ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения»

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКСИЧНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ В МОЛОКЕ И МОЛОЧНОЙ ПРОДУКЦИИ МЕТОДОМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ С ИНДУКТИВНО СВЯЗАННОЙ ПЛАЗМОЙ (ICP-MS)

д.б.н. Уланова Т.С., к.б.н. ***Гилева О.В.,***
Стенно Е.В., Недошитова А.В.

Пермь 2015

Международные и отечественные стандарты для молока и молочных продуктов

International Dairy Federation (IFD)

- Bulletin of the IDF No. 465/2013 - Identification and assessment of emerging issues associated with chemical contaminants in dairy products

The European Food Safety Authority (EFSA)

- Opinion of the EFSA CONTAM Panel related to Arsenic as undesirable substance in animal feed (http://www.efsa.europa.eu/en/science/contam/contam_opinions/185.html)
- Opinion of the EFSA CONTAM Panel related to Cadmium as undesirable substance in animal feed (http://www.efsa.europa.eu/en/science/contam/contam_opinions/475.html)
- Opinion of the EFSA CONTAM Panel related to Lead as undesirable substance in animal feed (http://www.efsa.europa.eu/en/science/contam/contam_opinions/474.html)

EUROPEAN COMMISSION(EC)

COMMISSION REGULATION No 1881/2006 of 19 December 2006 Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs // Official Journal of the European, 2006

Turk Food Codex (TFC)

Regulation of setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs, 2002.

Egyptian Organization for Standardization and Quality Control (EOS)

Egyptian Standard № 2360. Maximum levels of heavy metal contaminants in food, 1993.

Продовольственная и сельскохозяйственная организация Объединенных наций (FAO)

Compendium of food additive specifications, 2013

Технический регламент Таможенного союза

ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции» (от 9 декабря 2011 года № 880)

СанПин 2.3.2.1078-01

Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности продуктов детского питания (с изменениями на 1 июня 2011 года)

Международные стандарты для молока и молочных продуктов. Методы определения.

- **ISO/TS 6733:2006** Определение содержания свинца. Спектрометрический метод атомной абсорбции с применением графитовой печи.
- ***US EPA Method 200.8*** Способ анализа водных и солевых растворов методом ICP – MS.
- ***EN 15763:2010*** Пища. Определение микроэлементов. Определение мышьяка, кадмия, ртути и свинца в пищевых продуктах методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой после разложения под давлением.
- ***FDA U.S. EAM 4.7*** Elemental Analysis Manual. Inductively coupled plasma-mass spectrometric determination of arsenic, cadmium, chromium, lead, mercury, and other elements in food using microwave assisted digestion.

Рекомендуемые и используемые методы анализа в РФ

Нормативный документ	Метод определения	Определяемые элементы
Атомно-абсобционный метод определения токсичных элементов ГОСТ 30178-96	Атомно-абсорбционный метод с атомизацией в пламени	Pb, Cd, Cu, Zn, Fe
Методика выполнения измерений массовой доли меди и цинка в пищевых продуктах и продовольственном сырье МУК4.1.991- 00	Атомно-абсорбционный с электротермической атомизацией	Cu, Zn
Методика выполнения измерений массовой доли свинца и кадмия в пищевых продуктах и продовольственном сырье МУК 4.1.986-00	Атомно-абсорбционный с электротермической атомизацией	Pb, Cd
Методика определения токсичных элементов атомно-эмиссионным методом. Продукты пищевые. ГОСТ 30538-97	Атомно-эмиссионный с ионизацией в индуктивно связанной плазме	Cd, Pb, Cu, Zn, Fe, Sn, As
ГОСТ Р 53183-2008 Продукты пищевые. Определение следовых элементов. Определение ртути	Атомно-абсорбционная спектрометрия холодного пара с предварительной минерализацией пробы под давлением	Hg
МУ 31-05/04 Методика выполнения измерений массовой концентрации мышьяка (As) в пищевых продуктах, продовольственном сырье, кормах и продуктах их переработки, БАДах.	Вольтамперометрия	As
ГОСТ Р 51766-2001 Сырье и продукты пищевые. Атомно-абсорбционный метод определения мышьяка	Атомно-абсорбционный с электротермической атомизацией	As

ГОСТ EN 13804-2013 «Продукты пищевые. Определение следовых элементов»

<u>критерии эффективности методик выполнения измерений</u>

- при выборе методики определения для данной матрицы (конкретного пищевого продукта) более предпочтительна методика, регламентированная специальным стандартом для данного продукта, чем методика, распространяющаяся на все пищевые продукты

Цель исследования

- разработка и совершенствование методического обеспечения определения кадмия, свинца, мышьяка и ртути в молоке и молочной продукции в широком диапазоне концентраций с использованием высокочувствительного метода масс – спектрометрии с индуктивно связанной аргоновой плазмой.

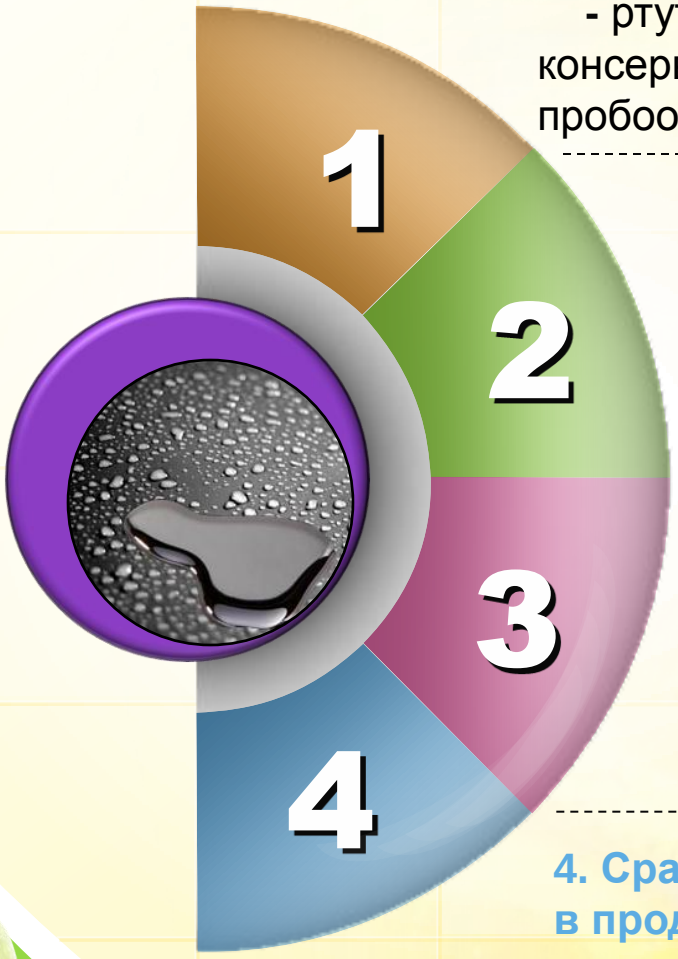
Задачи

1. Обоснование схемы отбора и подготовки образцов к анализу
2. Обоснование оптимальных параметров настройки чувствительности масс-спектрометра, реакционно/столкновительной ячейки
3. Установление градуировочной характеристики, диапазонов определяемых концентраций, пределов определения, предварительная метрологическая аттестация
4. Апробация метода

Материалы и методы

- Масс-спектрометр с индуктивно связанной плазмой Agilent 7500cx с октопольной реакционной/столкновительной ячейкой (USA). В качестве газа – реактанта гелий He
- Система микроволнового разложения проб SpeedWave SW-4 (Berghoff, Германия)
- Система очистки воды Milli-Q Integral-3 (Millipore, Франция)
- Настроечный раствор Tuning Solution, с концентрацией Li, Mg, Y, Ce, Tl, Co 1 мкг/дм^3
- Комплексный внутренний стандарт Bi^{209}, Ge^{72}, In^{115}, Li^{6}, Sc^{45}, Tb^{159}, Y^{89}
- Комплексный калибровочный раствор (Multi-element Calibration Standart 2A) (USA) с концентрацией 10 мг/л
- Внутренний стандарт родия ^{103}Rh (Rhodium Internal Standard Stock Solution, USA)
- Стандартный раствор ионов ртути с концентрацией 10 мг/дм^3 в 5% растворе азотной кислоты (Calibration Standard 2A – HG, USA)
- Особо чистая азотная кислота (Nitric Acid, 30702, Sigma - Aldrich)
- Молоко питьевое пастеризованное с жирностью 2,5% («Молкомбинат Кунгурский», «Маслозавод Нытвенский», «Вемол» Верещагино, "Чайковский молокозавод")

Ртуть как химический элемент. Физико-химические свойства.



1. Летучесть

- ртути определяет необходимость консервирования образца на стадии пробоотбора.

2. Высокий потенциал ионизации

- существенно ограничивает эффективность ионизации ртути в плазме и приводит к низкой чувствительности метода.

3. Эффект «памяти»

- объясняется плохой смываемостью остаточных количеств ртути на подающих путях масс-спектрометра, распылительной камере и горелке, деталях интерфейса.

4. Сравнительно низкие концентрации в продукте

Матричный эффект. Схема микроволнового разложения проб и подготовки к масс-спектрометрическому анализу

01

Разложение жидких молочных продуктов

- пробу объемом 3,5 см^3 вносили в кварцевые вкладыши или в тефлоновые автоклавы
- добавляли 0,05 см^3 раствора внутреннего стандарта родия (^{103}Rh) с массовой концентрацией ионов 1000 мкг/дм^3
- Добавляли 4,5 см^3 концентрированной азотной кислоты плотностью 1,415 г/см^3
- Оставляли на 5 – 10 мин открытыми, добавляли 1,5 см^3 концентрированной перекиси водорода
- Устанавливали в систему микроволнового разложения

02

Разложение густых и твердых молочных продуктов

- пробу массой 0,5 г вносили в кварцевые вкладыши или в тефлоновые автоклавы
- добавляли 0,1 см^3 раствора внутреннего стандарта родия (^{103}Rh) с массовой концентрацией ионов 1000 мкг/дм^3
- добавляли 6,0 см^3 концентрированной азотной кислоты плотностью 1,415 г/см^3
- Смесь оставляли на 5 – 10 мин открытой, добавляли 3,5 см^3 концентрированной перекиси водорода
- Устанавливали в систему микроволнового разложения

03

Подготовка к анализу

- Полученный минерализат количественно переносили в мерную пластиковую колбу объемом 50 см^3, автоклавы промывали 2-3 раза деионизованной водой, смыв также переносили в колбу.
- Подготовленные растворы использовали для измерений массовых концентраций элементов.
- Параллельно для каждой серии проб готовили холостой опыт, который подвергался всем стадиям пробоподготовки и включал все используемые реактивы, что и анализируемые пробы.

Инструментальные настройки масс-спектрометра

Мощность высокочастотного сигнала	1500-1600 Вт
Расстояние от горелки до отбирающего конуса	7,2 мм
Reaction mode (He)	4,5-5,0 мл/мин
Вытягивающая линза 1	2,7 В
Вытягивающая линза 2	-67 В
Смещающая омега-линза для 7500cx	-16 В
Омега-линза (отделяет ионы) для 7500_{cx}	3,8 В
Линза на входе реакционной ячейки	-36 В
Линза, фокусирующая на квадруполь	5 В
Линза на выходе реакционной ячейки	-34 В
Высокочастотное напряжение на октополе	160 В
Смещающее напряжение на октополе	-6 В
Скорость подачи образца	0,4мл/мин
Период интегрирования при концентрации до 1 мкг/л	0,1сек

Эффект «памяти»

• **завышение результатов анализа, градуировочный график нестабилен и нелинейный**

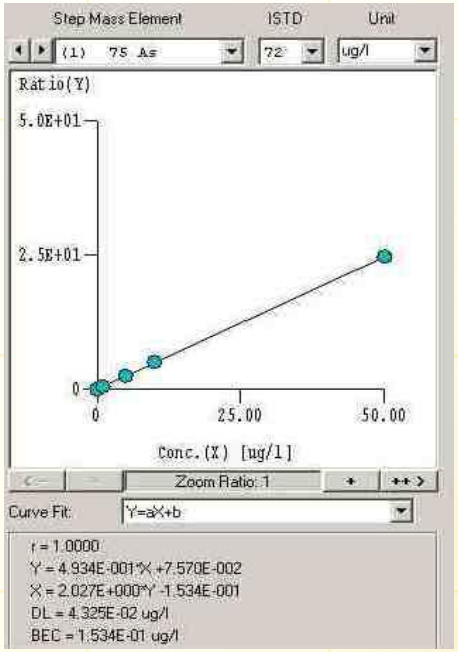
раствор хлорида золота (III) $AuCl_3$

вносили для ***повышения эффективности ионизации ртути и ее смываемости с подающих путей прибора*** в каждый исследуемый образец, градуировочный раствор, раствор для промывания. Конечная концентрация $AuCl_3$ во всех растворах составляла 5 мкг/ дм^3.

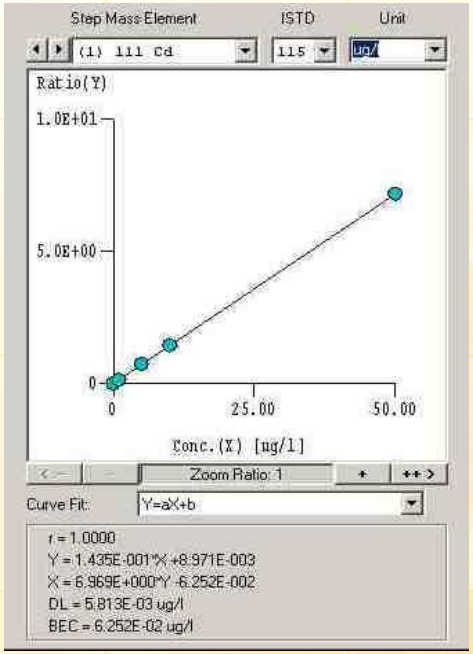
Градуировочный график

в плазму ***сначала подаются реальные пробы с низким содержанием ртути***, а затем растворы для градуировки от самого низкого к более концентрированному. Необходимо отметить, что при исследовании ртути в молоке и молочной продукции методом ICP-MS ***верхняя точка градуировочного графика не должна превышать 1,0 мкг/дм^3***, это также минимизирует загрязнение прибора, а следовательно и «эффект памяти». Построение градуировочного графика проводили по точкам 0,0; 0,1;0,5;1,0 мкг/дм^3.

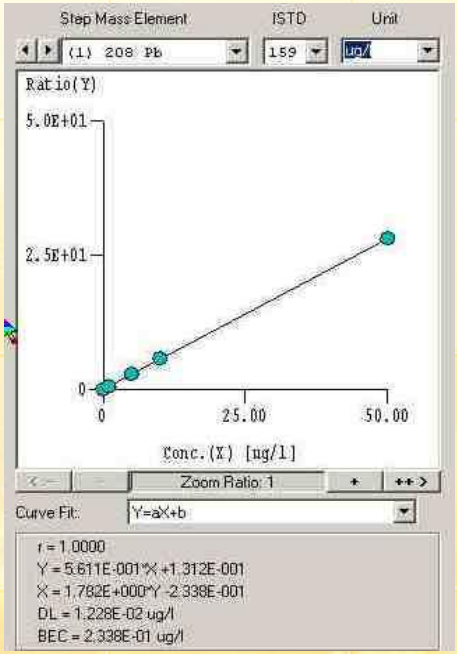
Градуировочные графики и пределы определения исследуемых химических элементов (LOQ)



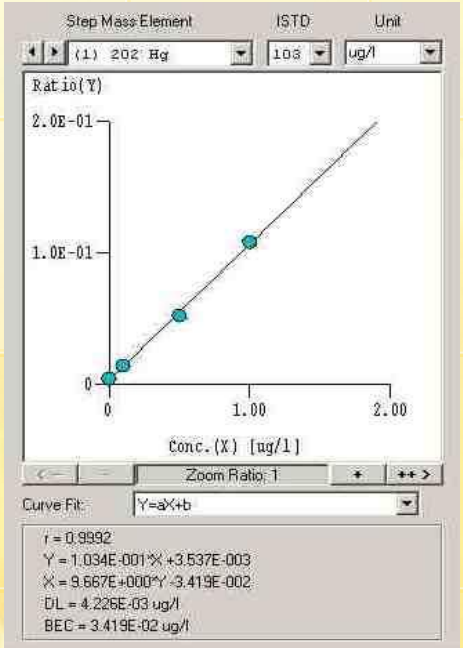
As



Cd



Pb



Hg

Элемент	LOD (мг/кг)	LOQ (мг/кг)	
		Жидкий продукт	Густой и твердый продукт
Мышьяк	0,0007	0,0024	0,030
Кадмий	0,00013	0,0004	0,006
Свинец	0,002	0,0066	0,09
Ртуть	0,0002	0,0007	0,01

FSIS 48/04. 2000 UK Total Diet Study of 12 elements (TDS). March, 2004. - 26 p.

Результаты предварительной метрологической аттестации метода

Диапазон измерений массовых концентраций элемента **в продукте**, мг/кг (л)	Показатели прецизионности (относительные значения), %		Показатель правильности (границы относительной систематической погрешности при доверительной вероятности 0,95), $\delta_c \pm$,%	Показатель точности (границы относительной погрешности при Р=0,95), $\pm\ \delta_л$, %
	стандартное отклонение повторяемости, σ_r, %	стандартное отклонение внутри-лабораторной прецизионности, $\sigma_{Rл}$,, %		
Мышьяк				
от 0,0024 до 1,0 от 0,030 до 10,0	12,3	12,5	11,6	27,1
Кадмий				
от 0,0004 до 1,0 от 0,006 до 10,0	5,2	14,0	15,6	31,5
Свинец				
от 0,0066 до 1,0 от 0,090 до 10,0	5,7	10,0	17,3	26,0
Ртуть				
от 0,001 до 0,015 от 0,01 до 0,2	5,7	11,2	21,7	30,9

Апробация метода. Пастеризованное молоко различных производителей Пермского края (N=170)

Концентрация мг/л в продукте **As** ПДК=0,005		Концентрация мг/л в продукте **Pb** ПДК=0,1		Концентрация мг/л в продукте **Cd** ПДК=0,03		Концентрация мг/л в продукте **Hg** ПДК=0,005	
FG-AAS	ICP-MS LOQ=0,0024	FG-AAS	ICP-MS LOQ=0,0066	FG-AAS	ICP-MS LOQ=0,0004	FG-AAS	ICP-MS LOQ=0,0007
<0,005	0,0024 ±0,0006	<0,02	0,014 ±0,0036	<0,01	0,0005 ±0,0002	<0,002	0,0013 ±0,0003
<0,005	0,0026 ±0,0007	<0,02		<0,01	0,0015 ±0,00046	<0,002	0,0009 ±0,0003
<0,005	0,0026 ±0,0007	<0,02		<0,01	0,00041 ±0,00012	<0,002	0,0007 ±0,0002
<0,005	0,0033 ±0,0009	<0,02		<0,01	0,00047 ±0,00014	<0,002	0,0007 ±0,0002

Выводы

1. Разработана методика измерений массовых концентраций химических элементов (кадмий, свинец, мышьяк, ртуть) в молочных продуктах методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой. Проведена предварительная метрологическая аттестация методики для измерения концентраций элементов в жидких и густых и твердых молочных продуктах для диапазонов определения в продукте и непосредственно в анализируемом растворе.

2. Отработанная схема пробоподготовки образцов в системе микроволнового разложения позволяет устранить проблему потери мышьяка и ртути за счет их летучести.

3. Обоснованные инструментальные настройки прибора в реакционном режиме работы масс-спектрометра с использованием гелия в качестве газа-реактанта позволили устранить интерференционное наложение хлорид-ионов при совместном определении ртути и мышьяка.

4. Оптимальные условия подачи и ввода образца в прибор, параметры сбора информации позволили минимизировать эффект «памяти» при определении ионов ртути.

5. Нижние пределы обнаружения измеряемых элементов (мышьяк, кадмий, свинец, ртуть) позволяют выполнять их количественное определение в молоке и молочных продуктах на уровне, значительно ниже установленных допустимых норм.

6. Разработанная методика апробирована при исследовании образцов молока с жирностью 2,5% от различных производителей Пермского края. Установлено достоверное содержание токсичных элементов, превышение содержания относительно допустимых норм не обнаружено.

7. Методические указания по измерению массовых концентраций химических элементов (кадмий, свинец, мышьяк, ртуть) в молочных продуктах методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой могут быть использованы для проведения лабораторных исследований по безопасности пищевой продукции учреждениями Роспотребнадзора Российской Федерации, а также предприятиями и учреждениями, осуществляющими контроль качества и исследование пищевых продуктов и продовольственного сырья.

Благодарю за внимание!