕШНОСТИ МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПХДД И ПХДФ И ИХ ДОПУСТИМЫЕ УРОВНИ

В России установлены допустимые уровни содержания диоксинов (в пересчете на диоксиновый эквивалент) и, согласно распоряжению Минздрава СССР № 142-9/105 от 5 мая 1991 года, составляют:

- для мяса (съедобная часть) – 0,9 нг/кг, в пересчете на жир-3,3 нг/кг;
- для рыбы (съедобная часть) - 11,0 нг/кг, в пересчете на жир-88,0 нг/кг;
- для молока и молочных продуктов в пересчете на жир – 5,2 нг/кг.

За норму погрешности настоящей методики приняты значения характеристики погрешности, полученные при ее аттестации.

При соблюдении всех регламентируемых методикой условий проведения измерений характеристика погрешности(d) результата анализа X с вероятностью $P = 0,95$ не превышает значений, приведенных в прил. 1.

4. МЕТОД ИЗМЕРЕНИЯ

Методика основана на экстракции из исследуемых проб продуктов питания ПХДД и ПХДФ органическим растворителем, в которые (пробы) предварительно были внесены изотопномеченные внутренние стандарты ПХДД и ПХДФ (стандарты-имитаторы), очистке экстрактов от сопутствующих соединений, мешающих определению ПХДД, ПХДФ, и последующем их анализе с помощью сочетания высокоэффективной капиллярной газовой хроматографии и масс-спектрометрии (ГХ-МС).

Идентификацию ПХДД и ПХДФ осуществляют по временам удерживания и соотношению площадей хроматографических пиков идентифицируемых компонентов и стандартов-имитаторов на регистрируемых ионных масс-хроматограммах.

Концентрации ПХДД и ПХДФ определяют методом абсолютной калибровки.

5. СРЕДСТВА ИЗМЕРЕНИЙ

Хромато-масс-спектрометрическая система, включает:

- газовый хроматограф, (Varian 3400, Hewlett-Packard 6890A);
- инжектор split-splitless или on-column;
- масс-спектрометрический детектор высокого или низкого разрешения, позволяющий вести регистрацию отдельных ионов с заданными массами;
- компьютерная система обработки данных (Finnigan MAT 8200, MAT-95, HP 5988, HP 5973, ITD 700, Nermag R 10-10);
- капиллярные хроматографические колонки 50 (60) м x 0,25 (0,32) мм с неподвижной неполярной фазой типа SE-54 (DB-5, Ultra-2 и др.) и полярной фазой SP 2331, CP Sil 88, DB-DIOXIN, HP-23;
- микрошприцы типа Hamilton вместимостью 1, 10, 100, 500 мкл с ценой деления 0,01, 0,1, 1,0, 10 мкл, соответственно.
- весы аналитические ВЛР-200М, 2 класса точности с погрешностью $\pm 0,0002$ г (ГОСТ 24104-80Е);
- меры массы Г-2-210 (ГОСТ 7328-82)
- стандартные растворы изотопномеченых ПХДД, ПХДФ (внутренний стандарт, стандарт-имитатор), производства фирмы Cambridge Isotope Laboratory (CIL), например, EDF – 4053*, сконцентрацией не менее (50 ± 5) мкг/см³.

Допускается использование других изотопов ¹³C12-хлорзамещенных производных или их композиций, стандартных растворов на основе ³⁷Cl₄, ¹³C₆ фирмы CIL.

Стандартные растворы немеченых отдельных или смеси всех 17 определяемых ПХДД и ПХДФ с содержанием их 40-400 мкг/см³, производства фирмы CIL (например, EDF – 7999) (для градуировки прибора). Рекавер стандарт (¹³C₁₂): 1,2,3,4-ТетраХДД/1,2,3,7,8,9-ГексаХДД, производства фирмы CIL.

Допускается использование стандартных растворов индивидуальных компонентов других фирм с содержанием основного компонента не менее 98-99% и с погрешностью аттестованного значения концентраций не выше 5%.

Микродозаторы 20-200; 100-1000 мкл., 1-5 см³.

Цилиндры 3-25 (50, 100)-1 (ГОСТ 1770-74).

Колбы мерные 2-25-2, 2-50-2 (ГОСТ 1770-74).

Пипетки 1-2-1, 2-2-5 (ГОСТ 29227-91).

*- Номер по каталогу «Environmental Contaminant Standards».

Допускается использование других средств измерения, обеспечивающие проведение анализа с заданной погрешностью, а также других колонок с неподвижными фазами, обеспечивающими разделение замещенных изомеров ПХДД и ПХДФ.

6. ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ УСТРОЙСТВА И ЛАБОРАТОРНАЯ ПОСУДА

1. Ротационный испаритель типа RY-05 ST Basic 1-B.
2. Сушильный шкаф типа SNOL 67/350 нерж. сталь.
3. Электродуховка лабораторная типа SNOL 7,2/1100.
4. Ванна ультразвуковой очистки типа Bandelink ДК-514 ВРВ.
5. Встряхиватель горизонтальный типа HS-260 Basic.
6. Эксикатор 2-250 (ГОСТ 9147-80Е).
7. Колонка стеклянная длиной 400 мм и внутренним диаметром 7 мм.
8. Колонка стеклянная длиной 200 мм и внутренним диаметром 7 мм.
9. Трубка стеклянная длиной 90 мм, внутренним диаметром 3,5 мм.
10. Флаконы для образцов с коническим дном и герметичной пробкой типа Wheaton Mini-Vials вместимостью 1 и 2 см³.
11. Флаконы для образцов с герметичной пробкой вместимостью 4-10 см³ (резервуар Мишаль-Миллер).
12. Колба Бунзена с воронкой Бюхнера.

13. Мясорубка с диаметром отверстий 3-5 мм.
 14. Трубки полиэтиленовые внешним диаметром 2 мм.
 15. Трубки из силиконовой резины.
 16. Резистор ПЭВ-15 ТУ-ОЖ 0467546, или другой обогреватель колонки.
 17. Баллон со сжатым воздухом или генератор чистого воздуха ГЧВ–0,8 –2,5 (ЖНЛК 2.022.000.000 ТУ).
 18. Редуктор кислородный.
 19. Посуда лабораторная стеклянная (ГОСТ 25336-82).
 20. Воронки лабораторные В-36-50, В-100-150 (ГОСТ 25336-82).
 21. Воронки делительные ВД-1-100 ХС (ГОСТ 25336-82).
 22. Дефлегматор 250-14/23-29/32-ТС (ГОСТ 25336-82).
 23. Колбы конические вместимостью Кн-1-50-14/23 ТС, Кн-1-250-24/29 ТС (ГОСТ 25336-82).
 24. Колбы круглодонные К-1-500-29/32 ТС, К-1-1000-29/32 ТС К-1-2000-29/32 ТС (ГОСТ 25336-82).
 25. Стаканы В-1-50 ТС, В-1-100 ТС (ГОСТ 25336-82).
 26. Холодильник ХПТ-1-300-14/23 ХС (ГОСТ 25336-82).
 27. Пробирки кварцевые П-6-КШ 14/23 (ГОСТ19908-80).
- Допускается использование вспомогательного оборудования и лабораторной посуды других марок, обеспечивающих проведение анализа с заданной погрешностью.

7. РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ

1. Ацетон, ос.ч. 9-5 (ТУ 263-039-44493179-00).
2. Толуол, ос.ч. 22-5 (ТУ 2631-065-44493179-01).
3. Метанол, х.ч. (ГОСТ 6995-77).
4. н-Гексан, ч. (ТУ 6-09-3375-78).
5. Метиленхлорид, ч.14-4 (ТУ 6-09-20-30-78)
6. Тридекан, ч. (ТУ 6-09-3732-74)

7. Кислота серная, ос.ч. (ГОСТ 4204-77).
8. Натрий серноокислый безводный, х.ч. (ГОСТ 4166-76).
9. Калия гидроксид, х.ч. (ГОСТ 24363-80)
10. Силикагель 60 для хроматографии (MERCK).
11. Оксид алюминия активированный, щелочной, Brokmann I, (Aldrich Chemical Company, Inc.).
12. Целит 545 (Fluka Chemika).
13. Уголь активированный «Nozit», тип А, пудра (Fluka Chemika).
14. Натрий фосфат, ч.д.а. (ГОСТ 9337-79).
15. Аммоний серноокислый безводный, х.ч. (ГОСТ 4166-76).
16. Магний серноокислый, ч.д.а. (ГОСТ 4523-77).
17. Диметилдихлорсилан, ч. (ТУ 6-09-3278-78).
18. Калия дихромат, ч. (ГОСТ 4220-75).
19. Циклогексен, х.ч. (ТУ 6-09-11-2009-87).
20. Вата медицинская гигроскопическая (ГОСТ 5556-81).
21. Фильтр стеклянный микроволоконистый GF/A,D,F (Whatman), (кварцевая вата).

Допускается использование реактивов и материалов других марок после их проверки путем проведения всей процедуры анализа для холостого опыта со стандартными растворами изотопномеченных ПХДД и оценки полученных результатов с учетом характеристик погрешности.

8. ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ

Требования безопасности устанавливаются в соответствии со специальными инструкциями по работе с диоксином (например, "Инструкция по технике безопасности по работе с 2,3,7,8-ТетраХДД", утверждена Главным Управлением при Минздраве СССР от 02.12.1986 г.).

Помещения, в которых проводится подготовка проб, должны быть оборудованы приточно-вытяжной вентиляцией. Исходные стандартные образцы для приготовления градуировочных растворов и аттестованных

смесей должны храниться в холодильнике, расположенном в запираемом металлическом шкафу.

Все операции по приготовлению аттестованных смесей и градуировочных растворов, содержащих ТетраХДД и его меченые аналоги, добавлению стандартов к образцу, подготовке образца к анализу, следует проводить в вытяжном шкафу.

Пробы, подготовленные к анализу, и растворы стандартных образцов, градуировочных и контрольных растворов, аттестованных смесей следует держать в ампулах, закрытых завинчивающейся или запрессованной крышкой с тефлонированной резиновой прокладкой, прокалываемой микрошприцем. Работать с указанными растворами необходимо в резиновых или полиэтиленовых перчатках.

Меры по оказанию первой помощи при попадании диоксина и его растворов на кожу, в глаза и желудок проводят в соответствии с "Временной инструкцией по лечению отравлений диоксином", утвержденной заместителем Министра здравоохранения СССР от 10 сентября 1986 г.

9. ТРЕБОВАНИЯ К КВАЛИФИКАЦИИ ОПЕРАТОРА

Подготовку проб могут проводить научный сотрудник, инженер, техник или лаборант со средним специальным или высшим образованием, прошедшие соответствующую подготовку по работе с веществами 1-го класса опасности и имеющие навыки работы в химической лаборатории. Измерения на приборе может проводить инженер или научный сотрудник, имеющие навыки работы на газовом хроматографе и масс-спектрометре. Все работающие должны быть проинструктированы о работе с веществами 1-2 класса опасности, органическими растворителями, правилах работы в химической лаборатории и работы с электроустановками.

10. ОТБОР, ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВКА ПРОБ

Условия отбора, хранения и транспортировки проб проводят согласно

11. ПОДГОТОВКА К ПРОВЕДЕНИЮ АНАЛИЗА

Перед выполнением измерений должны быть проведены следующие работы: подготовка химической посуды, приготовление растворов и адсорбционных колонок, подготовка измерительной аппаратуры, установление градуировочной характеристики, подготовка и экстракция проб, выделение ПХДД и ПХДФ, очистка проб на колонках.

11.1. Подготовка химической посуды и кварцевой ваты для колонок

Водопроводной водой со стеклянной химической посуды смывают видимые частицы или налет на стенках. Затем посуду промывают насыщенным раствором тринатрийфосфата (10-30 см³), обильно ополаскивают водопроводной водой и помещают в раствор дихромата калия в серной кислоте на 7-8 часов, после чего посуду обильно промывают последовательно водопроводной водой, насыщенным раствором тринатрийфосфата, дистиллированной водой, высушивают в сушильном шкафу. Далее, каждый предмет посуды ополаскивают последовательно ацетоном, дихлорметаном, толуолом, ацетоном и высушивают при 120-150° С в течение 30 минут.

Фильтр микроволокнистый стеклянный проходит те же стадии очистки, кроме обработки раствором тринатрийфосфата, прокаливают при 450° С в течение 4 часов.

11.2. Силанизирование посуды

Подготовленную посуду (п. 11.1.) охлаждают до комнатной температуры, ополаскивают 5% раствором диметилдихлорсилана в толуоле, выдерживают в течение 3 часов в сушильном шкафу при 250° С, а затем ее охлаждают до комнатной температуры и ополаскивают ацетоном.

11.3. Подготовка растворителей, сорбентов и осушителей

А) Очистка гексана

1-ый способ. К 4 дм³ гексана добавляют 150 г силикагеля,

импрегнированного серной кислотой (п. 11.3., В). Смесь встряхивают в течение 6-8 часов. После оседания силикагеля растворитель декантируют и перегоняют, отбрасывая первый отгон (приблизительно 5%) и остаток (5%).

2-ой способ. К 1 дм³ гексана в делительной воронке добавляют 100 см³ серной концентрированной кислоты, воронку энергично встряхивают. Затем содержимое отстаивается, и кислотный (нижний) слой удаляют. Процедура повторяется до слабо-желтой окраски кислоты после встряхивания с гексаном. Гексан в делительной воронке промывают дистиллированной водой, 0,1 н раствором щелочи, снова дистиллированной водой до нейтральной реакции лакмусовой бумажки, просушивают пропусканием гексана через слой сульфата натрия.

Хлористый метилен, ацетон, толуол и другие растворители очищают путем перегонки перед употреблением. Хлористый метилен стабилизируют циклогексеном (20 мкл/дм³).

Растворители с маркой «pesticide grade» (для анализа пестицидов) могут использоваться без дополнительной очистки.

Б) Активирование силикагеля и оксида алюминия

Силикагель промывают последовательно двойными объемами метанола, метиленхлорида, затем активируют в сушильном шкафу 24 часа при 180° С.

Оксид алюминия активируют при 600° С в электропечи в течение 12 ч в кварцевых ампулах по 4 г в каждой, после чего ампулы закрывают и хранят в эксикаторе с осушителем.

В) Силикагель, импрегнированный серной кислотой

Смесь активированного силикагеля (п. Б) и концентрированной серной кислоты перемешивают на встряхивателе или качалке до отсутствия комков (не менее 7 часов). Навески силикагеля и серной кислоты рассчитывают в зависимости от необходимой концентрации последней.

Г) Силикагель, импрегнированный гидроксидом калия

Готовят метанольный раствор гидроксида калия, для чего 224 г гидроксида калия растворяют в 300 см³ метанола.

К 120 г активированного силикагеля (п. Б) приливают 300 см³ метанольного раствора гидроксида калия порциями по 50-70 см³ и интенсивно перемешивают до отсутствия комков. Смесь выдерживают ночь в закрытой посуде, затем ее отфильтровывают, промывают порциями метанола по 100 мл до рН 6-7. Импрегнированный гидроксидом калия силикагель активируют при 180° С в течение 17 часов в сушильном шкафу.

Д) Натрий серноокислый прокаливают при температуре 400° С в течение 4 часов.

Е) Магний серноокислый прокаливают при температуре 450° С в течение 4 часов.

При подготовке и использовании каждой новой партии реактивов и материалов или замене одного из них проводят проверку путем выполнения всей процедуры анализа для холостого опыта и контрольной аттестованной смеси, оценивая результаты с учетом характеристик погрешности. Допускается использование растворителей и сорбентов других марок, обеспечивающих проведение анализа с заданной погрешностью.

11.4. Подготовка колонок

А) Подготовка угольной колонки

Для угольной колонки используют стеклянную трубку длиной 90 мм, внутренним диаметром 3,5 мм с оплавленными концами (п.6). С одного конца трубки вводят тампон из кварцевой ваты (п. 11.1.), высотой 10 мм. В колонку помещают 200 мг смеси активированного угля с целлитом (1:10) и колонку уплотняют постукиванием. Вводят аналогичный тампон из кварцевой ваты, окончательно уплотняя сорбент.

К изготовленной угольной колонке присоединяют резервуар Мишель-Миллер посредством тефлоновой трубки, уплотняя соединение с колонкой силиконовым шлангом.

Б) Подготовка «многослойной» колонки

Для «многослойной» колонки используют стеклянную трубку длиной 400 мм и внутренним диаметром 7 мм (п. 6.). Для «многослойной» колонки

используют стеклянную трубку длиной 400 мм и внутренним диаметром 7 мм (п. 5.8.). «Многослойная» колонка состоит из следующих слоев (сверху вниз) – 5 см³ 30% H₂SO₄ /SiO₂; 1,5 см³ MgSO₄; 10 см³ 40% H₂SO₄ /SiO₂; 1,5 см³ MgSO₄; 15 см³ 44% H₂SO₄ /SiO₂; 1,5 см³ MgSO₄; 7 см³ K₂SiO₃; 1,5 см³ MgSO₄.

В) Подготовка колонки с окисью алюминия

Для колонки этого типа используют стеклянную трубку длиной 200 мм и внутренним диаметром 7 мм (п. 6). Колонку набивают 4 г щелочным оксидом алюминия, предварительно активированный (п. 11.3., Б).

11.5. Приготовлении ерастворов ПХДД и ПХДФ

А) Приготовление исходных стандартных растворов меченных ¹³C₁₂-ПХДД и ПХДФ с концентрацией 1 мкг/см³ (стандарт-имитатор, внутренний стандарт), для чего проводят соответствующее разведение стандартных растворов изотопномеченных ¹³C₁₂-ПХДД и ПХДФ (п. 5).

Сосуды, в которых хранят растворы, маркируют и взвешивают для того, чтобы учесть потери растворителя в процессе испарения. Растворы хранят в мерных колбах с притертыми стеклянными пробками в холодильнике при температуре 4° С. Перед использованием растворы доводят до температуры окружающей среды и в случае необходимости корректируют уровень растворителя.

Растворы стабильны в течение 1 года.

Б) Приготовление рабочих стандартных растворов меченых ¹³C₁₂-ПХДД и ПХДФ с концентрацией 10 нг/см³ (стандарт-имитатор, внутренний стандарт) проводят в мерных колбах с использованием дозаторов, путем соответствующего разведения и сходных стандартных растворов ¹³C₁₂-ПХДД и ПХДФ (п. 11.5., А). При этом используют растворитель того же названия, который применялся в исходном растворе.

Условия хранения растворов идентичны п. 11.5., А.

Растворы стабильны в течение 1 года.

В) Приготовление градуировочных растворов соединений ¹²C₁₂-ПХДД и ¹²C₁₂-ПХДФ

Приготовление градуировочных растворов смеси или отдельных наименований каждого имеющегося вещества $^{12}\text{C}_{12}$ -ПХДД ($^{12}\text{C}_{12}$ -ПХДФ) проводят в мерных колбах с использованием дозаторов, путем соответствующего разведения имеющихся (закупленных) концентраций растворов $^{12}\text{C}_{12}$ -ПХДД ($^{12}\text{C}_{12}$ -ПХДФ). При этом используют растворитель того же названия, который применялся в исходном растворе.

Готовят следующие концентрации: Тетра- и ПентаХДД(Ф) от 10 до 100 нг/см³; ГексаХДД(Ф) от 20 до 200 нг/см³; ГептаХДД(Ф) от 40 до 400 нг/см³; ОктаХДД(Ф) от 100 до 1000 нг/см³. Для каждого вещества готовят не менее четырех концентраций.

Условия хранения растворов идентичны п. 11.5. А.

Растворы стабильны в течение 6 месяцев.

11.6. Подготовка аппаратуры

Хромато-масс-спектрометрическую систему готовят к работе в соответствии с инструкцией по эксплуатации. Проверяют функционирование ГХ-МС системы, вводя в инжектор хроматографа растворитель и рекавер стандарты, оценивают общую чувствительность прибора, фон, наличие эффектов "памяти" и артефактов.

11.7. Получение градуировочной зависимости для каждого из определяемых компонентов

Для каждого определяемого ПХДД(Ф) во флаконы, с плотно закрывающимися пробками, вместимостью 1 см³ вводят дозатором по 0,995 см³ градуировочных растворов (п.10.5., В) и добавляют с помощью микрошприца по 0,005 см³ стандартного раствора $^{13}\text{C}_{12}$ -2,3,7,8-ТетраХДД (или набора изотопномеченных внутренних стандартов) с концентрацией 1 мкг/см³ (п. 10.5., Б).

По 0,001 см³ каждого раствора вводят микрошприцем в инжектор газового хроматографа в режиме splitless (или on-column). Регистрируют масс-хроматограммы для ионов с массами, указанными в прил. 2.

С помощью системы обработки данных находят градуировочную

зависимость отношения площади хроматографического пика каждого определяемого компонента на масс-хроматограммах для одного или обоих регистрируемых изотопных ионов к площади пика соответствующего иона внутреннего стандарта от концентрации того же определяемого компонента. Например, для 2, 3, 7, 8-ТетраХДД и внутреннего стандарта $^{13}\text{C}_{12}$ -2, 3, 7, 8-ТетраХДД определяют зависимость концентрации 2, 3, 7, 8-ТетраХДД и отношения площадей хроматографических пиков для ионов 320/332, 322/334.

Градуировочная зависимость считается приемлемой, если все точки находятся в доверительном интервале, соответствующем 95%-й доверительной вероятности.

11.8. Подготовка и экстракция проб

Мягкие ткани биологических образцов нарезают на куски и размельчают в шнековой мясорубке с диаметром отверстий 3-5 мм. 100 г полученной массы помещают в колбу вместимостью 500 см³, дозатором вносят 0,01 см³ рабочего раствора меченого стандарта $^{13}\text{C}_{12}$ -2, 3, 7, 8-ТетраХДД с концентрацией 10 нг/см³, добавляют 150 см³ ацетона. Колбу помещают в ультразвуковую баню и через 10-15 минут в колбу добавляют 150 см³ гексана. Содержимое колбы озвучивают еще в течение 10 минут. Затем в колбу с образцом вносят 60 г сульфата аммония для получения насыщенного водного раствора сульфата аммония – 71%. Полученную смесь интенсивно перемешивают с помощью гомогенизатора в течение 30 минут, затем оставляют расслаиваться на 1-2 часа (при использовании этого метода не происходит мгновенного разделения фаз). Верхнюю фазу отделяют и фильтруют. Остаток в колбе дважды промывают в 30-50 см³ гексана, отфильтровывают через неплотный бумажный или стеклофильтр на воронке Бюхнера под небольшим вакуумом. Органические фазы объединяют.

11.9. Выделение ПХДД и ПХДФ

Экстракт переносят в резервуар Мишель-Миллер, который подсоединяют к угольной колонке. Создают в резервуаре давление не более 2 атмосфер, устанавливая скорость пропускания раствора через угольную

колонку 2 см³/мин. После пропускания всего раствора давление в резервуаре сбрасывают, помещают в резервуар 20 см³ смеси ацетона и гексана (50:50 объем.) и промывают ею колонку, пропуская ее с такой же скоростью. Гексан-ацетоновую фракцию упаривают на роторном испарителе в вакууме при 40° С до полной отгонки растворителя и взвешивают остаток, определяя количество жира. Угольную колонку отсоединяют от резервуара и переворачивают. Включают в сеть 220 В колоночный обогреватель и через 10 мин колонку помещают во внутрь его для нагрева колонки до температуры не выше 100° С. В резервуар над колонкой помещают 5 см³ толуола и устанавливают давление, достаточное для пропускания толуола через колонку со скоростью 2 см³/мин. Толуольный элюат содержит ПХДД и ПХДФ.

11.10. Очистка экстракта на «многослойной» колонке с модифицированным силикагелем

Толуольный экстракт разбавляют 45 см³ гексана, перемешивают и вносят в колонку с модифицированным силикагелем. Смывают остатки с колбы двумя порциями по 5 см³ гексана и так же переносят в колонку. После прохождения раствора колонку промывают 75 см³ смеси гексана и хлористого метилена в соотношении 3:1. Затем растворитель из колонки вытесняют током воздуха. Объединенный элюат упаривают до 1-1,5 см³ и очищают на колонке с оксидом алюминия.

11.11. Очистка на колонке с оксидом алюминия

Объединенный экстракт пропускают через колонку с оксидом алюминия. Колбу смывают дважды 5 см³ гексана, который так же пропускают через колонку. Колонку промывают последовательно 20 см³ смеси гексана и хлористого метилена (95:5 объем.) и элюируют 50 см³ смеси гексана и метиленхлорида (50:50 объем.). Элюат упаривают до объема около 2 см³ в колбе с дефлегматором, переносят во флакон Mini-Vial вместимостью 5 см³, добавляют 0,01 см³ тридекана и 0,001 см³ рекавер-стандарта, упаривают пробу в токе азота до полного испарения растворителя (кроме тридекана).

Подготовленные для анализа пробы могут храниться до 40 суток при

температуре не выше 4° С.

12. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

12.1. Условия проведения анализа

В связи с тем, что в настоящее время не существует капиллярных колонок, способных разделить все изомеры, в ряде случаев анализ проводят в два этапа. Сначала, применяют неполярную колонку типа SE-54. Если обнаруживают: 1, 2, 3, 7, 8, 9-ГексаХДД; 2, 3, 7, 8-ТетраХДФ; 2, 3, 4, 7, 8-ПентаХДФ; 1, 2, 3, 4, 7, 8-ГексаХДФ, то ту же пробу анализируют на полярной колонке, например, SP2331, для определения именно этих изомеров.

Анализ проводят по температурной программе, подобранной в процессе предварительных опытов, таким образом, чтобы обеспечить отделение определяемых ПХДД и ПХДФ от других изомеров в наилучшей степени. Эффективность разделения хроматографической системы перед каждой серией, но не реже одного раза в неделю, должна экспериментально подтверждаться вводом в ГХ-МС стандартной смеси изомеров ТетраХДД (п. 4.5.). Эффективность разделения достаточна при соблюдении следующего условия для любой пары изомеров:

$$2h/(H_1+H_2)<0,7,$$

где H_1, H_2 – высоты неразрешенных пиков;

h - высота долины между ними.

Для колонки с неподвижной фазой DB-5 можно рекомендовать, например, следующую температурную программу: начальная температура термостата 120° С, скорость подъема температуры 20° С/мин до 240° С, с 240° С до 270° С -2° С/мин и выдержка при этой температуре до выхода всех компонентов. Температура инжектора и интерфейса 250° С. Температура источника ионов масс-спектрометра -250° С, энергия ионизирующих электронов - 50-70 эВ. Условия получения масс-спектров могут быть и другими в зависимости от типа масс-спектрометра и условий его юстировки.

Необходимым условием является величина чувствительности системы ГХ-МС, которая должна обеспечивать регистрацию 10 пг 2, 3, 7, 8 ТетраХДД при отношении сигнал/шум равным 3:1.

Определяют времена удерживания 2, 3, 7, 8-замещенных ПХДД и ПХДФ и внутренних стандартов, вводя несколько раз контрольную смесь диоксинов, содержащую определяемые 2, 3, 7, 8-замещенные ПХДД и ПХДФ, измеряя в каждом опыте время на удерживания и рассчитывая их средние значение и доверительные интервалы. Времена удерживания зависят от типа колонки и условий работы.

Относительные времена удерживания некоторых ПХДД на двух разных неподвижных фазах (полярной и неполярной) приведены в Прил. 3.

12.2. Получение масс-хроматограмм

Отбирают микрошприцем 0,002 см³ анализируемого раствора и вводят в инжектор газового хроматографа в режиме splitless или on-column. Регистрируют ионные масс-хроматограммы для ионов, соответствующих определяемым ПХДД и ПХДФ и используемым внутренним стандартам(прил. 2).

ПРИМЕЧАНИЯ

1. При использовании масс-спектрометра низкого разрешения регистрируются ионы с соответствующими номинальными массами, например, вместо 319,897 - 320 и т.д.

2. Для обеспечения большей достоверности результатов желательно регистрировать большее число ионов для каждого соединения, а при использовании масс-спектрометрии низкого разрешения это необходимо; в качестве дополнительных ионов для регистрации желательно выбирать как изотопы молекулярных ионов, так и осколочные ионы (M-COС1)⁺.

13. ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ

По окончании анализа с помощью системы обработки данных фиксируют на масс-хроматограммах пики в области времен удерживания,

соответствующихыходу 2,3,7,8-замещенных ПХДД и ПХДФ и внутренних стандартов.

Вычисляют отношение площадей хроматографических пиков на масс-хроматограммах ионов M1 и M2, регистрируемых для каждого определяемого соединения и внутреннего стандарта, и сравнивают его с теоретическим значением, приведенным в прил. 2. Это отношение должно быть в пределах $\pm 15\%$ от теоретического значения, например, для ТетраХДД – от 0,65 до 0,89 (теоретическое отношение равно 0,77). Если имеются хроматографические пики в указанной области времен удерживания, но отношение площадей пиков выходит за эти пределы, то говорить о положительной идентификации по этим пикам ПХДД или ПХДФ в данной пробе нельзя. Требуется дополнительный анализ (на хроматографической колонке с другой неподвижной фазой, с ионизацией отрицательными ионами или с применением тандемной масс-спектрометрии) или же повторный анализ с дополнительной очисткой на колонке с активированным углем и на колонке с окисью алюминия. Если время удерживания данного компонента совпадает с временем удерживания соответствующего изотопномеченого внутреннего стандарта (отличается от него не более чем на 1 с или на 1 скан) или отличается от времени удерживания, измеренного для стандартного образца, не более, чем на 0,01% и отношение площадей пиков находится в указанных пределах, то этоткомпонент в данной пробе считается идентифицированным.

Измеряют площади пиков на масс-хроматограммах в указанной области. Оценивают эффективность извлечения ПХДД и ПХДФ по площадям пиков, соответствующих введенным меченым стандартам.

Например, для $^{13}\text{C}_{12}$ -2, 3, 7, 8-ТетраХДД эффективность извлечения E рассчитывается по формуле:

$$E = \frac{AsCk}{AkCs'} \times 100\%$$

Где A_s –площадь пика на масс-хроматограмме иона m/z 332 или 334 для внутреннего стандарта-имитатора $^{13}C_{12}$ -2, 3, 7, 8-ТетраХДД (в единицах счета интегратора); A_k -площадь пика для внутреннего стандарта $^{13}C_{12}$ -1, 2, 3, 4-ТетраХДД (в единицах счета интегратора); C_k –количество введенного рекавер-стандарта; C_s -количество введенного внутреннего стандарта (пг).

Концентрацию обнаруженных компонентов X_i определяют по формуле:

$$X_i = \frac{A_i P_s}{A_s P} K_i$$

где X_i –концентрация i -го определяемого компонента, пг/г, A - площадь хроматографического пика (в единицах счета интегратора) на масс-хроматограмме иона, регистрируемого для определения данного соединения (табл. 2); A_s – площадь хроматографического пика на масс-хроматограмме стандарта-имитатора (в единицах счета интегратора); P_s –количество добавленного к пробе стандарта-имитатора в пг; P – масса анализируемой пробы, г; K_i -градуировочный коэффициент, соответствующий данному отношению A_i/A_s на градуировочной зависимости.

Расчет проводят по масс-хроматограммам либо для одного из двух ионов $M1$ или $M2$, указанных в Прил. 2, либо для двух ионов с усреднением результатов, либо по сумме площадей соответствующих пиков на обеих масс-хроматограммах.

Конечный результат анализа представляют следующим образом:

$$X \pm D, \text{ пг/г, } P = 0.95,$$

где D - значение характеристики погрешности, рассчитанное по формуле $D = 0,01 * d * X$ (X – содержание определяемого компонента в пробе), значения d приведены в Прил. 1.

Результат представляют также в диоксиновых эквивалентах (ДЭ) путем умножения значений концентраций определяемых компонентов на

соответствующие коэффициенты, приведенные в Прил. 5.

14. КОНТРОЛЬ ПОГРЕШНОСТИ РЕЗУЛЬТАТОВ И ИЗМЕРЕНИЙ

14.1. Контроль правильности детектирования

Для доказательства правильности детектирования при каждом определении необходимо:

- для каждого из определяемых ПХДД, ПХДФ и для внутренних стандартов регистрировать не менее двух масс-хроматограмм по двум ионам M1 и M2 с массами, соответствующими изотопам молекулярного иона. Хроматографические пики на двух масс-хроматограммах для ионов M1 и M2, соответствующие каждому определяемому ПХДД, ПХДФ и внутреннему стандарту, должны быть синхронными;

- относительные времена удерживания хроматографических пиков ПХДД и ПХДФ (по отношению к внутреннему стандарту) не должны отличаться от измеренных для стандартных образцов ПХДД и ПХДФ более, чем на 0,01%, а в случае использования соответствующего изотопномеченого внутреннего стандарта – не более чем на 1 с или на 1 скан от времени удерживания внутреннего стандарта;

- отношение площадей хроматографических пиков на парных масс-хроматограммах ионов M1 и M2, регистрируемых для каждого определяемого компонента и внутреннего стандарта должно быть в пределах $\pm 15\%$ от теоретического, приведенного в табл. 3;

- отношение сигнала к шуму для каждого измеряемого хроматографического пика должно быть не менее 3:1;

14.2. Оперативный контроль воспроизводимости

Оперативный контроль воспроизводимости проводится периодически, через каждые 10-20 проб. Образцами контроля являются реальные пробы. Для анализа отбирают две параллельные пробы и анализируют в точном соответствии с прописью методики, максимально варьируя условия проведения анализа, т.е. получают два результата анализа, используя разные

наборы мерной посуды, разные партии реактивов. В работе должны участвовать два аналитика. Оперативный контроль воспроизводимости проводят путем сравнения результата контрольной процедуры D_k , равного расхождению двух результатов измерений (первичного – X_1 и повторного – X_2) содержания компонентов в одной и той же пробе, с нормативом оперативного контроля воспроизводимости – D .

Воспроизводимость контрольных измерений, а также воспроизводимость результатов измерений рабочих проб, получаемых за период, в течение которого условия проведения анализа принимают стабильными и соответствующими условиям проведения контрольных измерений, признают удовлетворительной, если

$$D_k = |X_1 - X_2| < D,$$

где $D = 0.01 * D_{отн} * X$ (X – среднее арифметическое значение первичного и повторного результатов измерений). Значения $D_{отн}$ приведены в Прил. 4.

При превышении норматива оперативного контроля воспроизводимости эксперимент повторяют. При повторном превышении указанного норматива выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам контроля, и устраняют их.

14.3. Оперативный контроль погрешности

Оперативный контроль погрешности проводят периодически раз в три месяца, а также при изменении условий анализа (применении новой партии реактивов или новых стандартных образцов, изменении характеристик прибора и т.п.).

Оперативный контроль погрешности выполняют в одной серии с проведением анализа рабочих проб.

Оперативный контроль погрешности проводят с использованием метода добавок, который состоит в сравнении результата контрольной процедуры K_k , равного разности между результатом контрольного измерения содержания

ПХДД и ПХДФ, замещенных в положениях 2,3,7,8, в пробе с известной добавкой X' , в пробе без добавки X и величиной добавки C , с нормативом оперативного контроля погрешности K_d .

Анализируют две одинаковые пробы одного и того же пищевого продукта. Первую анализируют в соответствии с прописью методики и получают результат анализа X . Ко второй части добавляют известное количество C определяемого компонента и анализируют в тех же условиях, получая результат анализа пробы с добавкой X' .

Погрешность считается удовлетворительной, если выполняется условие:

$$K_k = |X' - X - C| < K_d$$

Норматив оперативного контроля погрешности (допускаемое значение разности между результатом контрольного измерения пробы с добавкой X' , пробы X и величины добавки $-C$) во всем диапазоне измеряемых массовых концентраций определяемых ПХДД и ПХДФ рассчитывают по формулам:

-при проведении внутрилабораторного контроля ($P = 0,90$)

$$K_d = 0,84 \sqrt{(\Delta x')^2 + (\Delta x)^2}, \text{ нг/дм}^3;$$

-при проведении внешнего контроля ($P = 0,95$)

$$K_d = \sqrt{(\Delta x')^2 + (\Delta x)^2}, \text{ нг/дм}^3,$$

где $\Delta x'$, Δx (нг/дм³) – характеристика погрешности, соответствующая массовой концентрации определяемого компонента в исходной рабочей пробе и рабочей пробе с добавкой, соответственно;

$\Delta x = 0,01 \times d \times X$ (X – массовая концентрация определяемого компонента в исходной рабочей пробе);

$\Delta x' = 0,01 \times d \times X'$ (X' – массовая концентрация определяемого компонента в исходной рабочей пробе с добавкой). Значения d приведены в табл. 1.

При превышении норматива оперативного контроля погрешности эксперимент повторяют. При повторном превышении указанного норматива

выясняют причины, которые привели к неудовлетворительным результатам контроля, и устраняют их.

ПРИМЕЧАНИЯ:

1. Образцы для контроля анализируют в одной серии с реальными текущими рабочими пробами.
2. Результаты контроля могут быть распространены на результаты анализа реальных проб при условии, что массовые концентрации определяемых компонентов контрольной и реальной проб находятся в пределах одного и того же диапазона концентраций (диапазоны концентраций регламентированы табл. 1, 4 и 5 настоящей методики).

Приложение 1

Диапазон измерений, значения характеристик и относительной погрешности ее составляющих при доверительной вероятности $P = 0,95$

Диапазон измеряемых содержаний замещенных полихлорированных дибензо-п-диоксинов и дибензофуранов, нг/кг	Характеристика погрешности (границы интервала, в котором погрешность находится с заданной вероятностью), $\pm d$, %	Характеристика случайной составляющей погрешности (среднеквадратическое отклонение случайной составляющей погрешности), $s(d)$, %	Характеристика систематической составляющей погрешности (границы интервала, в котором систематическая составляющая погрешности находятся с заданной вероятностью), $\pm ds$, %
от 0,5 до 10 вкл.	74	34	33
св. 10 до 200 вкл.	48	22	20
св. 200 до 1000 вкл.	31	13	18

Приложение 2

Массы регистрируемых ионов и соотношение площадей их пиков на масс-хроматограммах

Соединение	M1	M2	Соотношение площадей
1	2	3	4
ТетраХДД	319,897	321,894	0,77
ТетраХДФ	303,902	305,899	0,77
ПентаХДД	355,855	357,852	1,32
ПентаХДФ	339,860	341,857	1,32
ГексаХДД	389,816	391,813	1,24
ГексаХДФ	373,821	375,818	1,24
ГептаХДД	423,777	425,774	1,05
ГептаХДФ	407,782	409,779	1,05
ОктаХДД	557,738	559,735	0,89
ОктаХДФ	441,743	443,740	0,89
¹³ C ₁₂ ТетраХДД	331,931	333,934	0,77

Приложение 3

Относительные времена удерживания хлорзамещенных ПХДД и ПХДФ

№ п/п	Соединение	Время удерживания/Неподвижная фаза	
		неполярная	полярная
		Ultra-2	SP-2331
1	1, 2, 3, 4-ТетраХДД	0,99	1,02
2	2, 3, 7, 8-ТетраХДД	1,00	1,00
3	1, 2, 3, 7, 8-ПентаХДД	1,23	1,40
4	1, 2, 3, 4, 7, 8-ГексаХДД	1,46	2,08
5	1, 2, 3, 6, 7, 8-ГексаХДД	1,47	1,94
6	1, 2, 3, 7, 8, 9-ГексаХДД	1,50	2,15
7	1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-ГептаХДД	1,76	2,98
8	ОктаХДД	2,17	4,50
9	2, 3, 7, 8-ТетраХДФ	0,96	0,96
10	1, 2, 3, 7, 8-ПентаХДФ	1,18	0,31
11	2, 3, 4, 7, 8-ПентаХДФ	1,22	1,35
12	1, 2, 3, 4, 7, 8-ГексаХДФ	1,39	2,01
13	1, 2, 3, 6, 7, 8-ГексаХДФ	1,39	2,03
14	2, 3, 4, 6, 7, 8-ГексаХДФ	1,43	2,07

15	1, 2, 3, 7, 8, 9-ГексаХДФ	1,48	2,09
16	1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-ГептаХДФ	1,61	2,83
17	1, 2, 3, 4, 7, 8, 9-ГептаХДФ	1,74	2,96
18	ОктаХДФ	2,12	4,45

Приложение 4
(к инструкции 4.1 – 2005)

Значения норматива оперативного контроля случайной составляющей относительной погрешности (воспроизводимости) при доверительной вероятности $P = 0,95$

Диапазон измеряемых содержаний 2, 3, 7, 8-замещенных полихлорированных дибензо-п-диоксинов и дибензофуранов	Норматив оперативного контроля воспроизводимости, $D_{отн}$, % (для двух результатов измерений $m=2$)
От 0,5 до 10 вкл.	94
св. 10 до 200 вкл.	61
св. 200 до 1000 вкл.	36

Приложение 5
Обязательное

Форма представления результатов анализа

Наименование организации, проводшей анализ. Номер аттестата аккредитации.

ПРОТОКОЛ № _____ от « ___ » _____

Количественного химического анализа полихлорированных дибензо-п-диоксинов

Краткое описание пробы (шифр; наименование и характеристика пробы и условия отбора проб).

Методика КХА

Определяемый компонент, ПХДД и ПХДФ	Диоксиновый эквивалент, ДЭ	РЕЗУЛЬТАТ АНАЛИЗА	
		Концентрация, пг/г	Концентрация в ДЭ, пг/г
1	2	3	4
2, 3, 7, 8-ТетраХДД	1		
1, 2, 3, 7, 8-ПентаХДД	0,5		
1,2,3,4,7,8-ГексаХДД	0,1		
1, 2, 3, 6, 7, 8-ГексаХДЦ	0,1		
1, 2, 3, 7, 8, 9-ГексаХДД	0,1		
1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-ГептаХДД	0,01		
ОктаХДД	0,001		
2, 3, 7, 8-ТетраХДФ	0,1		
1, 2, 3, 7, 8-ПентаХДФ	0,05		
2, 3, 4, 7, 8-ПентаХДФ	0,5		
1, 2, 3, 4, 7, 8-ГексаХДФ	0,1		
1, 2, 3, 6, 7, 8-ГексаХДФ	0,1		
2, 3, 4, 6, 7, 8-ГексаХДФ	од		
1, 2, 3, 7, 8, 9-ГексаХДФ	0,1		
1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-ГептаХДФ	0,01		
1, 2, 3, 4, 7, 8, 9-ГептаХДФ	0,01		

1	2	3	4
ОктаХДФ	0,001		
ДругиеТетраХДД			
ДругиеТетраХДФ			
ДругиеПентаХДЦ			
ДругиеПентаХДФ			

Другие ГексаХДД			
Другие ГексаХДФ			
Другой ГептаХДД			
Другие ГептаХДФ			
Предел обнаружения по $^{13}\text{C}_{12-2, 3, 7, 8}$ - ТетраХДД, пг/г	Суммарная концентрация в ДЭ, пг/г		
Относительная погрешность определения, %			

Подпись ответственного исполнителя

Примечание:

Допустимо представление другой, дополнительной информации по характеристикам проб и результатам анализов.