**Государственная комиссия**

**по химическим средствам борьбы с вредителями,**

**болезнями растений и сорняками при МСХ СССР**

УТВЕРЖДЕНО

Заместителем Главного государствен­ного

санитарного врача Союза ССР.

А. И. ЗАЙЧЕНКО

**МЕТОДЫ**

**ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКРОКОЛИЧЕСТВ**

**ПЕСТИЦИДОВ В ПРОДУКТАХ**

**ПИТАНИЯ, КОРМАХ И ВНЕШНЕЙ**

**СРЕДЕ**

Часть VI (том I)

Данные методики апробированы и рекомендованы

в качестве офици­альных группой экспертов при

Гос­комиссии по химическим средствам борьбы с

вредителями, болезнями растений и сорняками

при МСХ СССР.

Вологда — 1974

**КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДДТ**

**В ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ РАСТИТЕЛЬНОГО**

**И ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ И В ВОДЕ**

Краткая характеристика препарата, см, стр. 4.

**Принцип метода**

Метод основан на нитровании ДДТ до тетранитросоединения и получении окрашенного в синий цвет продукта при до­бавлении спиртового раствора едкого кали.

Чувствительность метода —5—10 *мкг* в пробе. Гексахло­ран и хлорорганические препараты диенового синтеза не ме­шают определению.

**Реактивы и растворы**

Ацетон, х. ч.

Бензол, х. ч.

Бензол-гексан, смесь (3 : 8).

н-Гексан, х. ч.

Хлороформ, х. ч.

Углерод четырххлористый, х. ч.

Петролейный эфир (фракция с температурой кипения 40— **60°).**

Эфир серный, х. ч.

Натрий едкий, 2 и 5% водные растворы.

Натрий сернокислый, х. ч., безводный.

Серная кислота, х. ч.

Нитрующая смесь;

а) раствор азотнокислого калия (натрия или аммония) в концентрированной серной кислоте (2 *г* в 20—30 *мл* серной кислоты);

б) смесь азотной кислоты, уд. вес 1,49—1,51 и серной кис­лоты, уд. вес 1,84 (1 : 1).

Азотную кислоту, уд. вес 1,49—1,51, готовят перегонкой смеси азотной кислоты, уд. вес 1,4, с серной кислотой, уд. вес 1,84 (1 : 1). Из 400 *мл* смеси кислот отгоняют 80—85 мл азотной кислоты, уд. вес 1,5. Перегонку кислоты можно произво­дить в приборе для перегонки азотной кислоты, реторте или колбе Вюрца, которую закрывают плотно асбестовой пробкой. В качестве воздушного холодильника используют внутреннюю трубку холодильника Либиха. Азотную кислоту хранят в склянке из темного стекла с хорошо притертой пробкой.

Калия оксалат, ч. д. а., 5% водный раствор.

Калий марганцовокислый, насыщенный водный раствор.

Натрий хлористый, насыщенный водный раствор.

Кали едкое, раствор в абсолютном этиловом спирте. 5 *г* едкого кали, х. ч., растворяют в 100 *мл* абсолютного спирта, добавляют 2 *г* мочевины и кипятят с обратным холодильни­ком в течение 10 минут. Затем раствор охлаждают, фильтру­ют и хранят в хорошо закупоренной темной склянке. Моче­вина предохраняет его от пожелтения.

Силикагель АСК Воскресенского химкомбината.

Кремниевая кислота, содержащая 10% влаги.

Окись алюминия, обработанная соляной кислотой, 200 *г* окиси алюминия для хроматографии заливают 300 *мл* 2 н. НС1 и оставляют на 12—15 часов при периодическом переме­шивании смеси. Затем адсорбент промывают водой до отрица­тельной реакции на ион хлора (с азотнокислым серебром), от­сасывают на воронке Бюхнера, рассыпают тонким слоем и су­шат при комнатной температуре до влажности 12—14%.

Уголь активированный марки БАУ, КАД-йодный, дробле­ный, растертый в фарфоровой ступке до диаметра зерна 0,25—0,5 *мм.*

Спирт этиловый абсолютный. Получают обезвоживанием в течение ночи над прокаленной сернокислой медью с после­дующим отгоном или фильтрованием через ватный тампон. Стандартный раствор ДДТ: 10 *мг* 4,4'-изомера ДДТ раство­ряют в 100 *мл* четыреххлористого углерода. 1 *мл* этого рас­твора содержит 100 *мкг* ДДТ.

Для получения 4,4'-изомера растворяют 10 *г* техническо­го ДДТ в 75 *мл* этилового спирта, кипятят с обратным холо­дильником в течение 10—15 минут и дают постоять не менее 2 часов. Затем фильтруют и сушат осадок при 80°. Темпера­тура плавления 4,4'-изомера ДДТ 108—109°.

**Приборы и посуда**

Фарфоровые камешки размером 1X1 мм.

Вата медицинская, гигроскопическая, обезжиренная.

Сосуды для экстракции.

Делительные воронки на 50, 100, 250, 500 *мл.*

Аппарат для отгонки растворителя.

Колонки хроматографические (15X20 м). Колонку за­полняют следующим образом: в узкий конец трубки помеща­ют небольшой ватный тампон, поверх которого насыпают слой соответствующего адсорбента нужной высоты. При этом необ­ходимо следить, чтобы слой адсорбента был плотным, без ще­лей и пустот. Скорость протекания хроматографируемого рас­твора должна быть порядка 2—3 *мл/мин.*

Колонки хроматографические (18X390 *мм).* В нижнюю часть хроматографической колонки помещают стекловату и обезжиренную вату и насыпают 70 *мл* силикагеля АСК. Сор­бент промывают, пропуская через колонку 50 *мл* петролейного зфира. Использованный растворитель отбрасывают.

**Ход анализа**

Подготовка пробы

ОВОЩИ, ФРУКТЫ, СЕНО, ФУРАЖ, ЗЕРНО, МУКА и другие продукты растительного происхождения \*\*\*. Для ана­лиза муки или отрубей навеска должна быть не менее 50 *г* из средней пробы 1 *кг,* для овощей, фруктов, растений навеска должна быть 20—30 *г* из средней пробы 1 *кг.* Пробы гомогенезируют или измельчают.

Навеску анализируемого продукта помещают в коничес­кую колбу и заливают петролейным эфиром, четыреххлористым углеродом или н-гексаном и экстрагируют в течение 30—40 минут на аппарате для встряхивания. Фильтруют экс­тракт через воронку со слоем безводного сернокислого нат­рия. Пробы муки и отрубей фильтруют через воронку Бюхне- ра под уменьшенным давлением.

Раствор переносят в Делительную воронку, приливают 5 *мл* серной кислоты и встряхивают в течение 5 минут. Очист­ку повторяют до получения бесцветной отработанной серной кислоты (5—7 раз). Очищенный экстракт, содержащий ДДТ, переносят в прибор для отгонки растворителей и отгоняют растворитель досуха. Для ускорения отгонки в колбу вносят 1—2 фарфоровых камешка. Последние следы удаляют током воздуха.

МОЛОКО, КИСЛОМОЛОЧНЫЕ НАПИТКИ (кефир, ку­мыс, простокваша).

Способ экстракции и очистки экстракта:

а) 50 *мл* молока упаривают в фарфоровой чашке на ки­пящей водяной бане до получения густой массы. После ох­лаждения измельчают остаток стеклянной палочкой, перено­сят в делительную воронку на 40—100 *мл* и ДДТ, трижды экстрагируют порциями по 15 *мл* четыреххлористого углерода или н-гексана.

Экстракты объединяют и Переносят в делительную ворон­ку, куда приливают 5—7 *мл* серной кислоты. После встряхи­вания и разделения слоев серную кислоту сливают, процеду­ру повторяют несколько раз до получения бесцветной серной кислоты. Экстракты некоторых особо жирных сортов молока требуют более тщательной очистки. В этом случае экстракт дополнительно обрабатывают раствором перманганата калия, обработку которым (порциями по 5 *мл)* следует вести перед очисткой серной кислотой и второй раз перед обработкой пос­ледней порции серной кислоты.

Очищенный экстракт переносят в колбу прибора для от­гонки растворителей и отгоняют растворитель досуха.

б) К 50 *мл* продукта прибавляют концентрированную серную кислоту до полного почернения пробы (30—40 *мл).* После охлаждения до 10—15° исследуемый раствор переносят в делительную воронку и экстрагируют н-гексаном или четыреххлористым углеродом два раза порциями по 25 *мл.* Во­ронку встряхивают 1—2 минуты, после чего оставляют на 30 минут для разделения слоев. В случае образования эмуль­сии прибавляют 1—2 *мл* этилового спирта.

Экстракты объединяют и встряхивают с 10 *мл* серной кис­лоты. Эту операцию повторяют 2—3 раза, после чего экстракт сушат над безводным сернокислым натрием, переносят его в колбу прибора для отгонки растворителя и отгоняют раст­воритель досуха.

в) МОЛОКО, КИСЛОМОЛОЧНЫЕ НАПИТКИ (кефир, кумыс, простокваша). 25 *мл* продукта помещают в делитель­ную воронку на 350 *мл,* прибавляют 5 *мл* насыщенного раство­ра оксалата натрия и 5 *мл* насыщенного раствора поваренной соли, перемешивают, приливают 100 *мл* ацетона и встряхивают смесь 2—3 минуты, затем добавляют 100 *мл* хлороформа вновь встряхивают 1—2 минуты. После полного разделении фаз нижнюю часть используют для анализа. Растворители отгоняют под вакуумом при температуре 40—45°С до полного их удаления. Оставшийся жир растворяют в 30 *мл* петролейного эфира и наносят на приготовленную хроматографическую колонку. Из колонки ДДТ элюируют 170 *мл* петролейного эфира. Собирают элюат в колбу для отгонки растворителей. Остаток растворителя «отжимают» из колонки с помощью ре­зиновой груши. Растворитель отгоняют под вакуумом при температуре 40—45°.

СГУЩЕННОЕ СТЕРИЛИЗОВАННОЕ МОЛОКО. 10 г про­дукта отвешивают в стаканчик и переносят в делительную во­ронку емкостью 150 *мл,* обмывают стаканчик дважды по 5 *мл* насыщенным раствором хлористого натрия. Содержимое во­ронки перемешивают, приливают 40 *мл* ацетона, энергично встряхивают 2—3 минуты, затем приливают 60 *мл* хлорофор­ма и вновь встряхивают 2—3 минуты. Далее продолжают ана­лиз, как описано в разделе молоко.

СГУЩЕННЫЕ МОЛОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ С САХАРОМ. В стаканчик отвешивают 10 *г* сгущенного продукта и прилива­ют 5 *мл* раствора оксалата калия, содержимое перемешивают и выливают в делительную воронку емкостью 250 *мл.* Стаканчик обмывают 5 *мл* того же раствора и сливают в дели­тельную воронку. Содержимое воронки перемешивают, прили­вают 60 *мл* ацетона и энергично встряхивают 2—3 минуты, добавляют 100 *мл* хлороформа и вновь встряхивают 7—8 ми­нут. Далее поступают, как описано для молока.

СУХИЕ МОЛОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ И СМЕСИ. В делитель­ную воронку емкостью 150 *мл* приливают 10 *мл* насыщенного раствора хлористого натрия, добавляют 2 *г* сухого продукта и встряхивают 2—3 -минуты. Приливают 30 *мл* ацетона, встря­хивают 2—3 минуты, добавляют 50 *мл* хлороформа и вновь встряхивают 5—7 минут. Далее поступают, как описано в раз­деле «Молоко».

СМЕТАНА, СЛИВКИ 30—40%. 5 г продукта смешивают с 10 *мл* насыщенного раствора хлористого натрия. Смесь пере­носят в делительную воронку, добавляют 40 *мл* ацетона, встря­хивают 2—3 минуты, приливают 70 *мл* хлороформа и вновь встряхивают 2—3 минуты. Далее анализ ведут, как описано з разделе «Молоко».

ТВОРОГ, СЫР. 10 *г* творога или измельченного на терке сыра растирают в ступке с 10 *мл* насыщенного раствора поваренной соли и переносят в делительую воронку на 150 *мл,* при­ливают 80 *мл* ацетона, встряхивают 2—3 минуты. Добавляют 100 *мл* хлороформа и вновь встряхивают 4—5 минут. Далее, как описано в разделе «Молоко».

МАСЛО. К 20 *г* растопленного в круглодонной колбе мас­ла приливают 45—50 *мл* ацетона, колбу встряхивают до пол­ного растворения жира, приливают 7—8 *мл* ледяной дистилли­рованной воды и после кратковременного осторожного встря­хивания и охлаждения на ледяной бане (жир при этом осаж­дается на стенке колбы в виде плотной массы), сливают водно- ацетоновый раствор в другую колбу. Указанную процедуру повторяют еще два раза. Из объединенного водно-ацетонового экстракта ацетон отгоняют на водяной бане, а ДДТ трижды экстрагируют из водного раствора н-гексаном или четыреххло- ристым углеродом порциями по 10 *мл.* Экстракты объединяют, переносят в делительную воронку, приливают 7—8 *мл* серной кислоты. После осторожного кратковременного встряхивания и разделения слоев кислоту сливают. Эту операцию повторя­ют несколько раз до получения бесцветной отработанной сер­ной кислоты. Переносят экстракт в прибор для отгонки рас­творителей и отгоняют растворитель досуха.

МЯСО. 25 *г* пробы измельченного исследуемого мяса по­мещают в коническую колбу со шлифом, заливают 50 *мл* четыреххлористого углерода или н-гексана, несколько раз встря­хивают и оставляют на 1 час. Экстракт сливают в делитель­ную воронку емкостью 300 *мл.* Колбу с исследуемым образ­цом мяса дважды споласкивают 25 *мл* растворителя, сливая его в ту же делительную воронку.

Приливают к экстракту небольшими порциями 50 *мл* кон­центрированной серной кислоты. Воронку встряхивают в те­чение 5 минут, после расслоения нижний слой сливают и от­брасывают, а экстракт очищают серной кислотой, как описано выше. Очищенный экстракт переносят в прибор для отгонки растворителей и отгоняют растворитель досуха.

ВОДА. См. стр. 17.

**Нитрование**: колбу, содержащую ДДТ, охлаждают и до­бавляют 4 *мл* охлажденной в холодильнике нитрующей сме­си. Охлаждение нитрующей смеси необходимо, в связи с тем, что при окислении органических веществ («воск» и «пара­фин»), которые не удаляются при очистке, резко повышается температура. Это может привести к разложению ДДТ, происходящему при температуре выше 100° С. Разложение обнару­живается лишь в конце анализа при появлении нехарактерной оранжевой окраски раствора.

Нитруют на кипящей водяной бане с азотной кислотой 45 мин., с азотнокислым калием 20 мин. После окончания нитрования продукт переносят в делительную воронку, содер­жащую 15 *мл* ледяной воды. Колбу для нитрования трижды споласкивают ледяной водой, сливая ее в делительную ворон­ку. На этой стадии, если необходимо, анализ можно прервать и продолжить на следующий день. Нитропродукт экстрагиру­ют трижды порциями по 10 *мл* серного эфира. Первую экс­тракцию проводят в течение 10 мин., последующие!—2 мину­ты. Затем эфирный раствор нитропродукта 3—5 раз встряхи­вают с 5 *мл* 2% водного раствора едкого натрия до получения бесцветного водного слоя. Для предотвращения возможного раз­ложения ДДТ необходимо, чтобы контакт эфирного раствора со слоем щелочи не был слишком продолжительным. Экстракт фильтруют через слой безводного, сернокислого натрия.

Обезвоженный эфирный раствор, содержащий тетранитропродукт, переносят в коническую колбу емкостью 50—100 *мл.*

Делительную воронку трижды споласкивают небольшим количеством серного эфира.

Эфир отгоняют и сухой остаток сушат в течение 30 минут в сушильном шкафу при температуре 80—100° С {следы воды мешают анализу).

Сухой остаток растворяют в 5 *мл* бензола, добавляют 5 *мл* спиртового раствора едкого кали. Появляется голубое окраши­вание, интенсивность которого измеряют через 5 минут на фотоэлектроколориметре с желтым светофильтром и в гювете с рабочей длиной 10 *мм.* Окраска колориметрируемого раство­ра устойчива 10—15 минут, после чего она ослабевает.

Построение калибровочного графика

В маленькие колбы вносят 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 *мл* стан­дартного раствора ДДТ, что соответствует 10, 20, 30, 40, 60, 80 *мкг* ДДТ. Удаляют растворитель на водяной бане досуха, прибавляют нитрующую смесь и далее проводят определение так, как описано для пробы.

Количество ДДТ в *мг* на 1 *кг* продукта вычисляют по фор­муле:

Х= А

*Р*

где А — количество ДДТ, найденное по калибровочному гра­фику, *мкг;*

*Р* — навеска продукта, *г.*