ГОСУДАРСТВЕННОЕ
САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ НОРМИРОВАНИЕ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СБОРНИК

МЕТОДИЧЕСКИХ ДОКУМЕНТОВ, НЕОБХОДИМЫХ ДЛЯ ОБЕСПЕЧЕНИЯ ПРИМЕНЕНИЯ ФЕДЕРАЛЬНОГО ЗАКОНА ОТ 12.06.08 №88-ФЗ

«Технический регламент на молоко и молочную продукцию»

Часть 9

МОСКВА 2009

gost.e-ecolog.ru

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Сборник методических документов, необходимых для обеспечения применения Федерального закона от 12 июня 2008 г. № 88-ФЗ «Технический регламент на молоко и молочную продукцию»

Часть 9

ББК 51.23
С23

С23 **Сборник** методических документов, необходимых для обеспечения применения Федерального закона от 12 июня 2008 г. № 88-ФЗ «Технический регламент на молоко и молочную продукцию»:.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009.—72 с.

ISBN 5—7508—0771—1

В сборник включены методические документы, содержащие правила и методы исследований (испытаний) и измерений, а также правила отбора образцов для проведения исследований (испытаний) и измерений, в соответствии с постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации Г. Г. Онищенко от 08.12.2008 № 67.

ББК 51.23

Технический редактор Г. И. Климова

Подписано в печать 14.05.09

Формат 60x88/16 Печ. л. 4,5

Тираж 200 экз. Заказ 36

Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
127994, Москва, Вадковский пер., д. 18/20

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
отделом издательского обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а
Отделение реализации, тел./факс 952-50-89

ISBN 5—7508—0771—1

© Роспотребнадзор, 2009
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009

Содержание

Энзиматическое агар-диффузное определение фосфорорганических инсектицидов в продуктах животного происхождения 4

Определение полихлорпинена и полихлоркамфена в воздухе, воде, почве, картофеле и свекле, мясе, молоке, тканях внутренних органов животных, крови, моче тонкослойной хроматографией 8

Определение севина в молоке и молочных продуктах газожидкостной хроматографией 17

Определение фосфамида в молоке и тканях животных газожидкостной хроматографией 20

Определение фталофоса в молоке и мясе тонкослойной хроматографией 22

Методические указания по определению метилнитрофоса в мясе, яйцах, молоке методом газожидкостной хроматографии 25

Методические указания по определению абата (дифоса) в мясе и молоке методом хроматографии в тонком слое 27

Методические указания по определению кельтана в молоке газохроматографическим методом 30

Методические указания по определению фоксима (валексона) в молоке и тканях животных методом газожидкостной хроматографии 32

Газоадсорбционный метод определения хлорофоса в молоке, органах и тканях животных и яйцах кур 34

Определение фозалона в молоке и тканях животных, траве, свекле, картофеле и комбикорме с помощью тонкослойной хроматографии 37

Определение пропоксура и фенеткарба в молоке и мясе методом тонкослойной хроматографии 41

Газохроматографический метод определения валексона в молоке, органах и тканях животных 45

Хроматографические методы определения остаточных количеств 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) в воде, почве, фураже, продуктах питания растительного и животного происхождения 48

Методические указания по определению оксамата в молоке и тканях животных методом газожидкостной хроматографии 59

Методические указания по определению содержания общей ртути в мясе, мясопродуктах, яйцах, рыбе, молочных продуктах, шоколаде, почве колориметрическим способом или при помощи тонкослойной хроматографии 62

Хроматографические методы определения остаточных количеств 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) в воде, почве, фураже, продуктах питания растительного и животного происхождения*

Краткая характеристика препарата

$C_8H_6O_3CL_2$ Мол. вес 221,04

2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д) белое кристаллическое вещество, стабильное при хранении. Т.пл.141 °С, т.кип. 160 °С/0,4 мм рт.ст. Константа диссоциации $2{,}3 \cdot 10^{-3}$. Стабильна при хранении в растворах различных органических растворителей и в кристаллическом состоянии. При 20 °С 540 мг кислоты растворяется в 1 л воды, 243 г кислоты в 100 мл эфира, 130 г кислоты в 100 мл этилового спирта, хорошо растворяется в ацетоне, четыреххлористом углероде и бензоле.

Применяется для борьбы с двудольными сорняками в посевах зерновых культур.

Препарат среднетоксичен для крыс и мышей $ЛД_{50}$ 350—560 мг/кг.

Принцип метода

Метод основан на экстракции 2,4-Д из гидролизованной пробы органическим растворителем с последующим определением в виде метилового эфира 2,4-Д с помощью газожидкостной хроматографии или в виде кислоты методом тонкослойной хроматографии. С помощью предлагаемого метода можно определить 2,4-Д, находящуюся в анализируемой пробе как в свободном, так и в связанном состоянии в виде конъюгатов с эндогенными веществами растений. Количественное определение 2,4-Д проводится методом внутреннего стандарта, который добавляется к пробе перед проведением гидролиза. В качестве внутреннего стандарта используется 2,4,5-трихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-5-Т). Чувствительность метода газожидкостной хроматографии составляет: в воде – 0,002 мг/л, в почве – 0,01 мг/кг, в траве – 0,02 мг/кг, в сене – 0,1 мг/кг, в зерне – 0,02 мг/кг, в молоке 0,04 мг/кг, в сливочном масле – 0,1 мг/кг, – в мясе (говядина) – 0,08 мг/кг. Чувствительность определения методом тонкослойной хроматографии составляет: (в виде 2,4-Д) – в воде – 0,04 мг/л, в почве – 0,2 мг/кг, в траве – 0,06 мг/кг, в сене –

---

* Разработан В. Д. Чмиль, Д. И. Чкаников ым, Н. Н. Павловым, А. М. Макеевым, ВНИИГИНТОКС и ВНИИ фитопатологии, утвержден 20 декабря, № 1541—76.

0,4 мг/кг, в зерне – 0,3 мг/кг, в молоке – 0,4 мг/л, в сливочном масле – 0,8 мг/кг, в мясе (говядина) – 0,6 мг/кг; в виде метилового эфира 2,4-Д – в виде – 0,01 мг/л, в почве – 0,05 мг/кг, в траве – 0,08 мг/кг, в сене – 0,1 мг/кг, в зерне – 0,08 мг/кг, в молоке – 0,1 мг/л, в сливочном масле – 0,2 мг/кг, в мясе (говядина) – 0,15 мг/кг. Процент определения методом тонкослойной хроматографии составляет: в воде + 90—95 %, в почве – 70—80 %, в траве – 60 %, в сене – 60 %, в молоке – 80 %, в сливочном масле – 70 %, в мясе – 75 %, в зерне – 60 %.

Минимально дстектируемое количество метилового эфира 2,4-Д с помощью детектора постоянной скорости рекомбинации 2 нг, линейный динамический диапазон детектирования не менее 70 мг. Минимально открываемое количество 2,4-Д на тонкослойных хроматограммах 1 мкг.

Реактивы и растворы

Азот особой чистоты, МРТ7 6-02-375-66

Азотно-кислое серебро, хч

Аммиак, 25-ный водный раствор

Ацетон, хч

Бикарбонат натрия, 3 %-ный водный раствор

Н-гексан, хч, (перегнанный)

Н-гептан, хч

Гидроортофосфат натрия, хч, 5 %-ный водный раствор

Диметилсульфат, 5 %-ный (%%-объемные) раствор в абсолютном метиловом спирте

Диэтиловый эфир (перегнанный)

Кальций серно-кислый, хч, прокаленный при 160 °С в течение 6 часов

Метиловый спирт, абсолютный

Муравьиная кислота, хч

Насыщенный водный раствор хлористого натрия

Петролейный эфир (Т кип. 40—60 °С)

Проявляющий реактив: в мерную колбу на 100 мл помещают 0,5 г азотно-кислого серебра, 5 мл дистиллированной воды, 7 мл аммиака (25 %-ный водный раствор) и доводят до метки ацетоном

Силикагель КСК

Соляная кислота, хч, концентрированная

Соляная кислота, 6н водный раствор

Соляная кислота, 2н водный раствор

Соляная кислота (1 : 1), водный раствор

Стандартный раствор 2,4-Д в метаноле с содержанием 100 мкг/мл

Стандартный раствор 2,4,5-Т в метаноле с содержанием 2,5 мкг/мл
Стандартный раствор метиловых эфиров 2,4-Д (10 мкг/мл) и 2,4,5-Т (2,5-мкг/мл) в метаноле
Стандартный раствор метилового эфира 2,4-Д в н-гексане с концентрацией 100 мкг/мл
Сульфат натрия безводный, хч
Фосфорно-вольфрамовая кислота, хч, 40 %-ный водный раствор
Хлористый натрий, хч
Эфирный раствор диазометана

Получение диазометана

Получение диазометана осуществляют из нитрозометилмочевины. Для получения нитрозометилмочевины во взвешенную литровую круглодонную колбу помещают 200 г 24 %-ного водного раствора метиламина (метиламин используется либо в виде водного раствора, либо в виде хлоргидрата) и добавляют при охлаждении 155 мл концентрированной соляной кислоты до кислой реакции (индикатор метилрот). Затем приливают такое количество воды, чтобы вес содержимого колбы достиг 500 г и прибавляют 300 г мочевины. Затем содержимое колбы осторожно кипятят с обратным холодильником 2 часа 45 минут и энергично 15 минут. Раствор в колбе охлаждают до комнатной температуры, растворяют в нем 110 г 95 %-ного азотисто-кислого натрия и охлаждают до 0 °С, В 3-литровом стакане готовят смесь 600 г льда и 100 г концентрированной серной кислоты, охлаждают содержимое стакана смесью льда и соли. В этот стакан при перемешивании приливают содержимое колбы (холодный раствор метилмочевины и нитрита натрия) с такой скоростью, чтобы температура не поднималась выше 0 °С. Получение нитрозометилмочевины проходит по следующим реакциям:

$$CH_2NH_2 \cdot HCl + H_2N{-}CO{-}NH_2 \rightarrow CH_3{-}NH{-}CO{-}NH_2 + NH_4Cl$$
$$CH_3{-}NH{-}CO{-}NH_2 + HNO_2 \rightarrow CH_3{-}N(NO){-}CO{-}NH_2 + H_2O$$

Нитрозометилмочевина всплывает на поверхность в виде мелких кристаллов, которые немедленно отфильтровывают на воронке Бюхнера и хорошо отсасывают под вакуумом. Затем кристаллы на фильтре размешивают до образования пасты с 50 мл холодной дистиллированной воды, отсасывают и сушат в вакуум-эксикаторе. Выход нитрозометилмочевины 66—72 % (105—115 г) от теоретического.

Полученную таким образом нитрозометилмочевину можно хранить в холодильнике длительное время. При температуре выше 20 °С ее не

следует хранить более 1 часа. При температуре 30 °С нитрозометилмочевина может разложиться без взрыва, но с выделением газообразных продуктов.

Получение диазометана из нитрозометилмочевины проходит по следующей реакции:

$$CH_3–N(NO)–CO–NH_2 + KOH \rightarrow CH_2N_2 + KCNO + 2H_2O$$

В круглодонную колбу на 100 мл помещают 3 мл 50 %-ного водного раствора едкого калия и 10 мл диэтилового эфира. Смесь охлаждают до 5 °С, после чего при взбалтывании прибавляют 1 г нитрозометилмочевины, колбу присоединяют к холодильнику, нижний конец которого снабжен алонжем с отводом, проходящим через резиновую пробку и погруженным в слой эфира на дне приемника. Приемник охлаждают смесью льда и соли.

Реакционную колбу помещают на водяную баню, нагретую до 50 °С. Эфирный раствор в колбе доводят до кипения. Время от времени содержимое колбы перемешивают. Отгонку прекращают после получения первых капель бесцветного дистиллята.

Ни в коем случае не следует отгонять весь эфир!

Приборы и посуда

Газовый хроматограф с детектором по захвату электронов (Цвет-5, Цвет-106 и т. п.).
Гомогенизатор (измельчитель тканей)
Колбы двухгорлые, круглодонные на 500 и 250 мл
Делительная воронка на 500 мл
Колба Бунзена на 500 мл
Воронка Бюхнера, диаметр 15 см
Грушевидные колбы на 100 мл
Ротационный испаритель ИР-1
Источник УФ-света
Водяная баня
Центрифужные пробирки
Контактный термометр на 100 °С
Мерные колбы на 5, 10 и 100 мл
Вакуумный водоструйный насос
Холодильник Либиха
Камера хроматографическая
Микропипетки

Медицинский шприц на 1 мл
Стеклянные пластинки 9 × 12
Сито капроновое 100 меш
Пульверизатор стеклянный
Электромешалка

Ход анализа

Газожидкостная хроматография

Вода. Пробу воды (250—1000 мл) помещают в делительную воронку, подкисляют соляной кислотой до pH~3, прибавляют 1 мл стандартного раствора 2,4,5–Т с концентрацией 2,5 мкг/мл и экстрагируют тремя порциями диэтилового эфира (100, 50 и 50 мл). Объединенный эфирный экстракт переносят в делительную воронку и экстрагируют 3 %-ным водным раствором бикарбоната натрия (или 5 %-ным водным раствором гидроортофосфата натрия) (3 × 50 мл). Объединенный водный раствор промывают двумя порциями петролейного эфира (или гексана) (по 50 мл), отбрасывают этот эфир (гексан), а водный раствор подкисляют соляной кислотой до pH~3 и трижды экстрагируют диэтиловым эфиром (3 × 50 мл). Объединенный эфирный экстракт сушат над безводным сульфатом натрия (5—10 г) в течение 15—30 минут при периодическом встряхивании и удаляют растворитель на ротационном испарителе в грушевидной колбе на 100 мл, причем последние порции растворителя удаляют током сухого воздуха. Сухой остаток в колбе метилируют, используя диметилсульфат или диазометан.

Метилирование диметилсульфатом. К сухому остатку в колбе приливают 3 мл %-ного раствора диметилсульфата в абсолютном метиловом спирте, тщательно ополаскивают стенки колбы, прибавляют 1 г безводного сульфата натрия, присоединяют обратный холодильник и помещают на водяную баню (Т-55 °С) на 10 минут. После окончания реакции метилирования содержимое колбы охлаждают под водопроводной водой, приливают 3 мл насыщенного раствора хлористого натрия, 1 мл н-гексана, энергично встряхивают в течение 2-х минут и после расслоения фаз вводят в хроматограф 3 мкл гексанового слоя.

Метилирование диазометаном. К сухому остатку в колбе приливают эфирный раствор диазометана до появления желтоватой окраски (при этом встряхивая содержимое колбы) и оставляют на 10 минут. Затем диэтиловый эфир удаляют током сухого воздуха, а остаток растворяют в 0,5—1,0 мл н-гексана и вводят в хроматограф 1—5 мкл раствора.

Условия хроматографирования (хроматограф Цвет-106): стеклянная спиральная колонка (длина 2 м, внутренний диаметр 3 мм), заполненная хроматоном N, 0,16—0,20, силанизированным ДМХС, с 5 % SE-30; скорость газа-носителя (азот особой чистоты) через колонку – 50 мл/мин, скорость продувочного газа (азот особой чистоты) через детектор – 150 мл/мин; температура термостата колонок – 170 °С, температура испарителя – 220 °С, температура термостата детектора 220 °С; шкала электрометра $20 \cdot 10^{-12}$ а скорость диаграммной ленты потенциометра 240 мм/час. Относительное время удерживания метилового эфира 2,4-Д в этих условиях: – 0,57. Абсолютное время удерживания – 4 м. 10 сек, Хроматографирование одной пробы проводят дважды. Измеряют на хроматограммах высоты пиков метиловых эфиров 2,4-Д и 2,4,5-Т, вычисляют среднее значение отношений этих высот из параллельных определений и по уравнению калибровочного графика находят содержание 2,4-Д в воде. Для построения калибровочного графика к пробам воды прибавляют 5, 10, 15, 20 мкг 2,4-Д (в виде раствора в метиловом спирте), 1 мл стандартного раствора 2,4—5Т с содержанием 2,5 мкг/мл и далее поступают так, как это описано выше. Измеряют на хроматограммах высоты пиков метиловых эфиров 2,4-Д и 2,4,5-Т, вычисляют среднее значение отношения этих высот из параллельных определений, строят график зависимости отношения высот хроматографических пиков метиловых эфиров 2,4-Д и 2,4,5-Т от содержания 2,4-Д в воде (мг/л). Полученный калибровочный график обрабатывают по методу наименьших квадратов и получают уравнение калибровочной прямой в виде

$$y = A + Bx, \text{ где}$$

y – соотношение высот хроматографических пиков метиловых эфиров 2,4-Д и 2,4,5-Т

X – содержание 2,4-Д в воде, мг/л

A и B – коэффициенты, которые получают при обработке калибровочного графика по методу наименьших квадратов.

С целью повышения надежности идентификации 2,4-Д для анализа проб целесообразно использовать колонки с неподвижными фазами различной полярности (например, SE-30 и XE-60, SE-30 и OV-I7). Условия хроматографирования при использовании фенилметилсиликона 0—17 следующее: стеклянная спиральная колонка (длина 2 м, внутренний диаметр 3 мм), заполненная хроматоном N 0,16—0,20 мм, силанизированным ДМСХ, с 5 % OV–17; скорость тока газа-носителя (азот особой чистоты) через колонку 50 мл/мин, скорость тока продувочного газа

(азот особой чистоты) через детектор – 150 мл/мин; температура испарителя – 220 °С, температура термостата колонок – 200 °С, температура термостата детектора 220 °С, шкала электрометра $20 \cdot 10^{-12}$ а скорость движения диаграммной ленты, потенциометра 240 мм/час. Относительное время удерживания метилового эфира 2,4-Д в этих условиях – 0,63. Абсолютное время удерживания – 6 мин. 48 сек.

Трава, сено, солома, зерно. Навеску травы (50 г) гомогенизируют в 150 мл дистиллированной воды, гомогенат количественно переносят в круглодонную колбу на 1 мл и приливают 38 мл концентрированной соляной кислоты. Навеску измельченного зерна (50 г), соломы или сена (по 10 г) помещают в круглодонную колбу на 1 л и приливают 150 мл 2н водного раствора соляной кислоты. К подготовленным образцам добавляют по 1 мл стандартного раствора 2,4–5–Т с концентрацией 2,5 мкг/мл, перемешивают, к колбе присоединяют обратный холодильник и помещают на кипящую водяную баню на 1 час. После охлаждения гидролизат фильтруют через бумажный фильтр на воронке Бюхнера, промывают осадок на фильтре без перемешивания тремя порциями (по 30 мл) 2н водного раствора соляной кислоты. К фильтрату добавляют 40 %-ный водный раствор фосфорно-волъфрамовой кислоты до 2 %-ной концентрации и фильтруют через бумажный фильтр на воронке Бюхнера. Осадок на фильтре трижды промывают 2н водным раствором соляной кислоты порциями по 30 мл. Объединенный фильтрат переносят в делительную воронку и экстрагируют тремя порциями диэтилового эфира (общий объем эфира равен объему фильтрата). Эфирный экстракт промывают небольшими количествами (15—20 мл) дистиллированной воды до нейтральной реакции промывных вод и затем экстрагируют тремя порциями (по 50 мл) 5 %-ного водного раствора гидроортофосфата натрия (или раствора бикарбоната натрия). Водные экстракты объединяют, подкисляют концентрированной соляной кислотой до pH-I и экстрагируют тремя порциями диэтилового эфира (75 + 50 + 50 мл). Объединенный эфирный экстракт после промывания небольшими (15—20 мл) порциями дистиллированной воды до нейтральной реакции промывных вод сушат над безводным сульфатом натрия (5—10 г) в течение 15—30 минут при периодическом встряхивании и растворитель удаляют на роторном испарителе в грушевидной колбе на 100 мл; последние порции растворителя удаляют током сухого воздуха. Сухой остаток растворяют в 0,5 мл ацетона и раствор наносят в виде полосы на стеклянную пластинку (5 х 20 см) с тонким слоем (0,4 мм) силикагеля КСК и дважды хроматографируют в системе растворителей – петролейный

эфир (или гекеан)-диэтиловый эфир – муравьиная кислота (50 : 50 : 2). Затем снимают силикагель с пластинки в виде 1 см зоны Rf 2,4-Д (0,5—0,6*) и количественно переносят в коническую колбу с притертой пробкой на 50 мл. Смачивают силикагель в колбе 1 мл дистиллированной воды, приливают 4—5 мм ацетона, встряхивают 1—2 мин и фильтруют через бумажный фильтр. Обработку силикагеля ацетоном проводят еще трижды. Объединенный ацетоновый экстракт сушат над безводным сульфатом натрия, удаляют растворитель на роторном испарителе, затем проводят метилирование образца и газохроматографическое определение 2,4-Д так, как это описано выше.

Для построения калибровочного графика в пробы травы, зерна, сена или соломы вносят 10, 15, 20 и 25 мкг 2,4-Д в виде раствора в метиловом спирте, *1 мл стандартного раствор 2,4,5-Т с содержанием* 2,5 мкг/мл и далее поступают так, как это описано выше.

Почва. Сухая почва: 100 г почвы, растертой и просеянной через сито с размером отверстий 1 мм, помещают в коническую колбу с пришлифованной пробкой на 500 мл, приливают 25—35 мл дистиллированной воды, 5 мл концентрированной соляной кислоты, 1 мл стандартного раствора 2,4,5-Т с содержанием 2,5 мкг/мл, тщательно перемешивают, прибавляют 150 мл ацетона и помещают на аппарат для встряхивания на 1 час. Затем растворитель отфильтровывают под вакуумом на воронке Бюхнера через бумажный фильтр и почву на фильтре трижды промывают ацетоном (3 х 2,0 мл). Затем ацетон удаляют на роторном испарителе, остаток из колбы переносят 100 мл дистиллированной воды в делительную воронку, экстрагируют тремя порциями диэтилового эфира (75, 50 и 50 мл) и далее поступают так, как это описано при определении 2,4-Д в воде. Для построения калибровочного графика в пробы почвы вносят 10, 15, 20 и 25 мкг 2,4-Д в виде раствора в метиловом, спирте, 1 мл стандартного раствора 2,4,5-Т с содержанием 2,5 мкг/мл и далее поступают так, как это описано выше.

Влажная почва. 100—200 г влажной почвы помещают в коническую колбу с притертой пробкой на 500 мл, приливают 5—10 мл концентрированной соляной кислотой, 150—300 мл ацетона, тщательно перемешивают, помещают на аппарат для встряхивания на 1 час и далее поступают так, как описано выше.

---

* Подвижность (Rf) стандарта – хч 2,4-Д в указанной системе растворитель определяют после обработки хроматограммы проявляющим реактивом.

Молоко. В пробу молока (25—50 мл) вносят 1 мл стандартного раствора 2,4,5-Т с концентрацией 2,5 мкг/мл, прибавляют концентрированную соляную кислоту (44—88 мл), помещают в круглодонную колбу на 250 мл, присоединяют обратный холодильник и помещают на кипящую водяную баню на 1 час для гидролиза. После охлаждения в колбу приливают 15 мл 40 %-ного водного раствора фосфорно-вольфрамовой кислоты, тщательно встряхивают, 100 мл дистиллированной воды и содержимое фильтруют под вакуумом на воронке Бюхнера. Остаток на фильтре промывают 2н водным раствором соляной кислоты, фильтрат экстрагируют диэтиловым эфиром (3 х 50 мм) и далее поступают так, как это описано, выше.

Для построения калибровочного графика в пробы молока (25—50 мл) вносят 2,5,10,20 мкг 2,4-Д (в виде раствора в метиловом спирте), 1 мл стандартного раствора 2,4,5-Т содержанием 2,5 мкг/мл, концентрированную соляную кислоту (44—88 мл) и далее поступают так, как описано выше.

Сливочное масло. 25 г масла растворяют в 100 н-гексана, вносят 1 мл стандартного раствора 2,4,5-Т с содержанием 2,5 мкг/мл, помещают в двухгорную круглодонную колбу на 500 мл, приливают 100 мл 6н соляной кислоты, присоединяют обратный холодильник и помещают на кипящую водяную баню на 1 час, перемешивая содержимое колбы с помощью электромешалки. После охлаждения содержимого колбы слои разделяют в делительной воронке и водный слой экстрагируют диэтиловым эфиром (2 х 50 мл). Гексановый слой экстрагируют 100 мл 6н соляной кислоты; затем водный слой экстрагируют диэтиловым эфиром (2 х 50 мл) и этот экстракт объединяют с первоначальным эфирным экстрактом. Затем из объединенного эфирного экстракта 2,4-Д извлекают 0,4н водным раствором бикарбоната натрия и далее поступают так, как описано при определении в молоке.

Для построения калибровочного графика в пробы масла (25 г), растворенные в 100 мл н-гексана, вносят 1 мл стандартного раствора 2,5,5-Т с концентрацией 2,5 мкг/мл, 10, 15, 20, 25 мкг 2,4-Д в виде раствора в метиловом спирте и далее поступают так, как это описано выше.

Мясо. 25—50 г мяса измельчают с помощью мясорубки, помещают в двухгорлую круглодонную колбу на 500 мл, вносят 1 мл стандартного раствора 2,4-5-Т с концентрацией 2,5 мкг/мл, приливают 6н соляную кислоту (100—200 мл), присоединяют обратный холодильник и помещают на водяную баню (Т = 100 °С) на 1 час, перемешивая содержимое колбы с помощью электромешалки. После охлаждения в колбу прили-

вают 15 мл 40 %-ного водного раствора фосфорно-вольфрамовой кислоты, 100 мл дистиллированной воды и содержимое колбы фильтруют под вакуумом на воронке Бюхнера. Остаток на фильтре промывают 2н водным раствором соляной кислоты, фильтрат экстрагируют диэтиловым эфиром (3 х 50 мл) и далее поступают так, как это описано выше.

Для построения калибровочного графика в пробы мяса вносят 1 мл стандартного раствора 2,4,5-Т с содержанием 2,5 мкг/мл, 10, 15, 20; 25 мкг 2,4-Д в виде раствора в метиловом спирте и далее поступают так, как это описано выше.

Тонкослойная хроматография

При количественном определении содержания 2,4-Д методом тонкослойной хроматографии подготовка образца и очистка экстракта проводятся таким же образом, как при анализе гербицида газохроматографическим методом, за исключением того, что 2,4,5-Т в пробы не вносится,

Полученный после очистки объединенный эфирный экстракт сушат над безводным сульфатом натрия и упаривают растворитель на ротарционном испарителе в грушевидной колбе на 100 мл до небольшого объема (1—2 мл). Упаренный экстракт количественно наносят на хроматографическую пластинку (9 х 12 см) с тонким слоем силикагеля КСК, закрепленного гипсом, с помощью капилляра или медицинского шприца на 1 мл. Затем на хроматографическую пластинку наносят 2,5 и 10 мкг 2,4-Д в виде раствора в ацетоне и проводят хроматографирование в системе растворителей петролейный эфир (или н-гексан)-диэтиловый эфир-муравьиная кислота (50 : 50 : 2). После окончания процесса хроматографирования пластинку извлекают из хроматографической камеры и сушат на воздухе в вытяжном шкафу. Для обнаружения зоны локализации 2,4-Д пластинку обрабатывают раствором азотно-кислого серебра в смеси дистиллированной воды, аммиака и ацетона, сушат и облучают УФ-светом в течение 10—15 минут. При наличии в пробе 2,4-Д на пластинке появляется серо-черное пятно на белом фоне с величиной Rf 0,5. Количественное определение 2,4-Д проводят путем визуального сравнения размера и интенсивности окраски пятен стандарта с пятном пробы. Минимально детектируемое количество 2,4-Д на хроматографической пластинке 1 мкг. Перед проведением серийных анализов необходимо определить открываемостъ метода, т. е. процент возврата 2,4-Д из контрольных проб, к которым предварительно были добавлены различные количества гербицида.

Для повышения надежности идентификации 2,4-Д, особенно при анализе проб с неизвестными обстоятельствами загрязнения, целесообразно после проведения газохроматографического определения содержания гербицида оставшуюся часть пробы анализировать с помощью тонкослойной хроматографии. Для этого гексановый экстракт наносят на хроматографическую пластинку (9 х 12) с тонким слоем силикагеля КСК, рядом наносят 2—10 мкг метилового раствора 2,4-Д в виде раствора в н-гексане и хроматографируют в системе растворителей н-гептан-ацетон (9 : 3). Далее поступают так, как это описано выше. Величина Rf метилового эфира 2,4-Д 0,46—0,47.

Сочетание величины времени удерживания и величины Rf метилового эфира 2,4-Д в сравнении с этими же показателями, полученными для стандартного соединения, позволяет более надежно проводить определение остаточных количеств 2,4-Д в анализируемых образцах.

Расчет результатов анализа

Для определения содержания 2,4-Д в пробах методом газожидкостной хроматографии используют следующую формулу

$$X = \frac{y - A}{B}, \text{ где}$$

X – содержание 2,4-Д в пробе, мг/л или мг/кг;

y – отношение высот хроматографических пиков метиловых эфиров 2,4-Д и 2,4,5-Т

A и B – коэффициенты, которые получают при обработке калибровочных графиков по методу наименьших квадратов.

Для определения содержания 2,4-Д в пробе методом тонкослойной хроматографии применяют следующую формулу

$$Д = \frac{10^5 \cdot A}{a \cdot R}, \text{ где}$$

$Д$ – содержание 2,4-Д в пробе, мг/л или мг/кг;

A – количество 2,4-Д в пробе, найденное визуальным сравнением со стандартом, мг;

a – объем или вес пробы, мл или г;

R – процент определения (открываемость), найденный предварительно, %.

Для определения содержания в пробе натриевой, диметилдиэтил или триэтанол-аминных солей 2,4-Д полученный результат необходимо соответственно умножить на 1,1, 1,46 и 1,67.

gost.e-ecolog.ru