

Министерство образования и науки Российской Федерации
Федеральное агентство по образованию
Российская экономическая академия имени Г. В. Плеханова
Кафедра товароведения и товарной экспертизы

ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ
ПО ДИСЦИПЛИНЕ «БЕЗОПАСНОСТЬ ТОВАРОВ»

Москва 2010

Составители: канд. техн. наук О. Н. Перелыгин
д-р техн. наук Л. Г. Елисеева
канд. техн. наук М. А. Положишникова

Лабораторный практикум по дисциплине «Безопасность товаров»./ Сост.: О. Н. Перелыгин, Л. Г. Елисеева, М. А. Положишникова – М.: Изд-во Российский экономический университет им. Г.В. Плеханова., 2010. – 52 с.

Представлен теоретический материал и даны практические рекомендации по определению общих показателей безопасности пищевых продуктов (токсичных элементов, радионуклидов, микотоксинов и пестицидов).

Для студентов специальности 100800 «Товароведение и экспертиза товаров».

© Российский экономический университет им. Г.В. Плеханова , 2010

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
РАБОТА 1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТОКСИЧНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ МЕТОДОМ ИНВЕРСИОННОЙ ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИИ.....	6
1.1. Описание метода инверсионной вольтамперометрии.....	6
1.2. Методика определения токсичных элементов	7
1.2.1. Пробоподготовка	7
1.2.2. Проведение измерений	9
1.2.3. Регистрация и обработка результатов	10
1.3. Порядок выполнения работы.....	12
РАБОТА 2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РАДИОНУКЛИДОВ СЦИНТИЛЛЯЦИОННЫМ СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ.....	15
2.1. Описание метода	17
2.2. Методика определения радионуклидов	20
2.2.1. Пробоподготовка образцов.....	20
2.2.2. Проведение измерений, регистрация и обработка результатов.....	21
2.3. Порядок выполнения работы.....	24
РАБОТА 3. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА ПРИ ОЦЕНКЕ БЕЗОПАСНОСТИ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ	28
3.1. Введение в область применения метода	28
3.2. Определение микотоксинов (на примере патулина) методом ВЭЖХ	33
3.2.1. Сущность метода	33
3.2.3. Пробоподготовка образцов.....	36
3.2.4. Порядок выполнения работы	39
3.2.4.1. Методика измерений.....	39
3.2.4.2. Установка хроматографических режимов разделения и регистрации результатов	40
3.3. Определение пестицидов методом газовой хроматографии (на примере хлорорганических пестицидов).....	43
3.3.1. Описание метода	43

3.3.2. Методика определения хлорорганических пестицидов методом газовой хроматографии	43
3.3.3. Пробоподготовка образцов	45
3.3.4. Методика проведения измерений	45
3.3.5. Порядок выполнения работы	47
3.3.5.1. Режимы хроматографического анализа хлорорганических пестицидов	47
Список литературы	50
Приложение 1	51

ВВЕДЕНИЕ

Контроль безопасности пищевых продуктов и продовольственного сырья – актуальная задача современного рынка продовольствия. Правовые основы обеспечения безопасности сформулированы в федеральных законах «О защите прав потребителей» от 7 февраля 1992 г. № 2300–1, «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» от 30 марта 1999 г. № 52–ФЗ, «О качестве и безопасности пищевых продуктов» от 2 января 2000 г. № 29–ФЗ, «О техническом регулировании» от 27 декабря 2002 г. № 184–ФЗ.

СанПиН 2.3.2.1078–01 «Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы» устанавливают гигиенические требования к допустимым уровням содержания химических загрязнителей, а также микробиологическим показателям безопасности пищевых продуктов, которые можно условно разделить на две группы: *общие показатели безопасности*, регламентируемые для большинства пищевых продуктов, и *показатели безопасности, отдельных групп (видов) пищевых продуктов*, учитывающие особенности их сырьевого состава и технологии производства (рис. 1).



Рис. 1. Показатели безопасности пищевых продуктов

Требования к показателям безопасности установлены также в соответствующих разделах ГОСТов (в перспективе – в соответствующих разделах технических регламентов).

Для определения показателей безопасности используется

комплекс современных методов – высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), высокоэффективная газожидкостная хроматография (ВЭГЖХ), инверсионная вольтамперометрия (ИВА), атомно-абсорбционная спектроскопия (ААС) и др. В лабораторном практикуме описаны особенности применения отдельных методов с учетом специфики определяемых показателей, даны практические рекомендации по их применению.

РАБОТА 1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТОКСИЧНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ МЕТОДОМ ИНВЕРСИОННОЙ ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИИ

Для определения содержания токсичных элементов в составе пищевых продуктов используют спектральные методы анализа – атомно-абсорбционную и атомно-эмиссионную спектроскопию, спектрофотометрию, а также электрохимические методы (ЭХМ) – вольтамперометрию, кулоно-метрию, потенциометрию и др.

Электрохимические методы имеют ряд преимуществ по сравнению со спектральными методами анализа. Они отличаются высокой экономичностью, обусловленной отсутствием или незначительным расходом реагентов, а также относительно невысокой стоимостью аппаратуры. К другим преимуществам ЭХМ необходимо отнести их высокую чувствительность и избирательность, отсутствие исключительных требований к квалификации персонала, возможность портативного исполнения измерительного прибора.

1.1. Описание метода инверсионной вольтамперометрии

Метод инверсионной вольтамперометрии (ИВА) или метод переменного-токовой полярографии широко применяется в санитарно-гигиенических исследованиях для определения содержания токсичных элементов. Вольтамперометрический анализатор «АКВ-07-МК» для определения содержания токсичных элементов представлен на рис. 2.

Принцип метода заключается в том, что на первой стадии присутствующие в водном растворе элементы (свинец, кадмий, цинк, медь, ртуть, мышьяк и др.) выделяются в



Рис. 2. Вольтамперометрический анализатор «АКВ-07-МК» для определения содержания токсичных элементов

свободном виде или форме соединений и накапливаются на электроде, сделанном из углеродного материала или благородного металла (золото, платина). На второй стадии (измерительной) происходит растворение накопленных элементов при строго контролируемом изменении напряжения на электроде, что приводит к появлению токовых пиков, высота которых зависит от концентрации элементов в растворе.

При инверсионной вольтамперометрии предел обнаружения отдельных элементов очень высокий, например, для свинца и ртути он составляет около 0,1 мкг/л.

Высокая чувствительность и селективность метода ИВА при относительной простоте анализа делают его более конкурентоспособным по сравнению с распространенным до недавнего времени методом атомно-абсорбционной спектроскопии (ААС). Метод ИВА позволяет также определять содержание фенолов, метилового спирта, ПАВ и др. Важным достоинством вольтамперометрии является возможность идентифицировать формы существования ионов металлов, так как разные химические формы обладают разной степенью токсичности (например, мышьяк трехвалентный более токсичен, чем мышьяк пятивалентный).

1.2. Методика определения токсичных элементов

Основные этапы методики определения токсичных элементов (кадмия, меди, свинца, цинка и др.) методом инверсионной вольтамперометрии (ИВА) представлены на рис. 3. Для определения массовых концентраций элементов в пробе используют метод добавок.

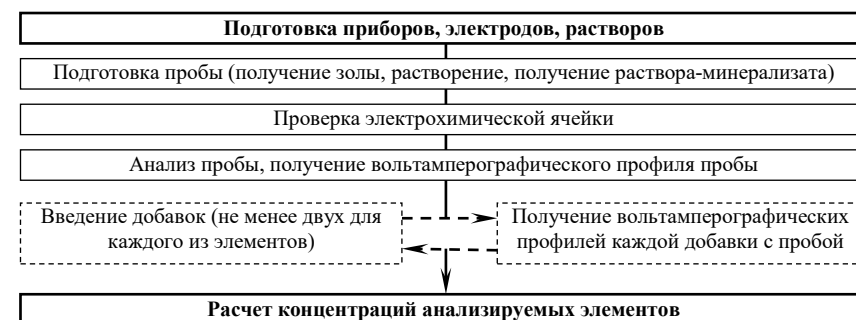


Рис. 3. Общая схема определения токсичных элементов в пробах пищевого сырья и пищевых продуктов методом ИВА

1.2.1. Пробоподготовка

Анализ содержаний следовых количеств токсичных элементов различными методами (атомная абсорбция, полярография, фотометрия и др.) требует предварительной пробоподготовки, так как металлы в

большинстве объектов находятся в связанном состоянии. Они образуют достаточно прочные органические комплексы, мешающие точному и воспроизводимому определению их содержания. Поэтому перед любым анализом необходимо предварительно разрушить органическую составляющую пробы, что позволяет выделить и сконцентрировать исследуемые элементы.

Подготовка проб для анализа содержания токсичных элементов заключается в предварительной минерализации объекта исследования, которую можно проводить «сухим» или «мокрым» способом, а также используя их сочетание. «Сухая» минерализация предполагает обугливание, сжигание или прокаливание исследуемого. При этом происходит разложение всех органических соединений до углекислого газа (CO_2) и воды, которые при высокой температуре удаляются из пробы. При «мокрой» минерализации – озоление проводят в присутствии сильных окислителей (чаще всего концентрированных кислот – HNO_3 и H_2SO_4), в открытых или закрытых системах (автоклавах), при более низких температурах – для уменьшения потерь исследуемых элементов (ртуть, мышьяк и др.).

Пробоподготовку осуществляют в соответствии с ГОСТом 26929–94 «Сырье и продукты пищевые. Подготовка проб. Минерализация для определения содержания токсичных элементов».

Продукты с содержанием влаги ниже 20% помещают на электроплитку и проводят обугливание до прекращения выделения дыма.

Продукты с содержанием влаги свыше 20% – в сушильный шкаф, постепенно доводят температуру до 150°C и выдерживают при этой температуре около 3 ч до начала обугливания, которое проводят на электроплитке до прекращения выделения дыма (для интенсификации обугливания допускается использовать азотную и серную кислоты).

Минерализацию проб проводят при постепенном повышении температуры муфельной печи на 50°C через каждые 30 мин. Доводят температуру до 450°C и продолжают минерализацию при этих условиях до получения серой золы. Тигель с золой извлекают из муфеля, охлаждают до комнатной температуры. Золу смачивают 1 см^3 азотной кислоты, тигель помещают на электроплитку и при слабом нагревании выпаривают кислоту. Снова помещают тигель с пробой в муфель, нагретый до температуры 250°C , постепенно доводят температуру до 450°C и выдерживают при этой температуре в течение 1 ч. Минерализацию считают законченной, когда зола становится белой или слегка окрашенной, без обугленных частиц. При наличии обугленных частиц повторяют обработку золы азотной кислотой.

Полученную золу растворяют в 1 см^3 1,0 н. раствора соляной кислоты. Приливают 5 см^3 раствора фонового электролита (п. 1.3), пере-

носят в мерную пробирку вместимостью 20 см³ и, споласкивая тигель и фильтр фоновым раствором, доводят содержимое пробирки до метки.

Если содержание металлов в пробе выходит за верхнюю границу диапазонов определяемых концентраций, допускается разбавление фоновым электролитом подготовленной к измерению пробы. Если содержание металлов в пробе выходит за нижнюю границу диапазонов определяемых содержаний, допускается анализ большей аликвоты из подготовленной к измерению пробы или увеличение времени электронакопления.

1.2.2. Проведение измерений

Получение каждого вольтамперографического профиля включает следующие этапы: очистку электрода→накопление→измерение. Причем время очистки всегда должно быть не меньше времени накопления.

Анализ проводят в следующей последовательности:

1) пробу объемом 20 см³, приготовленную к анализу в соответствии с п. 1.2.1, переносят в полярографическую ячейку;

2) устанавливают в ячейку хлорсеребряный электрод сравнения и рабочий электрод (углесталовый). Закрепляют ячейку в датчике;

3) включают прибор. Устанавливают потенциал электрохимической очистки рабочего электрода на отметку «0,0 В» и производят электрохимическую очистку по времени не менее 60 с. Не регистрируя вольтамперограммы, выключают ячейку;

4) устанавливают соответствующий потенциал накопления: «1,3 В» – при определении всех четырех элементов, включая цинк; «-0,9 В», если цинк не определяют. Включают ячейку, регистрируют вольтамперограмму и выключают ячейку. Устанавливают потенциал «0,0 В». Включают ячейку, проводят электрохимическую очистку электрода в течение времени, равного времени накопления. Не регистрируя вольтамперограммы, выключают ячейку. Проводят не менее трех циклов операций по регистрации вольтамперограммы и очистке электрода. Вычисляют среднее арифметическое значение всех произведенных замеров высот пиков. Величины, отличающиеся от среднего арифметического более чем на 20%, отбрасывают. Вычисляют среднее арифметическое значение высот пиков, не имеющих сильного разброса измеряемой величины, которое принимают за величину пика, соответствующего концентрации определяемого металла. Электрохимическую очистку электрода обязательно проводят после записи каждой вольтамперограммы.

Чувствительность полярографа и время накопления устанавливают таким образом, чтобы высота самого низкого пика из анализируемых металлов была равна 300–700 мА:

5) проводят регистрацию вольтамперограммы пробы с добавками элементов, так же как это описано в предыдущем пункте, при подобранной для каждого элемента чувствительности. В первую очередь проводят измерения концентраций свинца, кадмия и цинка. Для этого в ячейку пипеткой вводят добавки рабочих стандартных растворов с известными концентрациями элементов (п. 1.3.1) так, чтобы высоты пиков увеличились в 1,5–3 раза при подобранной для каждого элемента чувствительности. Затем проводят измерение концентрации меди. Для этого в ячейку пипеткой вводят добавку рабочего стандартного раствора меди по указанному выше принципу. Общий объем добавленных стандартных растворов всех элементов не должен превышать 10% от исходного объема исследуемого раствора в ячейке.

1.2.3. Регистрация и обработка результатов

Регистрацию вольтамперографических профилей осуществляют при помощи программного пакета «Polar-4.0» в порядке, приведенном на рис. 4.

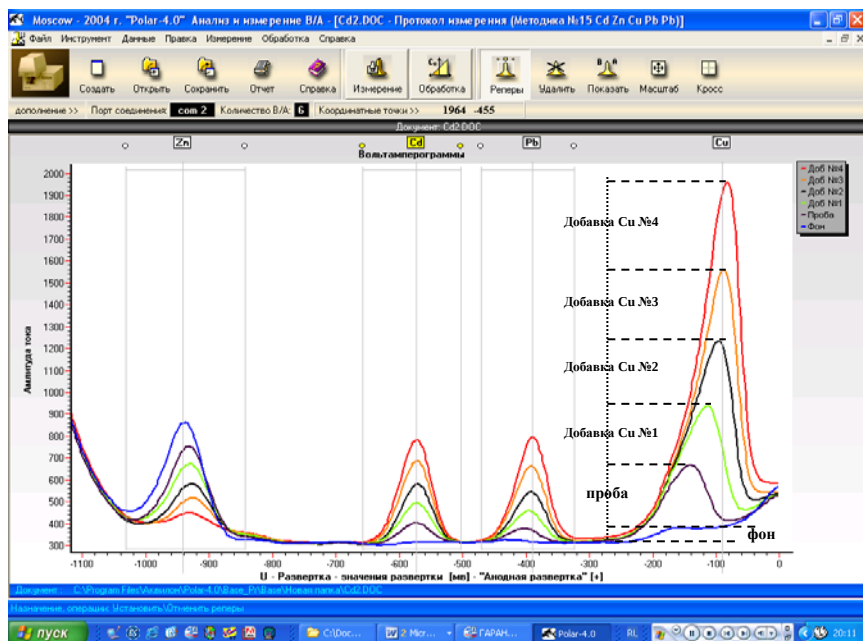


Рис. 4. Вольтамперографические профили пробы со стандартными добавками (Zn, Cd, Pb, Cu):

- 1 – фон (вольтамперографический профили фонового электролита); 2 – проба;
- 3 – проба с 1-й добавкой каждого из оцениваемых элементов; 4 – проба с 2-й добавкой каждого из оцениваемых элементов, 5 – проба с 3-й добавкой каждого из оцениваемых элементов; 6 – проба с 4-й добавкой каждого из оцениваемых элементов

Расчет массовой концентрации металлов в анализируемой пробе проводят по формулам 1 (для сухого пищевого продукта) и 2 (для жидкого пищевого продукта)

$$x_m = \frac{h \cdot C_{\text{ст}} \cdot V_{\text{ст}} \cdot V_0}{(H - h) \cdot (V_0 + \Sigma V_{\text{ст}}) \cdot m}, \quad (1)$$

$$x_v = \frac{h \cdot C_{\text{ст}} \cdot V_{\text{ст}} \cdot V_0}{(H - h) \cdot (V_0 + \Sigma V_{\text{ст}}) \cdot V_{\text{ан}}}, \quad (2)$$

где x_m – массовая концентрация металла в пробе сухого пищевого продукта (мг/кг); x_v – массовая концентрация металла в пробе жидкого пищевого продукта (мг/дм³); h – разность высот – высоты пика металла исходного раствора до введения добавки стандартного раствора и высоты пика металла в контрольном («холостом») растворе (мм); H – высота пика металла исходного раствора после добавки стандартного раствора (мм); $C_{\text{ст}}$ – концентрация добавленного стандартного раствора (мг/дм³); $V_{\text{ст}}$ – объем добавленного стандартного раствора определяемого элемента (дм³); $\Sigma V_{\text{ст}}$ – общий объем пробы и всех добавленных стандартных растворов всех металлов на момент определения искомого элемента (дм³); V_0 – исходный объем минерализованной пробы в полярографической ячейке (дм³); m – масса навески сухого анализируемого пищевого продукта, взятая для анализа (мг); $V_{\text{ан}}$ – исходный объем анализируемого жидкого пищевого продукта, взятый для анализа (дм³).

На рис. 5 представлена графическая зависимость, используемая для определения концентрации исследуемого элемента (например, Pb).

Аналогичные вычисления проводят для параллельной анализируемой пробы. Получают соответственно x_{m_1} , x_{m_2} или x_{v_1} , x_{v_2} . За окончательный результат анализа (x_m) принимают среднее арифметическое значение результатов двух параллельных определений:

$$x_m = \frac{(x_{m_1} + x_{m_2})}{2},$$

расхождения между которыми не должны превышать

значений норматива оперативного контроля сходимости. Значения норматива оперативного контроля сходимости приведены в соответствующих ГОСТах на методы испытаний (анализа) – ГОСТ Р 51301–99, ГОСТ Р 51823–2001, ГОСТ Р 52180–2003.

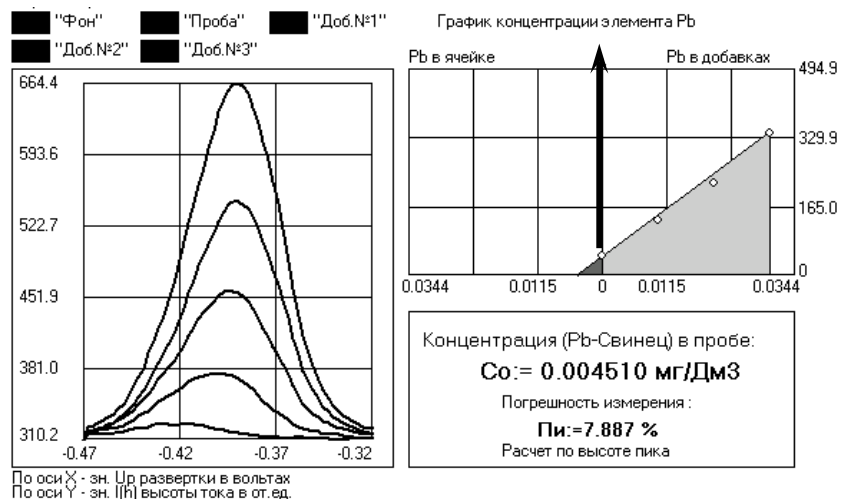


Рис. 5. Графики пиков вольтамперографических профилей и концентрации элемента (Pb)

1.3. Порядок выполнения работы

Цель работы – определение содержания токсичных элементов (на примере Zn, Cd, Pb и Cu) методом инверсионной вольтамперометрии при помощи вольтамперометрического анализатора «АКВ–07–МК».

Приборы, реактивы и материалы, необходимые для выполнения работы:

- электропечь камерная лабораторная с программируемым температурным режимом от 150 до 500°C (с погрешностью $\pm 10^\circ\text{C}$);
- шкаф сушильный, обеспечивающий поддержание заданного температурного режима в диапазоне от 40 до 150°C (с погрешностью $\pm 5^\circ\text{C}$);
- анализатор вольтамперометрический любого типа, позволяющий работать в переменноточковом режиме (например, АКВ–07–МК) с электрохимическим датчиком вращающегося электрода АКВ–07, в том числе с компьютерной системой управления и обработки информации «Polar–4.0»;
- электроды: электрод сравнения – хлорсеребряный (ЭВЛ 1–М4, предварительно заполненный насыщенным раствором KCl), рабочий (измерительный) электрод – углеситаловый АКУ–1, электрод вспомогательный (стеклоуглеродный тигель);
- пробирки мерные вместимостью 20 см³ (ГОСТ 1770);
- пипетки мерные переменного объема на 100–1000 мкл и 5–40 мкл;
- тигли кварцевые (ГОСТ 19908);

- рабочие стандартные растворы (свинца, кадмия, меди, цинка) с концентрацией 10 мг/дм³;
- спирт этиловый ректификованный (ГОСТ 18300);
- вода бидистиллированная (ГОСТ 6709);
- кислота соляная, 1М раствор (приготовление – 80 см³ концентрированной соляной кислоты внести в мерную колбу вместимостью 1000 см³, довести до метки бидистиллированной водой и перемешать);
- раствор фоновое электролита (приготовление – в мерную колбу вместимостью 1000 см³ налить 50 см³ 1М раствора соляной кислоты, 10 см³ 0,01М раствора азотнокислой ртути, долить до метки бидистиллированной водой и перемешать);
- ртуть азотнокислая, 0,01М раствор (приготовление – навеску HgNO₃ массой 0,334 г растворить в 50 см³ 0,1М азотной кислоты, раствор количественно перенести в мерную колбу вместимостью 100 см³, долить до метки бидистиллированной водой и перемешать);
- образцы пищевых продуктов (жидких и сухих: нативная, обугленная и озоленная формы) для определения содержания токсичных элементов.

Задание 1. Проведите пробоподготовку предложенных преподавателем образцов пищевых продуктов для определения содержания токсичных элементов в соответствии с п. 1.2.1. Перед началом выполнения практических операций для предупреждения возможных ошибок необходимо ответить на следующие вопросы:

- 1) почему нельзя определять содержание токсичных элементов в пробах пищевых продуктах без их предварительной подготовки;
- 2) в каких случаях для определения токсичных элементов можно обойтись без пробоподготовки и почему;
- 3) укажите основные этапы подготовки проб для определения элементного состава методом ИВА;
- 4) объясните, какой принцип положен в основу пробоподготовки для исследования элементного состава.

Задание 2. Значение потенциала аналитического пика является качественной характеристикой каждого элемента. Определите эти значения для исследуемых элементов на основе вольтамперометрических профилей, полученных при исследовании стандартных растворов металлов. Результаты определений занесите в табл. 1.

В конце работы ячейку и электроды тщательно промойте бидистиллированной водой. Стеклоуглеродный и углесталовый электроды отшлифуйте сухой фильтровальной бумагой, затем бумагой, смоченной этанолом.

Т а б л и ц а 1

Элемент	Диапазоны потенциала восстановления, В		
	Нижняя граница	Потенциал восстановления	Верхняя граница
Цинк			
Кадмий			
Свинец			
Медь			

Задание 3. Проведите измерения токсичных элементов (Zn, Cd, Pb, Cu) в подготовленных пробах пищевых продуктов в соответствии с п. 1.2.3. Для регистрации и обработки вольтамперографических профилей используйте режимы, указанные в табл. 2.

Т а б л и ц а 2

Наименование параметра	Наименование элемента			
	Zn	Cd	Pb	Cu
Тип измерительного электрода	Углеситаловый			
Направление развертки	Положительное			
Потенциал очистки электрода, В	0			
Время очистки, сек	60			
Скорость линейной развертки потенциала, мВ/сек	50			
Потенциал накопления, В	-1,3	-0,9		
Время накопления, сек	60			
Амплитуда развертки, В	1,4	1,05–1,10		
Потенциал аналитического пика (ориентировочное значение), В	-1,0	-0,7	-0,4	-0,1

Регистрация вольтамперограммы контрольного (фоновый) раствора проводится при тех же параметрах прибора и времени накопления элементов, при которых регистрировались соответствующие вольтамперограммы анализируемой пробы.

В соответствии с п. 1.2.3 рассчитайте значение концентрации для каждого из исследуемых элементов, результаты занесите в протокол испытаний (прил. 1).

Оцените значения нормативов оперативного контроля сходимости, которые приведены в соответствующих ГОСТах на методы контроля (анализа).

Сделайте заключение о соответствии (или несоответствии)

содержания токсичных элементов в исследованном пищевом продукте допустимым уровням, установленным СанПиН 2.3.2.1078–01.

Вопросы для самоконтроля

1. Для каких пищевых продуктов СанПиН 2.3.2.1078–01 устанавливают допустимые уровни содержания токсичных элементов? Какие вещества входят в перечень токсичных элементов?
2. Какие инструментальные методы анализа используют для определения содержания токсичных элементов в составе пищевых продуктов?
3. Укажите, какие преимущества имеют электрохимические методы по сравнению с другими методами, используемыми для определения содержания токсичных элементов?
4. В чем состоит принцип вольтамперометрического метода определения содержания токсичных элементов?
5. Какие этапы включает методика определения токсичных элементов в составе пищевых продуктов вольтамперометрическим методом?
6. Как проводят пробоподготовку пищевых продуктов для определения содержания токсичных элементов?
7. С какой целью при проведении измерений используют добавки рабочих стандартных растворов?
8. Что такое «вольтамперографический профиль» и как по нему рассчитывают концентрацию токсичных элементов?
9. Какой параметр является качественной идентификационной характеристикой каждого токсичного элемента?
10. Как обеспечивается точность определения токсичных элементов методом инверсионной вольтамперометрии?

РАБОТА 2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РАДИОНУКЛИДОВ СЦИНТИЛЛЯЦИОННЫМ СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Радиационная безопасность – важная проблема современного общества. Человек постоянно подвергается облучению естественным фоном, состоящим из космического излучения и излучения естественно распределенных природных радиоактивных веществ, находящихся в воде, почве, пищевых продуктах. Загрязнение окружающей среды радионуклидами связано в первую очередь с техногенными факторами, вызывающими ухудшение экологической обстановки на планете: захоронением радиоактивных отходов (РАО), выбросами радионуклидов при работе ТЭС и АЭС, проведением ядерных взрывов в мирных целях.

Пищевые продукты являются одними из основных источников поступления естественных радионуклидов в организм человека. Для всех пищевых продуктов СанПиН 2.3.2.1078–01 регламентируют допустимые уровни содержания радионуклидов ^{137}Cs и ^{90}Sr , для некоторых пищевых продуктов (например, безалкогольных напитков, минеральных вод и др.) нормируются также общая α - и β -радиоактивность.

α -излучение – это поток ядер гелия (He), испускаемых веществом при радиоактивном распаде или ядерных реакциях. Основными его свойствами являются высокая ионизирующая и малая проникающая способность, пробег 8–9 мм в воздухе и несколько микрон в живой ткани.

β -излучение – это поток электронов или позитронов, возникающих при ядерном распаде. Ионизирующая способность меньше, чем у α -излучения, а проникающая – больше, так как масса частиц значительно меньше при одинаковой энергии. В воздухе пробег составляет 1,8 м, в живой ткани – 2,5 см.

Излучения α - и β -частиц являются *непосредственно ионизирующими излучениями*, так как вызывают ионизацию вещества непосредственно при столкновениях с атомами и молекулами.

Распад ядер нестабильных радиоактивных элементов цезия и стронция порождает ионизирующие частицы – радионуклиды, которые передают свою энергию в веществе сначала электронам и положительно заряженным ядрам атома, сталкиваясь с ними, а затем уже электроны и ядра атомов производят ионизацию атомов и молекул. Эти излучения называют *косвенно ионизирующими*.

Нейтроны преобразуют свою энергию во взаимодействие с частицами вещества и способствуют получению γ -излучения. Проникающая способность зависит от вида атомов.

γ -излучение фотонов обладает колоссальной проникающей и малой ионизирующей способностью. Скорость распространения приблизительно равна скорости света.

^{137}Cs поступает в организм человека преимущественно с пищевыми продуктами. Он практически полностью всасывается в пищеварительном тракте. Биологический период полувыведения колеблется у взрослых от 10 до 200 сут., составляя в среднем 100 сут. Допустимые уровни ^{137}Cs варьируют от 8 до 500 Бк/кг (Бк/л) в зависимости от вида пищевого продукта.

^{90}Sr попадает в организм через желудочно-кишечный тракт, легкие и кожу и накапливается в костной ткани. Биологический период полувыведения из организма составляет от 90 до 154 сут. Допустимые уровни ^{90}Sr в пищевых продуктах варьируют от 8 до 140 Бк/кг (Бк/л).

В результате радиационного облучения живой ткани в ней

возникает ионизация молекул, сопровождающаяся разрывом молекулярных связей и изменением химической структуры соединений. Образующиеся свободные радикалы весьма активны и приводят к каталитическим реакциям, в результате которых происходит разрушение клеток, торможение функций кроветворных органов, расстройство желудочно-кишечного тракта и иммунной системы организма, сосуды становятся хрупкими.

2.1. Описание метода

Принцип действия всех приборов, предназначенных для определения радиоактивности, заключается в измерении эффектов, возникающих при взаимодействии излучения с веществом. Для регистрации излучения применяют разные методы:

ионизационный – основан на измерении степени ионизации в газах или полупроводниках при прохождении через них радиоактивного излучения или потока частиц;

фотографический – на измерении степени почернения фотопластинки при прохождении излучения или потока частиц;

химический – основан на измерении химических изменений в веществе при прохождении излучения или потока частиц;

калориметрический – на измерении количества тепла, выделенного в поглощающем веществе при прохождении излучения;

сцинтилляционный – на измерении интенсивности световых вспышек, возникающих при попадании радиоактивного излучения или частиц во флуоресцирующую среду.

В зависимости от метода регистрации различают разные *приборы радиационного контроля*: счетчики Гейгера, рентгенометры, радиометры, индивидуальные дозиметры, рентгеновские спектрометры, сцинтилляционные спектрометры и др.

Одним из самых чувствительных и универсальных методов определения радионуклидов на сегодняшний день является *сцинтилляционная спектрометрия* (СС). Сцинтилляционный метод детектирования характеризуется самой высокой эффективностью регистрации практически всех видов радиоактивного излучения (α -, β - и γ -излучающих радионуклидов). В сочетании с относительной простотой и быстротой приготовления счетного образца и возможностью одновременного определения в сложных смесях всех видов излучения он становится незаменимым при решении сложнейших радиоаналитических задач.

Принцип действия сцинтилляционных счетчиков основан на том, что, попадая в подходящую флуоресцирующую среду, излучение или частица вызывает мгновенную вспышку видимого света. По числу таких

вспышек — сцинтилляций можно судить о количестве частиц или фотонов в каждом энергетическом диапазоне. Характеристикой излучения является спектр — зависимость количества вспышек от энергии излучения каждой вспышки.

При помощи алгоритма расшифровки сцинтилляционных спектров на ЭВМ определяют радионуклидный состав проб по их характерному γ -, β - или α -излучению или по крайней мере надежно определяют соответствие контрольных уровней на определяемые радионуклиды, что зачастую является главной задачей радиационного мониторинга различных объектов.

Сцинтилляторы бывают твердые и жидкие. Из твердых наиболее распространен кристаллический иодид натрия (NaI), в который введено небольшое количество (1 или 2%) иодида таллия (Tl). В жидких сцинтилляторах активное вещество (антрацен, 2,5-дифенилоксазол (ДФО), 1,4-дифенилбензол и др.) находится в растворенной форме. Вспышки света, возникающие в результате флуоресценции активных веществ, регистрируются фотоумножителем. Между сцинтиллятором и фотоумножителем должен быть хороший оптический контакт, а стенки устройства должны хорошо отражать свет, чтобы не было потерь. Счетчик помещают в свинцовый «домик» (или в корпус из другого плотного материала), чтобы снизить помехи фонового излучения.

На рис. 6 представлен универсальный спектрометрический комплекс «Гамма-Плюс» (УСК «Гамма-Плюс»). Он состоит из нескольких измерительных радиометрических трактов, объединенных единой программной оболочкой. Пользователь имеет возможность независимо управлять любым трактом и обрабатывать результаты измерений с помощью одной ПЭВМ. Результаты измерений пробы на



Рис. 6. Универсальный спектрометрический комплекс «Гамма-Плюс»

одном измерительном тракте могут учитываться при измерениях ее на других трактах, что значительно повышает точность результатов и позволяет формировать общий протокол по результатам измерений одной пробы на разных трактах. Благодаря модульной структуре комплекса пользователь может формировать его состав в соответствии со своими потребностями.

Для регистрации γ - и β -излучения от счетного образца используются γ - и β -спектрометрические тракты со сцинтилляционным блоком детектирования (СБД):

- *гамма-СБД* включает сцинтиллятор, ФЭУ с делителем высокого напряжения и спектрометрический усилитель импульсов. В качестве сцинтиллятора используются кристаллы NaJ (активированные Tl) или CsJ (активированные Na) различных размеров и конфигураций;
- *бета-СБД* включает пластиковый сцинтиллятор (на основе полистирола различных размеров и конфигураций), ФЭУ с делителем высокого напряжения и спектрометрический усилитель импульсов.

Основные задачи радиационного контроля, решаемые с помощью комплекса, дифференцированы по видам радиометрических трактов.

Гамма-спектрометрический тракт позволяет:

- определять содержание ^{137}Cs и других радионуклидов в пробах пищевых продуктов и продовольственного сырья растительного и животного происхождения;
- определять содержание ^{226}Ra , ^{232}Th , ^{40}K , ^{137}Cs и других радионуклидов в пробах почвы, стройматериалов и других объектах внешней среды.

Бета-спектрометрический тракт позволяет:

- определять содержание ^{90}Sr в пробах пищевых продуктов и продовольственного сырья растительного и животного происхождения, а также в пробах почвы и воды;
- определять общую β -радиоактивность в пробах воды.

Для проведения калибровки γ - и β -спектрометров по энергии и обеспечения контроля за сохранностью параметров установки в состав спектрометра включены *контрольные источники*: γ -комбинированный контрольный источник $^{137}Cs+^{40}K$ в специальном сосуде для его экспонирования; β - ^{90}Sr контрольный источник точечной геометрии в специальной обойме для его экспонирования. Для экспонирования счетных образцов в зависимости от геометрической конфигурации сцинтилляционного кристалла применяются различные измерительные кюветы.

Для преобразования аналогового спектрометрического сигнала, поступающего с выхода каждого детектора, в цифровой применяется амплитудно-цифровой преобразователь (АЦП), выполненный либо в виде платы, встроенной в ПЭВМ, либо в виде отдельного блока, подключенного к порту ПЭВМ. Управление работой АЦП производится при помощи специальных программ (драйверов), входящих в состав программного пакета ПРОГРЕСС.

Этот программный пакет обеспечивает также обработку

спектров, расчет значений радиоактивности и погрешностей измерений.

2.2. Методика определения радионуклидов

Методика определения радионуклидов включает пробоподготовку образцов, проведение измерений, регистрацию данных и обработку результатов.

2.2.1. Пробоподготовка образцов

В зависимости от целей исследования используют разные методы пробоподготовки и технику измерения содержания радионуклидов на УСК «Гамма-Плюс». Если целью является определение предельно низких удельных активностей проб, то выбирают методы радиохимического концентрирования, обеспечивающие минимально возможный нижний предел измерений радионуклидов (НПИ). Сущность этих методов состоит в выделении исследуемого радионуклида в чистом виде, т. е. без примесей других радионуклидов.

Если анализ проводится с целью обязательного подтверждения соответствия содержания радионуклидов допустимым уровням, установленным СанПиН, то обычно используют методы подготовки проб без применения радиохимии. Ниже приводится описание методики пробоподготовки, относящейся к таким анализам.

Основной принцип подготовки пробы состоит в том, что, чем выше степень концентрирования пробы и больше масса счетного образца в кювете, имеющей аттестованную геометрию (заранее просчитанные и стандартизированные геометрические размеры), тем меньше погрешность измерения. При проведении испытаний рекомендованы следующие схемы подготовки проб с различными допустимыми уровнями (ДУ) по содержанию радионуклида ^{90}Sr (табл. 3).

Важное требование любой методики подготовки пробы для определения радионуклидов методом СС – гомогенность образца. Для осуществления этого требования пищевой продукт измельчают и/или тщательно перемешивают. Счетный образец может быть приготовлен как из нативного материала, так и с использованием методов физического концентрирования (высушивания, обугливания, озоления и т. п.). Для высушивания и обугливания обычно используют электроплиту, для озоления – муфельную печь (при $t = 800^\circ\text{C}$).

Т а б л и ц а 3

ДУ р/н Бк/кг	Алгоритм обработки спектра	Необходимая степень концентрирования	Масса, г		
			неконцентри- рованной пробы	кон- центрата	счетного образца
3,7	$(^{90}\text{Sr}+^{90}\text{Y})+^{40}\text{K}^*$	>15 раз	100–500	5–15	5–15
37	$(^{90}\text{Sr}+^{90}\text{Y})+^{40}\text{K}$	>3 раз	30–200	5–15	5–15
	Учет $^{40}\text{K}^{**}$	–	7–15	–	7–15
100	$(^{90}\text{Sr}+^{90}\text{Y})+^{40}\text{K}$	1–3 раз	5–15	5–15	5–15
	Учет ^{40}K	–	5–15	–	5–15

* $(^{90}\text{Sr}+^{90}\text{Y})+^{40}\text{K}$ – обработка β -спектра без учета активности ^{40}K .

**Учет ^{40}K – обработка β -спектра с учетом активности ^{40}K , снижающая погрешность результата определения ^{90}Sr .

Для непосредственного определения активности необходимо установить необходимую массу счетного образца, а также:

- для измерения пробы на β -спектрометре при помощи специального устройства приготовить из исследуемого материала таблетку равной толщины;
- для измерения пробы на γ -спектрометре заполнить сосуд Маринелли или чашку Петри материалом пробы до определенной отметки.

Внимание! При приготовлении счетного образца необходимо заполнять измерительный сосуд веществом пробы в строгом соответствии с одной из аттестованных геометрий.

2.2.2. Проведение измерений, регистрация и обработка результатов

Для определения радионуклидов в подготовленном счетном образце необходимо провести следующие операции.

Включить питание компьютера, а также γ - и β -спектрометрические детекторы. Загрузить программную оболочку ПРОГРЕСС в оперативную память компьютера, запустив файл **p.bat**, и выбрать в основной таблице строку, соответствующую виду измеряемого спектра (γ - или β -).

Запустить набор спектров каждого из калибровочных источников, убедиться в наличии β -спектра $^{90}\text{Sr}(^{90}\text{Y})$ и γ -спектра на экране (рис. 7). Прогреть каждый из трактов в течение 40 мин.

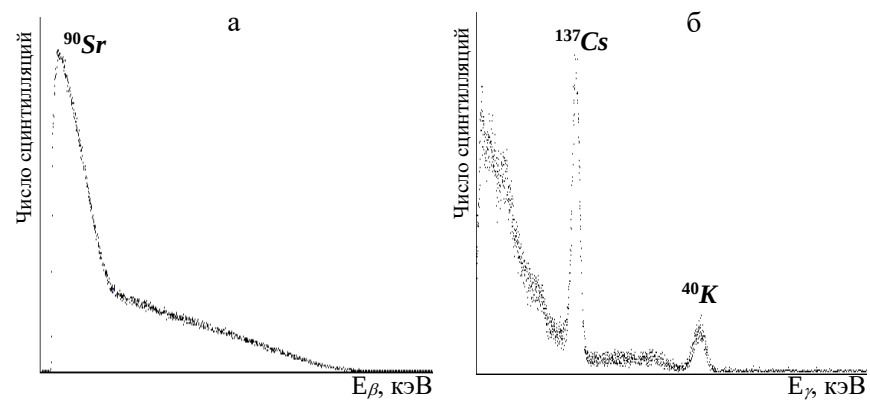


Рис. 7. Спектры калибровочных источников:
а – β -спектр $^{90}\text{Sr}(^{90}\text{Y})$; б – γ -спектр $^{137}\text{Cs}+^{40}\text{K}$

На рис. 8 приведена блок-схема, описывающая последовательность действий оператора при проведении измерений на γ - и β -спектрометрических трактах.

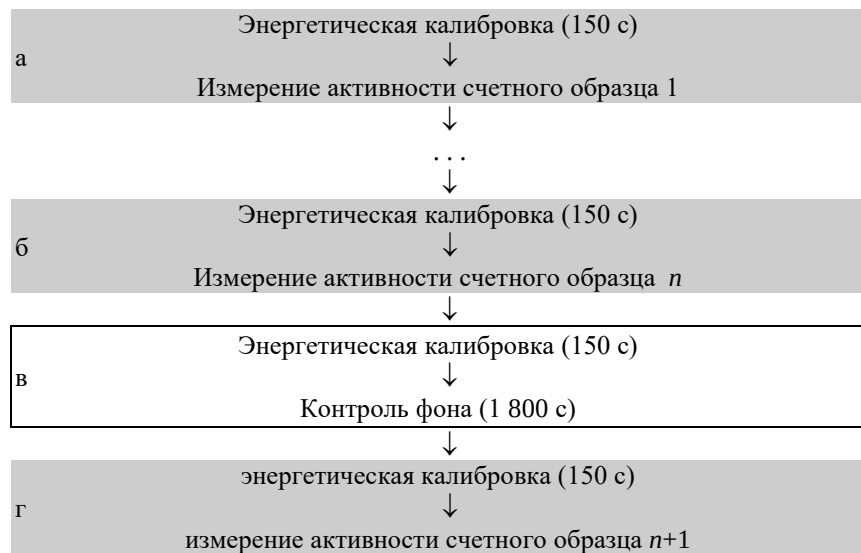


Рис. 8. Порядок проведения измерений активности счетных образцов
на γ - и β -спектрометрических трактах

Регламентом радиометрических измерений предусмотрено проведение калибровки каждого тракта по энергии перед каждым определением радиоактивности счетного образца или фона. Измерение фона (образца нулевой активности) проводится один раз в день.

В процессе измерения можно параллельно работать со всеми трактами и устройствами комплекса, обрабатывать записанные ранее спектры, оформлять результаты измерений, работать с базой данных и т. п. Кроме того, существует возможность выхода из программной оболочки ПРОГРЕСС и работы на ПЭВМ с другими программами без прерывания процесса регистрации спектра.

Ниже приводится характеристика основных режимов работы комплекса.

Калибровка β -тракта – проводится автоматически посредством сравнения формы спектра калибровочного точечного источника $^{90}\text{Sr}(^{90}\text{Y})$, входящего в состав установки, с формой реперного спектра точечного источника $^{90}\text{Sr}(^{90}\text{Y})$.

Калибровка γ -тракта – программа автоматически находит номера каналов анализатора, отвечающие вершинам пиков полного поглощения радионуклидов ^{137}Cs и ^{40}K , присваивает им значения энергии 662 кэВ и 1 461 кэВ соответственно и записывает вновь полученные калибровочные коэффициенты в память компьютера.

На экран монитора помимо результатов калибровки выдается значение контрольной скорости счета от калибровочного источника в определенном интервале энергий. Сохранность этого значения в пределах 10% от значения, указанного в свидетельстве о метрологической аттестации данной установки, является критерием работоспособности спектрометра в течение межповерочного интервала. Стандартное время энергетической калибровки составляет 150 с.

Контроль фона. Измерение фона необходимо производить в любое время, не реже одного раза за один рабочий день. Проведение фоновых измерений в начале рабочего дня необязательно. Стандартное время фоновых измерений – 1 800 с (30 мин).

Для проведения измерения фона необходимо выполнить следующие операции:

- нажать кнопку «пуск»;
- выбрать задачу «контроль фона» и подтвердить свой выбор повторным щелчком мыши;
- установить чистую кювету под детектор для β -тракта; убрать калибровочный источник с детектора, закрыть крышку свинцовой защиты для γ -тракта;
- нажать кнопку «продолжить».

По окончании набора программа рассчитывает значения скорости счета в измерительных энергетических интервалах для вновь измеренного фонового спектра и спектра фона, измеренного ранее, который хранится в специальном файле на диске ПЭВМ. После этого программа сравнивает значения, полученные для обоих спектров между собой. В том случае, если эти значения совпадают в пределах погрешности, программа складывает измеренный спектр со спектром, измеренным ранее, со статистическими весами 0,4 и 0,6 соответственно. Результат усреднения записывается в файл фонового спектра на место старого.

Для измерения активности счетного образца необходимо:

- подготовить пробу к измерению (пп. 2.2.1);
- взвесить пробы;
- установить кювету с пробой над (под) детектор(ом);
- ответить на предложенные программой вопросы;
- запустить измерение;
- после выполнения измерения (ориентировочно через 30 мин)

сохранить результат.

По окончании измерений необходимо сохранить спектры по каждому из трактов (для одного счетного образца необходимо присваивать один номер для всех трактов).

В зависимости от выбранного способа приготовления счетного образца, его предполагаемого радионуклидного состава и используемой геометрии измерения, применяются различные алгоритмы обработки β - и γ -спектров. Они заложены в программную оболочку ПРОГРЕСС.

Из полученных в результате обработки спектра значений активности радионуклидов в счетном образце программа рассчитывает значения удельной активности радионуклидов в исходной пробе, используя для этого сведения о счетном образце, вводимые оператором перед началом измерения. Набор вопросов о счетном образце, предлагаемых оператору программой, специфичен для каждого алгоритма обработки.

2.3. Порядок выполнения работы

Цель работы: определение содержания радионуклидов (^{90}Sr и ^{137}Cs) в пищевых продуктах методом сцинтилляционной спектрометрии при помощи универсального спектрометрического комплекса УСК «Гамма-Плюс».

Приборы и оборудование, реактивы и материалы, необходимые для выполнения работы:

- универсальный спектрометрический комплекс УСК «Гамма-Плюс» с программным обеспечением «Прогресс»;

- образцы пищевых продуктов (в нативной форме, а также озоленные);
- измерительные емкости (чашки Петри, сосуд Маринелли и др.) с аттестованной геометрией для размещения счетных образцов;
- весы технические или лабораторные с точностью измерения не меньше 0,1 г;
- тигли кварцевые или фарфоровые.

Для сравнения полученных результатов определения радионуклидов с установленными нормами необходимо использовать СанПиН 2.3.2.1078–01 или другой нормативный документ, регламентирующий эти значения.

Задание 1. Ознакомиться с особенностями подготовки проб для определения содержания радионуклидов (^{90}Sr и ^{137}Cs). Приготовить пробы в соответствии с п. 2.2.1. Во избежание возможных ошибок перед началом пробоподготовки необходимо ответить на следующие вопросы:

- 1) в каких случаях для определения радионуклидов (^{90}Sr и ^{137}Cs) можно обойтись без пробоподготовки и почему;
- 2) каковы основные этапы подготовки проб для определения радионуклидов методами физического концентрирования (^{90}Sr и ^{137}Cs);
- 3) в чем состоит сущность радиохимического концентрирования и когда его применяют.

Задание 2. Провести регистрацию и обработку спектров излучения калибровочных источников в соответствии с п. 2.2.2. Результаты калибровки (позиции пиков и контрольные скорости счета) сравнить с контрольными значениями, полученными при аттестации комплекса (табл. 4).

Т а б л и ц а 4

Контрольные значения для калибровочных источников

Используемый тракт	Показатели	Значения	
β-спектрометр	Энергия, кэВ	250	3 000
	Позиция (номер канала)	40	740
	Скорость счета в диапазоне 250–500 кэВ	102±10%	
γ-спектрометр	Энергия, кэВ	662	1 461
	Позиция (номер канала)	160	350
	Скорость счета в диапазоне 540–800 кэВ	83±10%	

Провести контрольное измерение фона, измерение активности счетных образцов по каждому из трактов в соответствии с п. 2.2.3.

По окончании обработки спектров излучения по каждому из трактов следует нажать мышью кнопку «сохранить результат». При этом результат обработки передается в специальный файл «базы данных» с одним кодом для одного образца по всем трактам и сохраняется в нем.

Задание 3. Определить содержание радионуклидов (^{90}Sr и ^{137}Cs) в исследуемом пищевом продукте. Для этого необходимо:

- войти в базу данных спектров, содержащую измеренные значения спектров по каждому из трактов сцинтилляционного спектрометра для всех счетных образцов, нажав мышью на соответствующий значок «архив»;
- нажать комбинацию клавиш Ctrl+End для установки маркера на последнюю запись в базе данных, соответствующую исследуемой пробе;
- нажать кнопку «протокол»;
- ввести цифры, соответствующие разделу СанПиН 2.3.2.1078–01, в котором приведены допустимые уровни содержания радионуклидов для исследуемого пищевого продукта, и нажать Enter;
- последовательными нажатиями клавиши Enter просмотреть протокол;
- если достигнутая точность измерений позволила программе выдать однозначное заключение о соответствии (или несоответствии) исследуемой пробы требованиям радиационной безопасности, регламентированным в СанПиН 2.3.2.1078–01, следует нажать кнопку «ОК» для вывода окончательного протокола на печать.

Результаты измерений занести в протокол (прил. 1) и оформить в виде табл. 5.

Т а б л и ц а 5

Наименование показателя, ед. измерения	Метод испытания	Норматив	Результат измерений
Показатель соответствия «В»	Сцинтилляционная спектрометрия	≤ 1	$B \pm \Delta B$
Удельная (объемная) активность ^{90}Sr , Бк/кг(л)		$^{90}\text{Sr}_{\text{норма}}$	$^{90}\text{Sr}_{\text{изм}} \pm \Delta ^{90}\text{Sr}$
Удельная (объемная) активность ^{137}Cs , Бк/кг(л)		$^{137}\text{Cs}_{\text{норма}}$	$^{137}\text{Cs}_{\text{изм}} \pm \Delta ^{137}\text{Cs}$

Заключение: по результатам измерений удельной активности техногенных радионуклидов ^{137}Cs и ^{90}Sr исследованный пищевой продукт может быть признан соответствующим (несоответствующим) нормативам СанПиН 2.3.2.1078–01.

Значение показателя соответствия B составляет $B \pm \Delta B$

$$B \pm \Delta B \leq 1$$

$$B = \left(\frac{{}^{137}Cs_{\text{изм}}}{{}^{137}Cs_{\text{норма}}} \right) + \left(\frac{{}^{90}Sr_{\text{изм}}}{{}^{90}Sr_{\text{норма}}} \right), \quad \Delta B = \sqrt{\left(\frac{\Delta {}^{137}Cs}{{}^{137}Cs_{\text{норма}}} \right)^2 + \left(\frac{\Delta {}^{90}Sr}{{}^{90}Sr_{\text{норма}}} \right)^2},$$

где B – показатель соответствия; ΔB – погрешность определения показателя B ; ${}^{137}Cs_{\text{изм}}$; ${}^{90}Sr_{\text{изм}}$ – измеренная удельная активность соответствующих радионуклидов; ${}^{137}Cs_{\text{норма}}$; ${}^{90}Sr_{\text{норма}}$ – нормируемая активность соответствующих радионуклидов для данного вида продукции; $\Delta {}^{137}Cs$; $\Delta {}^{90}Sr$ – погрешность определения радионуклидов.

Вопросы для самоконтроля

1. Какие показатели предусмотрены СанПиНом для контроля радиационной безопасности пищевых продуктов?
2. Какие вы знаете приборы радиационного контроля? Какие методы регистрации излучения лежат в основе принципа действия этих приборов?
3. В чем сущность сцинтилляционного метода регистрации излучения?
4. Какие существуют разновидности сцинтилляторов?
5. Каково назначение γ - и β -спектрометрических трактов?
6. Как проводят пробоподготовку пищевых продуктов для определения содержания радионуклидов? Что такое «счетный образец»?
7. Опишите последовательность действий при проведении измерений на γ - и β -спектрометрических трактах.
8. Как часто и с какой целью проводят измерения фона?
9. С учетом каких факторов выбирают алгоритм обработки β - и γ -спектров?
10. Что представляет собой «удельная активность» и в каких единицах она измеряется?
11. Как обеспечивается точность измерений при определении содержания радионуклидов сцинтилляционным методом?

РАБОТА 3. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА ПРИ ОЦЕНКЕ БЕЗОПАСНОСТИ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

3.1. Введение в область применения метода

Большинство пищевых продуктов имеют крайне сложный состав, обуславливающий многочисленные трудности при оценке их безопасности и качества. Анализ подобных систем начинают с выделения отдельных компонентов смеси, которое осложняется их малым содержанием. Для точного определения количества интересующего компонента используют специальную пробоподготовку: экстракцию, кристаллизацию, выпаривание, осаждение и т. д. Успешной альтернативой подобных методов пробоподготовки может быть процедура хроматографирования, т. е. разделения сложной смеси на составляющие компоненты.

Хроматография является гибридным аналитическим методом исследования, позволяющим не только разделить компоненты смеси, но и определить их качественный и количественный состав. В пищевой промышленности и санитарно-гигиенических исследованиях аналитика на 70–80% представлена хроматографическими методами.

Хроматография – физико-химический метод исследования веществ и их смесей, основанный на разделении компонентов в динамическом режиме за счет распределения их при перемещении между слоем неподвижной фазы и потоком подвижной фазы.

Подвижной фазой может быть либо газ – газовая хроматография (ГХ), либо жидкость – жидкостная хроматография (ЖХ). Жидкостная хроматография используется, когда анализируемые компоненты смеси термолабильны, нелетучи, имеют молекулярную массу более 1000 а.е.м. В остальных случаях используют ГХ.

Неподвижной фазой является пористое или гранулированное вещество или тонкая пленка жидкости, адсорбированная на твердой поверхности носителя. В зависимости от вида геометрии слоя неподвижной фазы хроматографию подразделяют на колоночную или плоскостойную. К последней относят бумажную (БХ) и тонкослойную хроматографию (ТСХ). Методы БХ и ТСХ изучались в дисциплине «Физико-химические методы контроля качества товаров» [4]. Предметом данной работы является знакомство с различными вариантами колоночной хроматографии – жидкостной и газожидкостной хроматографией – и их возможностями для оценки безопасности пищевых продуктов.

В колоночной хроматографии распространена классификация, основанная на относительной полярности подвижной и неподвижной фаз. Разнообразные механизмы взаимодействия сорбатов с неподвижной

фазой служат основой для классификации вариантов жидкостной хроматографии. Различают *нормально-* и *обращено-фазовую* хроматографию. В первом случае неподвижная фаза более полярна, чем подвижная, и основным механизмом, определяющим удерживание, служит взаимодействие сорбатов непосредственно с активными центрами сорбента за счет образования водородных связей. Во втором – наоборот подвижная фаза более полярна, чем неподвижная, и удерживание определяется непосредственным контактом молекул сорбата с поверхностью или объемом сорбента [2, 7, 9].

Основным элементом системы для газовой (ГХ) и жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) является *хроматографическая колонка*, представляющая собой калиброванную трубку, заполненную пористым сорбентом, через которую непрерывно пропускается (с определенной скоростью) элюент – гомогенная смесь растворителей (ВЭЖХ) или газ-носитель (ГХ). *Сорбент* (наполнитель колонки) удерживается в колонке с двух сторон микропористыми (металлическими) фильтрами и в процессе разделения остается неподвижным. В его объеме происходит разделение смеси веществ (сорбатов) на отдельные фракции. Сорбент обеспечивает разделение молекул, если обладает хотя бы одним из приведенных ниже основных свойств: 1) физически адсорбирует растворенные вещества из раствора; 2) химически взаимодействует с веществами раствора; 3) растворяет разделяемые вещества в несмешивающемся растворителе при контакте с растворами; 4) имеет пористую структуру и поэтому удерживает одни растворенные вещества и не задерживает другие в зависимости от их размера или формы.

После введения в верхнюю часть колонки аликвотной части анализируемой смеси различных сорбатов начинается их перемещение вдоль колонки. В процессе движения молекулы сорбатов взаимодействуют с активными центрами поверхности неподвижной фазы. Время, в течение которого молекулы находятся в адсорбированном состоянии, определяется силой межмолекулярного взаимодействия сорбатов с сорбентом. При очень слабом взаимодействии молекулы (А) почти все время находятся в растворе подвижной фазы и поэтому перемещаются вниз по колонке со скоростью, лишь незначительно отличающейся от скорости движения подвижной фазы. Напротив, при очень сильной адсорбции молекулы (В) с трудом отрываются от поверхности, и скорость их перемещения вдоль слоя адсорбента незначительна (рис. 9).

Хроматограмма является графическим результатом хроматографического процесса, кривой, описывающей зависимость

изменения концентрации анализируемых веществ в элюате¹ от времени (объема). С точки зрения аппаратного оформления хроматограммой можно назвать зависимость отклика детектора хроматографа от времени (объема) прохождения элюата через ячейку детектора.

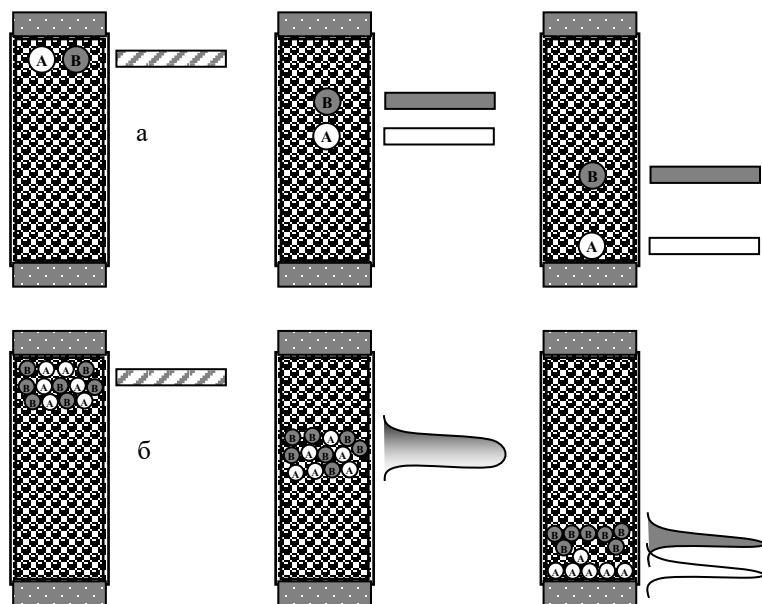


Рис. 9. Хроматографическое разделение:

а – гипотетическое разделение двух разных молекул А и В. Линия правее колонки изображает распределение молекул двух видов по высоте слоя; б – размывание зон при разделении реальной пробы вследствие отклонения величины скорости перемещения отдельных молекул

Хроматограмма состоит из ряда пиков, каждый из которых в идеальном случае (при полном разделении фракций) соответствует одному компоненту анализируемой пробы (рис. 10). Площадь (высота) пика пропорциональна концентрации компонента в элюате. Пик – кривая, в идеале приближающаяся к кривой распределения Гаусса, описывает постепенное нарастание концентрации вещества на выходе из колонки и последующее ее уменьшение.

При описании хроматографических процессов используют следующие понятия.

Время удерживания вещества (t_R) – время пребывания исследуемого вещества в хроматографической колонке (время появления максимума пика на хроматографическом профиле рис. 10). Для любого

¹ *Элюат* – элюент, содержащий компоненты пробы на выходе из колонки.

вещества при одинаковых условиях хроматографического разделения, использовании одной и той же колонки и минимальных колебаниях температуры окружающей среды время удерживания является специфичной и индивидуальной характеристикой. На этом основана идентификация компонентов разделяемой смеси.

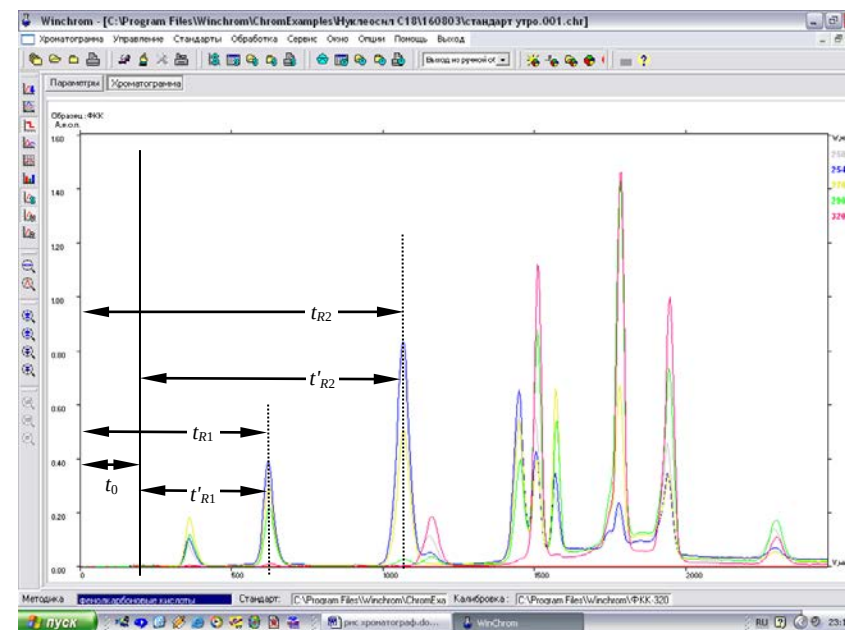


Рис. 10. Хроматограмма:

t_{Ri} – времена удерживания хроматографических пиков (удерживаемые объемы),
 t'_{Ri} – исправленные времена удерживания, t_0 – время элюирования несорбируемого вещества

Время удерживания несорбируемого вещества (t_0) – время элюирования вещества, которое не удерживается слоем адсорбента. Величина t_0 является важной характеристикой данной хроматографической системы при постоянном расходе элюента.

Исправленное время удерживания (t'_R) рассчитывается по формуле

$$t'_R = t_R - t_0. \quad (3)$$

Удерживаемый объем (V_R) компонента – объем элюента, прошедшего через колонку к моменту выхода элюационного максимума пика, определяется по формуле

$$V_R = t_R \cdot w, \quad (4)$$

где w – объемная скорость подачи элюента, мкл/мин или мл/мин.

Объем удерживания несорбируемого компонента (V_0) равен «мертвому» объему хроматографической системы.

Исправленный удерживаемый объем (V'_R) определяется по формуле

$$V'_R = V_R - V_0 = w \cdot t_R - w \cdot t_0 = w \cdot t'_R. \quad (5)$$

Коэффициент емкости (K') характеризует степень удерживания вещества в данной хроматографической системе и рассчитывается по формуле

$$K' = \frac{t_R - t_0}{t_0} = \frac{V_R - V_0}{V_0} = \frac{V'_R}{V_0}. \quad (6)$$

Этот параметр не зависит от размеров колонки.

Пределом детектирования называется количество вещества, введенного непосредственно в кювету детектора, при котором сигнал детектора в два раза превышает его шум (рис. 11).

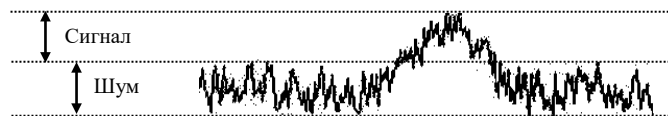


Рис. 11. Соотношение сигнал-шум при определении предела детектирования

Качественный хроматографический анализ

Для идентификации веществ на полученной хроматограмме исследователю необходимо установить:

- 1) какому веществу соответствует отдельный пик на хроматограмме анализируемой смеси;
- 2) какому пику на хроматограмме соответствует искомое анализируемое вещество.

Наиболее надежные результаты идентификации получают, если исследователь располагает химически чистыми веществами – **стандартами**, присутствие которых предполагается в анализируемой смеси. Растворы стандартов определенной концентрации называют **стандартными растворами**.

Идентификацию с использованием стандартных растворов проводят следующим образом:

- 1) подбирают оптимальные условия разделения анализируемой смеси;
- 2) измеряют параметры удерживания всех хроматографических пиков анализируемой смеси и смеси стандартов.

Если в анализируемой смеси находится хроматографический пик с параметрами удерживания, близкими к стандарту, то возможны следующие варианты:

1) вещество стандарта и компонент анализируемой смеси – одно и то же соединение. В этом случае идентификация закончена;

2) вещество стандарта и компонент анализируемой смеси – одно и то же соединение, но хроматографический пик компонента анализируемой смеси является неразделенным с хроматографическим пиком другого соединения. В этом случае необходимо изменить хроматографические условия и разделить плохо разделившиеся пики;

3) вещество стандарта и компонент анализируемой смеси являются разными веществами, так как несмотря на совпадение параметров удерживания, различаются по дополнительным характеристикам идентификации (например, имеют разные спектральные отношения – см. п. 3.2.2).

Количественный хроматографический анализ

В количественном анализе используют методы внутреннего и внешнего стандартов.

При использовании метода *внутреннего стандарта* (относительного метода) в анализируемую смесь добавляют компонент А известной концентрации с коэффициентом удерживания K' , отличным от коэффициентов удерживания анализируемых веществ смеси. Это позволяет решать следующие задачи: оценивать воспроизводимость и достоверность анализа, определять изменение концентраций веществ смеси относительно компонента А и др.

На практике часто необходимо знать абсолютную концентрацию каждого компонента смеси. В таких случаях используют метод *внешнего стандарта* (абсолютной калибровки), который предусматривает следующую последовательность проведения анализа.

Сначала производят градуировку хроматографа по стандартным растворам определяемых соединений, т. е. строят зависимость концентрации искомого соединения от высоты (площади) его хроматографического пика. Градуировку осуществляют таким образом, чтобы ожидаемый диапазон концентраций анализируемого соединения в исследуемой смеси находился в пределах градуировочной кривой.

Затем на хроматографическом профиле анализируемой смеси находят высоту (площадь) хроматографического пика определяемого соединения и по градуировочному графику рассчитывают его концентрацию.

3.2. Определение микотоксинов (на примере патулина) методом ВЭЖХ

3.2.1. Сущность метода

Для определения содержания микотоксинов в составе пищевых продуктов проводят пробоподготовку методом твердофазной экстракции на концентрирующих патронах «Диапак» (п. 3.2.3). Разделение, иден-



Рис. 12. Микроколоночный хроматограф

тификацию и количественное определение микотоксинов в подготовленных пробах осуществляют методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на микроколоночном хроматографе серии «Милихром-5» в модульном исполнении (рис. 12).

В работе рассматривается обращенно-фазовый вариант ВЭЖХ для определения патулина. Детектирование проводят на длине волны 276 нм. Для точной идентификации патулина используют также многоволновое детектирование, позволяющее применить в качестве дополнительного параметра идентификации спектральные отношения. Разделение осуществляют в режиме градиентного элюирования, что позволяет повысить разрешающую способность и чувствительность анализа.

Анализ пробы с помощью жидкостного хроматографа (рис. 13) осуществляется следующим образом. Определенный объем раствора анализируемой пробы с помощью узла ввода проб (2) вводится в верхнюю часть хроматографической колонки (3). С помощью насоса (1) анализируемая смесь прокачивается элюентом через хроматографическую колонку (3), в которой происходит разделение анализируемой

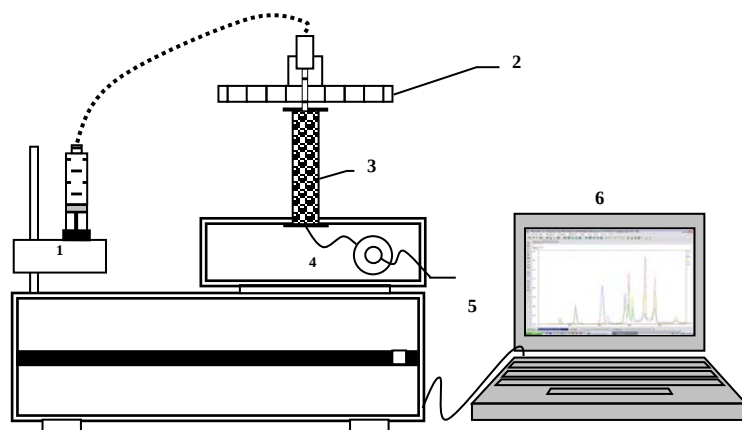


Рис. 13. Жидкостный хроматограф:

1 – насос; 2 – узел ввода проб; 3 – хроматографическая колонка; 4 – детектор; 5 – слив для элюата или коллектор для фракций; 6 – регистратор (самописец, интегратор или персональный компьютер)

смеси на отдельные фракции (компоненты). Вытекающий из колонки элюат, содержащий разделенные компоненты, анализируется детектором (4), показания которого фиксируются регистратором (6).

Методические основы ВЭЖХ

Для понимания сущности метода ВЭЖХ, используемого для определения патулина, необходимо изучить некоторые методические аспекты, лежащие в его основе.

Элюотропные ряды. Элюирующей силой элюента называется способность элюента (растворителя или смеси растворителей) вытеснять адсорбат с поверхности адсорбента. При этом чем сильнее молекулы элюента адсорбируются на активных центрах сорбента, тем выше его элюирующая сила. Расположенные в ряд по возрастанию элюирующей силы растворители образуют элюотропный ряд [2].

В качестве элюентов для обращенно-фазовой хроматографии используются смеси растворителей, содержащие воду и органические соединения, модифицирующие элюирующую силу – *n*-спирты, ацетонитрил, тетрагидрофуран и другие, образующие с водой истинные растворы. В нормально-фазовой хроматографии в качестве элюентов используют полярные модификаторы – линейные и циклические углеводороды (гексан, циклогексан, гептан и др.).

Детекторы для жидкостных хроматографов. В настоящее время разработано более 20 детекторов для ВЭЖХ. Наибольшее распространение получили пять, три из которых являются оптическими, а два – электрохимическими. Эти пять детекторов позволяют анализировать все классы органических и неорганических веществ.

К оптическим детекторам относят спектрофотометрический детектор (ультрафиолетовый (УФ), работающий в волновом диапазоне 200–360 нм и видимый с волновым диапазоном 360–780 нм), флуориметрический и рефрактометрический детекторы; к электрохимическим – вольтамперометрический и кондуктометрический детекторы. Особое значение имеет масс-спектрометрический детектор, обладающий уникальной информативностью, так как позволяет проводить идентификацию хроматографически разделенных компонентов, используя базы данных масс-спектров веществ.

Спектрофотометрический детектор является наиболее распространенным детектором для ВЭЖХ. Принцип его действия основан на известном законе светопоглощения Бугера-Ламберта-Бера [5]. Спектро-фотометрический детектор регистрирует спектры избирательного абсорбционного поглощения излучения веществом. Спектры поглощения зависят от строения исследуемого вещества. Это позволяет идентифицировать вещество по его спектру, располагая библиотекой спектров или стандартами. Согласно закону Бугера-Ламберта-Бера интенсивность полос спектров зависит от концентрации вещества, что

является основой количественного анализа, т. е. определения концентрации вещества.

Пусть монохроматический свет от источника интенсивностью I_0 попадает на кювету длиной l (оптический путь). Кювета заполнена раствором вещества с концентрацией C . Вещество способно поглощать монохроматическое излучение. Мерой способности поглощения данного монохроматического излучения служит величина ε – коэффициент молярного поглощения, или коэффициент экстинкции. Из кюветы выходит ослабленный световой пучок интенсивностью I . Согласно закону светопоглощения при длине волны $\lambda = \text{const}$

$$I = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon C l}, \quad (7)$$

где I – интенсивность светового потока после прохождения кюветы; I_0 – интенсивность падающего светового потока; ε – коэффициент экстинкции; C – молярная концентрация вещества в кювете; l – длина кюветы.

Отношение I к I_0 , выраженное в процентах, называется пропусканием T , а величина $A = \lg(I_0/I)$ – оптической плотностью.

$$A = \lg(I_0/I) = \varepsilon C \cdot l. \quad (8)$$

Оптическая плотность вещества прямо пропорциональна концентрации анализируемого вещества. В спектрофотометрических детекторах аналитической величиной является оптическая плотность A . Формула (8) служит основой количественного анализа при использовании спектрофотометрического детектора, так как оптическая плотность A вещества прямо пропорциональна высоте или площади хроматографического пика.

Зависимость оптической плотности A от длины волны падающего на кювету с веществом света в диапазоне длин волн от 190 до 360 нм называется ультрафиолетовым спектром поглощения (рис. 14).

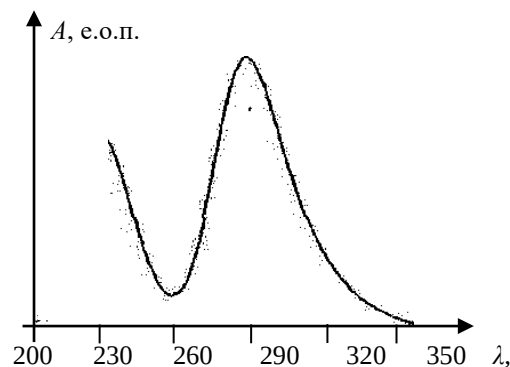


Рис. 14. Ультрафиолетовый спектр поглощения водного раствора вещества x

3.2.3. Пробоподготовка образцов

Любое вещество имеет длину волны максимального поглощения (λ , нм). При использовании данной длины волны детектор имеет наименьший порог обнаружения вещества.

С помощью спектрофотометрического детектора (СФД) детектируется большое количество веществ различных классов, поглощающих ультрафиолетовый свет.

Использование спектрофотометрического детектора в хроматографии значительно облегчает идентификацию. Многоволновый детектор в сочетании с программным обеспечением позволяет получить хроматограмму на нескольких длинах волн одновременно и рассчитать дополнительный параметр для идентификации компонентов – *спектральное отношение* (Q) – отношение высот хроматографического пика на разных длинах волн

$$Q = \frac{A_1}{A_2}, \quad (9)$$

где A_1 и A_2 – коэффициенты оптической плотности на длинах волн 1 и 2. Величина Q для каждого вещества является постоянной характеристикой и не зависит от его концентрации. Точность спектральных отношений зависит от значений оптической плотности вещества и конструкции детектора.

Пробоподготовка образцов при помощи метода твердофазной экстракции на концентрирующих патронах обеспечивает экономию временных и трудовых затрат. Твердофазная экстракция позволяет сконцентрировать пробу и очистить ее от сопутствующих примесей. Комплексная схема твердофазной экстракции предусматривает последовательное использование двух патронов:

- универсального концентрирующего патрона «ДИАПАК П-3» – патрона многоразового применения (до 50 проб) с набором верхних и нижних фильтров (10 шт.);

- универсального патрона для тонкой очистки «ДИАПАК С» – патрон одnorазового применения.

Для **подготовки концентрирующих патронов** необходимо выполнить следующие операции.

Для *подготовки концентрирующего патрона «ДИАПАК П-3»*:

- прокачать через патрон 10 мл смеси вода-ацетонитрил (58:42);

- непосредственно перед проведением пробоподготовки прокачать через патрон 10 мл дистиллированной воды.

Для *подготовки концентрирующего патрона «ДИАПАК С»*:

- прокачать через патрон 5 мл бензола и заглушить патрон с обоих концов.

Подготовка пищевого продукта к концентрированию

Навеску пробы массой 10,0 г поместить в стеклянный стакан, смешать с небольшим количеством дистиллированной воды и количественно перенести в мерную колбу вместимостью 50 мл. В колбу внести по 6,0 мл раствора Карреза I и раствора Карреза II. Содержание колбы довести дистиллированной водой до метки, тщательно перемешать и отфильтровать в мерный цилиндр через бумажный складчатый фильтр. Измерить объем прозрачного фильтрата П.

При подготовке осветленных соков и напитков отфильтровать пробу через плотный бумажный фильтр до получения 20 мл прозрачного фильтрата П.

Концентрирование пробы на патроне «ДИАПАК П-3»

Весь объем фильтрата П нанести на предварительно подготовленный патрон со скоростью 1–2 капли в секунду.

Промыть патрон 5 мл бидистиллированной воды, отбрасывая все смывы.

Элюировать патулин с патрона 10 мл этилацетата в колбу или мерную пробирку с пришлифованной пробкой, содержащую 5 мл 1,5%-ного водного раствора карбоната натрия, закрыть пробкой, интенсивно перемешать и дать расслоиться.

Собрать осушительную колонку, заполнив корпус с фильтром примерно 2 г безводного сульфата натрия, уплотнить осушитель постукиванием по стенке колонки и зафиксировать ватным тампоном.

Декантировать верхний этилацетатный слой при помощи пипетки, профильтровать через осушительную колонку, собирая фильтрат в отгонную сердцевидную колбу на 50 мл; дополнительно проэкстрагировать водный раствор карбоната натрия сначала 10 мл, а затем 5 мл этилацетата и, после расслоения, последовательно профильтровать декантированные объемы этилацетата через осушительную колонку в ту же колбу.

Упарить этилацетат в вакууме при температуре не выше 40°C до объема около 0,5 мл (не упаривать досуха!), добавить 2,5 мл бензола (соблюдать соотношение объемов 1:5).

Очистка пробы на патроне «ДИАПАК С»

Снять заглушки с подготовленного патрона и пропустить бензол-этилацетатный раствор пробы со скоростью 1–2 капли в секунду. Обмыть колбу еще 0,5–1,0 мл смеси бензол-этилацетат (85:15) и нанести на патрон, отбросив смывы.

Элюировать патулин с патрона 6 мл смеси бензол:этилацетат (7:3), собирая элюат в сердцевидную отгонную колбу.

Упарить элюат досуха на суховоздушной бане при температуре не более 40°C.

Немедленно! После упаривания перерастворить пробу в 0,2–0,25 мл элюента А (п. 3.2.4.2), охлажденного до 5–8°C.

3.2.4. Порядок выполнения работы

Цель работы – определение содержания микотоксина патулина в составе пищевых продуктов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на микроколоночном хроматографе серии «Миличром–5».

3.2.4.1. Методика измерений

Проведение измерений включает следующие основные этапы:

- градуировку хроматографа по растворам с известной массовой концентрацией патулина;
- подготовку пищевой пробы методом твердофазной экстракции по пп. 3.2.3;
- анализ экстракта методом ВЭЖХ с регистрацией сигнала УФ детектором;
- идентификацию патулина по параметрам удерживания и спектральным отношениям;
- вычисление массовой концентрации патулина в пробе на основе зарегистрированного аналитического сигнала (высоты пика) и градуировочного графика;
- вычисление массовой доли патулина в составе пищевого продукта.

Приборы, реактивы и материалы, необходимые для выполнения работы:

- хроматограф серии «Миличром–5» или любой другой хроматограф для ВЭЖХ с программным обеспечением WinXrom или Мультихром;
- хроматографическая колонка для ВЭЖХ: Диасфер–110–C10CN (5 мкм, 2×80 мм, ТУ 4215–001–05451931–94);
- дозатор переменного объема на 1–100 мкл;
- дозатор переменного объема на 100–1000 мкл;
- коническая колба с плотно притертым шлифом емкостью до 10 мл;
- мембранные фильтры;
- набор стандартных растворов патулина с концентрацией – 1, 2, 5 и 10 мг/л;
- фосфорная кислота 85%-ная;
- ацетонитрил для жидкостной хроматографии (о.с.ч. ТУ 6–09–3513–86, УФ поглощение до 200 нм);
- гексан, химически чистый (ректифицированный);

- трифторуксусная кислота;
- раствор Карреза I – 15,0 г гексацианоферата II калия растворить в 100 мл воды.
- раствор Карреза II – 30,0 г ацетата цинка растворить в 100 мл воды;
- элюенты А, Б и С.

Приготовление элюентов

Элюент А. В мерную колбу с плотно притертым стеклянным шлифом емкостью 100 мл вносят 20 мл ацетонитрила и 0,5 мл 10%-ного раствора трифторуксусной кислоты. Раствор тщательно перемешивают и доводят до метки дистиллированной водой, предварительно отфильтрованной через мембранный капроновый фильтр (0,2 мкм). Затем проводят дегазацию элюента вакуумированием в течение 1 минуты при разрежении 1 кГ·с/см².

Элюенты Б и С готовят также как элюент А, только на 100 мл раствора берут 10 и 0 мл ацетонитрила, соответственно.

3.2.4.2. Установка хроматографических режимов разделения и регистрации результатов

Для проведения измерений необходимо установить рабочие режимы хроматографа.

Режимы дозатора:

- регенерация – 300 мкл;
- объем пробы – 5 мкл;
- расход элюента – 150 мкл/мин;
- режимы градиентного элюирования: 800 мкл – элюента А, 500 мкл – элюента Б, 300 мкл – элюента С;
- температура термостата – 35⁰С.

Режимы детектирования:

- число длин волн – 3;
- длины волн – 250, 276, 290 нм;
- время измерения – 0,04 с.

Кондиционирование хроматографической системы осуществляют за 30 минут до проведения измерений путем выполнения «холостого» анализа, в котором стандартную смесь, содержащую патулин, заменяют 5–10 мкл элюента, а затем проводят разделение стандартной смеси микотоксинов.

Задание 1. Изучить методику пробоподготовки пищевых продуктов для определения содержания патулина. Приготовить пробы в соответствии с п. 3.2.3.

Задание 2. Провести градуировку хроматографа. Градуировку хроматографа осуществляют последовательным вводом стандартных

растворов патулина с концентрациями 1, 2, 5 и 10 мг/л.

Под руководством преподавателя предлагается с клавиатуры ПК в программу (WinXrom) ввести параметры проведения хроматографического разделения (пп. 3.2.4.3) и запустить в автоматическом режиме 2–4 хроматографических анализа. Результаты оформить в виде табл. 6.

Т а б л и ц а 6

№ п/п	Удерживаемый объем (V), мкл	Высота пика, е.о.п.	Концентрация микотоксина в пробе, мг/л
1.			

Хроматограмму стандарта необходимо сохранить в следующем формате: «СтандартДД–ММ–ГГ.001» (например, «Стандарт01–08–03.001»).

На основе полученных хроматографических профилей построить калибровочный график (по оси ординат откладывается концентрация – мг/л, по оси абсцисс оптическая плотность микотоксина A – е.о.п.).

Задание 3. Идентифицировать в исследуемом образце пищевого продукта патулин и определить его концентрацию.

Под руководством преподавателя запустить измерение подготовленной пробы пищевого продукта в автоматическом режиме (с параметрами хроматографического разделения, выбранными в задании 2). По окончании измерения провести идентификацию микотоксина патулина по файлу стандарта («СтандартДД–ММ–ГГ.001»), полученному в задании 2. Используя калибровочный график, построенный в задании 2, определить концентрацию патулина в пробе пищевого продукта.

Результаты занести в табл. 7.

Т а б л и ц а 7

№ п/п	Наименование идентифицированного микотоксина	Время удерживания, (t), с или удерживаемый объем (V), мкл	Высота пика, е.о.п.	Концентрация (C) в экстракте пробы, мг/л
1.				

Массовую концентрацию патулина в пробе пищевого продукта вычисляют по формуле

$$X = \frac{C \cdot V_p \cdot R}{100 \cdot M_{\text{пр}}}, \quad (10)$$

где C – массовая концентрация патулина в пробе, мг/л (вычисляется по градуировочной зависимости, исходя из значения высоты аналитического

пика); V_p – объем пробы, мл; R – степень извлечения микотоксина на стадии пробоподготовки (равна 60%); $M_{пр}$ – масса пробы пищевого продукта, использованной для очистки и последующего хроматографического определения, г.

Результат измерения массовой доли микотоксина в определяемом объекте представляют в следующем виде: $X \pm \Delta$ мг/кг; при $P=0,95$ и заносят в протокол (прил. 1), где X_i – массовая концентрация патулина в пробе, мг/кг; P – вероятность; Δ – граница абсолютной погрешности, вычисляемая по формуле

$$\Delta = \frac{15X_i}{100}. \quad (11)$$

После получения результата необходимо оценить значения нормативов оперативного контроля сходимости, которые приведены в соответствующих ГОСТах на методы контроля (анализа).

Сделать заключение о соответствии (или несоответствии) содержания патулина в исследованном пищевом продукте допустимым уровням, установленным СанПиН 2.3.2.1078–01.

Вопросы для самоконтроля

1. Какие принципы лежат в основе классификации хроматографических методов анализа?
2. В чем сущность хроматографического разделения? Как проводят качественную идентификацию и количественный анализ?
3. В каких пищевых продуктах нормируется содержание микотоксинов? Какие микотоксины определяют в составе пищевых продуктов в соответствии с требованиями СанПиН?
4. Какой хроматографический метод используют для определения содержания микотоксинов в составе пищевых продуктов?
5. На чем основано спектрофотометрическое детектирование? Что такое спектральные отношения и для чего их используют?
6. Как проводят пробоподготовку пищевых продуктов для определения содержания патулина методом ВЭЖХ?
7. Проведение каких операций включает методика определения патулина методом ВЭЖХ?
8. Что такое элюент и градиентное элюирование? Какие элюенты используют при определении патулина методом ВЭЖХ?
9. Как проводят идентификацию патулина и его количественное определение?
10. Как обеспечивается точность определения патулина методом ВЭЖХ?

3.3. Определение пестицидов методом газовой хроматографии (на примере хлорорганических пестицидов)

3.3.1. Описание метода

Газовой хроматографией называется хроматографический метод, в котором в качестве подвижной фазы применяется газ или пар. В свою очередь газовая хроматография может быть разделена на *газо-твердофазную* и *газожидкостную*. В первом случае неподвижной фазой служит твердое вещество – адсорбент, во втором – жидкость, распределенная тонким слоем по поверхности какого-либо твердого носителя (зерненного материала, стенок колонки).

В работе используется метод газо-твердофазной хроматографии. Неподвижная фаза представляет собой твердый гранулированный материал (например, силикагель, оксид алюминия или уголь). В основе процесса разделения лежит адсорбция на твердой поверхности.

3.3.2. Методика определения хлорорганических пестицидов методом газовой хроматографии

Методика основана на экстракции пестицидов из анализируемой пробы этилацетатом, очистке экстракта концентрированной серной кислотой или силикагелем с последующим анализом хлорорганических пестицидов на газовом хроматографе с детектором электронного захвата.

Анализ пробы с помощью газового хроматографа (рис. 15) осуществляется следующим образом. Дозированная часть экстракта анализируемой пробы с помощью микрошприца вводится в испаритель газового хроматографа, где она испаряется и потоком газа-носителя (азота, гелия, водорода) переносится в колонку. Колонка находится в термостате. Для более эффективного разделения компонентов смеси применяют программируемое повышение температуры. На колонке происходит динамическое разделение многокомпонентной пробы на индивидуальные

вещества. Выходящие из колонки разделенные фракции смеси компонентов, анализируются детектором электронного захвата, показания которого фиксируются регистратором (чаще персональным компьютером – ПК).



Рис. 15. Газовый хроматограф

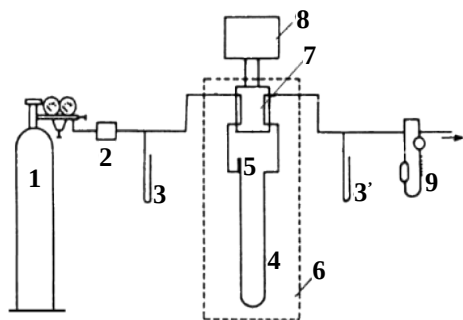


Рис. 16. Газовый хроматограф:
1 – баллон высокого давления с газом-носителем;
2 – стабилизатор потока; 3 и 3' – манометры;
4 – хроматографическая колонка; 5 – устройство для ввода пробы; 6 – термостат; 7 – детектор;
8 – регистратор (ПК); 9 – расходомер

Детектор электронного захвата представляет собой ячейку с двумя электродами (ионизационная камера), в которую поступает газ-носитель, прошедший через хроматографическую колонку и содержащий смесь разделенных компонентов (рис. 17). В камере он облучается постоянным потоком

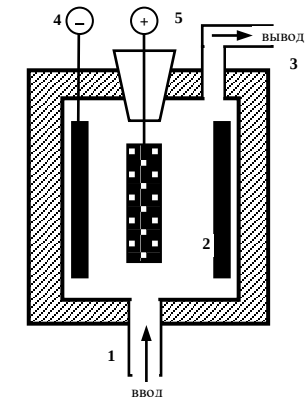


Рис. 17. Электронно-захватный детектор:
1 – ввод газа; 2 – источник излучения;
3 – вывод в атмосферу; 4, 5 – электроды

β -электронов, поскольку один из электродов изготовлен из материала, являющегося источником излучения (^{63}Ni , ^3H , ^{226}Ra). В детекторе происходит взаимодействие свободных электронов с молекулами определенных типов с образованием стабильных анионов: $AB + e = AB^- \pm \text{энергия}$, $AB + e = A + B^- \pm \text{энергия}$. В ионизованном газе-носителе в качестве отрицательно заряженных частиц присутствуют только электроны. В присутствии соединения, которое может захватывать электроны, ионизационный ток детектора уменьшается. В значительной степени благодаря использованию детектора электронного захвата удалось обнаружить повсеместное распространение пестицидов в окружающей среде.

3.3.3. Пробоподготовка образцов

Из объединенной пробы продукта отбирают навеску массой 50 г помещают в коническую колбу с притертой пробкой вместимостью 250 мл и приливают 100 мл этилацетата. Содержимое колбы перемешивают в течение 20 мин на аппарате для встряхивания.

Экстракт декантируют в круглодонную колбу, пропуская через слой безводного сернокислого натрия. Эту операцию повторяют еще 2 раза. Экстракт объединяют и концентрируют путем выпаривания досуха с помощью ротационного испарителя при температуре водяной бани 40–45°C.

Очистка экстракта

Сухой остаток количественно переносят с помощью 5 мл гексана в делительную воронку вместимостью 100 мл, добавляют 5 мл концентрированной серной кислоты и содержимое воронки аккуратно встряхивают 5–10 раз. После разделения слоев, нижний слой отбрасывают. Очистку экстракта повторяют 2 раза. Очищенный экстракт дважды промывают сначала 1%-ным раствором бикарбоната натрия порциями по 5 мл, затем водой до нейтральной реакции смывных вод. Гексановый экстракт количественно переносят в колбу грушевидной формы вместимостью 25 мл и отгоняют на ротационном испарителе при температуре водяной бани 40–45°C.

Сухой остаток растворяют в 10 мл гексана.

3.3.4. Методика проведения измерений

Методика проведения измерений включает следующие основные этапы:

- градуировку хроматографа по стандартным растворам с известной массовой концентрацией исследуемых пестицидов;
- подготовку пробы пищевого продукта методом жидкость/жидкостной экстракции по п. 3.3.3;

- анализ экстракта методом газовой хроматографии с регистрацией сигнала детектором электронного захвата;
- идентификацию определяемых пестицидов по параметрам удерживания;
- вычисление массовой концентрации пестицидов в пробе на основе зарегистрированных аналитических сигналов (площади пиков) и градуировочных характеристик;
- вычисление массовой доли пестицидов в составе пищевого продукта.

На рис. 18 представлен хроматографический профиль наиболее распространенных хлорорганических пестицидов, полученный методом газовой хроматографии. Номера пиков, обозначенные на хроматограмме, соответствуют номерам, указанным в табл. 8.

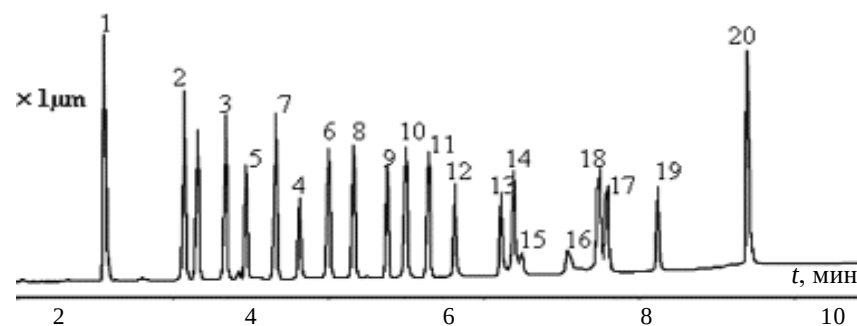


Рис. 18. Хроматографический профиль стандартной смеси пестицидов, полученный методом газовой хроматографии

Т а б л и ц а 8

Некоторые хлорсодержащие пестициды

№ пика	Пестициды	№ пика	Пестициды
1	Тетрахлор-м-ксилол (SS1)	11	Диэльдрин
2	α -ГХЦГ	12	Эндрин
3	Линдан	13	4,4'-ДДД
4	β -ГХЦГ	14	Эндосульфат II (β -эндосульфат)
5	Гептахлор	15	4,4'-ДДТ
6	δ -ГХЦГ	16	Эндрин альдегид
7	Альдрин	17	Эндосульфана сульфат
8	Гептахлорэпоксид	18	Метоксихлор
9	Эдосульфат I (α -эндосульфат)	19	Эндрин кетон
10	4,4'-ДДЕ	20	Декахлорбифенил (SS2)

3.3.5. Порядок выполнения работы

Цель работы: освоение методических основ и приобретение практических навыков определения хлорорганических пестицидов в составе пищевых продуктов методом газовой хроматографии.

Приборы, реактивы и материалы, необходимые для выполнения работы:

- хроматограф газовый с детектором электронного захвата (например, серии-3700 с программным обеспечением Мультихром);
- колонка стеклянная для газовой хроматографии длиной 1,5 м диаметром 3 мм, заполненная сорбентом (например, хромосорб WAV DmCs);
- ротационный испаритель с водяной баней;
- аппарат для встряхивания;
- коническая колба с плотно притертым шлифом емкостью 250 мл;
- делительная воронка вместимостью 100 мл;
- колба грушевидная 25 мл;
- набор стандартных растворов хлорорганических пестицидов с различной концентрацией – от 0,02 до 0,4 нг/5мкл;
- гексан, химически чистый (ректифицированный);
- этилацетат;
- концентрированная серная кислота по ГОСТу 14262–78;
- безводный сульфат натрия;
- бикарбонат натрия.

3.3.5.1. Режимы хроматографического анализа хлорорганических пестицидов

Режимы детектирования:

- температура колонки – 170⁰С;
- температура испарителя – 220⁰С;
- температура детектора – 230⁰С;
- скорость потока газа носителя – 40 мл/мин;
- рабочая шкала электрометра – $6,4 \cdot 10^{-11}$ А;
- объем пробы – до 5 мкл.

Кондиционирование хроматографической системы осуществляют за 12 часов до начала занятия в следующих режимах: 2 ч при $t = 100^0\text{C}$; 2 ч при $t = 150^0\text{C}$; 4 ч при $t = 200^0\text{C}$; 4 ч при $t = 220^0\text{C}$. Затем проводится разделение стандартной смеси хлорорганических пестицидов.

Задание 1. Изучить особенности подготовки проб пищевых продуктов для определения содержания пестицидов. Приготовить пробы пищевых продуктов, предложенные преподавателем, в соответствии с п. 3.3.3.

Задание 2. Провести градуировку хроматографической системы. Градуировку хроматографа осуществляют последовательным вводом

ряда смесей рабочих растворов, приготовленных из стандартных образцов хлорорганических пестицидов. Концентрация каждого пестицида в в первой смеси должна быть – 1 мг/л; во второй – 5 мг/л; в третьей – 10 мг/л.

Под руководством преподавателя с клавиатуры ПК в программу WinXrom ввести параметры проведения хроматографического разделения (пп. 3.3.5.2) и запустить в автоматическом режиме 2–3 хроматографических анализа. Результаты оформить в виде табл. 9.

Т а б л и ц а 9

№ п/п	Время удерживания (t), мин	Площадь пика, мкА·сек	Концентрация пестицида в пробе, мг/л
1.			

Хроматограмму стандарта необходимо сохранить в следующем формате: «Стандарт ДД–ММ–ГГ.001» (например, «Стандарт 01–08–03.001»).

На основе полученных хроматографических профилей, построить калибровочный график (по оси ординат откладывается концентрация пестицида – мг/л, по оси абсцисс – площадь пика, мкА·с).

Задание 3. Определение качественного и количественного состава хлорорганических пестицидов в исследуемом образце.

Под руководством преподавателя запустить измерение пробы пищевого продукта, приготовленной в соответствии с п. 3.3.3, в автоматическом режиме (с параметрами хроматографирования, выбранными в задании 2). По окончании измерения провести идентификацию пестицидов по файлам стандартов («Стандарт ДД–ММ–ГГ.001»), полученным в задании 2.

На основе полученного хроматографического профиля рассчитать значения площади пиков и времени удержания для каждого пестицида. По градуировочному графику определить массу пестицидов (мг) в аликвотной части экстракта, введенной в хроматограф. По окончании работы заполнить табл. 10.

Т а б л и ц а 10

№ п/п	Наименование идентифицированного пестицида	Время удерживания (t), мин	Площадь пика мкА·сек	Массовая концентрация пестицида (m_1) в экстракте, мкг/л
1.				

Массовую концентрацию X_i каждого из пестицидов в пробе исследуемого пищевого продукта (мг/кг) определяют по формуле

$$X_i = \frac{m_1 \cdot V_1}{m_2 \cdot V_2 R}, \quad (12)$$

где m_i – массовая концентрация пестицида, найденная по градуировочному графику в аликвотной части экстракта, мкг/л; m_2 – масса анализируемой пробы, г; V_1 – объем аликвоты, вводимой в хроматограф, мкл; V_2 – общий объем экстракта пробы, из которого взята аликвота для хроматографирования, мл; R – коэффициент извлечения (примерно 0,95).

Вычисления проводят до третьего десятичного знака. Результат измерения массовой доли пестицидов округляют до второго десятичного знака и заносят в протокол (прил. 1) в следующем виде: $X_i \pm \Delta$ (мг/кг(л)), при $P=0,95$, где X_i – массовая концентрация каждого из пестицидов в пробе, мг/кг(л); P – вероятность; Δ – граница абсолютной погрешности, вычисляемая по формуле

$$\Delta = \frac{15X_i}{100}. \quad (13)$$

После получения результатов необходимо оценить значения нормативов оперативного контроля сходимости, которые приведены в ГОСТе 30349–96 «Плоды, овощи и продукты их переработки. Методы определения остаточных количеств хлорорганических пестицидов».

Сделать заключение о соответствии (или несоответствии) содержания хлорорганических пестицидов в исследованном пищевом продукте допустимым уровням, установленным СанПиНом 2.3.2.1078–01.

Вопросы для самоконтроля

1. В каких пищевых продуктах нормируется содержание пестицидов? Какие пестициды определяют в составе пищевых продуктов в соответствии с требованиями СанПиН?
2. Какой хроматографический метод используют для определения содержания пестицидов в составе пищевых продуктов?
3. Какой детектор используется для определения хлорорганических пестицидов методом ГХ и на чем основан его принцип действия?
4. Как проводят пробоподготовку пищевых продуктов для определения содержания хлорорганических пестицидов методом ГХ?
5. Проведение каких операций включает методика определения хлорорганических пестицидов методом ГХ?
6. Как проводят идентификацию хлорорганических пестицидов и их количественное определение?
7. Как обеспечивается точность определения хлорорганических пестицидов методом ГХ?

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. СанПиН 2.3.2.1078–01. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы / Минздрав России. М., 2002.
2. ГОСТ 26929–94. Сырье и продукты пищевые. Подготовка проб. Минерализация для определения содержания токсичных элементов. М.: Изд-во стандартов, 1995.
3. ГОСТ 30349–96. Плоды, овощи и продукты их переработки. Методы определения остаточных количеств хлорорганических пестицидов. М.: Изд-во стандартов, 1997.
4. Современные методы анализа и оборудование в санитарно-гигиенических исследованиях. М.: ФГУП «Интерсэн», 1999.
5. Юинг Г. Инструментальные методы химического анализа: Пер. с англ. М.: Мир, 1989.
6. Нечаев А. П., Траубенберг С. Е., Кочеткова А. А. и др. Пищевая химия. СПб.: ГИОРД, 2003.
7. Перри С., Амос Р., Брюер П., Практическое руководство по жидкостной хроматографии / Пер. с англ. О. Г. Ларионова. М.: Мир, 1974.
8. Сакодынский К. И., Бражников В. С. и др. Аналитическая хроматография. М.: Химия, 1993.
9. Силаева Т. Д., Крисюк Б. Э. Практические работы по дисциплине «Физико-химические методы исследования». Тема «Хроматография». М.: Изд-во Рос. экон. акад., 2002.
10. Стыскин Е. Л., Ициксон Л. Б., Брауде Е. В. Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография. М.: Химия, 1986.
11. Методические указания по применению аналитического комплекта «патулин». М.: Био-Хим-Мак, 2000.

Испытательная лаборатория РЭА-ТЕСТ
Адрес: 115998, Москва, Стремянный пер., 28

ПРОТОКОЛ ИСПЫТАНИЙ

№ _____ от «___» _____ 200__ г.

1. Объект испытаний _____
2. Документация, по которой изготавливается продукция _____
3. Основание для проведения испытаний _____
4. Наименование и реквизиты заказчика _____
5. Дата(ы) проведения испытаний «___» _____ 200__ г.
6. Образцы для испытаний _____
- 6.1. Образец получен в _____
7. Методы испытаний _____
8. Результаты испытаний _____

Наименование показателя	Наименование НД на метод испытаний	Обозначение НД на продукцию	Значение характеристики, ед. физ. величин	Погрешность измерения

Примечание: данный протокол испытаний касается только образцов, подвергнутых этим испытаниям. Запрещается частичное или полное копирование, перепечатка протокола без разрешения испытательной лаборатории.

Руководитель аккредитованной _____ Елисеева Л. Г.
 испытательной лаборатории

Сотрудники _____

**ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ
ПО ДИСЦИПЛИНЕ «БЕЗОПАСНОСТЬ ТОВАРОВ»**

Составители: ПЕРЕЛЫГИН Олег Николаевич
ЕЛИСЕЕВА Людмила Геннадьевна
ПОЛОЖИШНИКОВА Марина Александровна

Редактор *Н. Н. Рыбкина*
Корректор
Оформление обложки *О. В. Василевская*

Подписано в печать . Формат 60х84 1/16.
Бумага офсетная. Печать офсетная. Усл. печ. л. 3,25. Уч.-изд. л. 3,19.
Тираж 100 экз. Заказ

Издательство Российской экономической академии
имени Г. В. Плеханова.
115998, Москва, Стремянный пер., 36.

Отпечатано в типографии РЭА имени Г. В. Плеханова.
115998, Москва, ул. Зацепа, 41/4.