



Республиканское унитарное предприятие

**«Научно-практический
центр гигиены»**

www.certificate.by

www.rspch.by

chromatographic@rspch.by

«Научная сессия БГМУ»

**Особенности хроматографического поведения
и пробоподготовки бенз(а)пирена,
выделяемого из резино-латексных композиций
в водную и воздушную среды, при проведении
обращенно-фазного ВЭЖХ анализа**

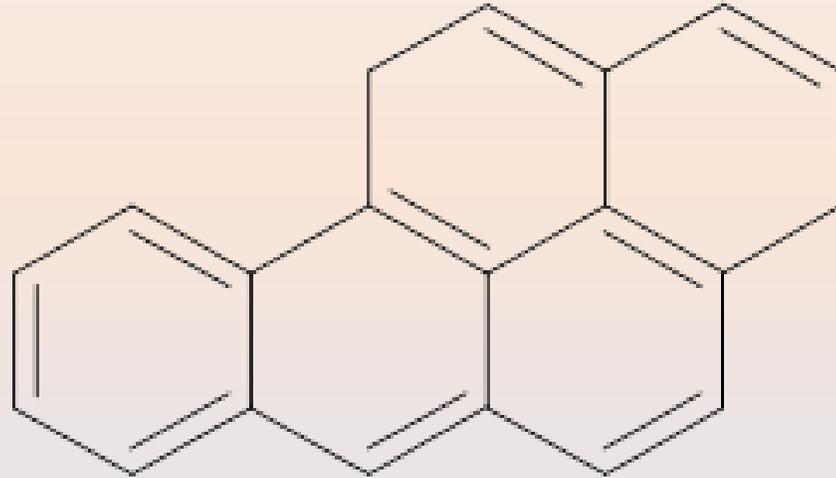
Турко Марина Святославовна,

Ковшова Татьяна Васильевна, Казакевич Екатерина Леонидовна,

Крымская Татьяна Петровна

Бенз(а)пирен

Бенз(а)пирен относится к классу полициклических ароматических углеводородов.



Образование и поступление:

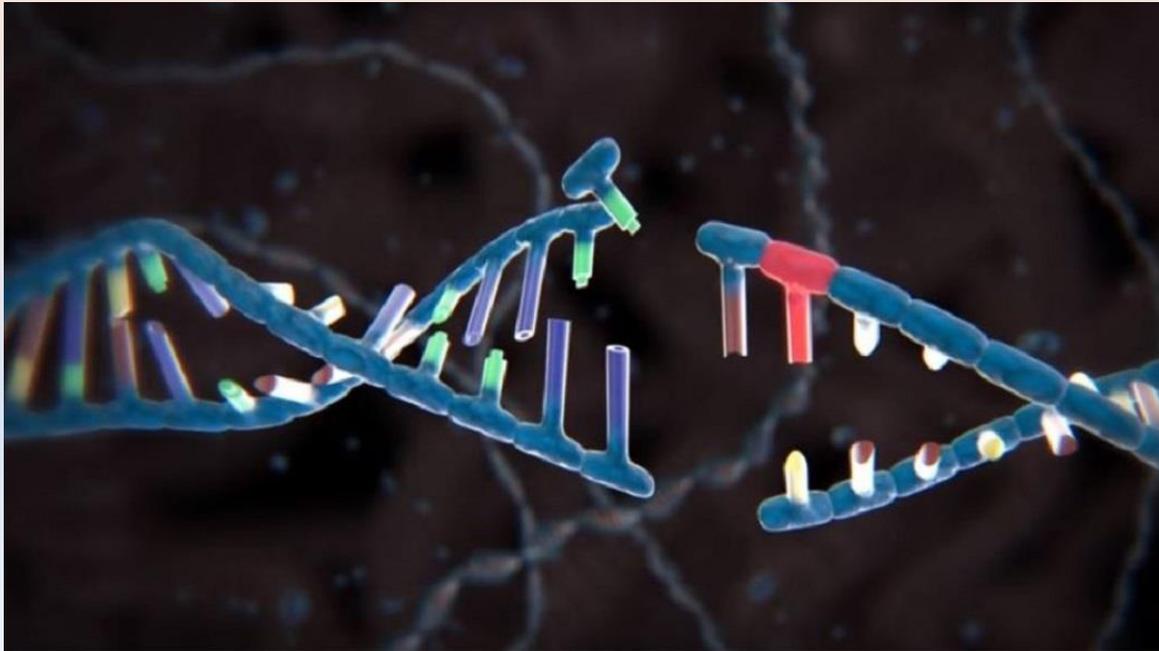
- микробиологические и высокотемпературные процессы, протекающие в природе (лесные пожары, вулканическая деятельность).
- техногенные источники (предприятия энергетического комплекса, автомобильный транспорт, химическая и нефтеперерабатывающая промышленность)

Бенз(а)пирен

Бенз(а)пирен отнесен к веществам **1 класса** опасности.

Помимо канцерогенного, бензапирен оказывает мутагенное, эмбриотоксическое, тератогенное, гематотоксическое действие.

По уровню биологического воздействия на человека бенз(а)пирен и другие ПАУ могут быть отнесены к разряду “суперэкоотоксикантов”.



Бенз(а)пирен

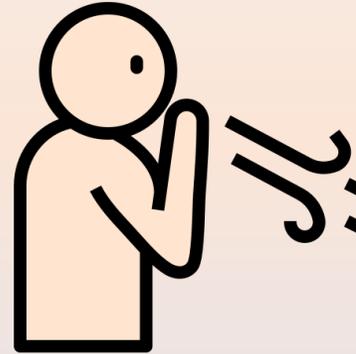
Бенз(а)пирен проникает в организм человека через:



воду



пищу



путем вдыхания



через кожу

Бенз(а)пирен опасен для человека в самых малых концентрациях, так как **способен к накоплению в организме.**

В настоящее время признано **недопустимым наличие бенз(а)пирена** в продуктах питания, воздухе и питьевой воде.

Однако полностью избежать наличия бенз(а)пирена практически невозможно. С этой целью были установлены гигиенические нормативы максимально допустимого содержания бенз(а)пирена в различных средах и объектах среды обитания.

Наименование объекта		Допустимые уровни, размерность	Нормативный документ
Почва		0,02 мг/кг	ГН 2.1.7.2041-06
Вода водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования		0,000005 мг/л	Постановление гл. гос. сан. врача РБ от 12.12.2003 № 163
		0,00001 мг/л	ТР ТС 021/2011
Расфасованная вода	Первая категория	0,005 мкг/л	ТР ТС 021/2011
	Высшая категория	0,001 мкг/л	
Воздух рабочей зоны		0,0001 мг/м ³	Постановление гл. гос. сан. врача РБ от 21.11.2003 № 140
Воздух населенных мест		0,000001 мг/м ³	
Миграция веществ, выделяющихся из материалов, изделий, контактирующих с пищевыми продуктами	Парафины и воски	Не допускается	ТР ТС 005/201
	Бумага парафинированная	Не допускается	
Количества миграции веществ, выделяющихся в модельную среду при исследовании школьно-письменных принадлежностей	Парафины и воски	Не допускается	ТР ТС 007/2011
	Резино-латексные композиции	Не допускается	
Количества миграции веществ, выделяющихся в модельную среду при исследовании игрушек	Парафины и воски	Не допускается	ТР ТС 008/2011
	Резино-латексные композиции	Не допускается	

Анализ по определению бенз(а)пирена

Определение бенз(а)пирена проводят на высокоэффективном жидкостном хроматографе с флуоресцентным детектированием.

Детектирование бенз(а)пирена и других ПАУ флуоресцентным детектором позволяет достичь высокой чувствительности метода, который селективен по отношению к бенз(а)пирену и обладает высокой чувствительностью. С его помощью можно определять содержания бенз(а)пирена на уровне нг (10^{-9}) и пг (10^{-12})



Анализ по определению бенз(а)пирена

Подбор параметров
хроматографического
определения

- Изучение спектральных характеристик бенз(а)пирена
- Подбор хроматографических колонок
- Подбор подвижной фазы
- Подбор температуры колонки
- Оптимальные параметры хроматографического определения бенз(а)пирена
- Построение градуировочного графика

Пробоподготовка
водных вытяжках

- Подготовка водной вытяжки
- Выбор оптимального растворителя
- Выбор оптимальных условий экстракции

Пробоподготовка
воздушных вытяжках

- Подготовка воздушной вытяжки
- Выбор фильтра и растворителя
- Выбор оптимальных условий экстракции

Процедуры и этапы
метрологической
аттестации

Подбор параметров хроматографического определения

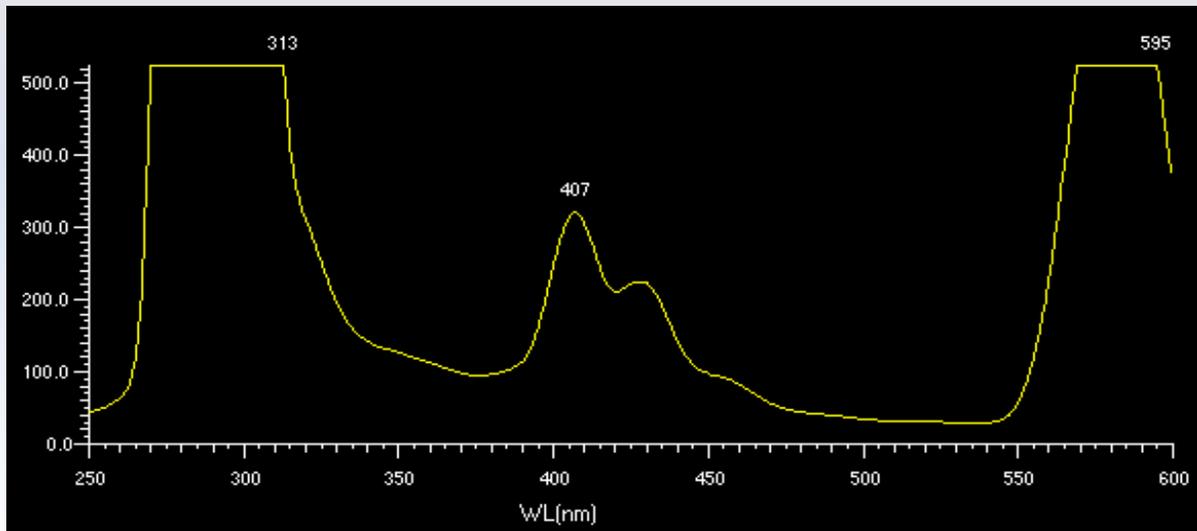
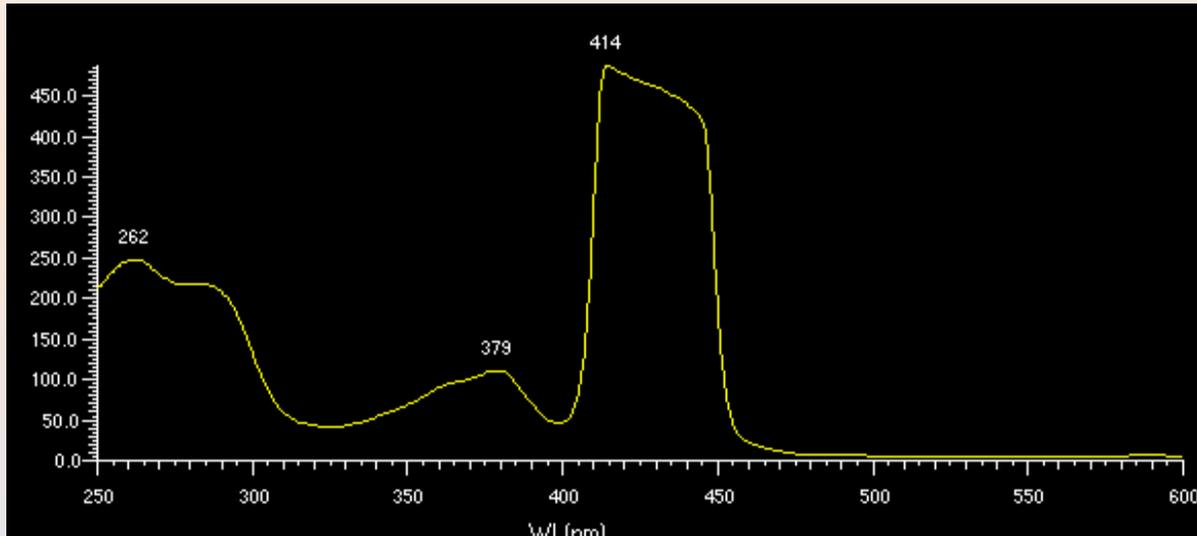
Изучение спектральных характеристик бенз(а)пирена

Оптимизации длины волны эмиссионного излучения

Максимумы поглощения:
при 262 нм, **290 нм**, 379 нм,
414 нм

Оптимизации длины волны возбуждающего излучения

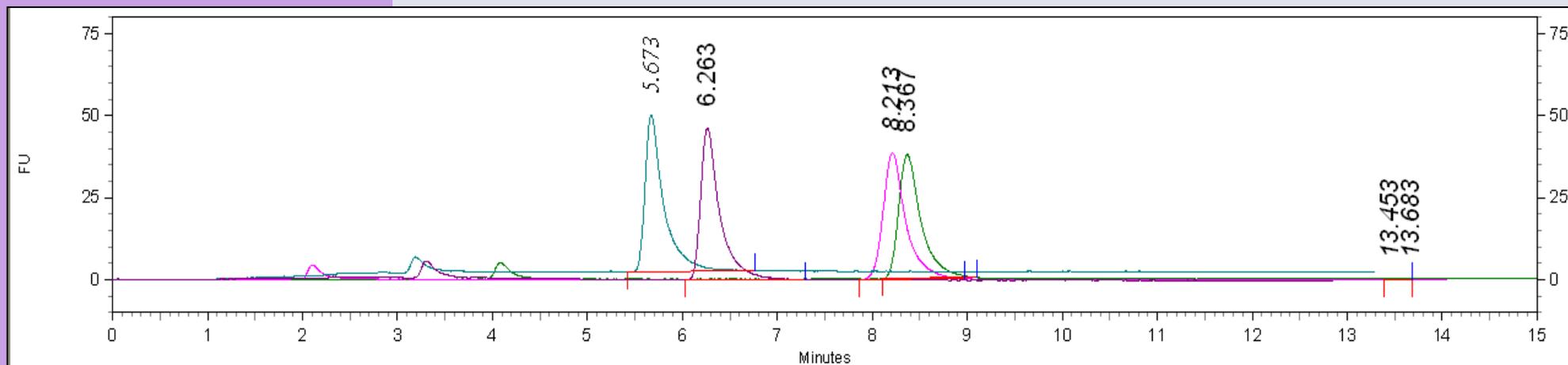
Максимумы флуоресценции:
при 410 нм, **430 нм**, 460 нм



Подбор параметров хроматографического определения

Подбор хроматографических колонок

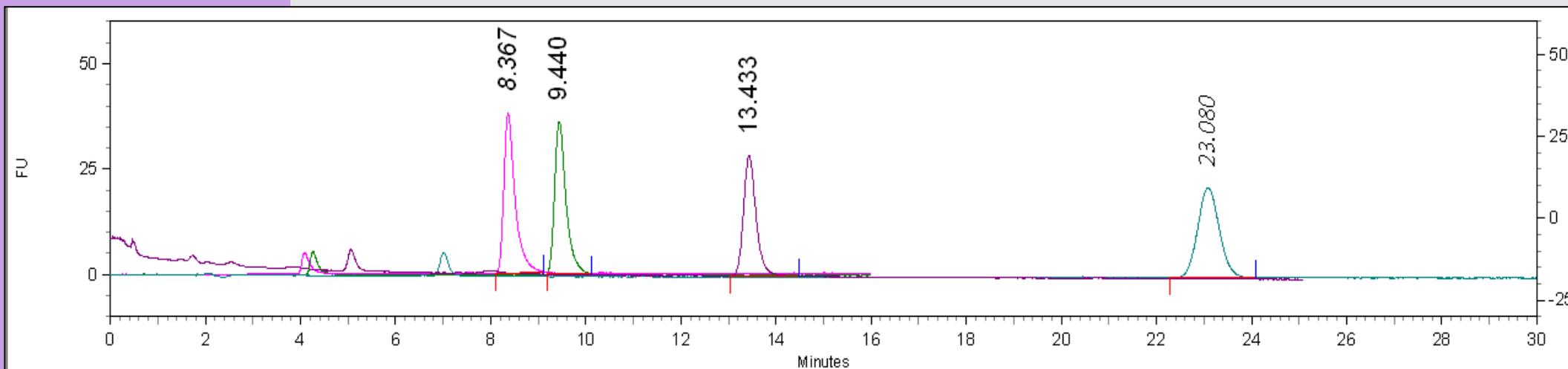
Наименование колонки	Время удерживания, R_f , мин	Площадь пика, S	Коэффициент асимметрии, A_{10}	Число теоретических тарелок, N, т.т.
Hypersil GOLD ((250 мм × 4,6 мм с зернением 3 мкм), «Agilent Technologies», США)	6,04	2706694	1,88	4 692
Zorbax Eclipse XDB-C18 ((150 мм × 4,6 мм с зернением 5 мкм), «Agilent Technologies», США)	8,37	2479019	1,56	6 367
NUCLEODUR-C18 Pyramid (250 мм × 4,6 мм с зернением 5 мкм) «Macherey-Nagel Gmb H&Co.KG», Германия)	5,67	2720928	1,90	4 964
Zorbax Eclipse PAH ((100 мм × 4,6 мм с зернением 5 мкм), «Agilent Technologies», США)	8,21	2603357	1,42	6 318



Подбор параметров хроматографического определения

Подбор подвижной фазы

Соотношение подвижных фаз ацетонитрил : вода	Время удерживания, R_f , мин	Площадь пика, S	Коэффициент асимметрии, A_{10}	Высота пика, h	Число теоретических тарелок, N, т.т.
98/2	8,37	2479019	1,56	151447	6 367
95/5	9,46	2527622	1,43	146012	7 708
90/10	13,43	2759098	1,22	140863	10 744
80/20	23,08	2704800	1,09	85477	11 870



Подбор параметров хроматографического определения

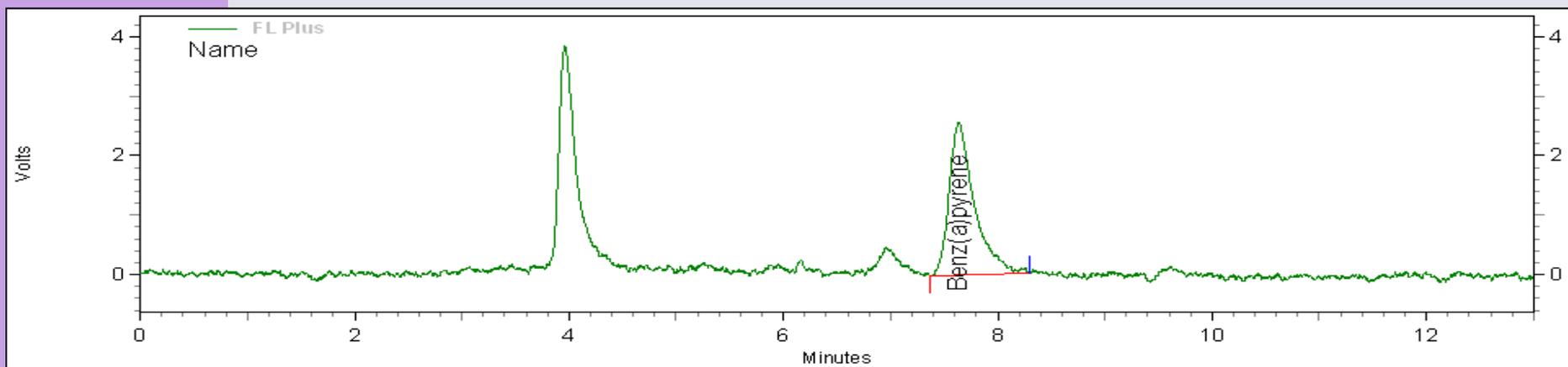
Подбор температуры колонки

Температура термостата колонки, °C	Время удерживания, R_f , мин	Площадь пика, S	Высота пика, h	Ширина основания, w	Коэффициент асимметрии, A_{10}	Число теоретических тарелок, N
20	13,757	2657588	116086	1,44	1,21	8 752
25	10,846	2623844	135001	1,35	1,32	7 561
30	8,313	2603357	153901	1,16	1,42	6 318
35	7,675	2668945	170515	1,15	1,57	6 100
40	5,453	2701121	189498	1,11	1,71	4 186

Оптимальное значение температуры колонки равно 35 °C, в связи со значительным сокращением времени анализа, оптимальными параметрами высоты, ширины пика и коэффициента асимметрии (1,57).

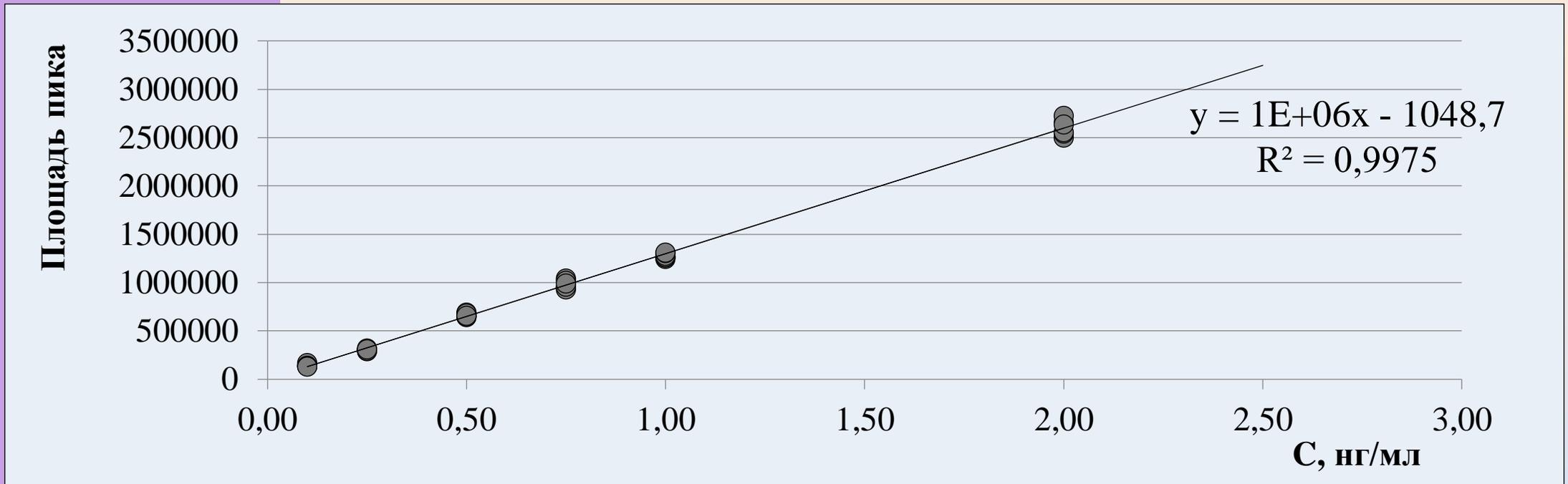
Оптимальные параметры хроматографического определения бенз(а)пирена

- Хроматографическая колонка Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 × 4.6 мм × 5 мкм);
- Состав подвижной фазы — ацетонитрил : вода – 98 : 2;
- Длина волны возбуждения — 290 нм;
- Длина волны эмиссии — 430 нм;
- Скорость потока — 0,5 см³/мин;
- Температура термостата колонки — 35°C;
- Объем вводимой пробы — 10 мкл.



Хроматограмма раствора бенз(а)пирена в ацетонитриле, соответствующего первой точке градуировочного графика (0,1 нг/см³)

Построение градуировочного графика



Градуировочный график зависимости площади хроматографического пика бенз(а)пирена от концентрации

Градуировочный график представляет собой линейную зависимость площади пика от массовой концентрации бенз(а)пирена в диапазоне от 0,1 до 2,0 нг/см³.

Зависимость имеет вид $y = bx$.

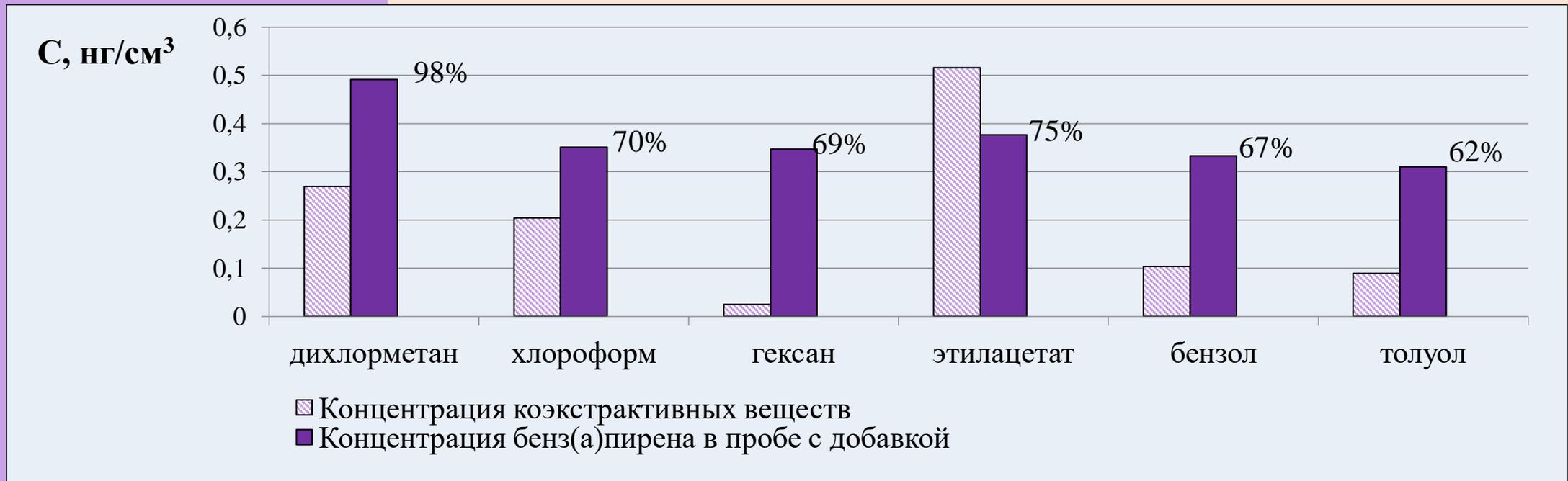


Подготовка водной вытяжки

Приготовление водных вытяжек из изделий из резино-латексных композиций, проводят при определенной экспозиции, температурном режиме и соотношении веса образца (г) к объему водной среды (см³) в соответствии с нормативными документами, включенными в Перечни стандартов к техническим регламентам Таможенного союза ТР ТС 007/2011, ТР ТС 008/2011 и действующими на территории государства.

Выбор оптимального растворителя

В качестве образцов для контроля использовали водные вытяжки из образцов из изделий из резино-латексных композиций, с внесенным раствором точной массовой концентрации бенз(а)пирена $0,5 \text{ нг/см}^3$.

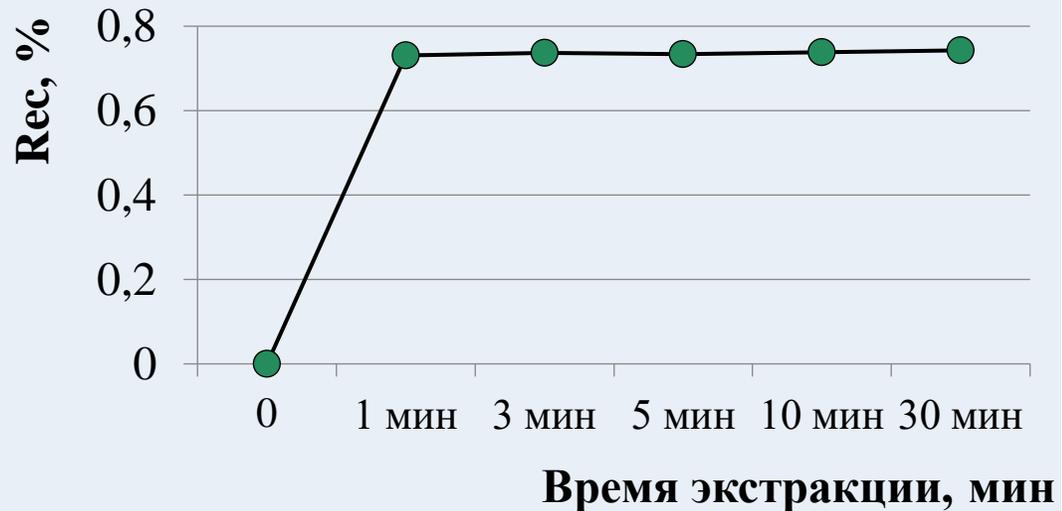


Существенное влияние коэкстрактивных веществ отсутствовало для гексана, бензола, толуола.

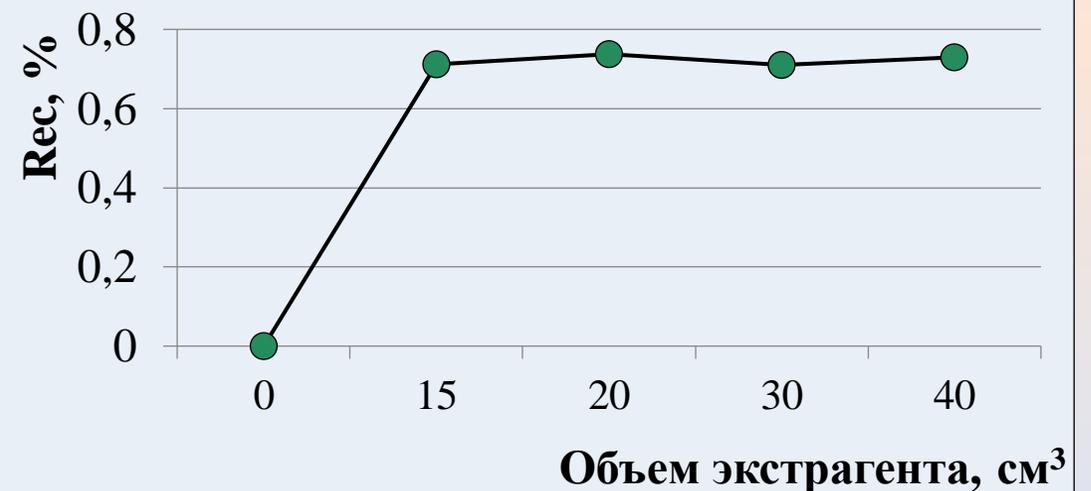
В качестве экстрагента выбран гексан.

Выбор оптимальных условий экстракции

На процесс экстрагирования бенз(а)пирена из водных вытяжек влияют такие факторы, как продолжительность процесса экстракции и объем экстрагента.

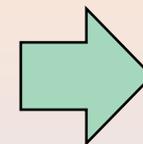
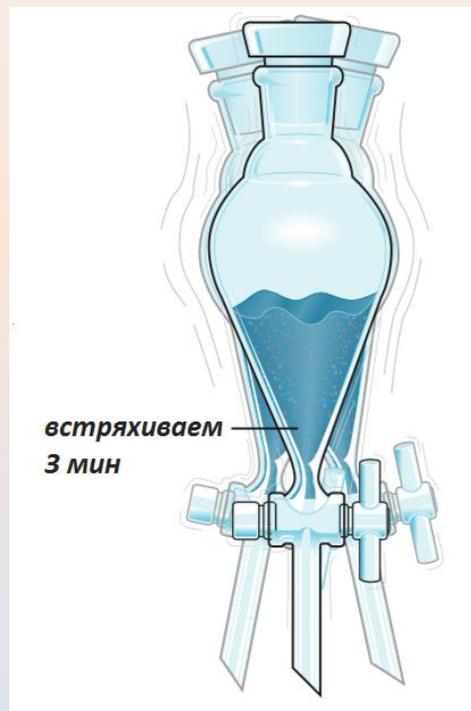
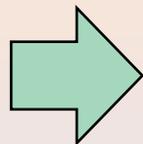


В первую минуту происходит основной процесс перехода бенз(а)пирена из водной фазы в органическую, однако для наиболее эффективного его извлечения, решено продолжительность экстракции увеличить до **3 мин.**



При использовании **15 см³** экстрагента степень экстракции достигает максимального значения.

Оптимальные параметры подготовки водной вытяжки для проведения ВЭЖХ/ФЛД анализа бенз(а)пирена



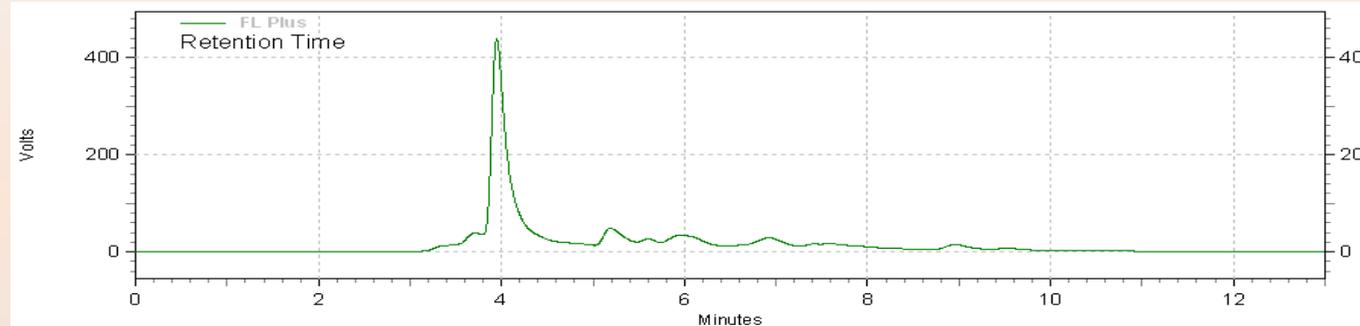
Бенз(а)пирена, содержащийся в водной вытяжке переходит в гексан.

После разделения двух фаз, гексановый слой сливают и экстракцию повторяют

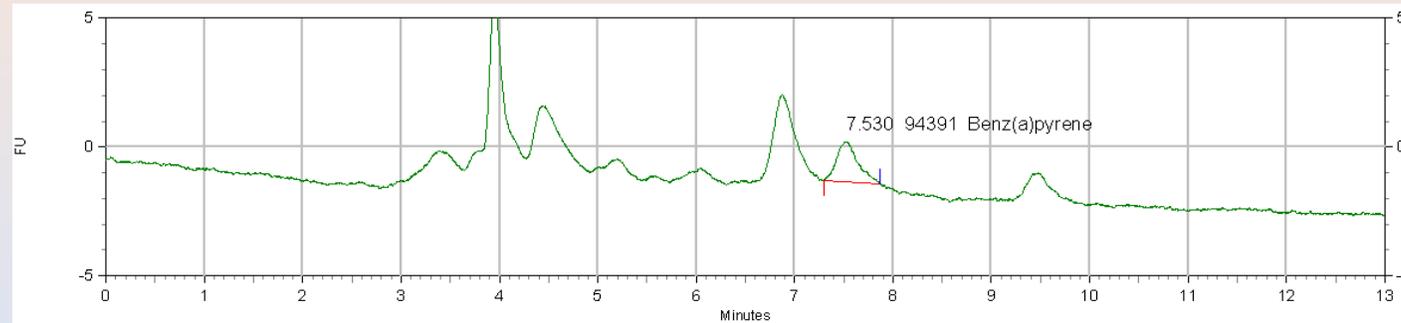
Объединенные гексановые экстракты собирают и упаривают досуха. Сухой остаток в колбе заливают 0,5 см³ ацетонитрила и хроматографируют.

Оптимальные параметры подготовки водной вытяжки для проведения ВЭЖХ/ФЛД анализа бенз(а)пирена

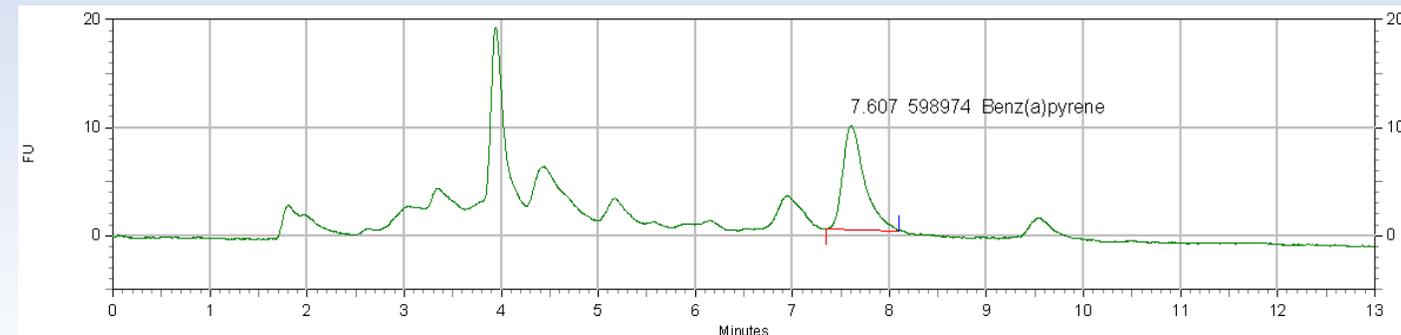
Хроматограмма контрольной пробы



Хроматограмма водной вытяжки с добавкой раствора бенз(а)пирена концентрацией 0,1 нг/см³



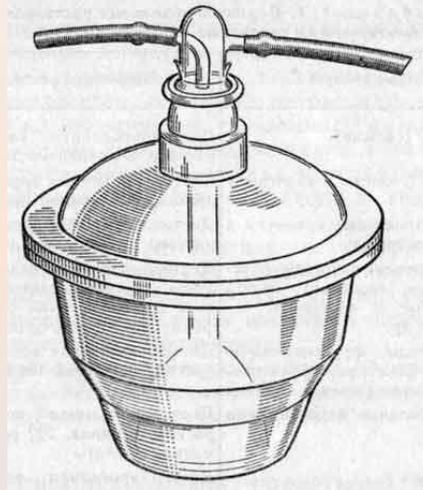
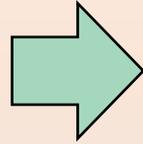
Хроматограмма водной вытяжки с добавкой раствора бенз(а)пирена концентрацией 0,5 нг/см³



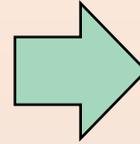
Подготовка воздушной вытяжки



Помещают игрушку
в эксикатор



Для приготовления воздушных
вытяжек используют эксикатор
объемом 10,0дм³



Прокачивают воздух с объёмным
расходом 0,5 дм³/мин с помощью
аспирационного устройства через фильтр
помещенный в пластмассовый
фильтродержатель.

Получение воздушных вытяжек из образцов изделий из резино-латексных композиций, проводят при определенной экспозиции, воздухообмене, температурном режиме и соотношении веса образца (г) (площади образца (м²)) к объему воздушной среды (м³) в соответствии нормативными документами, включенными в Перечни стандартов к техническим регламентам Таможенного союза ТР ТС 007/2011, ТР ТС 008/2011 и действующими на территории государства.

Выбор фильтра и растворителя

При подборе фильтров необходимо учитывать

- эффективность извлечение бенз(а)пирена,
- влияние присутствующих в фильтре компонентов, которые могут мешать определению бенз(а)пирена методом ВЭЖХ/ФЛД.

Экстрагент	Синяя лента		АФА-ХП-20		АФА-ВП-20	
	C_K , нг/см ³	Rec, %	C_K , нг/см ³	Rec, %	C_K , нг/см ³	Rec, %
Ацетонитрил	0,042	84	0,591	198	0,202	92
Метанол	0,169	75	0,340	129	0,101	74
Гексан	0,042	80	0,234	195	0,208	111
Толуол	0,071	82	0,235	0	0,070	0

На основании полученных экспериментальных данных показано, что при анализе воздушных вытяжек необходимо применять фильтр «синяя лента» и гексан, как оптимальный растворитель

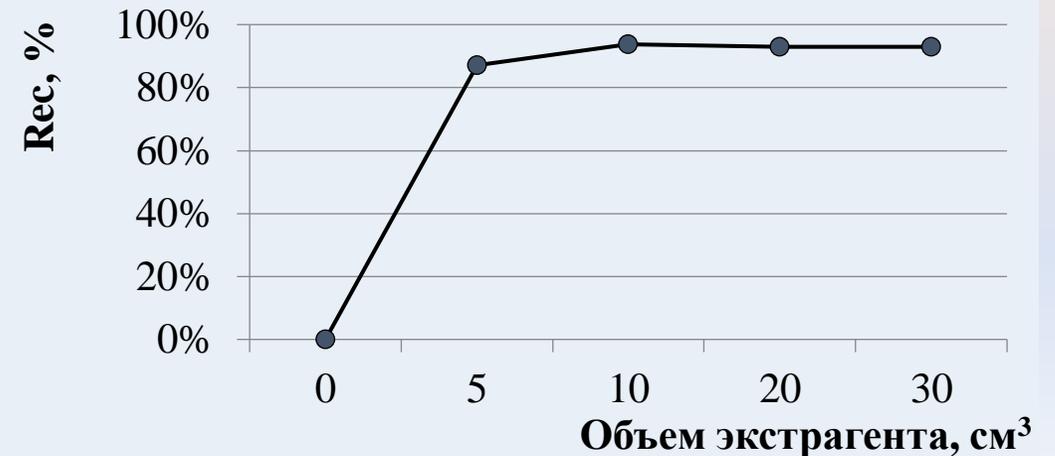
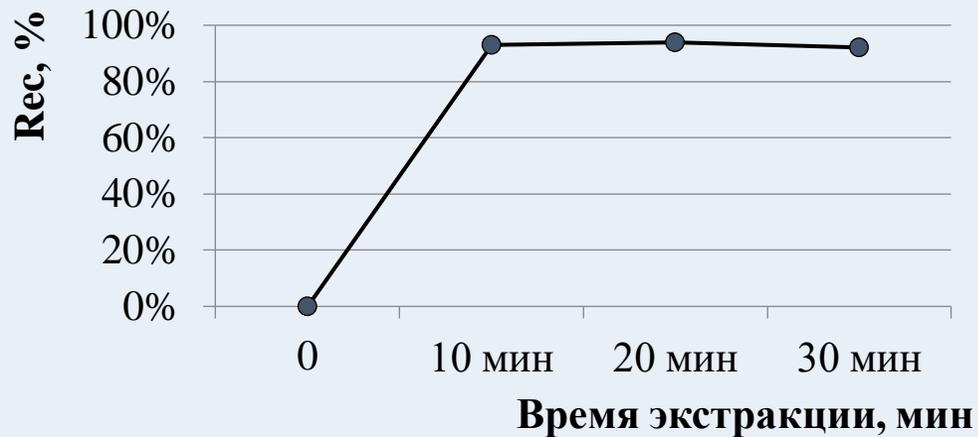
Выбор оптимальных условий экстракции

Для ускорения процесса извлечения бенз(а)пирена из фильтра используют метод ультразвуковой экстракции. Воздействие ультразвуком способствует проникновению жидкости в поры фильтра, что повышает степень извлечения.

Для достижения более высокого значения степени экстракции, были проведены исследования

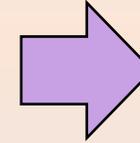
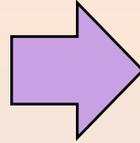
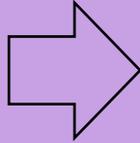
при изменении времени экстракции (10; 20; 30 мин);

при изменении объема экстрагента (5; 10; 20; 30 см³).



Использовании **10 см³ гексана** в течении **30 мин** методом ультразвуковой экстракции при двукратном экстрагировании позволило достичь степень извлечения бенз(а)пирена до **90 %**.

Оптимальные параметры подготовки воздушной вытяжки для проведения ВЭЖХ/ФЛД анализа бенз(а)пирена



Фильтр с отобранной пробой помещают в стеклянный бюкс СН-85/15 таким образом, чтобы сторона фильтра с отобранной пробой была обращена вверх

Фильтр с пробой заливают 10 см^3 гексана

Помещают в ультразвуковую баню на 30 мин при температуре $30 \text{ }^\circ\text{C}$.

Экстракцию повторяют еще раз.

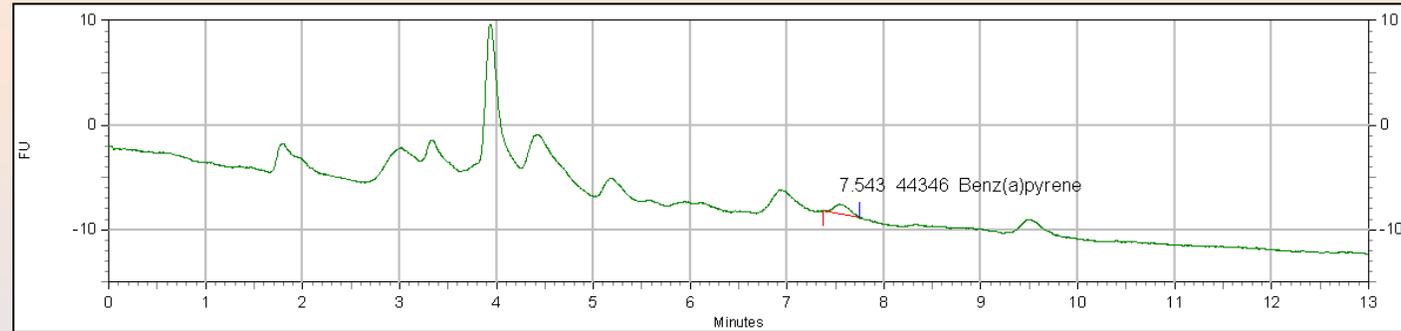
Бюкс с фильтром споласкивают 5 см^3 гексана.

Далее экстракты объединяют и упаривают досуха.

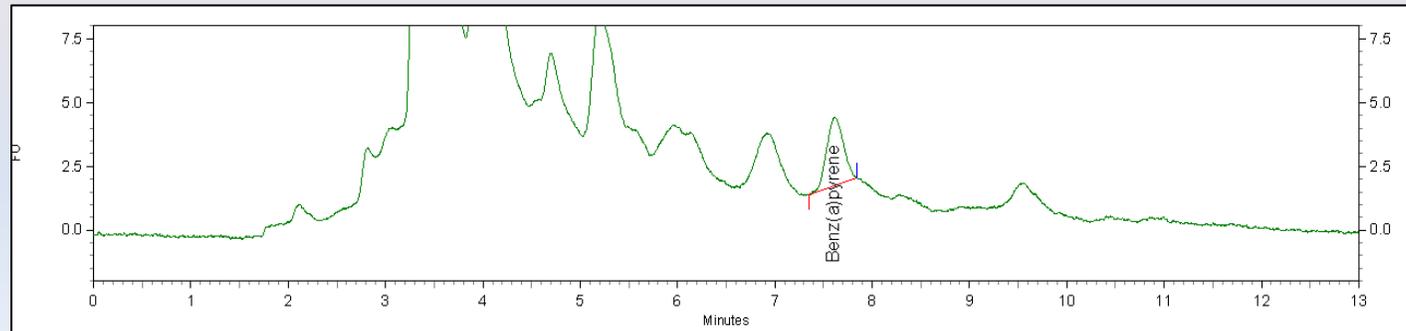
Сухой остаток в колбе заливают $0,5 \text{ см}^3$ ацетонитрила и хроматографируют.

Оптимальные параметры подготовки воздушной вытяжки для проведения ВЭЖХ/ФЛД анализа бенз(а)пирена

Хроматограмма
контрольной пробы

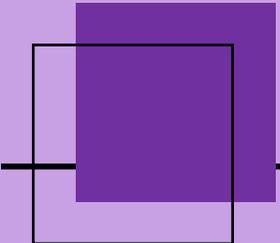


Хроматограмма
воздушной вытяжки с
добавкой бенз(а)пирена
концентрацией 0,1 нг/см³



Процедуры и этапы метрологической аттестации

Диапазон измерений массовой концентрации	Стандартное отклонение повторяемости, %	Предел повторяемости r , %	Стандартное отклонение воспроизводимости, %	Предел промежуточной прецизионности $r_{RI(TO)}$, %	Относительная расширенная неопределенность при $k = 2$ $U(X)$, %
Для водных вытяжек, мг/дм³					
0,000 0005 - 0,000 00125	S_r 4,5	13	$S_{RI(TO)}$ 6,2	17	43
0,000 00125 - 0,000 01					27
Для воздушных вытяжек, мг/м³					
0,000 005 - 0,000 0125	3,7	10	4,8	13	39
0,000 0125 - 0,0001					21



Заключение

- Подобраны условия хроматографического определения бенз(а)пирена;
- Подобраны условия подготовки к анализу водных и воздушных вытяжек;
- Проведен набор экспериментальных данных и рассчитана расширенная неопределенность методики.
- Разработан проект методики определения бенз(а)пирена в водных и воздушных средах;
- Разработан проект отчета о метрологической аттестации .

Спасибо за внимание

**Республика Беларусь
220012, г. Минск, ул. Академическая, 8
тел.: +375 17 284-13-70, +375 17 284-13-74, факс: +375 17 284-03-45
email: rspch@rspch.by chromatographic@rspch.by**