

119992, Россия, Москва, Ленинские горы, МГУ, д.1, стр.11

Тел./Факс (495) 939-59-67, тел. 939-58-06; www.bcmst.ru, E-mail: info@bcmst.ru

ИНСТРУКЦИЯ

по применению Аналитического комплекта

Бенз(а)пирен

МОСКВА

2008

Настоящая Инструкция предназначена для описания условий и способов применения Аналитического комплекта в подготовке проб и хроматографическом определении бенз(а)пирена в продовольственном сырье, пищевых продуктах и почве. В Инструкции также изложены рекомендации по работе с анализируемыми пробами, соблюдение которых повышает степень извлечения определяемых микотоксинов.

Авторы предлагаемых в настоящей Инструкции методических подходов к определению бенз(а)пирена методом твердофазной экстракции с радостью и огромным вниманием отнесутся к любым замечаниям и предложениям, относящимся к работе с Аналитическими комплектами.

I. Цель и назначение Аналитического комплекта *Бенз(а)пирен*

I.1. Цель выпуска Аналитического комплекта

Целью выпуска Аналитического комплекта *Бенз(а)пирен* является обеспечение воспроизводимой количественной подготовки и хроматографического анализа проб продовольственного зерна, а также копченых мясных, рыбных, жировых продуктов и почв, испытание которых на возможное содержание химического канцерогена бенз(а)пирена предусмотрено основным документом “Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов”, СанПиН 2.3.2.1078-01, М., Изд. Минздрав России, 2002.

Номинальный диапазон определяемого содержания бенз(а)пирена в зерне (индекс группы продуктов 6.4.1.) и в копченостях (индексы групп продуктов 6.1.4., 6.1.5., 6.1.11. и 6.1.12., 6.3.3. и 6.7.4.) составляет $0,0001 \pm 0,01$ мг/кг.

Норматив на предельно допустимое содержание бенз(а)пирена в почве составляет $0,02$ мг/кг.

I.2. Назначение Аналитического комплекта

Аналитический комплект *Бенз(а)пирен* предназначен для тонкой очистки водно-ацетонитрильных экстрактов проб зерна и почв, а также гексановых экстрактов суммарного жира проб копченых продуктов от компонентов, мешающих определению бенз(а)пирена методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), описанном в «Методике выполнения измерений содержания бенз(а)пирена в продовольственном зерне, копченых мясных, рыбных, жировых продуктах и почве», БСТ-МВИ-03-03.

1.3. Особенности Аналитического комплекта

Характерные особенности Аналитического комплекта:

- Полная (зерно и почва) или предпочтительная (копченые продукты) замена при подготовке проб традиционной жидкостной экстракции, требующей больших объемов токсичных и дорогостоящих органических растворителей, на твердофазную экстракцию (ТФЭ) с применением концентрирующих патронов “ДИАПАК” (ЗАО “БиоХимМак СТ”);
- Близкий к количественному выход бенз(а)пирена (80-85%);
- Высокая степень очистки проб от примесей;
- Широкое использование техники вакуумирования при твердофазной экстракции, включая применение т.н. вакуумного манифолда для одновременной подготовки нескольких проб;
- Различные режимы ВЭЖХ-разделения и детектирования бенз(а)пирена, позволяющие использовать, в том числе, доступные и дешевые комбинации оборудования.

Уникальной особенностью Комплекта *Бенз(а)пирен* является возможность определения бенз(а)пирена в экстрактах без проведения длительного систематического многоступенчатого фракционирования классов углеводов, как это предусмотрено в МУ № 4721-88, что обеспечивает исключительные преимущества для *сертификационных работ* центров ГСЭН России, станций защиты растений, экологических и агрохимических служб.

Наличие *экспресс-варианта* позволяет в несколько раз сократить время пробоподготовки и повысить производительность методики в условиях массового анализа. Вместе с тем, сохранение основного принципа экстракции бенз(а)пирена в водном ацетонитриле дало возможность использовать те же патроны в

нормативных режимах применения, что обеспечило преемственность метрологических характеристик измерения массовой доли по БСТ-МВИ-03-03 по отношению к типовой схеме.

II. Состав комплекта¹ Бенз(а)пирен

1. Комплект, обеспечивающий подготовку 100 единичных проб методом твердофазной экстракции для определения бенз(а)пирена, включает сорбент ДИАСОРБ А и концентрирующие патроны ДИАПАК трех разновидностей, выпускаемые по ТУ 4215-002-05451931-94:

- ДИАСОРБ А (3x100 мл) – специальный сорбент для приготовления 100 шт. концентрирующих патронов ДИАПАК А-3 для предварительной очистки водно-ацетонитрильного или ацетонитрильного экстракта, одноразового применения;
- ДИАПАК П-3 (2 шт.) - универсальный концентрирующий патрон многоразового применения (до 50 проб) с набором верхних и нижних фильтров;
- ДИАПАК С8 (10 шт.) - универсальный патрон для обезжиривания ацетонитрильного экстракта многоразового применения (до 10 проб);
- ДИАПАК С (100 шт.) - универсальный патрон для тонкой очистки одноразового применения.

2. Стандартный раствор бенз(а)пирена объемом 1 мл в ампуле (1 шт.) с аттестованной концентрацией (точное значение концентрации указывается в прилагаемом паспорте), свидетельство о метрологической аттестации и общая инструкция по применению стандартного образца прилагаются:

¹Примечание.

1. Общелабораторное оборудование и растворители в состав набора не входят, их варианты приведены в БСТ-МВИ-03-03.

- 100 мкг/мл в ацетонитриле (ВЭЖХ).
- 3. Средство разделения (по ТУ 4215-001-05451931-94):
 - колонка Eurospher-100-C18 или ДИАСФЕР-110-C16, 4×150 мм, для любого импортного хроматографа, 1 шт. (колонка **ТИП 1**);
 - колонка Eurospher-100-C18 или ДИАСФЕР-110-C16, 2×150 мм, для любого импортного хроматографа с детектором, снабженным специальной микрокюветой, 1 шт. (колонка **ТИП 2**);
 - колонка ДИАСФЕР-110-C16, 2×80 мм, для хроматографов “Миличром-5-3 (-5-7)”, 1 шт. (колонка **ТИП 3**);
- 4. Корпус пластиковый колонки с фильтром (воронка) –5 шт;
- 5. Инструкция по применению Аналитического комплекта *Бенз(а)пирен*.

III. Порядок проведения пробоподготовки

III.1. Отбор пробы и экстракция бенз(а)пирена

Общие вопросы отбора и дезинтеграции проб при анализе на содержание бенз(а)пирена приведены в стандартах на конкретную пищевую продукцию или почвы. Важно подчеркнуть значимость более тонкого размола образцов зерна и почв для воспроизводимой подготовки проб в экспресс-варианте метода.

1. Зерно и почва

Традиционная экстракция. Для получения экстракта навеску ($M_{\text{ГР}}$) 10÷25 г размолотой пробы перенести в плоскодонную колбу, добавить 50÷125 мл *экстрагента* (смеси вода-ацетонитрил (16:84) (V_3)), строго соблюдая соотношение 1:5 навески продукта к объему *экстрагента*, и интенсивно перемешивать на магнитной или механической мешалке в течение 60÷90 мин. Отфильтровать

экстракт через плотный бумажный фильтр (синяя лента) на воронке Бюхнера под вакуумом и отжать осадок на фильтре. Затем перенести фильтрат в мерный цилиндр и зафиксировать объем *водно-ацетонитрильного экстракта БП* ($V_{\text{ПР}}$), который должен составлять не менее $40 \div 100$ мл, соответственно исходному объему *экстрагента*.

Экспресс-вариант. В центрифужной пробирке на 25 мл суспендировать 5 г пробы зерна (1 г почвы) в 12 мл *экстрагента*, затем добавить дополнительную воду, объем которой рассчитать по формуле: $V = 6 - X$, где X – масса воды в навеске образца, например, 1 г при 20% влажности. Закрыть пробирку пробкой и встряхивать смесь вручную в течение 1 мин. Внести 6 г безводного Na_2SO_4 и повторить встряхивание. Центрифугировать 5 мин при 3000 мин^{-1} , перенести верхний слой (*ацетонитрильный экстракт*) в небольшую колбу, отфильтровав через маленькую воронку с плотным ватным тампоном.

2. Копченые продукты

Навеску 10 г достоверно отобранной и усредненной пробы копченого мясного, рыбного или жирового продукта растереть в ступке с 30 г безводного сульфата натрия, количественно перенести в плоскодонную колбу вместимостью не менее 100 мл и экстрагировать гексаном в объеме 40 мл в течение 30 мин при перемешивании на магнитной или механической мешалке. Дважды повторить процедуру экстракции гексаном объемами по 20 мл, каждый раз декантируя гексановый экстракт суммарного жира через 10 г безводного сульфата натрия (2-3 см на ватном тампоне в конической воронке) в отгонную колбу, упарить гексан из экстракта *суммарного жира* на ротационном испарителе при температуре не выше 45°C .

Приготовить взаимно насыщенные гексан и ацетонитрил, интенсивно взбалтывая в делительной воронке на 500 мл около 100 мл сухого гексана с 300 мл ацетонитрила, собрать отдельно гексановый (ГК) и ацетонитрильный (АН) слои, причем интерфазу отбросить. Растворить *суммарный жир* в 40 мл ГК (*раствор ГК*).

20 мл *раствора ГК* перенести в делительную воронку на 100 мл и провести реэкстракцию БП тремя объемами по 20 мл ацетонитрила, каждый раз добиваясь, по возможности, полного разделения слоев. Собрать экстракты в отгонную колбу и упарить на ротационном испарителе при температуре не выше 45°C до объема 8 -10 мл (*ацетонитрильный экстракт БП*), при помощи ацетонитрила количественно перенести в мерный цилиндр на 25 мл, довести его объем ацетонитрилом до 21 мл, а затем добавить 4 мл воды и тщательно перемешать *водно-ацетонитрильный экстракт БП*.

III.2. Очистка и концентрирование экстрактов

Основной схемой очистки *водно-ацетонитрильного экстракта БП* является комплексная схема твердофазной экстракции (ТФЭ) с последовательным использованием трех патронов ДИАПАК: {А-3, П-3, С}.

При экспресс-варианте *ацетонитрильный экстракт БП* очищают по схеме с последовательным использованием трех патронов ДИАПАК: {С8, А-3, С}.

III.2.1. Подготовка концентрирующих патронов

1. Концентрирующие патроны ДИАПАК С8

Кондиционирование патрона достигается прокачиванием 2 мл ацетонитрила. Для регенерации прокачивают 2 мл ацетона, а затем кондиционируют 2 мл ацетонитрила.

2. Концентрирующие патроны ДИАПАК А-3

Приготовление и подготовка к работе патронов выполняется в соответствии с Инструкцией по применению специальных патронов ДИАПАК.

3. *Концентрирующий патрон ДИАПАК П-3*

- Подготовка к работе и регенерация патронов выполняется в соответствии с Инструкцией по применению специальных патронов ДИАПАК;
- Прокачать через патрон 10 мл смеси вода-ацетонитрил (16:84).

4. *Концентрирующие патроны ДИАПАК С*

- Подготовка к работе патрона ДИАПАК С выполняется в соответствии с Инструкцией по применению специальных патронов ДИАПАК;
- Прокачать через патрон 5 мл гексана и заглушить с концов.

III.2.2. Предварительная очистка водно-ацетонитрильного или ацетонитрильного экстрактов БП на патроне Диапак А-3

Традиционный вариант. Прокачать через патрон сначала 25 мл (5 мл в случае почвы) *водно-ацетонитрильного экстракта БП*, приготовленного по п. III.1., а затем 3 мл смеси вода-ацетонитрил (16:84) в условиях вакуумирования, собирая объединенный целевой **элюат А** при скорости скапывания 2-3 капли в секунду.

В случае почвы перенести **элюат А** в мерный цилиндр на 25 мл, ополоснуть колбу двумя объемами по 5 мл *экстрагента* и довести объем раствора в цилиндре до 20 мл.

Экспресс-вариант. 8.0 (2.5 в случае почвы) мл *ацетонитрильного экстракта* по III.1.1. или III.1.2. прокачать через патрон ДИАПАК А-3 со скоростью скапывания 2-3 капли в секунду в отгонную колбу на 25 мл. Набрать в шприц еще 3 мл ацетонитрила и нанести на патрон, элюируя целевую фракцию *А3* в ту же колбу. В случае жировых образцов нанесение *ацетонитрильного экстракта* на патрон ДИАПАК А-3 проводить через патрон ДИАПАК С8. Упарить *целевую фракцию* досуха на ротационном испарителе при температуре не выше 45°C и перерастворить в 0.5 мл гексана (**экстракт БП**).

III.2.3. Концентрирование экстракта бенз(а)пирена на патроне Диапак П-3

Прокачать через подготовленный патрон **элюат А** (5 мл в случае почвы), а затем 5 мл ацетонитрила при скорости скапывания 1÷2 капли в секунду, собирая все смывы в приемник для регенерации ацетонитрила.

Элюировать с патрона целевую фракцию 7 мл смеси бензол-ацетонитрил (1:1) при скорости скапывания 1÷2 капли в секунду в отгонную колбу (**экстракт БП**).

Упарить **экстракт БП** на ротационном испарителе досуха при температуре не выше 45°C и растворить остаток в 0,5 мл гексана.

III. 2. 4. Тонкая очистка экстракта бенз(а)пирена на патроне Диапак С

Нанести 0.5 мл **экстракта БП** в гексане на подготовленный патрон **ДИАПАК С**, применяя в качестве воронки корпус без фильтра (имеется в комплекте), обмыть отгонную колбу и нанести на патрон два раза по 0,5 мл гексана, отбрасывая все смывы.

Элюировать бенз(а)пирен 6 мл бензола при скорости скапывания 1÷2 капли в секунду в сердцевидную отгонную колбу, упарить бензол досуха при температуре не выше 45°C и перерастворить сухой остаток **пробы БП** в **элюенте А** (V_p). Величина V_p зависит от примененной хроматографической системы (0.1-0.5 мл), причем ее точное значение приведено в БСТ-МВИ-03-03 (п.10.2.).

IV. Проведение ВЭЖХ-анализа

V.1. Особенности проведения ВЭЖХ-анализа

Порядок проведения ВЭЖХ-анализа бенз(а)пирена в изократическом обращено-фазовом (ОФ) режиме разделения на колонке с С18-привитым силикагелем в элюенте ацетонитрил-вода (8:2) приведен в МУ 4721-88. В качестве детектора использовался

флуориметр с длинами волн возбуждения и эмиссии 300 и 420 нм, соответственно.

За счет применения градиентного ОФ режима разделения по БСТ-МВИ-03-03 в Аналитическом комплекте *Бенз(а)пирен* на колонках Eurospher-100-C18 или Диасфер-110-C16 (**тип 1**) удастся повысить селективность определения бенз(а)пирена и обеспечить номинальный диапазон определяемых содержаний с длинами волн возбуждения и эмиссии 375 и 405 нм, соответственно.

В этом же режиме разделения и детектирования реализован ВЭЖХ-анализ бенз(а)пирена на отечественном хроматографе «Милихром-5-7», снабженном колонкой Диасфер-110-C16 (**тип 2**). Отличие состоит лишь в использовании длины волны возбуждения 296 нм и эмиссионного фильтра с полосой пропускания выше 380 нм. В БСТ-МВИ-03-03 нашла отражение как возможность применения для ВЭЖХ-анализа бенз(а)пирена изократического режима элюирования, так и флуориметрических детекторов с другими спектральными характеристиками

Важным преимуществом Аналитического комплекта *Бенз(а)пирен* является применение для ВЭЖХ-анализа только бинарных смесей вода-ацетонитрил в диапазоне 60-95 об. % ацетонитрила, что обеспечивает возможность его регенерации в целях сокращения стоимости единичного анализа.

IV.2. Порядок проведения ВЭЖХ-анализа

IV.2.1. Приготовление элюентов

В четырех мерных цилиндрах приготовить смеси ацетонитрил-вода в объемных соотношениях (60:40) – элюент А, (85:15) – элюент Б, (90:10) – элюент В и (95:5) – элюент Г. Все элюенты профильтровать через мембранный фильтр с порами 0,45 мкм и провести их вакуумную или термическую дегазацию.

IV.2.2. Подготовка хроматографической системы

Кондиционировать хроматографическую колонку прокачиванием элюента Г при номинальной скорости потока до прекращения дрейфа базовой линии флуориметрического детектора, установленного на длины волн возбуждения и эмиссии по п. IV.1. Установить следующие режимы градиентного элюирования для колонок соответствующего типоразмера:

1. **тип 1** – скорость потока 0.8 мл/мин, линейный градиент от 10 до 90% элюентов В/А за 30 мин, объем вводимой пробы – не более 50 мкл.
2. **тип 2** – скорость потока 150 мкл/мин, объем вводимой пробы – не более 50 мкл, форма градиента для хроматографа «Миличром-5-7» - преформированный ступенчатый градиент в сосудах для элюентов №№ 4-1 УВПА (состав и объемы ступеней, мкл, соответственно): элюент А – 1000, элюент Б – 300, элюент В – 300, и элюент Г - 600; объем регенерации – 400 мкл.

Ориентировочные времена удерживания бенз(а)пирена в этих режимах элюирования составляют: для колонки **тип 1** – 10÷12 мин, для колонки **тип 2** – 13÷16 мин.

IV.2.3. Градуировка хроматографа

Градуировку хроматографа осуществляют последовательным вводом в условиях п. IV.2.2. номинального объема ряда рабочих растворов, приготовленных из стандартного образца бенз(а)пирена со следующими диапазонами концентраций (с произвольным шагом в зависимости от ожидаемой концентрации в пробе): 0.005-0.5 мкг/мл. Для этого стандартный раствор бенз(а)пирена для ВЭЖХ, имеющийся в комплекте (п. II), разводят элюентом А в нужное число раз, учитывая точную концентрацию, приведенную в паспорте стандарта.

После математической обработки полученных хроматограмм фиксируют времена удерживания и площади пиков бенз(а)пирена и, при необходимости, строят градуировочные графики.

IV.2.4. Проведение ВЭЖХ-анализа

Номинальный объем подготовленных по п. III.2 ввести не менее двух раз в хроматограф в режимах по п. IV.2.2. После математической обработки хроматограмм провести идентификацию пиков бенз(а)пирена по параметрам удерживания и рассчитать среднюю площадь пиков.

По соответствующим градуировочным графикам определить методом абсолютной градуировки концентрации идентифицированного бенз(а)пирена в подготовленных пробах ($C_{БП}$).

IV.3. Расчет содержания бенз(а)пирена

Количественный расчет содержания бенз(а)пирена в пробах зерна, почвы и копченых продуктов по п. I.1. проводится по методу абсолютной градуировки с учетом эквивалента массы взятой на анализ пробы по формуле:

$$C_{ПР} = \frac{C_{БП} \cdot V_P}{M_Э \cdot R} \cdot 100, \quad (IV.1.)$$

где: $C_{ПР}$ – определяемое содержание бенз(а)пирена в пробе, мг/кг;

$C_{БП}$ – концентрация бенз(а)пирена в *пробе БП*, определенная по градуировочной зависимости, мкг/мл;

V_P – объем раствора *пробы БП* по п. III.2.4., мл;

$M_Э$ – эквивалент массы пробы, взятой на анализ, г;

R – степень извлечения бенз(а)пирена, %, (75 - для проб копченых продуктов и 85 - для проб зерна и почвы).

В случае подготовки пробы из экстрактов зерна или почв по п.Ш.1. допустимо откорректировать величину M_3 с учетом разбавления экстрагента водой, содержащейся в образце, а также неполноты отжима *водно-ацетонитрильного экстракта БП* по формуле:

$$M_3 = \frac{V_{\text{ПР}} \cdot M_{\text{ПР}}}{V_3 + W}, \quad (\text{IV.2.})$$

где: M_3 – эквивалент массы пробы, г;
 $M_{\text{ПР}}$ – исходная навеска пробы, г;
 V_3 – объем экстрагента, мл;
 $V_{\text{ПР}}$ – объем *водно-ацетонитрильного экстракта* после фильтрации, мл;
 W – содержание влаги в исходной навеске пробы, мл (пересчитать в мл, исходя из % содержания влаги в пробе!).

В случае подготовки пробы из экстракта копченого продукта по п. Ш.1.2. эквивалент массы пробы, взятой на анализ, составляет 5 г, при использовании экспресс-варианта по п. Ш.1.1. – 4 г, а в случае почвы – 0.25 г.

Разработал: _____ /Васияров Г.Г./
 _____ /Алексеева Г.С./

“ ___ “ _____ 2008 г



Закрытое Акционерное Общество “**БиоХимМак СТ**”

Россия, 119992, Москва, Ленинские горы, МГУ, д.1 стр.11

тел./факс (495) 939-59-67, 939-58-06 /офис/,

(499) 135-88-14 /лаборатория/

www.bcmst.ru E-mail:info@bcmst.ru