



**ЦЕНТР
ХИМИЧЕСКИХ
ИССЛЕДОВАНИЙ**

Общество с ограниченной ответственностью
«Центр химических исследований»
ОГРН 1137746231314
Тел.: +7(499) 372-22-44, e-mail: ccrlab@yandex.ru
www.центр-химических-исследований.рф

ЗАКЛЮЧЕНИЕ СПЕЦИАЛИСТА

по результатам химического исследования

№26-11-3/18

от «10» декабря 2018 г.

«26» ноября 2018 г., 14 час. 00 мин.
(дата, время начала производства исследования)

«10» декабря 2018 г., 18 час. 00 мин.
(дата, время окончания производства исследования)

г. Москва
(место производства исследования)

Специалист, выполнивший исследование:

Урваев Денис Геннадьевич

ООО «Центр химических исследований»

Генеральный директор

/Топилин С.В



Центр химических исследований
Общество с ограниченной ответственностью

ВВОДНАЯ ЧАСТЬ.

I. «26» ноября 2018 года в ООО «Центр химических исследований» поступил запрос на проведение химического исследования.

II. При запросе на исследование представлены материалы:

Ускоритель биологических процессов «Биус», 0,5 л.

III. На разрешение специалиста поставлены следующие вопросы:

1. Определение химического состава ускорителя биологических процессов "Биус".

2. Определение наличия микроорганизмов (дрожжи, плесени, бактерии).

3. Определение индекса токсичности образца при разбавлении 1:5 с водой по методике ПНДФ Т 14.1:2:3:4.11-04.

IV. Проведение исследования поручено Урваеву Денису Геннадьевичу.

Сведения о специалисте: Урваев Денис Геннадьевич - эксперт в области проведения химических экспертиз. Имеет высшее образование по специальности «Химия» (диплом Оренбургского государственного университета, рег. номер 050898, от 05.07.2005 г.). Имеет ученую степень кандидата химических наук (диплом серии КНД №013471). Прошел повышение квалификации по программе подготовки негосударственных судебных экспертов в АНО ДПО «Современная научно-технологическая академия» по программе «Методы химического анализа» (№ У02418.07/17/1). Стаж работы по специальности – с 2005 г.

V. Сведения об экспертном учреждении:

Общество с ограниченной ответственностью «Центр химических исследований» (ООО «ЦХИ») зарегистрировано в установленном порядке. Свидетельство о государственной регистрации ОГРН 1137746231314.

ООО «Центр химических исследований» осуществляет деятельность на основании Устава и действующего законодательства Российской Федерации. Проведение химических исследований и экспертиз является уставной деятельностью организации.

Специалист:



Д.Г.Урваев

Центр химических исследований
ООО «ЦХИ»

Стр. 2

Организация «Центр химических исследований» сертифицирована в соответствии с международным стандартом ISO 9001 (сертификат соответствия RU.МСК.009.005.СМ.11886 действителен до 30.08.2022 г).

ООО «Центр химических исследований» аккредитовано на проведение судебных экспертиз и исследований (Свидетельство об аккредитации серии А № 69/18 от 23.06.2018) и соответствует требованиям к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий ГОСТ ИСО / МЭК 17025-2009 (Аттестат аккредитации испытательной лаборатории №RU.НЦСС.АЛ.030 от 22.11.2018 г.).

Юридический адрес: 115172, г. Москва, ул. М. Каменщики, д. 18, стр. 16.

Телефон: 8(499)372-22-44. Интернет-сайт: центр-химических-исследований.рф. Адрес электронной почты: ccrlab@yandex.ru.

VI. Перечень оборудования:

1. ВЭЖХ / хроматомасс спектрометр Agilent 1200 Series.
2. Ультразвуковая ванна Ya Xun YX2100.
3. Весы аналитические OHAUS PA-214C свидетельство о поверке № ГВ428 от 05.04.2018 г. до 04.04.2019 г.
4. Мерные колбы.
5. Шкаф сушильный ШС-80-01.
6. Муфельная печь.
7. Воронки.
8. Ареометр АОН-4;
9. Мерный цилиндр.
10. Пипетки.
11. Спектральный комплекс на базе ИК-Фурье спектрометра Nicolet iS10.
12. Экспресс тесты МЭТ-НПАВ-РС и МЭТ-АПАВ-РС, МЭТ-КПАВ-РС.
13. Микробиологические экспресс-тесты «БИОКОНТРОЛЬ» с питательными средами №1 и №2.
14. Лакмусовая бумага.

VII. Перечень использованной литературы:

1. Большой химический справочник. А.И. Волков И.М. Жарский. – Изд. Современная школа, 2005 г.

Специалист:



Д.Г.Урваев

Центр химических исследований
ООО «ЦХИ»

Стр. 3

2. Неорганическая химия. Н.А. Абакумова, Н.Н. Быкова – Тамбов: Изд-во Тамб. гос. техн. ун-та – 2009 г. – 124 с.
3. Васильев В.П. Аналитическая химия. В 2 ч. Часть 2 Физико-химические методы анализа — М.: Высш. школа, 1989 — 384 с.
4. Практическое руководство по жидкостной хроматографии. Сычев К.С. - Москва: Техносфера, 2010 - 272 с.
5. Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография - Е.Л. Стыскин, Л.Б. Ициксон, Е.В. Брауде.
6. ИК-спектры основных классов органических соединений. Справочные материалы. Тарасевич Б. Н. – Москва, 2012 г. – 54 с;
7. Смит А. Л. Прикладная ИК-спектроскопия. / Пер. с англ. М.: Мир, 1982. 328 с.
8. Практикум по микробиологии: Учебное пособие для студентов высших учебных заведений /А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук и др. под ред. А.И. Нетрусова М.: Изд. Центр «Академия» 2005. - 600с.
9. "Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению интенсивности бактериальной биолюминесценции тест-системой "Эколюм". ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.11-04 (16.1:2.3:3.8-04)" (утв. МПР РФ 10.09.2004).
10. ГОСТ 18995.1-73. Продукты химические жидкие. Методы определения плотности (с Изменениями N 1, 2).

ИССЛЕДОВАНИЕ

Описание объекта исследования.

Объект исследования представляет собой желтоватую жидкость в пластиковой бутылке ускорителя биологических процессов «Биус». Внешний вид образца представлен на фотографиях в приложении 1.

Методы.

- Высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-селективным детектором. Наиболее перспективный аналитический вариант классической колоночной хроматографии в современном приборном исполнении. ВЭЖХ позволяет проводить одновременное разделение сложных проб на составляющие их компоненты, детектирование большинства компонентов, измерение концентрации одного или нескольких соединений (в зависимости от конкретных аналитических задач и наличия стандартных образцов).

Специалист:



Д.Г.Урваев

Стр. 4

Детектирование может осуществляться, как и при газохроматографическом методе, так и при помощи масс-селективного детектора. Способ ионизации, применяемый в масс-детекторе (в настоящей работе) это электроспрей-ионизация (ионизация распылением в электрическом поле. ESI, англ. electrospray ionization).

- Инфракрасная Фурье спектроскопия. Полосы поглощения появляются в результате переходов между колебательными уровнями основного электронного состояния изучаемой системы. Спектральные характеристики (положения максимумов полос, их полуширина, интенсивность) индивидуальной молекулы зависят от масс составляющих ее атомов, геометрии строения, особенностей межатомных сил, распределения заряда и др. Поэтому инфракрасные спектры отличаются большой индивидуальностью, что и определяет их ценность при идентификации и изучении строения соединений.

- Качественные реакции - совокупность химических, физико-химических и физических методов, применяемых для обнаружения элементов, радикалов и соединений, входящих в состав анализируемого вещества или смеси веществ.

- Экспресс-тест на ОМЧ (общее микробное число) и содержание грибов/дрожжей. Нормативный способ контроля чистоты заключается в том, что готовится питательная среда, на которую осуществляется посев пробы. Проверке чистоты может быть подвергнута любая проба – жидкая, густая, твёрдая (в том числе оборудование, стены, спецодежда), а также воздух. Светлая сторона служит для определения бактерий: чем больше в пробе микроорганизмов, тем больше точек будет на экспресс-тесте. На более тёмной стороне вырастают дрожжеподобные и мицелиальные грибы.

- Количественный контроль степени интегральной токсичности образцов на основе билюминесцентного анализа. Метод основан на технологии экологического контроля, в которой используются высокочувствительный специализированный микробный сенсор «Эколюм», реагирующий изменением интенсивности спонтанной билюминесценции на наличие в анализируемых пробах токсических веществ различной химической природы.

- Гравиметрия (весовой анализ). Метод количественного анализа в аналитической химии, который основан на измерении массы определяемого компонента, выделенном в виде веществ определённого состава.

- ГОСТ 18995.1-73 (СТ СЭВ 1504-79) Продукты химические жидкие. Методы определения плотности (с Изменениями N 1, 2).

Исследование по вопросу 1.

Определение химического состава ускорителя биологических процессов "Биус".

Исследуемый образец высушивали в сушильном шкафу при температуре 105°C. Массовая доля сухого остатка 0,53 %. Также образец озоляли при 1000°C в муфельной печи. Образец полностью озолился. То есть неорганических компонентов в составе образца нет.

Определяли плотность исследуемого образца. Испытание образца проводилось в соответствии с ГОСТ 18995.1-73 (СТ СЭВ 1504-79) Продукты химические жидкие. Методы определения плотности (с Изменениями N 1, 2).

Ход исследования: образец помещали в чистый сухой цилиндр так, чтобы уровень жидкости не доходил до верхнего его края на 3-4 см. Цилиндр с жидкостью помещали в термостат с температурой (20±0,1) °C. Измерение температуры образца проводили при использовании термометра, которым аккуратно перемешивали образец в цилиндре. Когда температура жидкости установилась на 20±0,1 °C, цилиндр вынимали из термостата. В цилиндр осторожно опускали чистый сухой ареометр. Отсчитывали показания по нижнему краю мениска (при использовании ареометров общего назначения). После определения плотности снова измеряли температуру испытуемой жидкости. Разность температур, измеренных до проведения испытания и после него, превышала на 0,1 °C.

Результат исследования: в ходе проведенного исследования, было установлено, что плотность образца равна 0,999 г/см³.

Сухой остаток образца исследовали методом ИК-Фурье спектроскопии с использованием спектрального комплекса на базе ИК-Фурье спектрометра Nicolet iS10, в режиме НПВО (нарушенного полного внутреннего отражения), кристалл – германий.

В результате анализа ИК-спектра образца было установлено, что он представляет собой полиоксиэтилен изооктилфениловый эфир. Это подтверждается совпадением основных максимумов и минимумов ИК-спектра образца и ИК-спектров веществ из базы данных ИК-спектров.

ИК-спектр образца и ИК-спектры сравнения представлены в приложении 2.

Образец в чистом виде исследовали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Образец хроматографировали в следующих условиях:

Колонка: ReprosilPurBasicC18 250x4,6 мм, 5 мкм

Буфер А – Вода + 100мкл/л ТФУК;

Буфер В – Ацетонитрил + 100мкл/л ТФУК;

Градиент от 5 до 100% ацетонитрила за 20 минут.

Скорость потока – 1 мл мин.

Результаты анализа.

На хроматограммах образца зафиксированы различные пики.

При анализе полученных масс-спектров было установлено, что имеются пики с разницей $m/z = 44$, что может соответствовать –соединению содержащему полиэтиленгликольные фрагменты $(-CH_2-CH_2-O-)_n$.

Полученные результаты подтверждают результаты ИК-спектроскопии. Образец содержит – полиоксиэтилен изооктилфениловый эфир.

Хроматограммы и масс-спектры образца представлены в приложении 3.

Также с помощью универсального индикатора устанавливали значение рН исследуемого образца, которое составляет 5-6 ед. рН.

В пробирку с воронкой вносили образец. В одну пробирку добавляли образец, во вторую - воду. Обе пробирки помещали в водяную баню при температуре 37 °С на 10 минут. Затем добавляли в обе пробирки по 10 капель 0,1% раствора крахмала. Через 5 минут добавляли в обе пробирки по 5 капель реактива Люголя. В первой пробирке жидкость окрашивается в желтый цвет, во второй пробирке, где образец отсутствует – содержимое пробирки окрашивается в синий цвет. Данная качественная реакция свидетельствует, о том что фермент содержащийся в образце разлагает крахмал. Следовательно, образец содержит ферменты, в частности амилазу.

Проводили качественные реакции на наличие различных поверхностно активных веществ с помощью тест-система для определения АПАВ МЭТ-АПАВ-РС, КПАВ МЭТ-КПАВ-РС производства ООО «МедЭкоТест», Москва.

В результате проведенных качественных реакций было установлено, что исследуемые образец содержит анионные поверхностно-актив АПАВ. КПАВ не обнаружены в исследуемых образцах.

Проводили качественную реакцию с образцом на наличие воды с безводным сульфатом меди. Результат положительный.

Таким образом, было установлено, что исследуемый образец содержит воду, полиоксиэтилен изооктилфениловый эфир, амилазу, АПАВ. Плотность образца 0,999 г/см³. рН составляет 5-6 ед.

Исследование по вопросу 2.

Определение наличия микроорганизмов (дрожжи, плесени, бактерии).

Для установления микробиологической загрязненности бактериями и грибами был применен экспресс-тест «БИОКОНТРОЛЬ». В экспресс-тесте «БИОКОНТРОЛЬ» в качестве питательных сред используются агар розового цвета (определение общего микробного числа) и агар красного цвета (определение дрожжей и грибов). Данные питательные среды соответствуют питательным средам № 1 и № 2 по Госфармакопее 11.

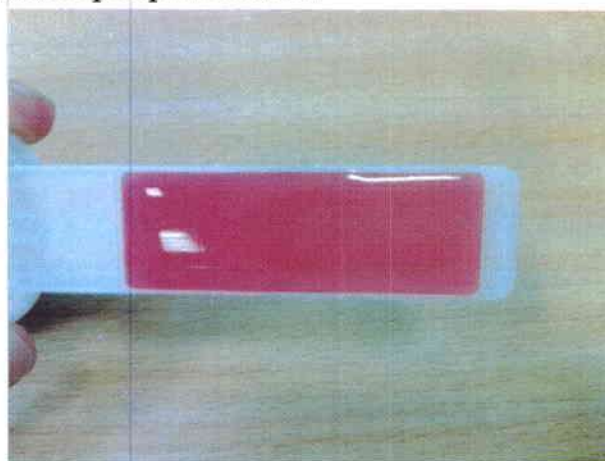
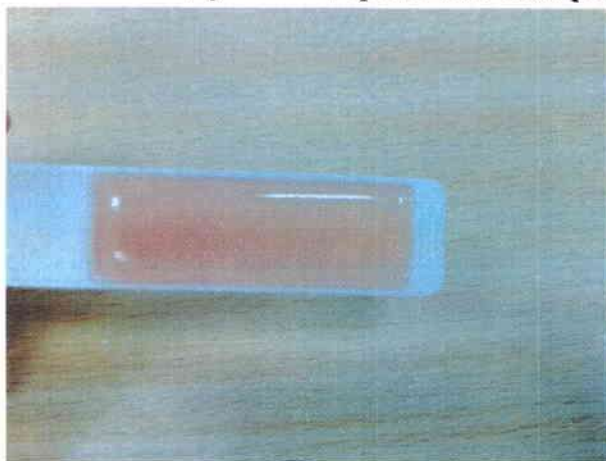
Питательная среда — однокомпонентный или многокомпонентный субстрат, применяемый для культивирования микроорганизмов или культур клеток высших организмов.

Проведение анализа: образец наносили на пластину с двух сторон. После этого пластину помещали обратно в пробирку, закрывали крышкой и убирали в темное защищенное от солнца место при температуре 25°C.

Через 24 часа после нанесения пробы на питательную среду №1 пробирку доставали и осматривали. В результате осмотра пластины образца было отмечено отсутствие колоний бактерий, что свидетельствует об их отсутствии в образце. После осмотра пробирку убирали в темное защищенное от солнца место при температуре 25°C.

Через 72 часа после нанесения пробы на питательную среду №2 пробирку доставали и осматривали. В результате осмотра было отмечено, что колонии дрожжей или грибов не выросли, что говорит об отсутствии спор дрожжей, плесени или грибов.

Исследуемый образец не содержит микроорганизмов.



Питательная среда № 1

Питательная среда № 2

Исследование по вопросу 3.

Определение индекса токсичности образца при разбавлении 1:5 с водой по методике ПНДФ Т 14.1:2:3:4.11-04.

Для определения возможного опасного для жизни или здоровья действия образца была определена токсичность образца, на основании измерения его индекса токсичности.

Токсичность - степень проявления ядовитого действия разнообразных химических соединений и их смесей.

Критерий токсичности (индекс токсичности) - достоверное количественное значение тест-параметра, на основании которого делается вывод о токсичности. Среди тест-параметров наиболее часто используются выживаемость, плодовитость, подавление ферментативной и метаболической активности организмов.

В качестве тест-объекта используются препараты «Эколюм» лиофилизированных люминесцентных бактерий или ферментные препараты бактериальной люциферазы. Методика основана на определении изменения интенсивности бактериальной биолюминесценции при воздействии химических веществ, присутствующих в анализируемой пробе, по сравнению с контролем. Люминесцентные бактерии оптимальным образом сочетают в себе различные типы чувствительных структур, ответственных за генерацию биоповреждений (клеточная мембрана, цепи метаболического обмена, генетический аппарат), с экспрессностью, объективным и количественным характером отклика целостной системы на интегральное воздействие токсикантов. Это обеспечивается тем, что люминесцентные бактерии содержат фермент люциферазу, осуществляющую эффективную трансформацию энергии химических связей жизненно важных метаболитов в световой сигнал на уровне, доступном для экспрессных и количественных измерений.

Критерием токсического действия является измерение с помощью прибора «Биотокс-10» интенсивности биолюминесценции тест-объекта под воздействием химических соединений, содержащихся в экстрактах ПК продукции по сравнению с раствором, не содержащим токсических веществ, или эталонной пробой. Уменьшение интенсивности биолюминесценции пропорционально токсическому эффекту.

Специалист:



Д.Г.Урваев

Центр химических исследований
ООО «ЦХИ»

Стр. 9

При изучении токсикологических свойств ПК продукции и ее химических ингредиентов люминесцентный бактериальный тест показывает хорошую корреляцию с их действием на высших животных, метод Драйзе, культуры клеток человека, подкожную адсорбцию, фототоксичность и т.п.

Токсическое действие определяют по ингибированию интенсивности ее биолюминесценции за 30-минутный период экспозиции.

Количественные оценки тест-реакции выражаются в виде безразмерной величины - индекса токсичности "Т".

Индекс токсичности "Т" равен отношению:

$$T = 100 (I_0 - I) / I_0, \quad (1)$$

где I_0 и I соответственно интенсивность биолюминесценции контроля и опыта при фиксированном времени экспозиции исследуемой пробы с бактериальным препаратом.

Методика допускает три пороговых уровня индекса токсичности:

- 1) допустимая степень токсичности образца: индекс токсичности T меньше 20;
- 2) образец токсичен: индекс T равен или больше 20 и меньше 50;
- 3) образец сильно токсичен: индекс токсичности T равен или более 50.

Подготовка посуды для определения индекса токсичности.

Стеклянную посуду для отбора проб и биотестирования промывали смесью бихромата калия и серной кислоты (хромовой смесью). Стенки посуды осторожно смачивали хромовой смесью, после чего на 3 часа посуду оставляли, затем ее тщательно промывали водопроводной водой, нейтрализовали раствором пищевой соды и промывали 4 раза дистиллированной водой. Посуду для отбора проб сушили на воздухе, а используемую для биотестирования, - в сушильном шкафу при 105 °С в течение 1 часа (кроме мерных колб).

Подготовка проб. Извлечение водорастворимых форм химических соединений из образцов.

Навеску образца помещали в коническую колбу, мерным цилиндром приливают пятикратный объем дистиллированной воды (рН 6,8 - 7,4) (5 куб. см на 1 г образца), взбалтывали в течение 5 минут и оставляли для экстракции на 24 часа. Через 24 часа экстракт фильтровали через бумажный фильтр - белую,. Полученный экстракт тестировали на токсичность.

Проведение испытаний

Готовили контрольный образец путем смешения в кювете от люминометра 0,1 мл рабочей суспензии бактерий и 0,9 мл дистиллированной



воды. При приготовлении опытного образца к 0,1 мл рабочей суспензии бактерий добавляли 0,9 мл отфильтрованного образца.

Измерение интенсивности билюминесценции проводили с помощью прибора "Биотокс" спустя 30 мин.

Средний индекс токсичности образца составляет 13,7 %. Исследуемый образец не токсичен.

ВЫВОД

По результатам проведенного исследования специалист приходит к следующему заключению:

По вопросу 1:

Определение химического состава ускорителя биологических процессов "Биус".

Ускоритель биологических процессов "Биус" содержит воду, полиоксиэтилен изеокилфениловый эфир, амилазу, анионный поверхностно-активные вещества (АПАВ).

По вопросу 2:

Определение наличия микроорганизмов (дрожжи, плесени, бактерии).

Ускоритель биологических процессов "Биус" не содержит микроорганизмов (дрожжи, плесени, бактерии).

По вопросу 3:

Определение индекса токсичности образца при разбавление 1:5 с водой по методике ПНДФ Т 14.1:2:3:4.11-04.

Индекс токсичности образца при разбавление 1:5 с водой по методике ПНДФ Т 14.1:2:3:4.11-04 составляет 13,7 %. Ускоритель биологических процессов "Биус" не токсичен.

Специалист



Д.Г. Урваев

Приложения.

Приложение 1. Внешний вид образца

Приложение 2. ИК-спектр образца и ИК-спектры сравнения.

Приложение 3. Хроматограммы и масс-спектры образца.

Приложение 4. Копии документов, подтверждающих компетенцию специалиста.

Приложение 5. Сертификаты соответствия экспертного учреждения.

Специалист:

Д.Г.Урваев

Центр химических исследований
ООО «ЦХИ»

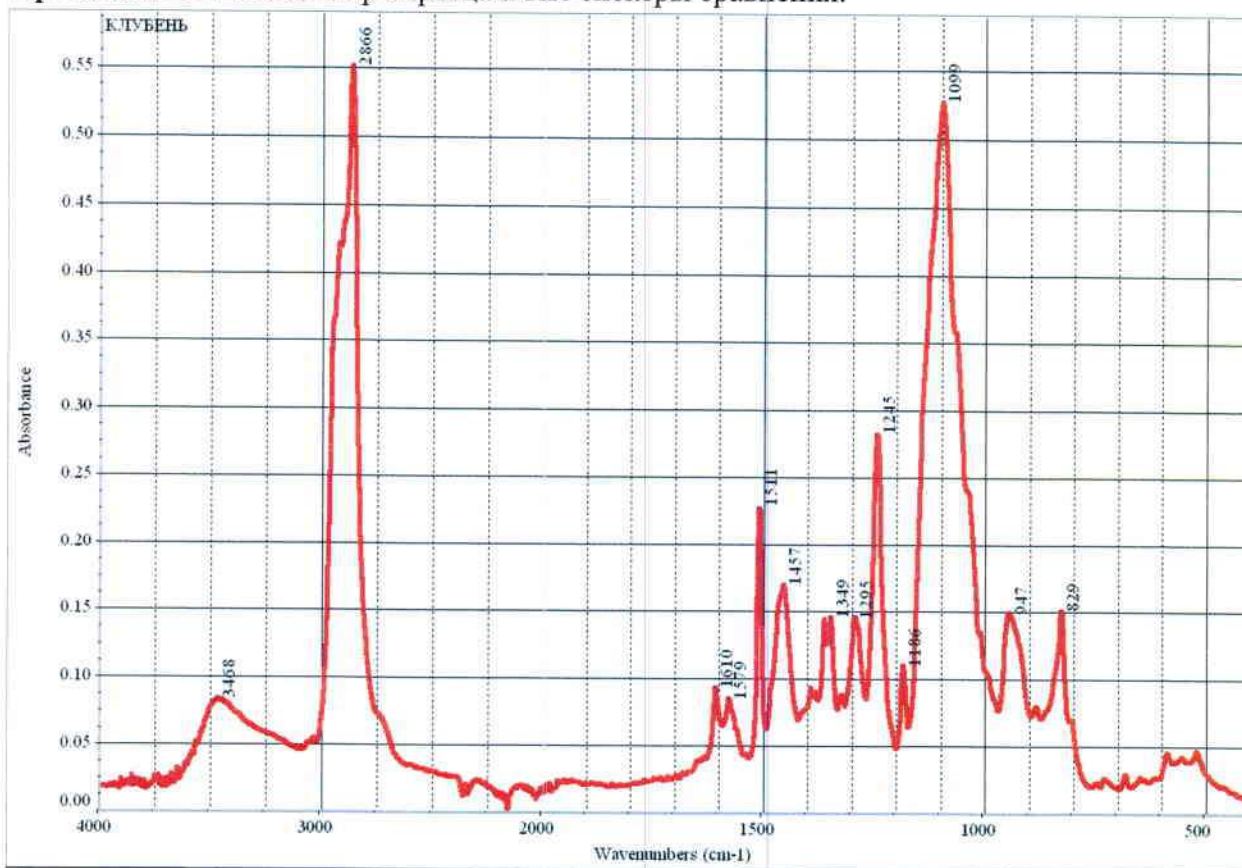
Стр. 11

Приложения.

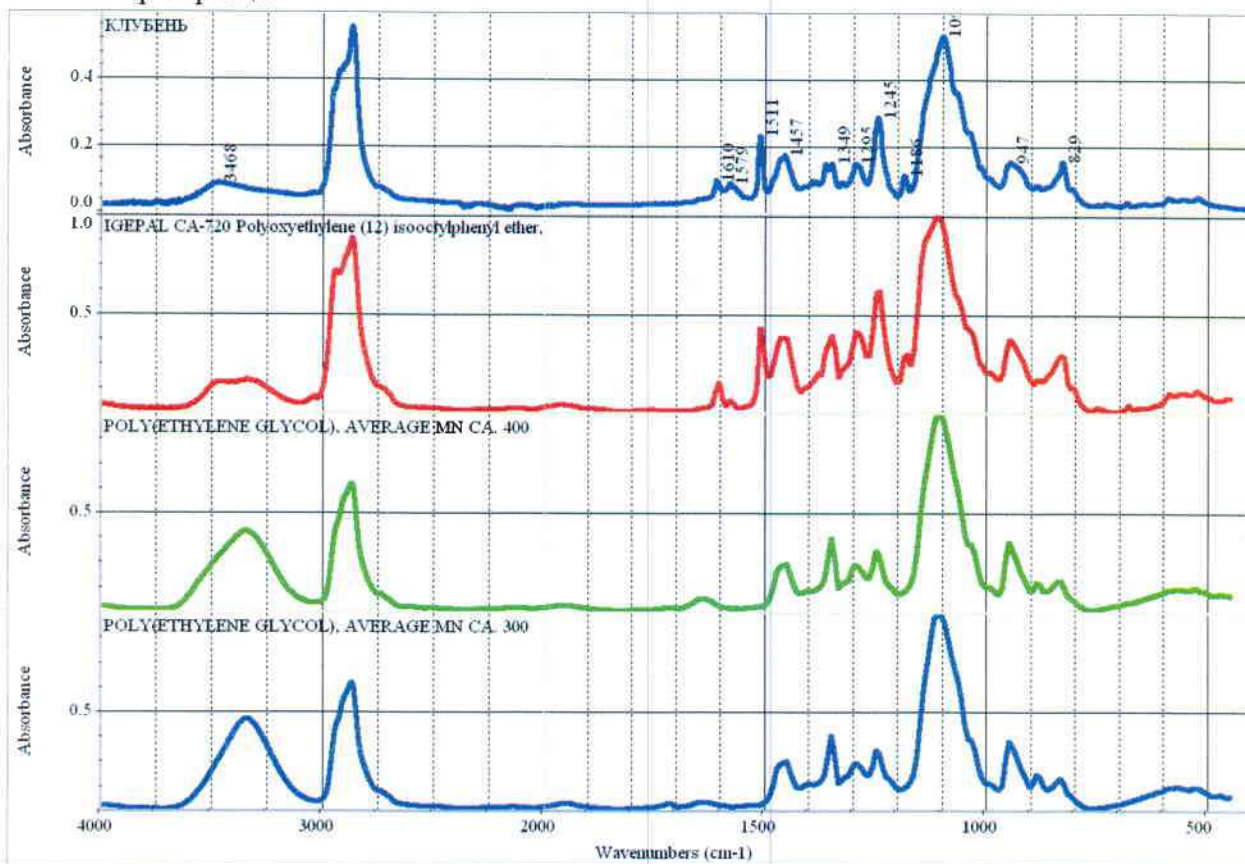
Приложение 1. Внешний вид образца.



Приложение 2. ИК-спектр образца и ИК-спектры сравнения.



ИК-спектр образца.



ИК-спектр образца и ИК-спектры сравнения.

Специалист:

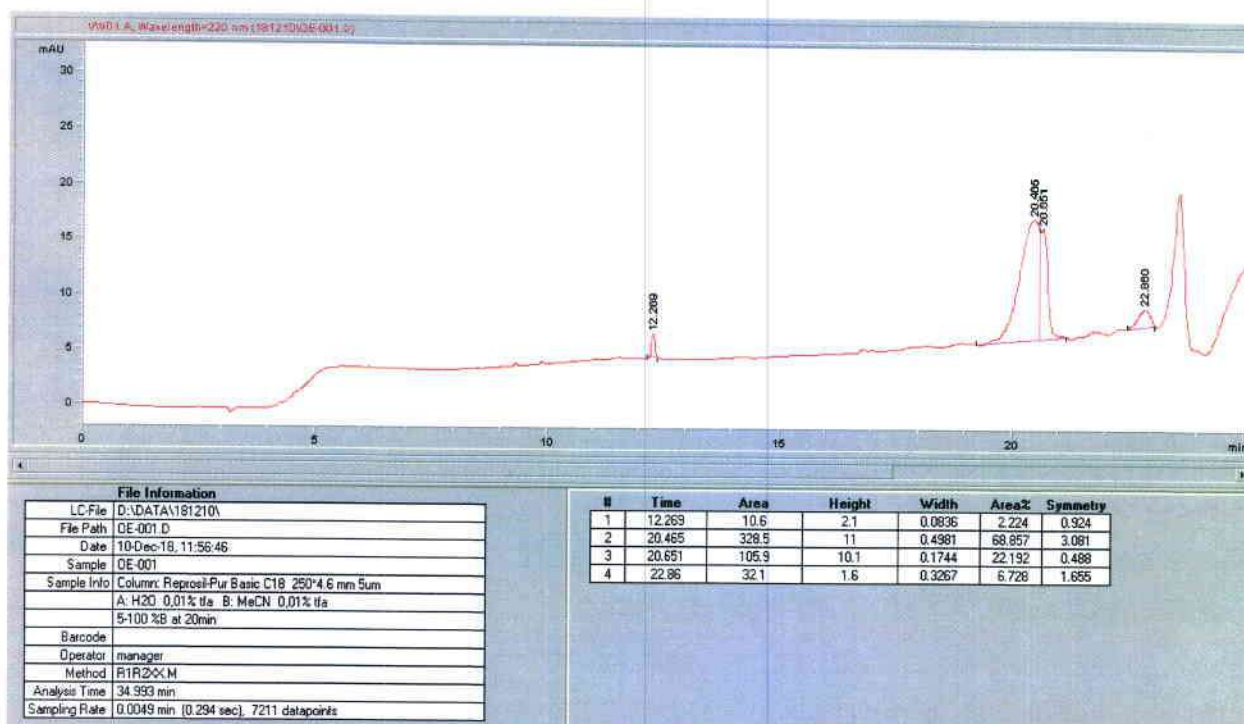
Урваев

Д.Г.Урваев

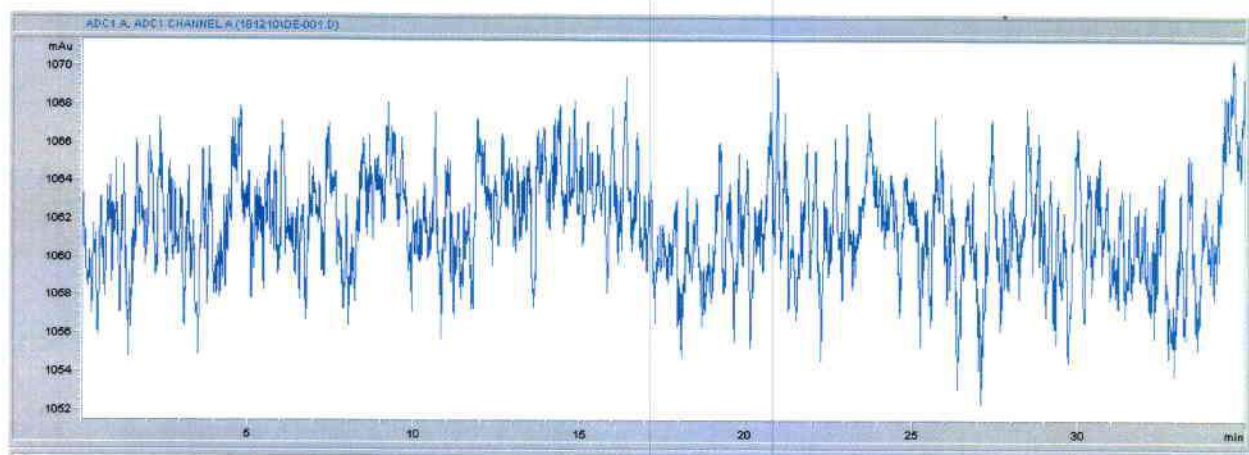
Центр химических исследований
ООО «ЦХИ»

Стр. 13

Приложение 3. Хроматограммы и масс-спектры образца.



Хроматограмма с УФ детектором.

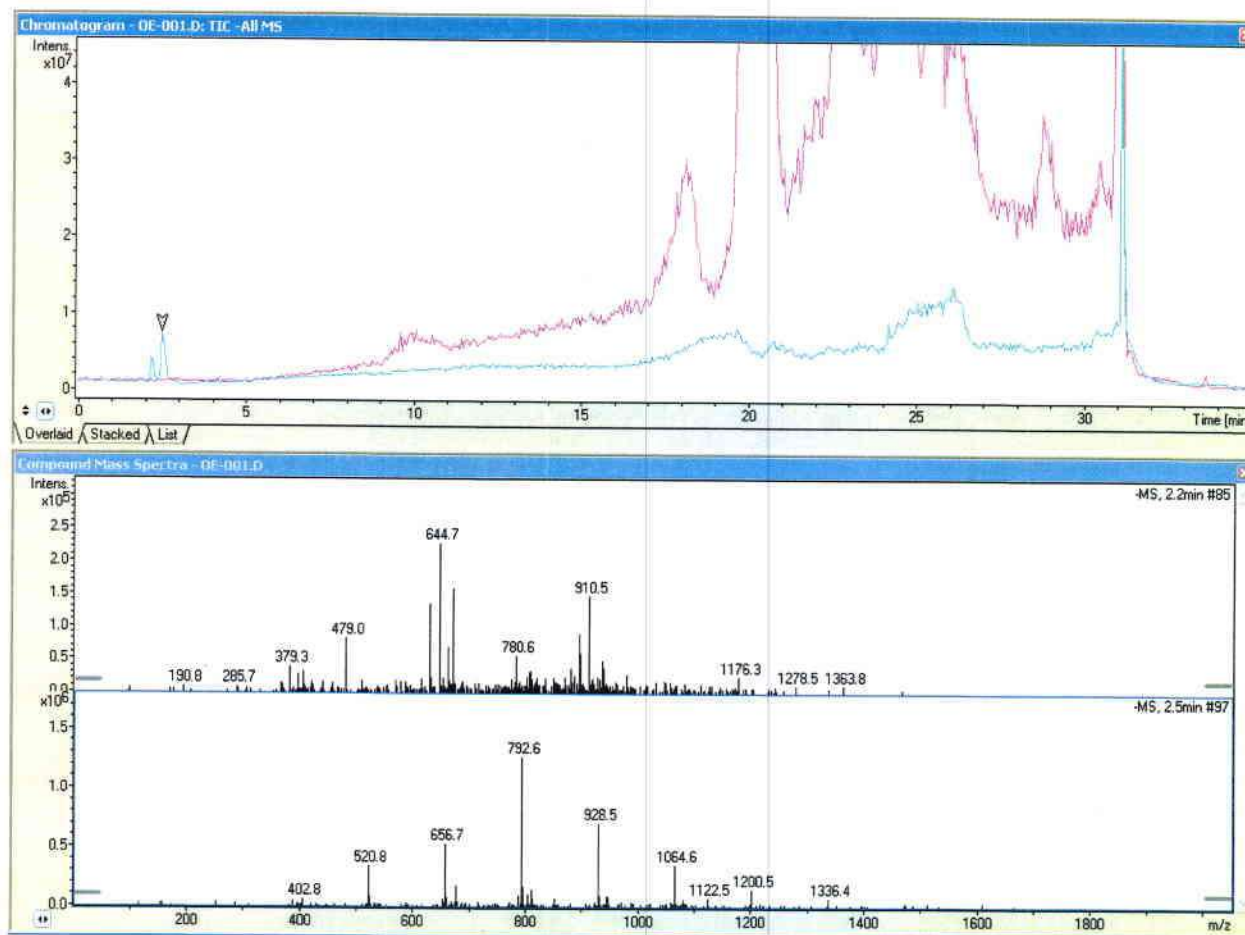


Хроматограмма с ELSD детектором.

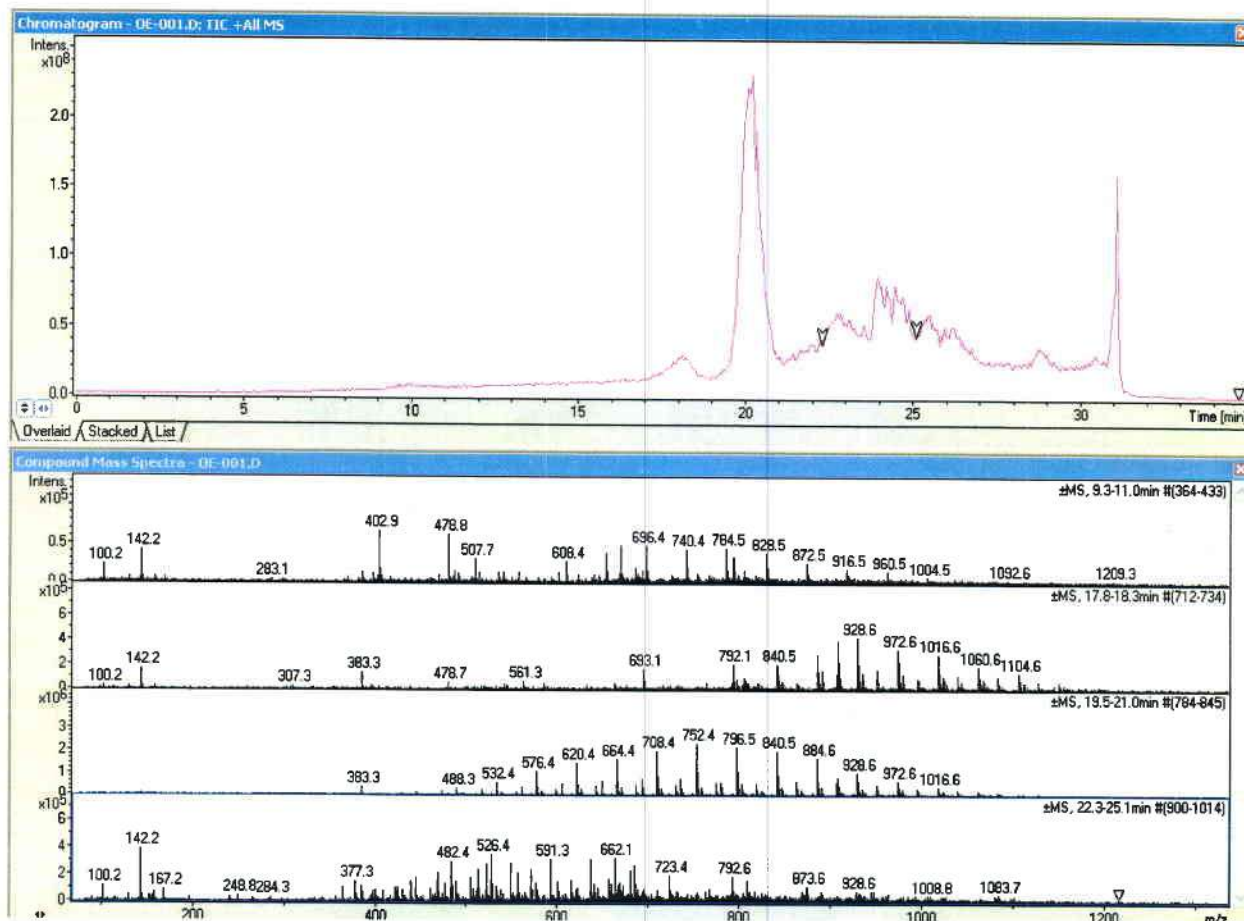
Специалист:

Д.Г.Урваев
 Центр химических исследований
 ООО «ЦХИ»

Стр. 14



Масспектр (отрицательный) пиков с временем удерживания 2,2 мин и 2,5 мин.



Масспектр (положительный) зон с временем удерживания 9,3-11,0 мин, 17,8-18,3 мин, 19,5-21,0 мин, 22,3-25,1 мин.

Приложение 4. Копии документов, подтверждающих компетенцию специалиста.



Специалист:

[Signature]

Д.Г.Урваев

Центр химических исследований
ООО «ЦХИ»

Стр. 17

Приложение 5. Сертификаты соответствия экспертного учреждения.



Специалист:

Урваев

Д.Г.Урваев

Центр химических исследований
ООО «ЦХИ»

Стр. 18