

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

**Государственное учреждение
«РЕСПУБЛИКАНСКИЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР ГИГИЕНЫ»**

**ТРЕБОВАНИЯ К ОЦЕНКЕ
КОНТАМИНАЦИИ ОРГАНИЗМА
ХЛОРСОДЕРЖАЩИМИ СОЕДИНЕНИЯМИ И
ТЯЖЕЛЫМИ МЕТАЛЛАМИ**

(инструкция по применению)

Минск - 2008

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Министра –
Главный государственный
санитарный врач
Республики Беларусь



В.И. Качан

2008 г.

Регистрационный № _____

ТРЕБОВАНИЯ К ОЦЕНКЕ КОНТАМИНАЦИИ ОРГАНИЗМА
ХЛОРСОДЕРЖАЩИМИ СОЕДИНЕНИЯМИ И ТЯЖЕЛЫМИ МЕТАЛЛАМИ
(инструкция по применению)

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр
гигиены»

АВТОРЫ:

к.м.н. Застенская И.А., к.х.н. Н.И. Марусич, к.х.н. Шуляковская О.В., к.х.н.
Ивашкевич Л.С., Чашинская Т.И., Турко Н.Н., Присмотров Ю.Н., Вашкевич
Е.В., Тимофеева О.Н., к.м.н. Зиновкина В.Ю.

Минск, 2008

Цели Инструкции. Настоящая Инструкция по применению определяет основные требования к оценке контаминации организма человека при проведении биологического мониторинга в целях:

- стандартизации методов и критериев оценки контаминации организма человека тяжелыми металлами (ртуть, свинец, кадмий) и хлорсодержащими соединениями (полихлорированные дибензодиоксины (ПХДД) и полихлорированные дибензофураны (ПХДФ), полихлорированные бифенилы (ПХБ))
- доказательства причинно-следственной связи между уровнем загрязнения окружающей и производственной среды и заболеваниями и расстройствами;
- интегральной оценки безопасности и качества окружающей среды в связи с загрязнением тяжелыми металлами и хлорсодержащими соединениями;
- прогноза изменения показателей состояния индивидуального и популяционного здоровья;
- обоснование принятия управленческих решений;
- контроля эффективности внедрения мер по снижению риска факторов окружающей среды для здоровья человека;
- выявления источников загрязнения окружающей среды;
- обеспечения участия Республики Беларусь в проведении исследований по оценке риска хлорсодержащих соединений и тяжелых металлов на международном уровне.

Область и уровень внедрения. Инструкция предназначена для врачей-гигиенистов, педиатров и терапевтов при проведении оценки риска, социально-гигиеническом мониторинге, эпидемиологических исследованиях, диагностике причин развития экологически обусловленных заболеваний, обосновании и оценки эффективности внедрения профилактических мероприятий и может быть внедрена на уровне учреждений республиканского подчинения, областных и городских центров гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья, центров диагностики и лечения расстройств и

заболеваний, вызванных действием производственных и экологических факторов.

Перечень необходимого оборудования и реактивов для проведения количественного анализа остаточных количеств ПХДД/ПХДФ, ПХБ в биологических средах изложен в приложениях 3 и 4. Перечень оборудования, необходимого для проведения анализа тяжелых металлов изложен в ГОСТ Р 51309-2001 «Вода питьевая. Определение содержания элементов методами атомной спектроскопии». Для проведения исследований микроэлементного состава волос и ногтей может быть рекомендован рентгенофлуоресцентный спектрометр ELVAX. Лабораторная посуда, необходимая для отбора образцов описана в разделе 5 «Требования к отбору образцов, транспортировке и хранению».

Показания к применению.

Инструкция рекомендуется к применению в рамках системы социально-гигиенического мониторинга окружающей среды, выявления причинно-следственных связей развития экологически обусловленной патологии, объективного обоснования необходимых управленческих решений.

Противопоказания для применения - отказ донора от участия в проведении исследований.

Основные принципы:

- соблюдение этических норм, таких как согласие донора;
- взятие пробы не должно наносить вред донору.

Этапы проведения исследований:

1. Выбор контингента
2. Анкетирование
3. Рандомизация и формирование когорт
4. Выбор вида биологического материала для исследования
5. Отбор образцов, транспортировка и хранение
6. Проведение анализа
7. Регистрация и оценка результатов

Рекомендации по обоснованию управленческих решений по результатам биологического мониторинга

Этические проблемы при проведении мониторинга

Требования к лабораториям, осуществляющим биологический мониторинг

1. Выбор категорий населения для участия в исследовании

Исследование контаминации организма может выполняться на индивидуальном, групповом и популяционном уровне.

Исследования на *индивидуальном* уровне рекомендуются в случае необходимости выявления нарушений здоровья человека с наличием/накоплением химических веществ в организме, например, в диагностических целях (выявление причины заболевания), в случаях профессиональной патологии, по личному заявлению обращающегося и т.д.

Исследования *отдельной группы лиц* рекомендуются в случае, когда воздействию подвергается отдельная категория лиц (работающие в одном цехе; дети, проживающие в зоне действия промышленного предприятия; лица, подвергшиеся действию химических веществ в результате аварии (спасатели и т.д.)).

Популяционные исследования необходимы для выявления причинно-следственных связей заболеваемости населения и загрязнения окружающей среды, включая продукты питания, в также установления значимых источников загрязнения на локальном, региональном, национальном, международном уровне.

Выбор контингента населения проводится при проведении исследований на популяционном уровне.

Основные принципы выбора контингента:

- соответствие целям и параметрам исследования (например, если целью исследования является оценка состояния здоровья детского населения, или отдельного региона, то контингент формируется из представителей определенной возрастной группы или жителей отдельного региона);

- согласие всех участвующих в исследовании;
- репрезентативность когорт (для получения репрезентативных данных количество исследуемых проб должно соответствовать уровню, при котором возможна интерпретация данных в отношении популяции в целом).

Возможны два основных варианта выбора:

- популяция в целом (преимущества – можно получить более полную картину воздействия и установить референтный уровень контаминации; недостатки – необходим достаточный объем выборки);
- «горячие» точки (преимущества – меньший объем выборки, возможность контроля предупредительных и превентивных мер в этой популяции; недостатки – невозможно установить референтный уровень для популяции в целом).

Исключения:

- лица, проживающие менее 5-и лет на обследуемой территории;
- лица, имеющие выраженное воздействие на рабочем месте;
- лица, страдающие хронической патологией;
- отказывающиеся принимать участие в исследовании;
- лица с расстройствами психики;
- дети до 6-х лет в случаях, когда предполагаемым типом биоматериала будет кровь.

При выборе контингента исследуемых в отдельных случаях можно использовать так называемых принцип «удобства отбора». Например, исследователь может выбрать отдельный контингент населения (например, работающих на одном крупном предприятии без влияния химических веществ – административно-управленческий аппарат и т.д.; обращающихся в клинику по причинам, не связанным с воздействием химических веществ – травмы и т.д.; доноры; студенты университета;). Такой принцип отбора сокращает возможности использования полученных данных на большие популяции, в связи со сложностью рандомизации когорты по перечисленным выше признакам. Тем не менее, такой принцип выбора когорты приемлем,

например, при скрининговых исследованиях, а также для получения первичных данных с целью выбора целевой когорты в дальнейшем.

Для установления размера выборки используются следующие подходы:

фиксированное количество (50, 100, и т.д.);

фиксированный индекс (например, 1:10000)

расчет с применением специальных статистических программ. Размер выборки для исследования зависит от численности общей популяции населения. Как правило, чем больше размер популяции в целом, тем меньше процент лиц, включаемых в исследования с вариацией от 0.01% до 80% (при групповых исследованиях).

С учетом численности населения отдельных административных территорий республики могут быть даны следующие размеры когорт.

Таблица 1 – Рекомендуемые размеры выборки для исследований

Численность популяции в целом, чел	Размер когорты в процентах к общей численности популяции	Размер когорты, чел
10 000 000	0.01%	1000
1 000 000	0.05%	500
100 000	0.1 - 0.2 %	100 - 200
1000	0.5-1%	50-100
100	1-5%	10-50

При групповых исследованиях (например, при общей популяции 100 человек) для получения репрезентативных данных объем когорты может быть до 30% и более (в зависимости от целей исследования).

2. Анкетирование

Для получения полной информации об участвующих в биологическом мониторинге проводится их анкетирование. Целью анкетирования является получение максимально полной информации о поле, возрасте, месте

проживания, длительности проживания, месте работы и профессии, диете, вредных привычках, другой информации, необходимой для реализации целей исследования. Примерный вариант анкеты представлен в приложении 1.

3. Рандомизация и формирование когорт

На основе полученных при анкетировании данных проводится рандомизация:

- по полу, возрасту, месту проживания (обучения), профессии, социально-экономического положения и других характеристик при необходимости (вредные привычки, диета, хобби и т.д.)

Выбор контингента для исследования и избранные критерии рандомизации должны быть полностью описаны при презентации результатов исследований.

Рандомизация по месту проживания, как правило, включает следующие критерии:

- индустриальная зона, зона интенсивного дорожного движения, зона сельскохозяйственного производства, природная (без наличия выраженных источников загрязнения окружающей среды) зона.

Рекомендуемая рандомизация по возрасту:

- 6-11 лет; 11-16 лет; 16-21 год; 22-45 лет; старше 45 лет.

4. Выбор вида биологического материала для исследования

В биологическом мониторинге (определении экспозиции/контаминации) используется широкий спектр доступного биологического материала: кровь (венозная, пуповинная), моча, слюна, грудное молоко, сперма, выдыхаемый воздух, волосы (скальповые), ногти, подкожный жир, ткани и внутренние органы (при операционном вмешательстве, биопсии).

Для исследования контаминации организма тяжелыми металлами и хлорорганическими соединениями используются кровь, моча, грудное молоко, волосы.

Принципы выбора биологического материала:

- минимизация/исключение риска для человека, участвующего в исследовании;
- соответствие физико-химическим характеристикам исследуемого химического вещества (водорастворимость, жирорастворимость, способность депонироваться в волосах, ногтях и т.д.; например, жирорастворимые соединения не обнаруживаются в моче);
- время сохранения химиката в биологической среде;
- доступность (подкожный жир, образцы тканей и внутренних органов являются трудно доступным материалом, тогда как волосы, моча, слюна являются наиболее легко доступными);

Наиболее предпочтительными являются неинвазивные методы отбора биологического материала.

Для оценки контаминации организма тяжелыми металлами и хлорорганическими соединениями используются следующие виды биологического материала (табл. 2)

Таблица 2 – Виды биологического материала, рекомендуемые для проведения биологического мониторинга

свинец	кровь (цельная), моча, волосы
кадмий	кровь (плазма), моча, волосы
ртуть	кровь (цельная), волосы
хлорсодержащие пестициды	кровь (плазма), грудное молоко
полихлорированные бифенилы	кровь (плазма), грудное молоко
полихлорированные дибензодиоксины и дибензофураны	кровь (плазма), грудное молоко

Кровь является наиболее предпочтительным типом биоматериала для проведения исследований, поскольку практически все поступающие химические вещества в той или иной степени поступают в кровяное русло. При наличии депо (костная ткань, жировая ткань) часть циркулирующего

вещества остается в депо, и концентрация в крови снижается. После того, как устанавливается равновесие между депо и кровяным руслом концентрация, измеренная в крови является отражением контаминации организма и не изменяется в течение определенного времени. Кроме того, при использовании крови есть возможность проведения поиска маркеров биологического ответа, что позволяет оценить не только контаминацию, но и вызванные ею изменения функционирования систем организма. Дополнительным преимуществом исследования крови является ее относительная стабильность и условия для получения репрезентативных и воспроизводимых результатов.

Моча является субстратом, с которым многие химические вещества (водорастворимые, неперсестирующие) выводятся из организма. Моча является неинвазивным методом отбора образцов, не представляет риска для участвующего в исследовании, не требует специального оборудования, приспособлений и специальных условий для отбора. Может быть отобрана вне медицинского учреждения, что является преимуществом по сравнению с отбором крови. Отбор мочи может проводиться в течение всего дня для оценки выведения за день. Моча является непостоянной средой организма и ее концентрация меняется в зависимости от объема потребленной жидкости, возраста и т.д. Поэтому при применении в качестве типа биологического субстрата мочи проводятся исследования содержания креатинина, как маркера, с использованием которого проводится оценка полученных результатов.

При популяционных исследованиях отбираются все возможные виды биологического материала (моча, кровь, волосы) для получения данных по контаминации различными химическими веществами.

5. Требования к отбору образцов, транспортировке и хранению

Образцы должны отбираться в химически интактную посуду соответствующего объема с плотно закрывающимися крышками.

Каждый образец маркируется отдельно в соответствии с форматом кодировки, установленной в начале исследования, и кодировкой анкеты. Например: код образца 01M07, где 01 – порядковый номер испытуемого в списке; М – кодировка вида образца (М - моча, С- сыворотка, П- плазма, Ж – жировая ткань, В – волосы и т.д.); 07 – код области/города, где отобран образец (01 – Брестская, 02 – Витебская и т.д.). Исследователь может установить свой формат кодировки образцов. Единственным требованием является исключение возможности дублирования образцов и их неправильной последующей трактовки.

Несоблюдение требований отбора, транспортировки, хранения образцов может привести к разложению исследуемого химического вещества (особенно, органических соединений) или к дополнительной контаминации веществами, находящимися в окружающей среде или мигрирующей из материалов, контактирующих с образцом.

При отборе крови (венозной и пуповинной) отбор ее осуществляется в специально приспособленном помещении в медицинском учреждении с добавлением антикоагулянта (гепарин, ЭДТА, цитрат) или без него. Отбор крови осуществляется, как правило, натошак, в объеме не более 20 мл (свинец -2-5 мл, ПХБ – 10 мл, кадмий – 2-5 мл). Для изучения содержания отдельных химикатов (диоксинов/фуранов) объем образца должен быть не менее 70 мл. Первичная обработка образца проводится в соответствии с требованиями, предусмотренными соответствующей методикой определения. Сыворотка крови или плазма являются наиболее подходящим объектом исследования при оценке контаминации.

Для изучения концентрации химических веществ и их метаболитов собирают утреннюю порцию мочи (как правило, в полном объеме). Это обусловлено тем, что эта порция мочи является наиболее концентрированной и позволяет определять химические вещества в малых концентрациях при хроническом воздействии. Для сбора мочи рекомендуется использовать 1-литровый полиэтиленовый мешок с широким горлышком.

Для исследования волос желательно собирать неокрашенные скальповые волосы в количестве не менее 200 мкг длиной 4 см. Скорость роста волос составляет 10 мм/месяц. Отбор 4 см волос от их конца позволяет оценить контаминацию в среднем за 4 месяца. Если волосы короче, чем 4 см, это должно быть отражено в протоколе. Если волосы длиннее 4 см, то та часть, которая длиннее, чем 4 см от корня волос срезается и не используется в исследовании. После отбора их хранят в пластиковых плотно закрывающихся пакетах.

Требования к отбору грудного молока изложены в Инструкции «Методика биологического мониторинга хлорорганических соединений в грудном женском молоке» (№ 049-0707 утв. Главным государственным санитарным врачом РБ 21.01.2008).

Транспортировка биологического материала осуществляется в охлаждаемых контейнерах.

Хранить кровь и мочу можно при температуре 4⁰С не более 5 дней. Длительное хранение рекомендовано при температуре – 20⁰С. Рекомендовано однократное размораживание субстрата для проведения исследований.

Условия отбора, транспортировки и хранения образцов должны быть подробно описаны в соответствующих протоколах (образец протокола приведен в приложении 2).

6. Проведение анализа

Методика определения концентрации полихлорированных бифенилов в биологическом материале представлена в Приложении 3 к настоящей Инструкции.

Методика определения концентрации полихлорированных дибензо-п-диоксинов и дибензофуранов в биологических жидкостях и крови методом хроматомасс-спектрологии представлена в Приложении 4 к настоящей Инструкции

Определение содержания тяжелых металлов проводится в соответствии с СТБ ГОСТ Р 51309-2001, а также с применением рентгенофлуоресцентного спектрометра ELVAX в соответствии с прилагаемой к прибору методикой.

7. Регистрация и оценка результатов

Регистрацию результатов после их статистической обработки (рекомендуется использовать программу «Statistica 6,0» или другую программу статистической обработки данных) целесообразно проводить с помощью таблицы, приведенной ниже. В этом случае есть возможность оценить референтный уровень, а также выявить группы населения, подверженные высокому риску развития заболеваний, вызванных влиянием тяжелых металлов и хлорорганических соединений.

Таблица 3 – содержание тяжелых металлов и хлорорганических соединений в биологическом материале (кровь, моча, волосы, грудное молоко и т.д.)

Когорта, возраст	N	% LoQ	P50	P90	P95	max	min	средняя геометрическая	Доверительный интервал
6-11								
11-16								
16-21								
22-45								
> 45								

где

N – количество проб;

LoQ - % проб ниже уровня обнаружения;

min и max – минимальное и максимальное значения соответственно;

процентили P50, P90, P95 – показатель, в пределах которых находятся 50, 90 и 95 % полученных данных соответственно.

Определение степени риска каждого индивидуума проводится путем сравнения полученных результатов с индексами:

- индекс 1, ниже которого практически отсутствует вероятность проявления негативных эффектов;

- индекс 2, превышение которого формирует повышенный риск развития негативных эффектов.

Таблица 4 – Сравнительные уровни контаминации биологических жидкостей для оценки риска развития негативных эффектов для здоровья тяжелых металлов и хлорорганических соединений

Исследуемый показатель и среда	группа	Индекс 1	Индекс 2
Свинец в крови	Дети младше 12 лет и женщины репродуктивного возраста	100 мкг/л	150 мкг/л
	Мужчины и женщины моложе 45 лет	150 мкг/л	250 мкг/л
Кадмий в моче	Дети, взрослые моложе 25 лет	1 мкг/г креатинина	3 мкг/г креатинина
	Взрослые старше 25 лет	2 мкг/г креатинина	5 мкг/г креатинина
Ртуть в моче	Дети и взрослые	5 мкг/г креатинина	20 мкг/г креатинина
Ртуть в крови	Дети и взрослые	5 мкг/л	15 мкг/л
Диоксины и фураны	Дети и взрослые	Н.о.	0.1 пг/л
ПХБ	Дети и взрослые	Н.о.	1 мкг/л

Рекомендации по обоснованию управленческих решений по результатам биологического мониторинга

По результатам биологического мониторинга возможно рекомендовать применение различных методов управления риском в зависимости от его степени. Рекомендуемые стратегии по снижению риска описаны ниже.

1. 90 - 95 % показателей зарегистрированы на уровне ниже индекса 1:

- нет необходимости в принятии немедленных мер по снижению риска на популяционном уровне;
- продолжение информирования о научных, социально-экономических и других аспектах влияния химических веществ на здоровье и мерах по предотвращению воздействия;
- проведение индивидуальной профилактики заболеваний у лиц с высоким содержанием токсикантов в биологических субстратах (выявление источника, детоксикационная терапия, диета и т.д.);

2. 50- 90 % показателей зарегистрированы на уровне ниже индекса 1, превышение индекса 2 ниже 5 %:

- широкое проведение информационных кампаний об угрозе влияния химических веществ и мерам профилактики воздействия (например, сокращение потребления хищных сортов морских рыб, исследование контаминации в индивидуальном порядке и т.д.);
- проведение индивидуальной профилактики заболеваний у лиц с высоким содержанием токсикантов в биологических субстратах (выявление источника, детоксикационная терапия, диета и т.д.);

3. более 50 % показателей зарегистрированы на уровне между индексом 1 и 2, превышение индекса 2 ниже 10 %:

- расширение программы мониторинга окружающей среды и продуктов питания для выявления источников контаминации;
- выявление источников контаминации на популяционном уровне;
- разработка и внедрение программ сокращения выбросов и сбросов в окружающую среду;
- внедрение специальных программ по деконтаминации беременных и кормящих матерей;
- широкое проведение информационных кампаний об угрозе влияния химических веществ и мерам профилактики воздействия (например, сокращение потребления хищных сортов морских рыб, исследование контаминации в индивидуальном порядке и т.д.);

- проведение индивидуальной профилактики заболеваний у лиц с высоким содержанием токсикантов в биологических субстратах (выявление источника, детоксикационная терапия, диета и т.д.);

4. более 10 % показателей зарегистрированы на уровне равном или выше индекса 2:

- необходимо срочное принятие мер по снижению риска: пересмотр законодательства и стандартов (при необходимости), расширение научных исследований для поиска источников, запрет применения химикатов, формирующих повышенных риск развития заболеваний и негативных эффектов и т.д.;

- незамедлительная разработка и внедрение программ по снижению риска;

- массовое обучение населения адекватных мерам предотвращения возможных негативных последствий;

- расширение программы мониторинга окружающей среды и продуктов питания для выявления источников контаминации;

- дополнительное проведение биологического мониторинга в других когортах (расширенной когорте);

- - проведение индивидуальной профилактики заболеваний у лиц с высоким содержанием токсикантов в биологических субстратах (выявление источника, детоксикационная терапия, диета и т.д.).

Этические вопросы

Биологический мониторинг должен проводиться с соблюдением общих и специфических этических принципов:

- исследование можно проводить только после получения согласия испытуемого;

- принять все требуемые меры предосторожности, чтобы не нанести вред при отборе образца;

- соблюдать полную конфиденциальность исследований;

- информировать о целях и задачах исследования, методах анализа, необходимой научной информации и т.д.;
- представлять индивидуальные данные только по требованию и при получении данных о повышенном риске для здоровья;
- информировать о повышенном риске только после полного научного подтверждения полученных данных;
- исключить требование информации, являющейся строго конфиденциальной (расовое происхождение, политическое и религиозное мировоззрение, сексуальная жизнь, криминальный анамнез, финансовое положение, семейные проблемы и т.д.);

Требования к лабораториям, осуществляющим биологический мониторинг

Лаборатории, выполняющие исследования в рамках биологического мониторинга должны быть аккредитованы в национальной (международной) системе качества.

Кроме того, к проведению исследований в рамках биологического мониторинга, предъявляются следующие обязательные требования:

- составлять подробный протокол о рабочем месте, времени отбора образцов, потенциального воздействия через кожу и т.д. (см. приложение 2)
- на фазе предшествующей анализу отражать в записях условия отбора образцов, из транспортировки и хранения до проведения анализа;
- строго соблюдать процедуру проведения анализа и фиксировать все наблюдаемые отклонения;
- установить и выполнять процедуру внутреннего и внешнего контроля и проведения сличительных анализов.

Анкета

1. Дата рождения (сколько Вам лет?)
2. Адрес проживания (при желании):
3. Как долго Вы живете в этом месте: с < 1 года; с 1-5 лет; с > 5 лет
4. Место проживания
 Ваш дом/квартира находится
 главной дороги/ магистралаи? С
 второстепенной дороги..... С
 жилой район/ зеленая зона? С
5. В каком по величине городе/деревне Вы живете?
 менее 1 999 жителей С
 более 1 999 жителей..... С
 2 000 – 4 999 жителей..... С
 5000-19999 жителей..... С
 20 000 – 49 999..... С
 50 000 – 74 999..... С
 75 000 – 99 999..... С
 100 000 – 249 999..... С
 250 000 – 499 999 С
 более 500 000..... С
 не знаю..... С
6. Что из ниже перечисленного расположено на расстоянии менее 50 м от Вашего дома:

	Да	нет
автозаправочная станция.....	С	С
автомастерская.....	С	С
типография/издательство.....	С	С
химчистка.....	С	С
предприятие металлургической промышленности.....	С	С
место сбора отходов.....	С	С
мусоросжигающий завод.....	С	С
предприятие в использованием растворителей.....	С	С
ферма, свинарник (другое, связанное с содержанием животных).....	С	С
парк, сквер, сад, лесная зона и т.д.	С	С
лесопилка, деревообработка..	С	С
6. Какое топливо Вы используете для приготовления пищи и обогрева?

	Приготовление пищи	обогрев
мазут.....	С	С
газ	С	С
уголь, дрова	С	С
электричество.....	С	С
центральное отопление.....	С	С
другое.....	С	С
укажите.....	_____	_____

7. Разбивали ли Вы ртутный термометр в последние 12 месяцев в Вашем доме?

- Да..... С
 Нет..... С
 Не знаю..... С

8. **a)** основной источник питьевой воды? (включая приготовление чая, кофе и других напитков)

- центральное водоснабжение..... С
 бутилированная вода..... С
 колодец..... С
 не знаю..... С

b) основной источник воды для приготовления пищи?

- центральное водоснабжение..... С
 бутилированная вода..... С
 колодец..... С
 не знаю..... С

9. Из какого материала в Вашем доме сделаны трубы для подачи воды?

- медь С
 железо С
 стали С
 свинец..... С
 пластик..... С
 другое..... С
 укажите _____
 не знаю..... С

10. Вы курите:

- нет, я никогда не курил(а)..... С
 да, курю ежедневноС
 да, курю иногда..... С
 нет, я бросил(а) > 1 года назад С
 нет, я бросила < 1 года назад С

11. Как часто за последние 4 недели Вы ели следующие продукты

	Несколько раз в день	ежедневно	Несколько раз в неделю	Раз в неделю	2-3 раза в месяц	Раз в месяц	Не ел(а)
Гриль (продукты, приготовленные на открытом огне)	С	С	С	С	С	С	С
рис	С	С	С	С	С	С	С
внутренности (печень, почки, легкие и т.д.)	С	С	С	С	С	С	С
дичь, дикие звери	С	С	С	С	С	С	С
лесные грибы	С	С	С	С	С	С	С
рыбу/морепродукты	С	С	С	С	С	С	С
морскую рыбу	С	С	С	С	С	С	С
речную рыбу	С	С	С	С	С	С	С
морепроукты	С	С	С	С	С	С	С

12. Едите ли Вы фрукты и овощи, выращенные в частных подворьях?

нет..... С

да С

13. Если да, то, как часто

	Несколько раз в день	ежедневно	Несколько раз в неделю	Раз в неделю	2-3 раза в месяц	Раз в месяц	Не ел(а)
Фрукты/овощи свежие	С	С	С	С	С	С	С
Фрукты/овощи консервированные	С	С	С	С	С	С	С

14. Как часто Вы употребляете алкоголь?

	1 и более стаканов в день	5-6 стаканов в неделю	2-4 стакана в неделю	1 стакан в неделю	2-3 стакана в месяц	Меньше 1 стакана в месяц	Не пью
Пиво (250-400 мл)	С	С	С	С	С	С	С
Вино, шампанское (100-200 мл)	С	С	С	С	С	С	С
Крепкие напитки (20-35 мл)	С	С	С	С	С	С	С

15. Вы работаете? (где, кем, как долго)

Протокол отбора крови

1. Ф.И.О. исследователя
2. Где проводился отбор? (название медицинского учреждения)
3. Идентификационный номер образца (маркировка)
4. Дата и время отбора образца
5. Объем отобранной крови
6. Какие-либо отклонения при отборе, если таковые были (быстро/медленно сворачивается и т.д.)
7. Условия транспортировки (время транспортировки, вид транспорта, наличие холодильного оборудования, непредвиденные обстоятельства)
8. Дата и время заморозки образца
9. Подпись исследователя

Протокол отбора мочи

1. Ф.И.О. исследователя
2. Где проводился отбор? (на дому, в учреждении)
3. Идентификационный номер образца (маркировка)
4. Дата и время отбора образца
5. Объем контейнера/объем отобранной мочи
6. Какие-либо наблюдения, отклонения (цвет, осадок)
7. Условия транспортировки (см. выше)
8. Дата и время заморозки образца
9. Подпись исследователя

Протокол отбора волос

1. Ф.И.О. исследователя
2. Где проводился отбор? (на дому, в учреждении)
3. Идентификационный номер образца (маркировка)
4. Дата и время отбора образца
5. Структура волос: а) подвергались ли волосы химической обработке:

Да	С
Нет	С
Если да, то	
более 1 месяца назад	С
1 месяц – неделя назад	С
менее 1 недели назад	С
б) волосы натуральные	
прямые	С
волнистые	С
кудрявые	С
6. Цвет волос

а) окрашивались ли волосы	
Да	С
Нет	С
Если да, то	
более 1 месяца назад	С
1 месяц – неделя назад	С
менее 1 недели назад	С

б) цвет натуральных волос

черные/темнокоричневые	С
коричневые	С
брюнет	С
светлые	С
рыжие	С
седые	С
белые	С

6. Дата последнего мытья волос _____
7. Длина волос в См _____
8. Отобранные волосы: длина в см _____, вес в мг _____
9. Какие-либо наблюдения, отклонения (цвет, осадок)
10. Условия транспортировки (см. выше) _____
11. Условия хранения (место хранения, температура, глубокая заморозка (жидкий азот, морозильное устройство для глубокой заморозки.)
12. Подпись исследователя _____

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ПОЛИХЛОРИРОВАННЫХ БИФЕНИЛОВ В КРОВИ И ЖИРОВОЙ ТКАНИ

Методика определения основана на экстракции остаточных количеств ПХБ и ХОП из пробы крови гексаном и смесью гексана с ацетоном из проб жировой ткани, последующей очистке экстракта концентрированной серной кислотой, отмывании экстракта водой, осушении его сульфатом натрия, концентрировании на роторном испарителе и определении контаминантов с помощью газожидкостной хроматографии.

Идентификация вещества проводится по времени удерживания, а количественное определение - методом абсолютной калибровки.

Нижний предел измерения составляет 0,06 мкг/л анализируемой пробы. Диапазон линейности для всех исследованных контаминантов составляет 0,0003-0,15 мкг/см³ исследуемого раствора или в пересчете на исследуемый продукт 0,00006 - 0,0300 мг/л или мг/кг. Интервал определяемых концентраций остаточных количеств ПХБ и ХОП 0,0001-0,0300 мг/л (для крови) или 0,0001 – 0,0300 мг/кг (для жировой ткани). Для определения более высоких концентраций остаточных количеств ПХБ и ХОП необходимо уменьшить массу навески пробы или увеличить количество гексана, в котором растворен экстракт для хроматографирования.

Метрологические значения методики характеризуются согласно Приложению 3.1.

Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

1. Средства измерений

Газовый хроматограф с детектором по захвату электронов		
Весы лабораторные общего назначения ВЛР 200, 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г		ГОСТ 24104
Колбы мерные	2-10-2 2-25-2 2-100-2	ГОСТ 1770
Пипетки градуированные	1-1-1-1 1-1-1-2 1-1-1-5	ГОСТ 29227
Цилиндры мерные	1-50-2 1-100-2	ГОСТ 1770
Микрошприцы, мкл	10 25 100 500	«Agilent», №5182-3499

2. Вспомогательные устройства и оборудование

Колонка хроматографическая кварцевая капиллярная слабополярная «Agilent» ДВ-1701 длиной 30 м, внутренним диаметром 0,25 мм, толщиной пленки 0,25 мкм или равноценная указанной, позволяющая получить такое же разделение анализируемых веществ

Генератор водорода	ГВЧ-12	
Перемешивающее устройство	ПЭ-6410	АО «Экрос» г. С.-Петербург
Фильтр «синяя лента»		ГОСТ 12026
Ротационный испаритель	ИР-М	ТУ 255-11-917-74
Центрифуга		«Beckman» J6-НС
Ступка фарфоровая	№ 4	ГОСТ 9147
Воронка делительная		ВД-1-100 ХС ВД-1-200 ХС ГОСТ 25336
Колбы		Гр-100-14123 ТС О-50-14123 ТС ГОСТ 25336
Воронка стеклянная		В-56-80 ХС В-75-110 ХС ГОСТ 25336
Бумага индикаторная универсальная		ТУ 6-09-118-89
Барометр		ТУ 2504-1797-75

3. Реактивы, материалы и растворы

Гексахлорбензол	99% основного вещества
α - Гексахлорциклогексан	99% основного вещества
β- Гексахлорциклогексан	99 % основного вещества
γ - Гексахлорциклогексан	99 % основного вещества
Гептахлор	99 % основного вещества
Альдрин	99 % основного вещества
4, 4' -ДДЕ	99 % основного вещества
4, 4' - ДДД	99 % основного вещества
4, 4' - ДДТ	99 % основного вещества
2,4,4' - Трихлорбифенил, № 28	Раствор в изооктане концентрацией 10мкг/см ³ ±3,4%, 98 % основного вещества
2,2',5,5' - Тетрахлорбифенил, №52	Раствор в изооктане концентрацией 10мкг/см ³ ±3,4%, 99 % основного вещества
2,2',4,5,5'-Пентахлорбифенил, №101	Раствор в изооктане концентрацией 10мкг/см ³ ± 3,4%, 94 % основного вещества
2,3',4,4',5'- Пентахлорбифенил, № 118	Раствор в изооктане концентрацией 10мкг/см ³ ± 2,4%, 99 % основного вещества
2,2',3,4,4',5'- Гексахлорбифенил, № 138	Раствор в изооктане концентрацией 10мкг/см ³ ± 2,4%, 98 % основного вещества
2,2',4,4',5,5'- Гексахлорбифенил, № 153	Раствор в изооктане концентрацией 10мкг/см ³

2,2',3,4,4',5,5'- Гептахлорбифенил, № 180	± 4,1%, 94 % основного вещества Раствор в изооктане концентрацией 10мкг/см ³ ± 3,4%, 98 % основного вещества
Гексан	95 % основного вещества
Спирт этиловый	ГОСТ5962-67
Ацетон, х.ч.	ГОСТ 2603-79
Натрий серноокислый безводный, х.ч.	ГОСТ 4166-76
Натрий углекислый кислый, х.ч.	ГОСТ 4201-79
Кислота серная, х.ч.	ГОСТ 4204-77
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709-72

Могут быть использованы другие средства измерения и вспомогательные устройства, по точности не уступающие рекомендуемым, а также реактивы не ниже указанной чистоты.

4. Требования безопасности

При работе с реактивами и приборами должны соблюдаться требования безопасности, установленные в действующих технических нормативных правовых актах.

Анализ по данной методике должен выполняться согласно инструкции «Основные правила безопасности работы в химических лабораториях». – М.: Химия, 1979 г. и инструкции «Общие правила пожарной безопасности Республики Беларусь для общественных зданий и сооружений» ППБ 1.04 - 2002.

Параметры микроклимата на рабочих местах должны соответствовать требованиям СанПиН 9 - 80 РБ 98 "Гигиенические требования к микроклимату производственных помещений", утвержденных постановлением Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь от 25 марта 1999 г. № 9 - 80 - 98 и ГОСТ 12.1.005 - 88.

5. Требования к квалификации оператора

К выполнению измерений могут быть допущены лица, имеющие высшее или среднее специальное образование, изучившие настоящую Инструкцию и прошедшие подготовку для работы на газовом хроматографе.

6. Условия выполнения измерений

При выполнении измерений в лаборатории согласно ГОСТ 15150-69 должны быть соблюдены следующие условия:

- температура воздуха $20 \pm 5^\circ\text{C}$;
- атмосферное давление 84,0-106,7 кПа (630-800 мм. рт. ст.);
- влажность воздуха не более 80% при температуре 25°C ;
- напряжение питающей сети $220 \pm 22\text{В}$;
- частота переменного тока $50 \pm 1\text{Гц}$.

7. Подготовка к выполнению измерений

Перед выполнением измерений должны быть проведены следующие работы: подготовка измерительной аппаратуры, приготовление растворов, построение градуировочных графиков, отбор и подготовка проб к анализу.

7.1. Подготовка измерительной аппаратуры

Включают хроматограф согласно инструкции по эксплуатации. Устанавливают рабочие режимы для термостата колонок, испарителя и детектора. Проводят стабилизацию работы хроматографа на рабочих режимах в течение 30-40 мин. Условием стабильности

является дрейф нулевого сигнала, не превышающий 1 - 2% от шкалы регистрации сигнала при чувствительности, соответствующей минимально определяемой концентрации.

7.2. Приготовление растворов

Приготовление основных стандартных растворов полихлорированных бифенилов концентрацией 0,4 мкг/см³ (а) и хлорорганических пестицидов концентрацией 1 мкг/см³ (б).

а) Готовят основной стандартный раствор смеси ПХБ концентрацией 0,4 мкг/см³. По 1 см³ раствора каждого ПХБ концентрацией 10 мкг/см³ в изооктане вносят в колбу вместимостью 25 см³, доводят раствор до метки гексаном. Раствор может храниться в холодильнике в колбе с притертой пробкой в течение 6 месяцев.

б) Готовят основной стандартный раствор смеси ХОП концентрацией 1 мкг/см³. Взвешивают на часовом стекле с точностью до ± 0,0001 г 10 мг каждого ХОП. Навеску каждого ХОП количественно переносят в мерные колбы вместимостью 100 см³, добавляют 20 см³ гексана. Колбы встряхивают до полного растворения вещества, затем доводят до метки гексаном. Концентрация каждого раствора ХОП составляет 100 мкг/см³. По 1 см³ растворов каждого ХОП концентрацией 100 мкг/см³ вносят в колбу вместимостью 100 см³, доводят до метки гексаном. Концентрация каждого ХОП в смеси составляет 1 мкг/см³. Раствор хранится в колбе с притертой пробкой в холодильнике в течение 6 месяцев.

Приготовление рабочего стандартного раствора смеси ПХБ и ХОП.

Готовят рабочий стандартный раствор смеси ПХБ и ХОП концентрацией 0,2 мкг/см³. Берут 5 см³ и 2 см³ раствора смеси ПХБ концентрацией 0,4 мкг/см³ и ХОП концентрацией 1 мкг/см³ соответственно пипетками на 5 и 2 см³ и вносят в мерную колбу вместимостью 10 см³. Доводят до метки гексаном. Раствор хранится в колбе с притертой пробкой в холодильнике в течение двух месяцев.

Приготовление градуировочных растворов смеси ПХБ и ХОП.

Для приготовления градуировочных растворов смеси ПХБ и ХОП в гексане с концентрацией 0,0003; 0,0015; 0,0050; 0,0150; 0,0250; 0,0750; 0,1500 мкг/см³ в мерные колбы вместимостью 10 см³ микрошприцами на 25 мкл; 100 мкл; 500 мкл и градуировочными пипетками на 1 см³, 2 см³, 5 см³ и 10 см³ вносят 15 мкл; 75 мкл; 250 мкл, 0,75 см³; 1,25 см³; 3,75 см³ и 7,5 см³ рабочего стандартного раствора смеси ПХБ и ХОП соответственно и доводят до метки гексаном. Растворы могут храниться в холодильнике в течение двух недель.

7.3. Построение градуировочных графиков

Весь диапазон измеряемых концентраций разбивают на три поддиапазона 0,0003 - 0,0050 мкг/см³; 0,0050 - 0,0250 мкг/см³ и 0,0250 - 0,1500 мкг/см³.

При построении градуировочного графика первого поддиапазона используют градуировочные растворы смеси ПХБ и ХОП в гексане с концентрацией 0,0003; 0,0015; 0,0050 мкг/см³. По 5 мкл каждого раствора вводят в хроматограф, начиная с раствора наименьшей концентрации, не менее пяти раз. При этом значения времени удерживания определяемых компонентов не должны отличаться друг от друга более, чем на 1 %.

При построении градуировочного графика второго поддиапазона используют градуировочные растворы смеси ПХБ и ХОП в гексане с концентрацией 0,0050; 0,0150; 0,0250 мкг/см³; третьего поддиапазона - 0,0250; 0,0750 и 0,1500 мкг/см³.

Условия хроматографирования:

Объем вводимой пробы	5 мкл
Давление газа-носителя	100 кПа
водорода на входе в колонку	

Температура колонки $100^{\circ}\text{C} \xrightarrow{30^{\circ}\text{C}/\text{мин}} 200^{\circ}\text{C} \xrightarrow{3^{\circ}\text{C}/\text{мин}} 260^{\circ}\text{C} \xrightarrow{30^{\circ}\text{C}/\text{мин}} 280^{\circ}\text{C}$
(3 мин)

Температура испарителя 250°C
Температура детектора 380°C

Время удерживания представлено в таблице 1.

Таблица 1 – Время удерживания и относительное время удерживания исследуемых ХОП и ПХБ

Компонент	Время удерживания, мин	Относительное время удерживания	Компонент	Время удерживания, мин.	Относительное время удерживания
ГХБ	5,84	0,464	ПХБ 101	11,26	0,895
α -ГХЦГ	6,67	0,530	ДДЕ	12,58	1,00
γ -ГХЦГ	7,56	0,601	ПХБ 118	13,91	1,106
ПХБ 28	7,75	0,616	ПХБ 153	14,55	1,157
Гептахлор	8,04	0,639	ДДД	15,93	1,266
ПХБ 52	8,61	0,684	ПХБ 138	16,07	1,277
Альдрин	8,74	0,695	ДДТ	16,67	1,325
β -ГХЦГ	9,54	0,758	ПХБ 180	19,18	1,525

Значения времени удерживания, указанные в таблице 1, должны быть уточнены при использовании других типов оборудования, реагентов и хроматографических колонок.

Для построения градуировочных графиков измеряют площади пиков, соответствующие концентрациям ПХБ и ХОП в градуировочных растворах. По полученным данным рассчитывают коэффициенты регрессии a и b прямой $Y = aX + b$ методом наименьших квадратов.

Градуировочный график строится с учётом вычисленных значений уравнения $Y = aX + b$, где Y – площадь пика определяемых концентраций;

X – концентрации контаминантов в градуировочном растворе;

a и b – коэффициенты регрессии.

8. Отбор и подготовка проб к анализу

8.1. Экстракция остаточных количеств ПХБ и ХОП из проб крови

Объем проб цельной крови составляет 10 см^3 . Отделение плазмы производят центрифугированием при 3000 об/мин. Отбирают 3 см^3 образца плазмы, взвешивают, тщательно растирают в фарфоровой ступке с 10-15 г безводного сульфата натрия, количественно переносят в коническую колбу вместимостью 250 см^3 , смывая 10 см^3 гексана. Устанавливают колбу на перемешивающее устройство для экстракции. Время экстракции 15 минут. Экстракт декантируют в круглодонную колбу вместимостью 100 см^3 . Экстракцию проводят дважды с тем же количеством растворителя. Гексановые экстракты объединяют и переносят в делительную воронку вместимостью 100 см^3 .

8.2. Экстракция остаточных количеств ПХБ и ХОП из проб жировой ткани

Пробу жировой ткани тщательно перемешивают и отбирают навеску массой 1 г с точностью $\pm 0,01$ г. Затем навеску измельченного образца тщательно растирают в фарфоровой ступке с 15-20 г безводного сульфата натрия, количественно переносят в коническую колбу вместимостью 50 см^3 , смывая 50 см^3 смеси гексан - ацетон в соотношении 1:1. Устанавливают колбу на перемешивающее устройство для экстракции.

Время экстракции 60 минут. Экстракт фильтруют в круглодонную колбу вместимостью 100 см³. Экстракцию проводят дважды с тем же количеством растворителей. Экстракты объединяют и отгоняют растворитель на ротационном испарителе до 0,5 см³. Затем к остатку добавляют 30 см³ гексана, переносят в делительную воронку вместимостью 100 см³.

8.3. Очистка экстрактов проб

Для очистки экстракта используют серную кислоту. Очистку серной кислотой проводят до тех пор, пока она не обесцветится. Очищенный экстракт промывают сначала дистиллированной водой, затем 1% раствором NaHCO₃ и снова дистиллированной водой до pH 7. Далее очищенный экстракт количественно переносят в коническую колбу вместимостью 100 см³, сушат 15г безводного сульфата натрия, фильтруют в круглодонную колбу вместимостью 50 см³, отгоняют растворитель на ротационном испарителе до объема 0,5-1,0 см³. Последние капли растворителя удаляют с помощью резиновой груши. К остатку пипеткой вместимостью 1 см³ добавляют 1 см³ гексана. Колбу закрывают притертой стеклянной пробкой. Полученный экстракт в количестве 5 мкл вводят в хроматограф не менее 2 раз.

9. Выполнение измерений

Анализ полученных экстрактов проводится на газовом хроматографе. Условия хроматографирования такие же, как и при построении градуировочного графика п.8.3.

Качественная идентификация ПХБ и ХОП осуществляется по времени удерживания или по относительному времени удерживания анализируемых компонентов, а также путём ввода в пробу раствора смеси чистых стандартных веществ. В последнем случае увеличение высоты сигнала соответствующего пика без изменения его ширины свидетельствует о наличии компонента. Проводят расчет площади пиков и по градуировочным графикам, построенным при анализе градуировочных растворов, находят содержание ПХБ и ХОП в гексановом экстракте. Для подтверждения результатов анализа в сомнительных случаях рекомендуется использовать альтернативную неполярную капиллярную колонку RTX-1.

10. Обработка результатов измерений

Содержание каждого компонента ПХБ и ХОП в пробе (X'') в мг/кг продукта рассчитывают по формуле:

$$X'' = \frac{X' \times V \times V_1}{m \times V_2}, \text{ где}$$

X' - концентрация ПХБ и ХОП, найденная по градуировочному графику, мкг/см³;

m - масса навески, г;

V - объем экстракта, см³ (V=1 см³);

V₁ - объем, взятый для хроматографирования при построении градуировочного графика, мкл (V₁=5 мкл);

V₂ - объем, взятый для хроматографирования при исследовании пробы, мкл (V₂=5мкл);

За результат анализа принимают среднее арифметическое определений концентраций каждого ПХБ и ХОП, найденных в двух параллельных пробах. Гарантированный результат анализа представляют в следующем виде:

$$X = \bar{X} \pm \Delta, \text{ где } \bar{X} = \frac{X''_1 + X''_2}{2}$$

X''₁ - концентрация каждого ПХБ и ХОП в первой пробе, мг/кг;

X''₂ - концентрация каждого ПХБ и ХОП во второй пробе, мг/кг;

\bar{X} - средняя концентрация каждого ПХБ и ХОП, найденная при анализе двух параллельных проб;

Δ - суммарная погрешность методики.

Значения точностных параметров методики (диапазон концентраций св. 0,0050-0,0300 мг/кг)

Компонент	Число парал. определений, n	Границы суммы неискл. системат. погреш., $Q_i, \%$	Погрешность град. графика, $D_{гр}, \%$	Доверительные границы случ. составляющей погреш. град. графика, E_y	Норматив сходимости, $d, \%$	Норматив воспроизводимости, $D, \%$	Норматив точности, $K, \%$	Допустимые расхожд. между результатами в разных лабораториях, %	Относит. суммарная погреш. результата измерения, $D, \%$
ГХБ	2	5,52	0,87	2,10	1,73	13,82	15,74	22,31	11,15
α - ГХЦГ	2	5,58	1,3	2,30	1,77	13,55	15,59	22,12	11,06
γ - ГХЦГ	2	5,46	0,62	1,72	1,86	14,06	15,95	22,62	11,31
ПХБ - 28	2	5,74	1,89	5,25	2,18	14,00	16,09	22,82	11,41
Гептахлор	2	5,53	1,07	2,97	1,99	15,85	17,57	24,92	12,46
ПХБ 52	2	5,49	0,89	2,47	2,22	16,17	17,82	25,28	12,64
Альдрин	2	5,51	0,96	2,66	3,04	15,15	16,96	24,06	12,03
β - ГХЦГ	2	5,86	2,21	6,13	1,91	12,52	14,95	21,20	10,60
ПХБ 101	2	5,45	0,50	1,39	1,77	14,45	16,27	23,08	11,54
ДДЕ	2	5,53	1,10	3,05	1,64	13,45	15,47	21,94	10,97
ПХБ 118	2	5,44	0,46	1,28	1,83	12,61	14,69	20,84	10,42
ПХБ 153	2	5,47	0,71	1,97	1,99	13,95	15,86	22,50	11,25
ДДД	2	5,46	0,65	1,80	2,42	12,74	14,82	21,02	10,51
ПХБ 138	2	5,45	0,56	1,55	1,82	13,54	15,50	21,98	10,99
ДДТ	2	5,45	0,54	1,50	1,76	14,77	16,57	23,50	11,75
ПХБ 180	2	5,46	0,61	1,69	1,72	14,46	16,30	23,12	11,56

Значения точностных параметров методики (диапазон концентраций св. 0,0010-0,0050 мг/кг)

Компонент	Число парал. определений, n	Границы суммы неискл. системат. погреш., $Q_i, \%$	Погрешность град. графика, $D_{гр}, \%$	Доверительные границы случ. составляющей погреш. град. графика, E_y	Норматив сходимости, $d, \%$	Норматив воспроизводимости, $D, \%$	Норматив точности, $K, \%$	Допустимые расхожд. между результатами в разных лабораториях, %	Относит. суммарная погреш. результата измерения, $D, \%$
ГХБ	2	5,52	1,14	3,92	9,12	17,54	19,21	27,47	13,63
α - ГХЦГ	2	5,49	0,83	3,61	8,95	17,03	18,60	26,38	13,19
γ - ГХЦГ	2	5,79	2,02	5,61	10,31	18,98	20,53	29,12	14,56
ПХБ - 28	2	6,39	3,38	9,38	11,51	19,58	21,43	30,4	15,20
Гептахлор	2	5,57	1,26	3,50	8,50	19,75	21,19	30,06	15,03
ПХБ 52	2	6,11	2,30	7,80	11,24	18,83	20,59	29,20	14,60
Альдрин	2	5,73	1,86	5,17	10,81	19,82	21,28	30,18	15,09
β -ГХЦГ	2	5,92	2,38	6,61	10,81	15,92	17,88	25,36	12,68
ПХБ 101	2	5,52	1,03	2,86	11,62	19,96	21,29	30,20	15,10
ДДЕ	2	5,86	2,22	6,16	8,86	17,48	19,22	27,26	13,63
ПХБ 118	2	5,64	1,57	4,36	9,63	18,15	19,70	27,94	13,97
ПХБ 153	2	5,55	1,02	2,83	10,16	18,80	20,23	28,70	14,35
ДДД	2	5,49	0,84	2,33	10,19	18,79	20,19	28,64	14,32
ПХБ 138	2	5,75	1,91	5,30	10,81	18,63	20,19	28,64	14,32
ДДТ	2	5,57	1,26	3,50	9,70	19,74	21,11	29,94	14,97
ПХБ 180	2	5,69	1,73	4,80	8,45	18,88	20,39	28,92	14,46

Значения точностных параметров методики (диапазон концентраций 0,0001-0,0010 мг/кг)

Компонент	Число парал. определений, n	Границы суммы неискл. системат. погреш., Q_i , %	Погрешность град. графика, $D_{гр.}$, %	Доверительные границы случ. составляющей погреш. град. графика, E_y	Норматив сходимости, d , %	Норматив воспроизводимости, D , %	Норматив точности, K , %	Допустимые расхожд. между результатами в разных лабораториях, %	Относит. суммарная погреш. результата измерения, D , %
ГХБ	2	6,05	2,75	7,70	11,92	20,16	22,04	31,22	15,61
α - ГХЦГ	2	6,08	2,74	7,61	12,10	20,06	21,69	30,76	15,38
γ - ГХЦГ	2	6,10	2,80	7,77	11,72	20,81	22,38	31,74	15,87
ПХБ - 28	2	6,68	3,91	10,85	12,70	22,84	24,55	34,82	17,41
Гептахлор	2	5,78	1,99	5,52	10,68	21,01	22,39	31,76	15,88
ПХБ 52	2	5,89	2,30	6,38	12,41	20,63	22,09	31,34	15,67
Альдрин	2	6,20	3,00	8,33	11,23	22,09	23,60	33,48	16,74
β - ГХЦГ	2	6,38	3,36	9,32	13,64	25,88	27,21	38,60	19,30
ПХБ 101	2	6,01	2,60	7,22	11,65	26,15	27,31	38,74	19,37
ДДЕ	2	5,95	2,44	6,77	10,96	19,54	21,14	29,98	14,99
ПХБ 118	2	6,55	3,68	10,22	11,59	20,93	22,74	32,26	16,13
ПХБ 153	2	5,60	1,41	3,91	11,96	21,85	23,08	32,74	16,37
ДДД	2	5,73	1,86	5,16	11,20	20,36	21,77	30,88	15,44
ПХБ 138	2	5,63	1,52	4,22	11,61	21,08	22,39	31,76	15,88
ДДТ	2	5,67	1,65	4,58	12,02	23,52	24,68	35,00	17,50
ПХБ 180	2	6,04	2,67	7,41	11,57	21,83	23,28	33,02	16,51

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЛИХЛОРИРОВАННЫХ ДИБЕНЗО-*n*-ДИОКСИНОВ И ДИБЕНЗОФУРАНОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ И КРОВИ МЕТОДОМ ХРОМАТОМАСС-СПЕКТРОСКОПИИ

Настоящая методика устанавливает метод идентификации и выполнения измерений массовых концентраций (далее концентраций) 17 высокотоксичных замещенных полихлорированных дибензо-*p*-диоксинов (ПХДД), дибензофуранов (ПХДФ) и их изомеров: 2,3,7,8-ТетраХДД; 1,2,3,7,8-ПентаХДД; 1,2,3,4,7,8-ГексаХДД; 1,2,3,6,7,8-ГексаХДД; 1,2,3,7,8,9-ГексаХДД; 1,2,3,4,6,7,8-ГептаХДД; ОктаХДД; 2,3,7,8-ТетраХДФ; 1,2,3,7,8-ПентаХДФ; 2,3,4,7,8-ПентаХДФ; 1,2,3,4,7,8-ГексаХДФ; 1,2,3,6,7,8-ГексаХДФ; 2,3,4,6,7,8-ГексаХДФ; 1,2,3,7,8,9-ГексаХДФ; 1,2,3,4,6,7,8-ГептаХДФ; 1,2,3,4,7,8,9-ГептаХДФ; ОктаХДФ в биологических жидкостях и крови с использованием хромато-масс-спектрометрии.

Предел обнаружения тетра-, пента-, гекса-, гепта- и октахлорированных ПХДД и ПХДФ составляет соответственно 0,5; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0 нг/кг при массе анализируемой пробы 10-200 г.

ОПИСАНИЕ МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ

1. Краткая характеристика исследуемых веществ.

Всего существуют 75 различных ПХДД и 135 ПХДФ, отличающихся количеством и местом присоединения атомов хлора. Наиболее токсичные 17 изомеров ПХДД и ПХДФ. Из них самым токсичным является 2,3,7,8-тетрахлордибензо-*p*-диоксин (2,3,7,8-ТХДД), который представляет собой кристаллическое вещество с температурой плавления 305-307° С, растворимостью в воде 2×10^{-8} %, химически инертное, термостойкое, не разлагаемое кислотами и щелочами. 2,3,7,8-ТХДД высоко токсичен даже в малых концентрациях. Токсичность других ПХДД и ПХДФ выражается в эквивалентах токсичности (диоксиновых эквивалентах, ДЭ) - долях от токсичности 2,3,7,8-ТХДД, принятой за единицу (см. Приложение 1).

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

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

Таблица 1 - Диапазон измерений, значения характеристики относительной погрешности и ее составляющих при доверительной вероятности P=0,95

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

3. Сущность метода.

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

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

Концентрации ПХДД и ПХДФ определяют по площадям соответствующих хроматографических пиков по методу внутреннего стандарта.

4. Средства измерений.

4.1. Хромато-масс-спектрометрическая система, включающая:

- газовый хроматограф, (Varian 3400, Hewlett-Packard 6890A);
- инжектор split-splitless или on-column;
- масс-спектрометрический детектор высокого или низкого разрешения, позволяющий вести регистрацию отдельных ионов с заданными массами;
- компьютерная система обработки данных (Finnigan MAT 8200, MAT-95, HP 5988, HP 5973, ITD 700, Nermag R 10-10);
- капиллярные хроматографические колонки 50 (60) м x 0,25 (0,32) мм с неподвижной неполярной фазой типа SE-54 (DB-5, Ultra-2 и др.) и полярной фазой SP 2331, CP Sil 88, DB-DIOXIN, HP-23;
- микрошприцы типа Hamilton вместимостью 1, 10, 100, 500 мкл с ценой деления 0,01, 0,1, 1,0, 10 мкл, соответственно.

4.2. Весы аналитические ВЛР-200М, 2 класса точности с погрешностью $\pm 0,0002$ г ГОСТ 24104-80Е

4.3. Меры массы Г-2-210 ГОСТ 7328-82

4.4. Стандартные растворы изотопномеченных ПХДД, ПХДФ (внутренний стандарт, стандарт-имитатор), производства фирмы Cambridge Isotope Laboratory (CIL), например, EDF – 4053*, с концентрацией не менее (50 ± 5) мкг/см³.

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

4.5. Стандартные растворы нативных отдельных или смеси всех 17 определяемых ПХДД и ПХДФ с содержанием их 40-400 мкг/см³, производства фирмы CIL (например, EDF – 7999) (для градуировки прибора).

4.6. Рекавер стандарт (¹³C₁₂): 1,2,3,4-TCDD/1,2,3,7,8,9-HxCDD (внутренний стандарт для проверки прибора), производства фирмы CIL.

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

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

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

4.9. Колбы мерные 2-25-2, 2-50-2 ГОСТ 1770-74

4.10. Пипетки 1-2-1, 2-2-5 ГОСТ 29227-91

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

* - Номер по каталогу «Environmental Contaminant Standards».

5. Вспомогательные устройства и лабораторная посуда.

- 5.1. Ротационный испаритель типа RY-05 ST Basic 1-B
- 5.2. Сушильный шкаф типа SNOL 67/350 нерж. сталь
- 5.3. Электропечь лабораторная типа SNOL 7,2/1100
- 5.4. Ванна ультразвуковой очистки типа Bandelink ДК-514 ВР
- 5.5. Встряхиватель горизонтальный типа HS-260 Basic
- 5.7. Эксикатор 2-250 ГОСТ 9147-80E
- 5.8. Колонка стеклянная длиной 400 мм и внутренним диаметром 7 мм.
- 5.9. Колонка стеклянная длиной 200 мм и внутренним диаметром 7 мм.
- 5.10 Трубка стеклянная длиной 90 мм, внутренним диаметром 3,5 мм.
- 5.11. Флаконы для образцов с коническим дном и герметичной пробкой типа Wheaton Mini-Vials вместимостью 1 и 2 см³.
- 5.12. Флаконы для образцов с герметичной пробкой вместимостью 4-10см³ (резервуар Мишаль-Миллер).
- 5.13. Колба Бунзена с воронкой Бюхнера
- 5.14. Мясорубка с диаметром отверстий 3-5 мм
- 5.15. Трубки полиэтиленовые внешним диаметром 2 мм.
- 5.16. Трубки из силиконовой резины.
- 5.17. Резистор ПЭВ-15 ТУ - ОЖ0467546, или другой обогреватель колонки
- 5.18. Баллон со сжатым воздухом или генератор чистого воздуха ГЧВ –0,8 –2,5, ЖНЛК 2.022.000.000 ТУ.
- 5.19. Редуктор кислородный.
- 5.20. Посуда лабораторная стеклянная ГОСТ 25336-82
- 5.20.1. Воронки лабораторные В-36-50, В- 100-150 ГОСТ 25336-82
- 5.20.2. Воронки делительные ВД-1-100 ХС ГОСТ 25336-82
- 5.20.3. Дефлегматор 250-14/23-29/32-ТС ГОСТ 25336-82
- 5.20.5. Колбы конические вместимостью Кн-1-50-14/23 ТС, Кн-1-250-24/29 ТС ГОСТ 25336-82
- 5.20.6. Колбы круглодонные К-1-500-29/32 ТС, К-1-1000-29/32 ТС К-1-2000-29/32 ТС ГОСТ 25336-82
- 5.20.7. Стаканы В-1-50 ТС, В-1-100 ТС ГОСТ 25336-82
- 5.20.8. Холодильник ХПТ-1-300-14/23 ХС ГОСТ 25336-82
- 5.20.9. Пробирки кварцевые П-6-КШ 14/23 ГОСТ 19908-80

Допускается использование вспомогательного оборудования и лабораторной посуды других марок, обеспечивающих проведение анализа с заданной погрешностью.

6. Реактивы и материалы.

- 6.1. Ацетон, о.с.ч. 9-5 ТУ 263-039-44493179-00
- 6.2. Толуол, ос.ч. 22-5 ТУ 2631-065-44493179-01
- 6.3. Метанол, х.ч. ГОСТ 6995-77
- 6.4. н-Гексан, ч. ТУ 6-09-3375-78
- 6.5. Метиленхлорид, ч.14-4 ТУ 6-09-20-30-78
- 6.6. Тридекан, ч. ТУ 6-09-3732-74
- 6.7. Кислота серная, ос.ч. ГОСТ 4204-77
- 6.8. Натрий серноокислый безводный, х.ч., ГОСТ 4166-76
- 6.9. Калия гидроксид, х.ч. ГОСТ 24363-80
- 6.10. Силикагель 60 для хроматографии (MERCK)
- 6.11. Оксид алюминия активированный, щелочной, Brokmann I, (Aldrich Chemical Company, Inc.)
- 6.12. Целит 545 (Fluka Chemika)

- 6.13. Уголь активированный для газовой хроматографии, 0,3-0,5 мм (Fluka Chemika)
- 6.14. Карбопак С 60/80 (Supelco)
- 6.15. Натрий фосфат, ч.д.а., ГОСТ 9337-79.
- 6.16. Аммоний серноокислый безводный, х.ч. ГОСТ 4166-76
- 6.17. Магний серноокислый, ч.д.а. ГОСТ 4523-77
- 6.18. Диметилдихлорсилан, ч. ТУ 6-09-3278-78
- 6.19. Калия дихромат, ч., ГОСТ 4220-75.
- 6.20. Циклогексен, х.ч. ТУ 6-09-11-2009-87
- 6.21. Вата медицинская гигроскопическая ГОСТ 5556-81
- 6.22. Фильтр стеклянный микроволокнистый GF/A,D,F (Whatman), (кварцевая вата).

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

7. Требования безопасности.

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

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

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

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

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

8. Требования к квалификации оператора

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

9. Отбор, хранение и транспортировка проб.

Условия отбора, хранения и транспортировки проб проводят согласно СТБ 1036-97.

10. Подготовка к проведению анализа.

Перед выполнением измерений должны быть проведены следующие работы: подготовка химической посуды, приготовление растворов и адсорбционных колонок,

подготовка измерительной аппаратуры, установление градуировочной характеристики, подготовка и экстракция проб, очистка проб на колонках.

10.1. Подготовка химической посуды и кварцевой ваты для колонок

Водопроводной водой со стеклянной химической посуды смывают видимые частицы или налет на стенках. Затем посуду промывают насыщенным раствором тринатрийфосфата (10-30 см³), обильно ополаскивают водопроводной водой и помещают в раствор дихромата калия в серной кислоте на 7-8 часов, после чего посуду обильно промывают последовательно водопроводной водой, насыщенным раствором тринатрийфосфата, дистиллированной водой, высушивают в сушильном шкафу. Далее, каждый предмет посуды ополаскивают последовательно ацетоном, дихлорметаном, толуолом, ацетоном и высушивают при 120-150⁰С в течение 30 минут.

Фильтр микроволокнистый стеклянный проходит те же стадии очистки, кроме обработки раствором тринатрийфосфата, прокаливают при 450⁰С в течение 4 часов.

10.2. Силанизирование посуды. Подготовленную по п. 10.1. посуду, охлаждают до комнатной температуры, ополаскивают 5% раствором диметилдихлорсилана в толуоле, выдерживают в течение 3 часов в сушильном шкафу при 250⁰С, а затем ее охлаждают до комнатной температуры и ополаскивают ацетоном.

10.3. Подготовка растворителей, сорбентов и осушителей.

а) Очистка гексана. 1-ый способ. К 4 дм³ гексана добавляют 150 г силикагеля, импрегнированного серной кислотой (п. 10.3 «в»). Смесь встряхивают в течение 6-8 часов. После оседания силикагеля растворитель декантируют и перегоняют, отбрасывая первый отгон (приблизительно 5%) и остаток (5%).

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

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

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

б) Активирование силикагеля и оксида алюминия.

Силикагель промывают последовательно двойными объемами метанола, метиленхлорида, затем активируют в сушильном шкафу 24 часа при 180⁰С.

Оксид алюминия активируют при 600⁰С в электропечи в течение 12 ч в кварцевых пробирках по 4 г в каждой, после чего ампулы закрывают и хранят в эксикаторе с осушителем.

в) Силикагель, импрегнированный серной кислотой.

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

г) Силикагель, импрегнированный гидроксидом калия.

Готовят метанольный раствор гидроксида калия, для чего 190 г гидроксида калия растворяют в 500 см³ метанола.

К 100 г активированного силикагеля (п. «б») приливают 500 см³ метанольного раствора гидроксида калия порциями по 50-70 см³ и интенсивно перемешивают до отсутствия комков. Смесь выдерживают ночь в закрытой посуде, затем ее отфильтровывают, промывают

метанолом до pH 6-7 и сушат током воздуха (воздух для сушки пропускается через трубку, заполненную гидроксидом натрия для удаления CO₂). Импрегнированный гидроксидом калия силикагель активируют при 180⁰C в течение 12 часов в сушильном шкафу.

д) Натрий серноокислый прокаливают при температуре 400⁰C в течение 4 часов.

е) Магний серноокислый прокаливают при температуре 450⁰C в течение 4 часов.

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

10.4. Подготовка колонок.

а) Подготовка угольной колонки.

Для угольной колонки используют стеклянную трубку длиной 90 мм, внутренним диаметром 3,5 мм с оплавленными концами (п.5.10). С одного конца трубки вводят тампон из кварцевой ваты, подготовленной по п. 10.1., высотой 10 мм. В колонку помещают 200 мг смеси активированного угля карбопак-С с целитом (1:10) и колонку уплотняют постукиванием. Вводят аналогичный тампон из кварцевой ваты, окончательно уплотняя сорбент.

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

б) Подготовка «многослойной» колонки.

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

в) Подготовка колонки с окисью алюминия.

Для колонки этого типа используют стеклянную трубку длиной 200 мм и внутренним диаметром 7 мм (п. 5.9.). Колонку набивают 4 г щелочным оксидом алюминия, предварительно активированный (п. 10.3. б.).

10.5. Приготовление растворов ПХДД и ПХДФ.

а) Приготовление исходных стандартных растворов меченных ¹³C₁₂-ПХДД и ПХДФ с концентрацией 1 мкг/см³ (стандарт-имитатор, внутренний стандарт), для чего проводят соответствующее разведение стандартных растворов изотопномеченных ¹³C₁₂-ПХДД и ПХДФ (п. 4.4).

Сосуды, в которых хранят растворы, маркируют и взвешивают для того, чтобы учесть потери растворителя в процессе испарения. Растворы хранят в мерных колбах с притертыми стеклянными пробками в холодильнике при температуре 4⁰C. Перед использованием растворы доводят до температуры окружающей среды и в случае необходимости корректируют уровень растворителя.

Растворы стабильны в течение 1 года.

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

Условия хранения растворов идентичны п. «а».

Растворы стабильны в течение 1 года.

в) Приготовление градуировочных растворов нативных соединений ¹²C₁₂-ПХДД и ¹²C₁₂-ПХДФ.

Приготовление градуировочных растворов смеси или отдельных наименований каждого имеющегося вещества в нативном виде ¹²C₁₂-ПХДД (¹²C₁₂-ПХДФ) проводят в мерных

колбах с использованием дозаторов, путем соответствующего разведения имеющихся (закупленных) концентраций растворов $^{12}\text{C}_{12}$ -ПХДД ($^{12}\text{C}_{12}$ -ПХДФ). При этом используют растворитель того же названия, который применялся в исходном растворе.

Готовят следующие концентрации: тетра- и пента-ХДД(Ф) от 10 до 100 нг/см³; гекса-ХДД(Ф) от 20 до 200 нг/см³; гепта-ХДД(Ф) от 40 до 400 нг/см³; окта-ХДД(Ф) от 100 до 1000 нг/см³. Для каждого вещества готовят не менее четырех концентраций.

Условия хранения растворов идентичны п. «а».

Растворы стабильны в течение 6 месяцев.

10.6. Подготовка аппаратуры.

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

10.7. Получение градуировочной зависимости для определяемых компонентов.

Во флаконы, плотно закрывающиеся пробками, вместимостью 1 см³ вводят дозатором по 0,095 см³ градуировочных растворов (п.10.5.в) и добавляют с помощью микрошприца по 0,005 см³ стандартного раствора $^{13}\text{C}_{12}$ -2,3,7,8-ТХДД (или набора изотопномеченых внутренних стандартов) с концентрацией 1 мкг/см³ (п. 10.5.б).

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

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

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

Таблица 2 -Массы регистрируемых ионов и соотношение площадей их пиков на масс-хроматограммах

Соединение	M1	M2	Соотношение площадей
1	2	3	4
ТХДД	319,897	321,894	0,77
ТХДФ	303,902	305,899	0,77
ПеХДД	355,855	357,852	1,32
ПеХДФ	339,860	341,857	1,32
ГкХДД	389,816	391,813	1,24
ГкХДФ	373,821	375,818	1,24
ГпХДД	423,777	425,774	1,05
ГпХДФ	407,782	409,779	1,05
охдд	557,738	559,735	0,89
ОХДФ	441,743	443,740	0,89

$^{13}\text{C}_{12}\text{ТХДД}$	331,931	333,934	0,77
---------------------------------	---------	---------	------

10.8. Подготовка и экстракция проб

10 г биологической пробы или крови помещают в колбу вместимостью 500 см³, дозатором вносят 0,01 см³ рабочего раствора меченого стандарта $^{13}\text{C}_{12}\text{-2,3,7,8-ТХДД}$ с концентрацией 10 нг/см³, добавляют 100 см³ ацетона и 100 см³ очищенной и проверенной на диоксины воды. Колбу помещают в ультразвуковую баню и через 10-15 минут в колбу добавляют 150 см³ гексана. Содержимое колбы озвучивают еще в течение 10 минут. Затем в колбу с образцом вносят 70-80 г сульфата аммония для получения насыщенного водного раствора сульфата аммония – 71%. Полученную смесь интенсивно перемешивают с помощью гомогенизатора в течение 30 минут, затем оставляют расслаиваться на 12-24 часа (разделение фаз происходит очень медленно). После чего гексановую фракцию отделяют и фильтруют через прокаленный сульфат магния, остаток в колбе дважды промывают 30-50 см³ гексана, отфильтровывают через слой сульфата магния под небольшим вакуумом, органические фазы объединяют.

10.9. Выделение ПХДД и ПХДФ

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

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

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

10.11. Очистка на колонке с оксидом алюминия

Объединенный экстракт пропускают через колонку с оксидом алюминия. Колбу смывают дважды 5 см³ гексана, который также пропускают через колонку. Колонку промывают последовательно 20 см³ смеси гексана и хлористого метилена (95:5 объем.) и элюируют 50 см³ смеси гексана и метиленхлорида (50:50 объем.). Элюат упаривают до объема около 2 см³ в колбе с дефлегматором, переносят во флакон Mini-Vial вместимостью 5 см³, добавляют 10 мкл тридекана и упаривают в токе азота до полного испарения растворителя (кроме тридекана).

Подготовленные для анализа пробы могут храниться до 40 суток при температуре не выше 4°С.

11. Проведение измерений

11.1. Условия проведения хроматографического анализа.

В связи с тем, что в настоящее время не существует капиллярных колонок, способных разделить все изомеры, в ряде случаев анализ проводят в два этапа. Сначала, применяют

неполярную колонку типа SE-54. Если обнаруживают: 1,2,3,7,8,9-ГкХДД; 2,3,7,8-ТХДФ; 2,3,4,7,8-ПеХДФ; 1,2,3,4,7,8-ГкХДФ, то ту же пробу анализируют на полярной колонке, например, SP2331, для определения именно этих изомеров.

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

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

где H_1 , H_2 - высоты неразрешенных пиков, h - высота долины между ними.

Для колонки с неподвижной фазой DB-5, например, можно рекомендовать следующую температурную программу: начальная температура термостата 120° С, скорость подъема температуры 20° С/мин до 240° С, с 240° С до 270° С -2° С/мин и выдержка при этой температуре до выхода всех компонентов. Температура инжектора и интерфейса 250°С. Температура источника ионов масс-спектрометра -250° С, энергия ионизирующих электронов - 50-70 эВ. Условия получения масс-спектров могут быть и другими в зависимости от типа масс-спектрометра и условий его юстировки. Необходимым условием является величина чувствительности системы ГХ-МС, которая должна обеспечивать регистрацию не менее 10 пг 2,3,7,8 ТХДД при отношении сигнал/шум равным 3.

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

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

Таблица 3 -Относительные времена удерживания хлорзамещенных ПХДД и ПХДФ

Время удерживания, мин / Неподвижная фаза			
№	Соединение	неполярная	полярная
п/п		Ultra-2	SP-2331
1	1,2,3,4-ТХДД	0,99	1,02
2	1,2,7,8-ТХДД	1,00	1,00
3	1,2,3,7,8-ПеХДД	1,23	1,40
4	1,2,3,4,7,8-ГкХДД	1,46	2,08
5	1,2,3,6,7,8-ГкХДД	1,47	1,94
6	1,2,3, 7,8,9-ГкХДД	1,50	2,15
7	1,2,3,4,6,7,8-ГпХДД	1,76	2,98
8	ОХДД	2,17	4,50
9	1,2,7,8-ТХДФ	0,96	0,96
10	1,2,3,7,8-ПеХДФ	1,18	0,31
11	2,3,4,7,8-ПеХДФ	1,22	1,35
12	1,2,3,4,7,8-ГкХДФ	1,39	2,01
13	1,2,3, 6,7,8-ГкХДФ	1,39	2,03
14	2,3,4,6,7,8-ГкХДФ	1,43	2,07
15	1,2,3, 7,8,9-ГкХДФ	1,48	2,09

16	1,2,3,4,6,7,8-ГпХДФ	1,61	2,83
17	1,2,3,4,7,8,9-ГпХДФ	1,74	2,96
18	ОХДФ	2,12	4,45

11.2. Получение масс-хроматограмм

Отбирают микрошприцем 0,002 см³ анализируемого раствора и вводят в инжектор газового хроматографа в режиме splitless или on-column. Регистрируют ионные масс-хроматограммы для ионов, соответствующих определяемым ПХДД и ПХДФ и используемым внутренним стандартам (табл.3).

ПРИМЕЧАНИЯ

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

2. Для обеспечения большей достоверности результатов желательно регистрировать большее число ионов для каждого соединения, а при использовании масс-спектрометрии низкого разрешения это необходимо; в качестве дополнительных ионов для регистрации желательно выбирать как изотопы молекулярных ионов, так и осколочные ионы (M-COC1)⁺.

12. Вычисление результатов измерений

По окончании анализа с помощью системы обработки данных фиксируют на масс-хроматограммах пики в области времен удерживания, соответствующих выходу 2,3,7,8-замещенных ПХДД и ПХДФ и внутренних стандартов.

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

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

Например, для ¹³C₁₂-2,3,7,8-ТХДД эффективность извлечения E рассчитывается по формуле:

$$E = \frac{A_s C_k}{A_k C_s} \times 100\%$$

где A_s - площадь пика на масс-хроматограмме иона m/z 332 или 334 для внутреннего стандарта-имитатора ¹³C₁₂-2,3,7,8-ТХДД (в единицах счета интегратора); A_k - площадь пика для внутреннего стандарта ¹³C₁₂-1,2,3,4-ТХДД (в единицах счета интегратора), C_k - количество

введенного стандарта-имитатора $^{13}\text{C}_{12-2,3,7,8}\text{-ТХДД}$ (пг), C_s -количество введенного внутреннего стандарта $^{13}\text{C}_{12-1,2,3,4}\text{-ТХДД}$ (пг).

Концентрацию обнаруженных компонентов X_j определяют по формуле:

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

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

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

Конечный результат анализа представляют следующим образом:

$$X \pm D, \text{ пг/г}, P = 0.95$$

где D - значение характеристики погрешности, рассчитанное по формуле

$D = 0,01 * d * X$ (X - содержание определяемого компонента в пробе), значения d приведены в таблице 1.

Результат представляют также в диоксиновых эквивалентах (ДЭ) путем умножения значений концентраций определяемых компонентов на соответствующие коэффициенты, приведенные в Приложении 1.

13. Контроль погрешности результатов измерений

13.1. Контроль правильности детектирования

Для доказательства правильности детектирования при каждом определении необходимо:

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

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

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

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

- интервал эффективности извлечения ПХДЦ и ПХДФ, определяемый по отношению: $^{13}\text{C}_{12-2,3,7,8}\text{-ТХДД} / ^{13}\text{C}_{12-1,2,3,4}\text{-ТХДД}$, должен быть в пределах 25%- 150%.

13.2. Оперативный контроль воспроизводимости.

Оперативный контроль воспроизводимости проводится периодически, через каждые 10-20 проб. Образцами контроля являются реальные пробы. Для анализа отбирают две параллельные пробы и анализируют в точном соответствии с прописью методики, максимально варьируя условия проведения анализа, т.е. получают два результата анализа, используя разные наборы мерной посуды, разные партии реактивов. В работе должны участвовать два аналитика. Оперативный контроль воспроизводимости проводят путем сравнения результата контрольной процедуры D_k , равного расхождению двух результатов измерений (первичного – X_1 и повторного - X_2) содержания компонентов в одной и той же пробе, с нормативом оперативного контроля воспроизводимости - D .

Воспроизводимость контрольных измерений, а также воспроизводимость результатов измерений рабочих проб, получаемых за период, в течение которого условия проведения анализа принимают стабильными и соответствующими условиям проведения контрольных измерений, признают удовлетворительной, если $D_k = |X_1 - X_2| < D$,

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

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

Таблица 4 Значения норматива оперативного контроля случайной составляющей относительной погрешности (воспроизводимости) при доверительной вероятности $P=0,95$

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

13.3. Оперативный контроль погрешности.

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

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

Оперативный контроль погрешности проводят с использованием метода добавок, который состоит в сравнении результата контрольной процедуры K_k , равного разности между результатом контрольного измерения содержания ПХДД и ПХДФ, замещенных в положениях 2,3,7,8, в пробе с известной добавкой X' , в пробе без добавки X и величиной добавки C , с нормативом оперативного контроля погрешности K_d .

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

Погрешность считается удовлетворительной, если выполняется условие:

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

Норматив оперативного контроля погрешности (допускаемое значение разности между результатом контрольного измерения пробы с добавкой X' , пробы X и величины добавки – C)

во всем диапазоне измеряемых массовых концентраций определяемых ПХДД и ПХДФ рассчитывают по формулам:

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

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

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

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

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

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

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

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

ПРИМЕЧАНИЯ:

1. Образцы для контроля анализируют в одной серии с реальными текущими рабочими пробами.

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

Форма представления результатов анализа.

Наименование организации, проведший анализ. Номер аттестата аккредитации.

ПРОТОКОЛ № _____ от «___» _____

количественного химического анализа полихлорированных

дибензо-п-диоксинов

Краткое описание пробы (шифр; наименование и характеристики пробы и условий пробоотбора).

Методика КХА

Определяемый компонент, ПХДД и ПХДФ	Диоксиновый эквивалент, ДЭ	РЕЗУЛЬТАТ АНАЛИЗА	
		Концентрация, пг/г	Концентрация в ДЭ, пг/г
2,3,7,8-ТХДД	1		
1,2,3,7,8-ПеХДД	0,5		
1,2,3,4,7,8-ГкХДД	0,1		
1,2,3,6,7,8-ГкХДЦ	0,1		
1,2,3,7,8,9-ГкХДД	0,1		
1,2,3,4,6,7,8-ГпХДД	0,01		
ОХДД	0,001		
2,3,7,8-ТХДФ	0,1		
1,2,3,7,8-ПеХДФ	0,05		
2,3,4,7,8-ПеХДФ	0,5		
1,2,3,4,7,8-ГкХДФ	0,1		
1,2,3,6,7,8-ГкХДФ	0,1		
2,3,4,6,7,8-ГкХДФ	од		
1,2,3,7,8,9-ГкХДФ	0,1		
1,2,3,4,6,7,8-ГпХДФ	0,01		
1,2,3,4,7,8,9-ГпХДФ	0,01		
ОХДФ	0,001		
Другие ТХДД			
Другие ТХДФ			
Другие ПеХДЦ			
Другие ПеХДФ			
Другие ГкХДД			
Другие ГкХДФ			
Другой ГпХДД			
Другие ГпХДФ			
Предел обнаружения по ¹³ C ₁₂ - 2,3,7,8-ТХДД, пг/г		Суммарная концентрация в ДЭ, пг/г	
Относительная погрешность определения, %			

Подпись ответственного исполнителя

Примечание: допустимо представление другой, дополнительной информации по характеристикам проб, пробоотбору и результатам анализов.