ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 51116— 2017

КОМБИКОРМА, ЗЕРНО И ПРОДУКТЫ ЕГО ПЕРЕРАБОТКИ

Определение содержания дезоксиниваленола методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2017

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Акционерным обществом «Всероссийский научно-исследовательский институт комбикормовой промышленности» (АО «ВНИИКП»), Обществом с ограниченной ответственностью «ЛЮМЭКС-МАРКЕТИНГ» (ООО «ЛЮМЭКС-МАРКЕТИНГ»)

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 004 «Комбикорма, белково-витаминно-минеральные концентраты, премиксы»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 15 сентября 2017 г. № 1132-ст

4 ВЗАМЕН ГОСТ Р 51116—97

*Правила применения настоящего стандарта установлены в статье 26 Федерального закона от 29 июня 2015 г. № 162-ФЗ «О стандартизации в Российской Федерации». Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном (по состоянию на 1 января текущего года) информационном указателе «Национальные стандарты», а официальный текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ближайшем выпуске ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет (*gost.e-ecolog.ru

© Стандартинформ, 2017

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Сущность метода 2
4 Требования безопасности 2
5 Требования к проведению испытаний 2
6 Отбор проб 3
7 Подготовка проб 3
8 Определение содержания ДОН в изократическом режиме элюирования 3
9 Определение содержания ДОН в градиентном режиме элюирования 10
Приложение А (справочное) Перевод катионита в Н-форму для варианта А 17
Приложение Б (справочное) Таблица Стьюдента 18

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

КОМБИКОРМА, ЗЕРНО И ПРОДУКТЫ ЕГО ПЕРЕРАБОТКИ

Определение содержания дезоксиниваленола методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Compound feeds, grain and grain by-products. Determination of desoxinivalenol by high-performance liquid chromatography method

Дата введения — 2019—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на зерно, продукты его переработки, комбикорма, кормовые смеси и устанавливает метод определения содержания дезоксиниваленола (далее — ДОН) высокоэффективной жидкостной хроматографией (далее — ВЭЖХ) с очисткой экстракта от примесей с помощью колоночной хроматографии:

- с использованием оксида алюминия, активированного угля и катионита в изократическом режиме элюирования;
- с использованием активированного угля в градиентном режиме элюирования.

Диапазон измерений содержания ДОН от 0,2 до 5,0 млн$^{-1}$ (мг/кг).

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 12.1.004 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.005 Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны

ГОСТ 12.1.007 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 12.4.009 Система стандартов безопасности труда. Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание.

ГОСТ 12.4.021 Система стандартов безопасности труда. Системы вентиляционные. Общие требования

ГОСТ 1770—74 (ИСО 1042-83, ИСО 4788-80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 4204 Реактивы. Кислота серная. Технические условия

ГОСТ 4461 Реактивы. Кислота азотная. Технические условия

ГОСТ 5556 Вата медицинская гигроскопическая. Технические условия

ГОСТ ISO 6497 Корма. Отбор проб

ГОСТ ISO 6498 Корма, комбикорма. Подготовка проб для испытаний

ГОСТ 6709 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 6995 Реактивы. Метанол-яд. Технические условия

ГОСТ 9293 (ИСО 2435—73) Азот газообразный и жидкий. Технические условия

ГОСТ 13496.0 Комбикорма, комбикормовое сырье. Методы отбора проб

ГОСТ 16317 Приборы холодильные электрические бытовые. Общие технические условия

ГОСТ 20298 Смолы ионообменные. Катиониты. Технические условия

Издание официальное

ГОСТ 25336 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 28311 Дозаторы медицинские лабораторные. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ 29227—91 (ИСО 835-1—81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

ГОСТ Р 12.1.019 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ Р ИСО 5725-6—2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике

ГОСТ Р 53228 Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодному информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана недатированная ссылка, то рекомендуется использовать действующую версию этого стандарта с учетом всех внесенных в данную версию изменений. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, то рекомендуется использовать версию этого стандарта с указанным выше годом утверждения (принятия). Если после утверждения настоящего стандарта в ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение рекомендуется применять без учета данного изменения. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, рекомендуется применять в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Сущность метода

Сущность метода заключается в экстракции ДОН из анализируемой пробы смесью ацетонитрила с водой, очистке экстракта с помощью колоночной хроматографии и определении ДОН с использованием обращенно-фазовой ВЭЖХ с фотометрическим детектированием.

4 Требования безопасности

4.1 При выполнении испытаний необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007, требования электробезопасности при работе с электроприборами по ГОСТ Р 12.1.019, а также требования, изложенные в технической документации на используемые приборы.

4.2 Работа с химическими реактивами должна проводиться в вытяжном шкафу.

4.3 Помещение должно быть оснащено вентиляционными системами по ГОСТ 12.4.021, средствами пожаротушения по ГОСТ 12.4.009 и соответствовать требованиям пожаробезопасности по ГОСТ 12.1.004.

4.4 Содержание вредных веществ в воздухе не должно превышать допустимых значений по ГОСТ 12.1.005.

4.5 ДОН обладает токсическим действием, поэтому необходимо избегать контакта кожных покровов с его растворами. При попадании раствора на кожу или на стол необходимо смыть загрязнение проточной водой с моющим средством, а затем обработать участок кожи и загрязненные поверхности этиловым спиртом.

5 Требования к проведению испытаний

5.1 Условия проведения испытаний

При подготовке и проведении испытаний должны быть соблюдены следующие условия:

- температура окружающей среды ..... от 15 °С до 25 °С;
- относительная влажность воздуха ..... не более 80 %;
- атмосферное давление ..... от 84,0 до 106,7 кПа;
- напряжение в сети ..... от 198 до 242 В;
- частота в сети ..... от 49 до 51 Гц.

5.2 Требования к квалификации оператора

К выполнению испытаний и обработке их результатов допускают специалиста, имеющего высшее или среднее специальное образование и опыт работы в химической лаборатории, прошедшего соответствующий инструктаж, освоившего метод в процессе обучения и показавшего удовлетворительные результаты при выполнении процедур контроля качества результатов измерений.

6 Отбор проб

Отбор проб — по ГОСТ ISO 6497, ГОСТ 13496.0 или в соответствии с нормативными документами на анализируемые продукты.

7 Подготовка проб

Подготовка проб к испытанию — по ГОСТ ISO 6498.

8 Определение содержания ДОН в изократическом режиме элюирования

8.1 Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы и реактивы

8.1.1 Хроматограф жидкостный со спектрофотометрическим детектором, позволяющим проводить измерения в диапазоне длин волн от 200 до 300 нм, снабженный программным обеспечением для сбора и обработки хроматографических данных.

8.1.2 Хроматографическая колонка для ВЭЖХ, заполненная обращенно-фазовым сорбентом, которая обеспечивает в условиях выполнения анализа эффективность не менее 5000 теоретических тарелок по пику ДОН[1)]. Для увеличения срока использования колонки рекомендуется использовать защитную колонку (предколонку), заполненную тем же сорбентом.

8.1.3 Весы неавтоматического действия по ГОСТ Р 53228 с пределами допускаемой погрешности взвешивания ± 0,001 г.

8.1.4 Колбы мерные 2(2а)—25(50,100,500)—2 по ГОСТ 1770—74 (подраздел 1.3).

8.1.5 Цилиндры мерные 1(2, 3, 4)—10(25, 50,100, 250)—2 по ГОСТ 1770—74 (подраздел 1.1).

8.1.6 Пипетки градуированные 1(2, 3, 5)—1(1а, 2, 2а)—2—0,5(1,2,5,10) по ГОСТ 29227—91 (раздел 5).

8.1.7 Дозатор пипеточный одноканальный переменного объема 100—1000 мм^3 с метрологическими характеристиками по ГОСТ 28311.

8.1.8 Стандартный образец состава раствора ДОН в ацетонитриле (массовая концентрация ДОН — 100 мкг/см^3, погрешность не более ± 5,0 мкг/см^3) или ДОН кристаллический с массовой долей основного вещества не менее 97 %.

8.1.9 Колонка хроматографическая стеклянная (внутренний диаметр 10 мм, длина 20 см).

8.1.10 Колонка хроматографическая стеклянная (внутренний диаметр 5 мм, длина 10 см) с оттянутым концом и шарообразной верхней частью вместимостью 10—15 см^3 или пластиковые колонки (внутренний диаметр 5 мм).

8.1.11 Испаритель ротационный, снабженный водяной баней с регулятором температуры в диапазоне от 20 °С до 90 °С.

8.1.12 Насос лабораторный вакуумный, мембранный или водоструйный по ГОСТ 25336, обеспечивающий разрежение от 2,5 до 10 кПа.

8.1.13 Устройство для перемешивания проб (шейкер), обеспечивающее частоту встряхивания до 120 мин$^{-1}$.

8.1.14 Шкаф сушильный, обеспечивающий температуру до 200 °С.

8.1.15 Измельчитель проб, обеспечивающий измельчение до частиц размером менее 1 мм, например лабораторная мельница.

8.1.16 Холодильник бытовой по ГОСТ 16317.

[1)] Примером подходящей колонки является колонка длиной 150 мм и внутренним диаметром 2,1 мм, заполненная сорбентом Alltima C18 или Kromasil C18 с размером частиц 5 мкм. Эта информация приведена для удобства пользователей стандарта и не является рекламой. Могут быть использованы колонки других типоразмеров и (или) с иным размером частиц, если они обеспечивают указанные требования по эффективности.

8.1.17 Колбы П-1-25(50)-14/23, П-2-100-34 или П-1-100-19-26(29-32) по ГОСТ 25336 с притертыми стеклянными или полиэтиленовыми пробками.

8.1.18 Воронки В-56-80 ХС по ГОСТ 25336.

8.1.19 Стаканы В—1(2)—50 ТХС по ГОСТ 25336.

8.1.20 Фильтры бумажные «красная лента».

8.1.21 Вата медицинская гигроскопическая по ГОСТ 5556.

8.1.22 Штатив лабораторный универсальный.

8.1.23 Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

8.1.24 Ацетонитрил для ВЭЖХ, ос. ч. (оптическая плотность при 200 нм относительно дистиллированной воды должна быть не более 0,05, массовая доля воды не более 0,05 %).

8.1.25 Алюминия оксид для хроматографии нейтральный, фракция 50—150 мкм.

8.1.26 Катионит КУ-2-8 в Н-форме по ГОСТ 20298.

Примечание — Если в спецификации катионита не указана его форма, то перед началом работы необходимо перевести его в Н-форму в соответствии с приложением А.

8.1.27 Уголь активированный с размером частиц от 0,08 до 0,10 мм.

8.1.28 Кислота серная по ГОСТ 4204, х. ч. или азотная по ГОСТ 4461, х. ч.

Примечание — Допускается применение других средств измерений с метрологическими характеристиками не хуже вышеуказанных, вспомогательного оборудования и материалов с техническими характеристиками не хуже вышеуказанных и реактивов аналогичной или более высокой квалификации.

8.2 Подготовка стеклянной лабораторной посуды

8.2.1 Лабораторную посуду для приготовления и хранения элюента моют серной или азотной кислотой (см. 8.1.28) без применения других моющих средств, тщательно промывают водопроводной и многократно ополаскивают дистиллированной водой (см. 8.1.23) и сушат при температуре 105 °С. Категорически запрещается использовать для мытья посуды хромовую смесь.

8.2.2 Остальную стеклянную посуду моют горячей водой с моющим средством, тщательно ополаскивают дистиллированной водой (см. 8.1.23) и также сушат при температуре 105 °С.

8.3 Подготовка сорбента для колоночной хроматографии

В чистый химический стаканчик (см. 8.1.19) помещают 10,0 г оксида алюминия и 0,5 г активированного угля (см. 8.1.27), тщательно перемешивают при помощи стеклянной палочки.

Сорбент хранят в стеклянной посуде с пришлифованной или полиэтиленовой пробкой. Срок хранения — 1 мес при комнатной температуре.

8.4 Приготовление растворов

8.4.1 Подвижная фаза для хроматографии

8.4.1.1 Общие требования

Подвижную фазу перед использованием дегазируют выдерживанием в течение 1—2 ч на ультразвуковой бане или с помощью вакуумного насоса.

Подвижную фазу хранят в герметично закрытой посуде. Срок хранения — 7 сут при комнатной температуре.

Для приготовления и хранения подвижной фазы не допускается использование посуды с резиновыми и корковыми пробками.

8.4.1.2 Приготовление подвижной фазы

В мерную колбу (см. 8.1.4) вместимостью 100 $см^3$ при помощи градуированной пипетки (см. 8.1.6) помещают 6 $см^3$ ацетонитрила, объем раствора в колбе доводят до метки дистиллированной водой (см. 8.1.23) и тщательно перемешивают.

8.4.2 Приготовление смеси ацетонитрил — вода в соотношении 84 : 16 по объему для экстракции ДОН из пробы

В мерную колбу (см. 8.1.4) вместимостью 500 $см^3$ помещают 420 $см^3$ ацетонитрила (см. 8.1.24), объем раствора в колбе доводят до метки дистиллированной водой (см. 8.1.23) и тщательно перемешивают.

Срок хранения смеси в герметично закрытой посуде — 1 мес при комнатной температуре.

8.4.3 Приготовление растворов ДОН

8.4.3.1 Общие требования

Растворы ДОН хранят в холодильнике при температуре от 2 °С до 8 °С в герметично закрытой посуде, исключающей возможность испарения растворителя и контакт раствора с материалами, отличными от стекла или фторопласта.

Допускается приготовление градуировочных растворов в меньших объемах (в виалах) с использованием пипеточных дозаторов (см. 8.1.7) и использование градуировочных растворов с иными значениями массовой концентрации в диапазоне линейности градуировочной характеристики от 0,4 до 10,0 мкг/см^3.

8.4.3.2 Приготовление запасного раствора ДОН

В мерную колбу (см 8.1.4) вместимостью 25 см^3 помещают 1 см^3 раствора стандартного образца состава раствора ДОН в ацетонитриле (см. 8.1.8) и доводят до метки ацетонитрилом (см. 8.1.24).

Номинальное значение массовой концентрации ДОН в запасном растворе составляет 4 мкг/см^3.

Если значение массовой концентрации ДОН, приведенное в паспорте на стандартный образец, отличается от номинального значения 100 мкг/см^3 или для приготовления запасного раствора ДОН отбирается менее 1 см^3 стандартного образца, то фактическое значение массовой концентрации ДОН в приготовленном растворе $C_{зап}$, мкг/см^3, вычисляют по формуле

$$C_{зап} = \frac{C_0 \cdot V_0}{V_{зап,0}}, \quad (1)$$

где C_0 — значение массовой концентрации ДОН в растворе стандартного образца, использованном для приготовления запасного раствора, мкг/см^3;

V_0 — объем стандартного образца, отобранный для разбавления, см^3;

$V_{зап,0}$ — объем приготовленного раствора, см^3 (25 см^3).

Срок хранения запасного раствора — 6 мес.

Примечание — Допускается приготовление запасного раствора ДОН с использованием основного раствора, приготовленного по 9.3.2.2.

8.4.3.3 Приготовление градуировочных растворов ДОН

В колбу для упаривания помещают указанный в таблице 1 объем раствора ДОН с номинальным значением массовой концентрации 4 мкг/см^3 (см. 8.4.3.2), удаляют растворитель упариванием в вакууме при температуре водяной бани от 40 °С до 45 °С. Полученный сухой остаток растворяют в соответствующем объеме (см. таблицу 1) подвижной фазы (см. 8.4.1.2).

Таблица 1

Номер градуировочного раствора	Номинальное значение массовой концентрации ДОН, мкг/см^3	Объем запасного раствора ДОН (см. 8.4.3.2), $V_{зап}$, см^3	Объем подвижной фазы, добавляемый к сухому остатку, см^3
1	10	2,5	1
2	4	1	1
3	0,4	1	10

Срок хранения градуировочных растворов № 1 и № 2 — 7 сут, раствора № 3 — 1 сут в условиях, исключающих испарение растворителя.

Фактическое значение массовой концентрации ДОН в градуировочных растворах C_i вычисляют по формуле

$$C_i = \frac{C_{зап} \cdot V_{зап}}{V_i}, \quad (2)$$

где $C_{зап}$ — фактическое значение массовой концентрации ДОН в запасном растворе, вычисленное по формуле (1), мкг/см^3;

$V_{зап}$ — объем запасного раствора, отобранный для разбавления, см^3;

V_i — объем приготовленного градуировочного раствора, см^3.

8.4.3.4 Приготовление контрольного раствора ДОН

Контрольный раствор ДОН в подвижной фазе готовят согласно 8.4.3.3, используя аликвоту 0,5 $см^3$ запасного раствора ДОН номинального значения массовой концентрации 4 мкг/$см^3$ (см. 8.4.3.2) и растворяя остаток после упаривания в 2 $см^3$ подвижной фазы (см. 8.4.1.2).

Номинальное значение массовой концентрации ДОН в контрольном растворе составляет — 1 мкг/$см^3$, фактическое значение вычисляют по формуле (2).

Срок хранения раствора — 7 сут в условиях, исключающих испарение растворителя.

8.5 Подготовка хроматографа к работе

Подготовку хроматографа к работе проводят в соответствии с руководством по эксплуатации. Необходимые настройки программного обеспечения производят в соответствии с руководством пользователя программного обеспечения.

8.6 Условия проведения хроматографического анализа

При использовании хроматографической колонки по 8.1.2 рекомендуются следующие условия хроматографического анализа:

- подвижная фаза — смесь ацетонитрил — вода (см. 8.4.1.2);
- рабочая длина волны — 210 нм;
- объемная скорость потока подвижной фазы — 150 $мм^3$/мин;
- объем дозирования — 20 $мм^3$;
- температура термостата колонки (при его наличии) — (25 ± 1) °С.

При использовании колонок других типоразмеров скорость потока подвижной фазы и объем дозирования выбирают в соответствии с указаниями изготовителя хроматографа и колонки.

Допускается варьирование объемной доли ацетонитрила в составе подвижной фазы в диапазоне от 4 % до 8 % с целью оптимизации разделения пиков ДОН и компонентов матрицы пробы.

8.7 Градуировка хроматографа

Градуировку хроматографа рекомендуется проводить с использованием подвижной фазы (см. 8.4.1.2).

Регистрируют не менее двух хроматограмм для каждого градуировочного раствора (см. 8.4.3.3), проверяют правильность автоматической разметки и, если необходимо, корректируют ее.

Далее проводят процедуру градуировки согласно руководству пользователя программного обеспечения, определяют время удерживания и параметры градуировочной характеристики.

Градуировочную характеристику признают приемлемой, если вычисляемые программой относительное среднеквадратическое отклонение составляет не более 5 %, а коэффициент корреляции — не ниже 0,99.

Если хотя бы одно из этих условий не выполняется, заново регистрируют хроматограммы градуировочных растворов и определяют параметры градуировочной характеристики. При этом допускается отбраковывать неудовлетворительные данные, однако число принятых в градуировку точек должно быть не меньше двух для каждого градуировочного раствора.

Повторную градуировку хроматографа проводят при неудовлетворительных результатах ее контроля стабильности (см. 8.8), а также после проведения ремонта или длительного простоя хроматографа.

8.8 Контроль стабильности градуировочной характеристики

Контроль стабильности градуировочной характеристики проводят в начале рабочего дня перед измерениями.

Для контроля стабильности градуировочной характеристики используют контрольный раствор (см. 8.4.3.4). Допускается в качестве контрольного раствора использовать растворы с другой массовой концентрацией ДОН, приготовленные аналогично градуировочным в диапазоне линейности градуировочной характеристики (см. 8.4.3.1), исходя из предполагаемого содержания ДОН в анализируемых пробах.

Регистрируют не менее двух хроматограмм контрольного раствора.

На полученных хроматограммах проводят автоматическую идентификацию пика ДОН. При необходимости вносят программную коррекцию времени удерживания пика.

При помощи программного обеспечения к хроматографу проверяют сходимость значений времени удерживания и значений массовой концентрации ДОН по формулам (3) и (4) соответственно.

$$|t_1 - t_2| \le 0{,}05 \cdot \bar{t}, \quad (3)$$

где t_1 и t_2 — время удерживания ДОН на первой и второй хроматограммах соответственно, мин;

$\bar{t}$ — среднеарифметическое значение t_1 и t_2, мин.

$$|C_{к,1} - C_{к,2}| \le 0{,}05 \cdot \bar{C}_к, \quad (4)$$

где $C_{к,1}$ и $C_{к,2}$ — значения массовой концентрации ДОН в контрольном растворе, определенные по первой и второй хроматограммам соответственно, мкг/см^3;

$\bar{C}_к$ — среднеарифметическое значение $C_{к,1}$ и $C_{к,2}$, мкг/см^3.

Градуировочная зависимость признается стабильной, если выполняется условие

$$|\bar{C}_к - C_1| \le 0{,}1 \cdot C_1, \quad (5)$$

где $\bar{C}_к$ — среднеарифметическое значение $C_{к,1}$ и $C_{к,2}$, мкг/см^3;

C_1 — фактическое значение массовой концентрации ДОН в контрольном растворе (см. 8.4.3.4), мкг/см^3.

Если условие (5) не выполняется, то процедуру контроля повторяют и при получении неудовлетворительного результата контроля градуировку хроматографа по 8.7 проводят заново.

8.9 Подготовка хроматографических колонок для очистки проб

8.9.1 Колонки для очистки проб готовят непосредственно перед выполнением анализа.

Подготовленную колонку используют однократно.

8.9.2 В носик колонки (см. 8.1.9) помещают небольшое количество ваты. При помощи воронки переносят в колонку 1 г сорбента, подготовленного по 8.3, уплотняют осторожным постукиванием, а затем помещают 3 г катионита в Н-форме, предварительно выдержанного в течение 30 мин в дистиллированной воде для набухания. Перед переносом в колонку избыток воды над катионитом сливают декантацией.

8.9.3 На дно хроматографической колонки (см. 8.1.10) помещают небольшое количество ваты, смоченной дистиллированной водой (см. 8.1.23), и плотно утрамбовывают при помощи стеклянной палочки. В чистом стаканчике взвешивают 0,1 г активированного угля (см 8.1.27), приливают к нему 3—5 см^3 дистиллированной воды, перемешивают до получения однородной суспензии и в несколько приемов переносят в колонку, добавляя при необходимости новые порции воды. Подключают колонку к вакуумному насосу и отсасывают воду досуха. После пропускания воды сверху на слой угля помещают ватный тампон.

8.10 Испытание холостой пробы

Испытание холостой пробы проводят до начала анализа проб.

Отбирают 5 см^3 смеси ацетонитрил — вода (см. 8.4.2) и выполняют все операции по 8.12.2, получая таким образом концентрат холостой пробы. Анализируют концентрат по 8.12.3. Если на хроматограмме присутствуют пики, по времени удерживания близкие к пику ДОН, то находят и устраняют причины загрязнения холостой пробы (посуда или реактивы).

Контроль холостой пробы проводят для каждой новой партии растворителя или сорбента для колоночной хроматографии, а также в тех случаях, когда возникают сомнения в качестве используемой дистиллированной воды или ацетонитрила.

8.11 Контроль полноты извлечения ДОН

Полноту извлечения ДОН определяют по коэффициенту извлечения ДОН в контрольной пробе.

Для этого в плоскодонную колбу (см. 8.1.17) вместимостью 100 см^3 помещают 1 см^3 запасного раствора ДОН (см. 8.4.3.2), 24 см^3 подвижной фазы (см. 8.4.1.2), тщательно перемешивают, фильтруют через складчатый бумажный фильтр (см. 8.1.20), проводят очистку по 8.12.2 и хроматографические измерения по 8.12.3. Используя градуировочную характеристику, определяют массовую концентрацию ДОН в полученном концентрате контрольной пробы.

Коэффициент извлечения ДОН η вычисляют по формуле

$$\eta = \frac{X_к}{C_Д}, \quad (6)$$

где $X_к$ — измеренное значение массовой концентрации ДОН в концентрате контрольной пробы, мкг/см^3;

$C_Д$ — значение массовой концентрации ДОН в концентрате контрольной пробы, вычисленное по формуле (7), мкг/см^3.

Массовую концентрацию ДОН в концентрате контрольной пробы $C_Д$, мкг/см^3, вычисляют по формуле

$$C_Д = \frac{C_{зап} \cdot V_5 \cdot V_3}{(V_2 + V_5) \cdot V_4}, \quad (7)$$

где $C_{зап}$ — фактическое значение массовой концентрации запасного раствора ДОН (см. 8.4.3.2), мкг/см^3;

V_5 — объем запасного раствора ДОН, см^3 (1 см^3);

V_3 — аликвота фильтрата, взятая для дальнейшего анализа по 8.12.2, см^3 (5 см^3);

V_2 — объем подвижной фазы, взятый для экстракции, см^3 (24 см^3);

V_4 — объем концентрата контрольной пробы, см^3 (0,5 см^3).

Контроль извлечения ДОН проводят на этапе освоения методики и при использовании каждой новой партии оксида алюминия, угля и/или катионита. Данная процедура должна быть проведена не менее трех раз, причем контроль извлечения должен выполнить каждый из операторов, выполняющий испытания.

Контроль полноты извлечения ДОН считается удовлетворительным, если каждое из полученных значений коэффициента извлечения ДОН η не менее 0,70, а расхождение между максимальным и минимальным значениями, полученными оператором, не превышают 0,10. В противном случае необходимо найти причины неудовлетворительного проведения подготовки пробы и повторить процедуру контроля полноты извлечения до получения результатов, удовлетворяющих указанному выше условию.

Вычисляют среднеарифметическое значение полученных значений коэффициента извлечения ДОН и используют его при обработке результатов измерений (см. 8.13).

8.12 Проведение испытаний

8.12.1 Экстракция ДОН из пробы

В плоскодонную колбу (см. 8.1.17) вместимостью 100 см^3 помещают от 4,5 до 5,5 г подготовленной в соответствии с разделом 7 пробы, взвешенной с погрешностью ±0,01 г. Добавляют 25 см^3 смеси ацетонитрил — вода (см. 8.4.2) и перемешивают в течение 30 мин. Полученный экстракт фильтруют через бумажный складчатый фильтр (см. 8.1.20).

8.12.2 Очистка экстракта

Отбирают 5 см^3 фильтрата, полученного по 8.12.1, переносят на подготовленную по 8.9.1 колонку и элюируют со скоростью не выше 1 капля/с в колбу для упаривания.

После того как уровень жидкости достигнет поверхности сорбента, пропускают через колонку 10 см^3 смеси ацетонитрил — вода (см. 8.4.2), собирая элюат со скоростью не выше 1 капля/с в ту же колбу для упаривания.

Полученный элюат упаривают досуха в вакууме при температуре водяной бани от 80 °С до 90 °С.

К сухому остатку добавляют 1 см^3 дистиллированной воды (см. 8.1.23), колбу закрывают пробкой, стенки колбы осторожно омывают находящейся в ней жидкостью. Содержимое колбы переносят в колонку, подготовленную по 8.9.3. Стенки колбы повторно обмывают 1 см^3 дистиллированной воды, которую тоже переносят в колонку. Создавая разрежение при помощи вакуумного насоса, пропускают жидкость со скоростью примерно одна капля в 4—5 с в колбу для слива. Далее промывают колонку еще 2 см^3 дистиллированной воды. Собранный элюат отбрасывают.

Из колонки элюируют ДОН 8 см^3 смеси ацетонитрил — вода (см. 8.4.2) при помощи вакуумного насоса со скоростью не выше 1 капля/с в колбу для упаривания.

Собранный элюат упаривают досуха при температуре водяной бани от 80 °С до 90 °С, сухой остаток растворяют в 0,5 см^3 подвижной фазы (см. 8.4.1.2), тщательно ополаскивая стенки колбы, и выдерживают 5 мин. Полученный концентрат пробы используют для хроматографических измерений в течение рабочего дня.

8.12.3 Проведение хроматографических измерений

Для каждого полученного концентрата пробы регистрируют по две хроматограммы.

При работе с пробами сложного состава для устранения мешающего влияния компонентов матрицы на последующие хроматографические измерения и с целью сокращения времени анализа рекомендуется после выхода пика ДОН увеличить объемную скорость подвижной фазы в 1,5—2 раза в течение 40 мин, затем обязательно снизить объемную скорость до значения, используемого при хроматографическом анализе (см. 8.6), дождаться стабилизации базовой линии и продолжить хроматографические измерения.

Идентификацию ДОН в пробе проводят средствами программного обеспечения по совпадению времени удерживания пика ДОН для концентрата пробы и контрольного раствора (см. 8.8) при ширине окна идентификации 5 %.

Если на хроматограмме концентрата пробы идентифицирован пик ДОН, то используя полученную по 8.8 градуировочную характеристику, вычисляют массовую концентрацию ДОН для каждого из двух вводов. Проверяют выполнение условия сходимости полученных измеренных значений, используя неравенство

$$|C_{п,1} - C_{п,2}| \le 0{,}07 \cdot \bar{C}_п, \quad (8)$$

где $C_{п,1}$ и $C_{п,2}$ — значение массовой концентрации ДОН для первого и второго ввода, мкг/см^3;

$\bar{C}_п$ — среднеарифметическое значение массовых концентраций $C_{п,1}$ и $C_{п,2}$, мкг/см^3.

Если это условие выполняется, то в качестве значения массовой концентрации ДОН в концентрате пробы принимают среднеарифметическое значение. Если условие не выполняется, то находят и устраняют причины нестабильности, после чего ввод концентрата пробы повторяют.

В случае сложных проб для подтверждения правильности идентификации пика рекомендуется выполнить добавку градуировочного раствора ДОН в подвижной фазе (см. 8.4.3.3) к концентрату пробы. О достоверности идентификации можно судить по увеличению высоты предполагаемого пика ДОН. Величина добавки должна составлять от 50 % до 150 % от найденного содержания ДОН в концентрате пробы.

8.13 Обработка результатов измерений

Массовую долю ДОН в пробе X, млн$^{-1}$ (мг/кг), вычисляют по формуле

$$X = \frac{C_п \cdot V_1 \cdot V_3}{V_2 \cdot m \cdot \eta}, \quad (9)$$

где $C_п$ — массовая концентрация ДОН в концентрате пробы, мкг/см^3;

V_1 — объем смеси ацетонитрил-вода (см. 8.4.2), взятый для экстракции ДОН, см^3 (25 см^3);

V_3 — объем концентрата пробы, см^3 (0,5 см^3);

V_2 — аликвота экстракта, взятая для анализа по 8.12.2, см^3 (5 см^3);

m — масса навески, г;

η — коэффициент извлечения ДОН, вычисленный по формуле (6).

Если коэффициент извлечения ДОН превышает 0,9, допускается при расчете по формуле (9) его не учитывать.

8.14 Оформление результатов измерений

За результат определения содержания ДОН в пробе принимают среднеарифметическое значение результатов двух параллельных определений, для которых выполняется условие приемлемости (см. 8.15).

Результат измерений массовой доли ДОН в пробе представляют в виде $X \pm U$, млн$^{-1}$ (мг/кг), при этом U — значение показателя точности измерений (расширенная неопределенность с коэффициентом охвата, равным двум), которое вычисляют по формуле

$$U = 0{,}01 \cdot \bar{X} \cdot U_{отн}, \quad (10)$$

где 0,01 — коэффициент пересчета;

$\bar{X}$ — среднеарифметическое значение содержания ДОН для двух параллельных определений (X_1, X_2), млн$^{-1}$ (мг/кг);

$U_{отн}$ — относительная расширенная неопределенность с коэффициентом охвата, равным двум, % (21 %).

Результат измерений при содержании ДОН менее нижней границы диапазона измерений представляют в виде «менее 0,2 млн$^{-1}$ (мг/кг)». Результат измерений при содержании ДОН выше верхней границы диапазона измерений представляют в виде «более 5,0 млн$^{-1}$ (мг/кг)».

Числовое значение результата измерений должно оканчиваться цифрой того же разряда, что и значение расширенной неопределенности в абсолютных единицах, содержащее не более двух значащих цифр.

8.15 Контроль точности результатов испытаний

8.15.1 Контроль приемлемости результатов в условиях повторяемости

Расхождение между результатами двух параллельных определений массовой доли ДОН в пробе X_1, млн$^{-1}$ (мг/кг), и X_2, млн$^{-1}$ (мг/кг), полученными в одной лаборатории в условиях повторяемости по ГОСТ Р ИСО 5725-1—2002 (подраздел 3.14), должно соответствовать условию

$$100 \cdot \frac{|X_1 - X_2|}{\bar{X}} \le r_{отн}, \qquad (11)$$

где 100 — коэффициент пересчета в проценты;

$\bar{X}$ — среднеарифметическое значение результатов параллельных определений массовой доли ДОН в пробе, млн$^{-1}$ (мг/кг);

$r_{отн}$ — относительное значение предела повторяемости, %, (20 %).

При невыполнении условия (11) окончательный результат измерений устанавливают в соответствии с ГОСТ Р ИСО 5725-6—2002 (подраздел 5.2).

8.15.2 Контроль приемлемости результатов, полученных в условиях воспроизводимости

Расхождение между результатами измерений массовой доли ДОН, полученными в двух лабораториях $\bar{X}_{1лаб}$ и $\bar{X}_{2лаб}$, млн$^{-1}$ (мг/кг) на идентичных пробах, разными операторами с использованием различных экземпляров оборудования должно соответствовать условию

$$100 \cdot \frac{|\bar{X}_{1лаб} - \bar{X}_{2лаб}|}{\bar{X}_{лаб}} \le CD_{0,95,отн}, \qquad (12)$$

где 100 — коэффициент пересчета в проценты;

$\bar{X}_{лаб}$ — среднеарифметическое значение результатов измерений массовой доли ДОН в пробах в двух лабораториях, млн$^{-1}$ (мг/кг);

$CD_{0,95,отн}$ — относительное значение критической разности, % (29 %).

При невыполнении условия (12) лабораториям рекомендуется использовать методы оценки приемлемости результатов измерений согласно ГОСТ Р ИСО 5725-6—2002 (пункты 5.3.3 и 5.3.4).

8.16 Контроль качества результатов измерений

Контроль качества результатов измерений в лаборатории предусматривает проведение контроля стабильности результатов измерений с учетом требований ГОСТ ИСО 5725-6—2002 (раздел 6).

9 Определение содержания ДОН в градиентном режиме элюирования

9.1 Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы и реактивы

Используют средства измерений, вспомогательные устройства, материалы и реактивы по 8.1, за исключением 8.1.9, 8.1.25, 8.1.26, а также нижеследующие:

9.1.1 Колонка для ВЭЖХ, заполненная обращенно-фазовым сорбентом, обеспечивающая в условиях выполнения анализа эффективность не менее 5000 теоретических тарелок по пику ДОН[1)].

[1)] Например, колонка длиной 80 мм, внутренним диаметром 2 мм, заполненная сорбентом диабонд С16* или эквивалентным ему. Эта информация приведена для удобства пользователей стандарта и не является рекламой. Могут быть использованы колонки других типоразмеров и (или) с иным размером частиц, если они обеспечивают указанные требования по эффективности.

9.1.2 Спектрофотометр любого типа, предназначенный для измерений оптической плотности жидких проб в ультрафиолетовой области спектра (190—400 нм) с пределом допускаемой основной погрешности коэффициента пропускания ± 1 %.

9.1.3 Весы с пределами допускаемой абсолютной погрешности не более ± 0,02 мг.

9.1.4 Колбы Кн-1-500-29/32 по ГОСТ 25336 с притертыми стеклянными или полиэтиленовыми пробками.

9.1.5 Азот по ГОСТ 9293.

9.1.6 Метанол-яд по ГОСТ 6995.

Примечание — Допускается применение других средств измерений с метрологическими характеристиками не ниже вышеуказанных, вспомогательного оборудования и материалов с техническими характеристиками не ниже вышеуказанных и реактивов аналогичной или более высокой квалификации.

9.2 Подготовка стеклянной лабораторной посуды

Стеклянную лабораторную посуду готовят по 8.2.

9.3 Приготовление растворов

9.3.1 Подвижная фаза для элюирования в градиентном режиме

9.3.1.1 Готовят смесь ацетонитрил — вода в соотношении 1:20 по объему.

9.3.1.2 Готовят смесь ацетонитрил — вода в соотношении 1:8 по объему.

9.3.1.3 Готовят смесь ацетонитрил — вода в соотношении 1:2 по объему.

9.3.1.4 Готовят смесь ацетонитрил — вода в соотношении 1:1 по объему.

9.3.2 Приготовление растворов ДОН

9.3.2.1 Общие требования

Растворы ДОН хранят в холодильнике при температуре от 2 °С до 8 °С в герметично закрытой посуде не более одного года.

Допускается приготовление градуировочных растворов в меньших объемах (в виалах) с использованием пипеточных дозаторов и градуировочных растворов с иными значениями массовой концентрации в диапазоне линейности градуировочной характеристики от 1 до 20 мкг/см^3.

9.3.2.2 Приготовление основного раствора ДОН

В мерную колбу (см. 8.1.4) вместимостью 100 см^3 помещают (10,0 ± 0,1) мг ДОН кристаллический, растворяют в дистиллированной воде (см. 8.1.23), объем раствора в колбе доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

Для определения массовой концентрации ДОН в основном растворе 3 см^3 приготовленного раствора переносят в пробирку. Воду испаряют досуха в токе азота или при вакууме с помощью водоструйного насоса при нагревании не выше 60 °С. К остатку добавляют 3 см^3 метанола (см. 9.1.16) и измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 218 нм в кюветах толщиной оптического слоя 10 мм относительно метилового спирта.

Массовую концентрацию ДОН в основном растворе C_0, мкг/см^3, вычисляют по формуле

$$C_0 = \frac{A \cdot M \cdot 1000}{\varepsilon \cdot l}, \qquad (13)$$

где A — значение оптической плотности основного раствора ДОН;

M — молярная масса ДОН, г/моль (296 г/моль);

1000 — коэффициент согласования единиц массы и объема;

ε — коэффициент молярной экстинкции ДОН, дм^3/моль·см (4500 дм^3/моль·см).

l — длина оптического пути, см (1 см).

9.3.2.3 Приготовление градуировочных растворов

В три мерные колбы (см. 8.1.14) вместимостью по 100 см^3 помещают основной раствор ДОН (см. 9.3.2.2) в объемах, указанных в таблице 2. Объем растворов в колбах доводят до метки дистиллированной водой (см. 8.1.23) и тщательно перемешивают.

Таблица 2

Номер градуировочного раствора	Объем основного раствора ДОН V_0, см^3	Массовая концентрация ДОН в i-м градуировочном растворе C_i, мкг/см^3	Масса ДОН, содержащаяся в i-м градуировочном растворе, вводимом в хроматограф m_i, мкг
1	5	C_1	$m_1 = V C_1$*
2	10	C_2	$m_2 = V C_2$*
3	25	C_3	$m_3 = V C_3$*
* V — объем градуировочного раствора, вводимого в хроматограф (4 мм^3).			

Фактическую массовую концентрацию ДОН в приготовленном растворе C_i, мкг/см^3 , вычисляют по формуле

$$C_i = \frac{C_0 \cdot V_0}{V_i}, \quad (14)$$

где C_0 — значение массовой концентрации ДОН в основном растворе, взятом для разведения, мкг/см^3;
V_0 — объем основного раствора, взятого для разведения, см^3;
V_i — объем приготовленного раствора, см^3.

9.4 Подготовка хроматографических колонок для очистки экстракта

На дно двух хроматографических колонок (см. 8.1.10) помещают промытые ацетонитрилом ватные тампоны. В одну колонку (далее — колонка № 1) вносят (0,20±0,05) г активированного угля, в другую (далее — колонка № 2) — (0,10±0,05) г активированного угля (см. 8.1.27). Осторожно постукивая по колонке, уплотняют активированный уголь до высоты слоя, не изменяющейся при дальнейшем постукивании.

Перед первыми анализами колонку кондиционируют, проводя элюирование по 9.7.2 без введения в колонку экстракта пробы.

9.5 Контроль полноты извлечения ДОН

Полноту извлечения ДОН определяют по коэффициенту извлечения ДОН в контрольной пробе.

Для этого в колбу вместимостью 500 см^3 (см. 9.1.4) помещают 5 см^3 основного раствора ДОН, приливают 21 см^3 дистиллированной воды (см. 8.1.23) и 109 см^3 ацетонитрила (см. 8.1.24), перемешивают, фильтруют через складчатый бумажный фильтр, проводят очистку по 9.7.2, хроматографические измерения по 9.7.3.

Коэффициент извлечения ДОН η вычисляют по формуле (6).

Массовую концентрацию ДОН в контрольной пробе $C_Д$, мкг/см^3, вычисляют по формуле

$$C_Д = \frac{C_0 \cdot V_0 \cdot V_2}{(V_1 + V_0) \cdot V_3}, \quad (15)$$

где C_0 — значение массовой концентрации основного раствора ДОН, мкг/см^3;
V_0 — объем основного раствора ДОН, см^3 (5 см^3);
V_2 — аликвота фильтрата, взятая для очистки по 9.7.2, см^3 (5 см^3);
V_1 — общий объем ацетонитрила и воды, взятый для экстракции, см^3 (120 см^3);
V_3 — объем концентрата контрольной пробы, см^3 (0,2 см^3).

Контроль полноты извлечения ДОН считается удовлетворительным, если каждое из полученных значений коэффициента извлечения ДОН η не менее 0,70, причем расхождение между максимальным и минимальным значениями, полученными оператором, не превышает 0,10.

В этом случае вычисляют среднеарифметическое значение полученных результатов и используют его при обработке результатов измерений (см. 9.8). В противном случае необходимо найти причины неудовлетворительного проведения подготовки пробы и повторить процедуру контроля полноты извлечения до получения результатов, удовлетворяющих указанному выше условию.

9.6 Градуировка хроматографа

Для проведения градуировки хроматографа регистрируют не менее трех хроматограмм для каждого градуировочного раствора (см. 9.3.2.3). Объем вводимого раствора — 4 мм^3. Проверяют правиль-

ность автоматической разметки и, если необходимо, корректируют ее. Используя программное обеспечение к хроматографу, устанавливают градуировочную характеристику.

Допускается альтернативный способ установления градуировочной характеристики, описанный ниже.

Для каждого ввода определяют время удерживания ДОН t_i, мин, и высоту пика h_i, мм или е.о.п.

Среднее время удерживания ДОН $\bar{t}$, мин, вычисляют по формуле

$$\bar{t} = \frac{\sum_{i=1}^{n} t_i}{n}, \quad (16)$$

где t_i — время удерживания ДОН для i-го градуировочного раствора, мин;

n — количество хроматограмм градуировочных растворов (n =9).

Среднеквадратичное отклонение значения времени удерживания S, мин, вычисляют по формуле

$$S = \sqrt{\sum_{i=1}^{n} (t_i - \bar{t}) / n - 1}, \quad (17)$$

где t_i — время удерживания ДОН для i-го градуировочного раствора, мин;

$\bar{t}$ — среднее время удерживания ДОН $\bar{t}$, мин, вычисленное по формуле (16);

n — количество хроматограмм градуировочных растворов (n = 9).

Границы абсолютной погрешности значения времени удерживания $\pm\Delta_t$, мин, вычисляют по формуле

$$\Delta_t = S \cdot t, \quad (18)$$

где S — среднеквадратичное отклонение значения времени удерживания ДОН, вычисленное по формуле (17), мин;

t — значение коэффициента Стьюдента (t-критерия) для числа степеней свободы $v = n - 1$ при доверительной вероятности P = 0,95 (см. таблицу Б.1, приложение Б).

Записывают интервал, в котором могут находиться с вероятностью P = 0,95 значения времени удерживания ДОН от $(\bar{t} - \Delta_t)$ до $(\bar{t} + \Delta_t)$.

Для каждого градуировочного раствора вычисляют значение градуировочного коэффициента K_i, мкг/мм или мкг/е.о.п., по формуле

$$K_i = \frac{m_i}{h_i}, \quad (19)$$

где m_i — масса ДОН, введенная в хроматограф с i-м градуировочным раствором, (см. таблицу 2), мкг;

h_i — высота пика i-го градуировочного раствора, мм или е.о.п.

Среднеарифметическое значение градуировочного коэффициента $\bar{K}$, мкг/мм или мкг/е.о.п., вычисляют по формуле

$$\bar{K} = \frac{\sum_{i=1}^{n} K_i}{n}, \quad (20)$$

где K_i — значение градуировочного коэффициента для i-го градуировочного раствора, вычисленное по формуле (19), мкг/мм;

n — количество хроматограмм градуировочных растворов (n =9).

Значение градуировочного коэффициента контролируют не реже одного раза в месяц. Для этого вводят в хроматограф один из градуировочных растворов и вычисляют для него градуировочный коэффициент K_i.

Градуировочная характеристика признается стабильной, если выполняется условие

$$|K_i - \bar{K}| \le 0{,}1 \cdot \bar{K}. \quad (21)$$

Если условие (21) не выполняется, то процедуру градуировки хроматографа проводят заново.

9.7 Проведение испытаний

9.7.1 Экстракция ДОН

В колбу вместимостью 500 см^3 (см. 9.1.4) помещают (25,00 ± 0,05) г анализируемой пробы, приливают 20 см^3 дистиллированной воды (см. 8.1.23) и затем 105 см^3 ацетонитрила (см. 8.1.24). Колбу закрывают пробкой и встряхивают на устройстве для перемешивания проб (см. 8.1.13) в течение 30 мин. После этого содержимое колбы фильтруют через бумажный складчатый фильтр (см. 8.1.20) в колбу с притертой пробкой (см. 8.1.17).

9.7.2 Очистка экстракта

5 см^3 фильтрата, полученного по 9.7.1, переносят в колонку № 1, подготовленную по 9.4, и элюируют со скоростью не более 0,5 см^3/мин в колбу для упаривания вместимостью 50 см^3. С целью ускорения допускается проводить элюирование с помощью вакуума водоструйного насоса (см. 8.1.12). После того, как уровень жидкости достигнет поверхности сорбента, через колонку пропускают 15 см^3 ацетонитрила, собирая элюат в ту же колбу.

С помощью ротационного вакуумного испарителя (см. 8.1.11) при температуре не более 60 °С полностью отгоняют растворитель. К сухому остатку добавляют 1 см^3 дистиллированной воды, колбу закрывают пробкой и ее стенки осторожно омывают находящейся в ней жидкостью. Содержимое колбы с помощью пипетки переносят в колонку № 2 (см. 9.4). Стенки колбы повторно омывают 1 см^3 дистиллированной воды, которую также переносят в колонку № 2. Колонку промывают 2 см^3 дистиллированной воды и элюат отбрасывают.

Из колонки № 2 ДОН элюируют 7,5 см^3 ацетонитрила в колбу для упаривания вместимостью 25 см^3. Собранный элюат упаривают досуха с помощью ротационного вакуумного испарителя. Остаток растворяют в 0,2 см^3 метанола. Полученный раствор используют для хроматографического анализа (далее — анализируемый раствор).

9.7.3 Проведение измерений

9.7.3.1 Условия проведения измерений

При использовании хроматографической колонки по 9.1.1 измерения проводят в следующих условиях:

а) разделение компонентов проводят на колонке размером 80х2 мм;

б) сорбент — диабонд С 16 с эффективностью не менее 5000 теоретических тарелок по пику ДОН;

в) рабочие длины волн УФ-детектора — 230 и 276 нм (230 нм — опорная длина волны, 276 нм — длина волны для контроля чистоты экстракта);

г) скорость элюирования —100 мм^3/мин.

Элюирование проводят в градиентном режиме, используя рекомендации изготовителя хроматографа и (или) колонки. Например, при использовании хроматографа «Милихром» в шприце насоса готовят элюент с перформированным градиентом. Насос устанавливают в перевернутое положение и набирают последовательно:

- 600 мм^3 воды;
- 500 мм^3 раствора ацетонитрил-вода (1:20);
- 600 мм^3 раствора ацетонитрил-вода (1:8);
- 100 мм^3 раствора ацетонитрил-вода (1:2);
- 100 мм^3 раствора ацетонитрил-вода (1:1);
- 700 мм^3 ацетонитрила;

д) объем анализируемого раствора — 4 мм^3;

е) чувствительность — 0,1 е.о.п. при 100 мВ шкалы самописца.

Устанавливают следующие параметры:

- количество образцов — 3;
- объем ступеней, мм^3: 1-600, 2-500, 3-600, 4-100, 5-100, 6-700;
- объем, мм^3: регенерации — 200, буфера (подвижная фаза) — 15, пробы — 4, буфера (подвижная фаза) — 10;
- расход элюента — 100 мм^3 /мин; скорость набора — 800 мм^3 /мин.

9.7.3.2 Измерение массовой концентрации ДОН в анализируемом растворе с использованием градуировочной характеристики

Для каждого полученного анализируемого раствора регистрируют по три хроматограммы. Объем вводимого раствора — 4 мм^3. По показаниям прибора при двух длинах волны — 230 и 276 нм оценивают чистоту анализируемого раствора согласно инструкции к прибору.

Идентификацию пика ДОН проводят по времени удерживания $t_{пр}$, которое должно находиться в интервале, установленном при градуировке (см. 9.6)

$$(\bar{t} - \Delta_t) \le t_{пр} \le (\bar{t} + \Delta_t). \quad (22)$$

Измеряют высоту пиков ДОН.

9.7.3.3 Проведение измерений анализируемого раствора с использованием метода внешнего стандарта

Для этого в колонку хроматографа вводят три раза по 4 мм^3 анализируемого раствора и градуировочных растворов. Измеряют высоту пиков ДОН анализируемого раствора и того градуировочного раствора, высота пиков которого наименее отличается от высоты пиков анализируемого раствора.

9.8 Обработка результатов измерений

9.8.1 Обработка результатов измерений с использованием градуировочной характеристики

Содержание ДОН в пробе X, млн$^{-1}$ (мг/кг), вычисляют по формуле

$$X = \frac{K \cdot h_{пр} \cdot V_1 \cdot V_2 \cdot 1000}{V_3 \cdot m \cdot V_4 \cdot \eta}, \quad (23)$$

где K — градуировочный коэффициент, мкг/мм или мкг/е.о.п;

$h_{пр}$ — среднеарифметическое значение результатов трех измерений высоты пиков анализируемого раствора, мм или е. о. п.;

V_1 — объем полученного анализируемого раствора ДОН, см^3 (0,2 см^3);

V_2 — объем экстракта анализируемой пробы, см^3 (125 см^3);

1000 — коэффициент согласования единиц объема;

V_3 — объем анализируемого раствора, введенный в хроматограф, мм^3 (4 мм^3);

m — масса анализируемой пробы, г (25 г);

V_4 — объем экстракта анализируемой пробы, взятый для очистки, см^3 (5 см^3);

η — коэффициент извлечения ДОН, вычисленный по формуле (6).

9.8.2 Обработка результатов измерений с использованием метода внешнего стандарта

Содержание ДОН в пробе X, млн$^{-1}$ (мг/кг), вычисляют по формуле

$$X = \frac{m_i \cdot h_{пр} \cdot V_1 \cdot V_2 \cdot 1000}{h_i \cdot V_3 \cdot m \cdot V_4 \cdot \eta}, \quad (24)$$

где m_i — масса ДОН, содержащаяся в i-м градуировочном растворе (см. таблицу 2), введенном в хроматограф, высота пика которого наименее отличается от высоты пиков анализируемого раствора, мкг;

$h_{пр}$ — среднеарифметическое значение результатов трех измерений высоты пиков анализируемого раствора, мм или е. о. п.;

V_1 — объем полученного анализируемого раствора ДОН, см^3 (0,2 см^3);

V_2 — объем экстракта анализируемой пробы, см^3 (125 см^3);

1000 — коэффициент пересчета единиц объема;

h_i — среднеарифметическое значение результатов трех измерений высоты пиков i-го градуировочного раствора, мм или е.о.п.;

V_3 — объем анализируемого раствора, введенный в хроматограф, мм^3 (4 мм^3);

m — масса анализируемой пробы, г (25 г);

V_4 — объем экстракта анализируемой пробы, взятый для очистки, см^3 (5 см^3);

η — коэффициент извлечения ДОН, вычисленный по формуле (6).

9.9 Оформление результатов измерений

За результат определения содержания ДОН в пробе принимают среднеарифметическое значение результатов двух параллельных определений, для которых выполняется условие приемлемости (см. 9.10).

Результат определения содержания ДОН в пробе представляют в виде

$$\bar{X} \pm \Delta, \text{ млн}^{-1} \text{ (мг/кг)},$$

где Δ — значение абсолютной погрешности измерений при доверительной вероятности $P = 0,95$, которое вычисляют по формуле

$$\Delta = 0,01 \cdot \delta \bar{X}, \quad (25)$$

где 0,01 — коэффициент пересчета;

δ — относительная погрешность, %, (см. таблицу 3);

$\bar{X}$ — среднеарифметическое значение содержания ДОН для двух параллельных определений (X_1, X_2), млн$^{-1}$ (мг/кг).

Таблица 3

Диапазон содержания ДОН в пробе, млн$^{-1}$ (мг/кг)	Относительная погрешность при $P = 0,95$ δ, %	Относительное значение предела повторяемости, при $P = 0,95$ $r_{отн}$, %	Относительное значение предела воспроизводимости при $P = 0,95$ $R_{отн}$, %
От 0,2 до 2,0 включ.	25	24	36
св. 2,0 » 5,0 »	21	20	30

Числовое значение результата измерений должно оканчиваться цифрой того же разряда, что и значение расширенной неопределенности измерений (абсолютной погрешности измерений), содержащее не более двух значащих цифр.

9.10 Контроль точности результатов испытаний

9.10.1 Контроль приемлемости результатов в условиях повторяемости

Расхождение между результатами двух параллельных определений X_1, млн$^{-1}$ (мг/кг), и X_2, млн$^{-1}$ (мг/кг), полученными в одной лаборатории в условиях повторяемости по ГОСТ Р ИСО 5725-1—2002 (подраздел 3.14) должно соответствовать условию:

$$|X_1 - X_2| \le 0,01 \cdot \bar{X} \cdot r_{отн}, \quad (26)$$

где 0,01 — коэффициент пересчета;

$\bar{X}$ — среднеарифметическое значение результатов двух параллельных определений, млн$^{-1}$ (мг/кг);

$r_{отн}$ — относительное значение предела повторяемости, %, указанное в таблице 3.

Если это условие не соблюдается, то используют методы проверки приемлемости результатов параллельных определений и установления окончательного результата согласно ГОСТ Р ИСО 5725-6—2002 (раздел 5).

9.10.2 Контроль приемлемости результатов в условиях воспроизводимости

Расхождение между результатами измерений, полученными в двух лабораториях, $\bar{X}_{1лаб}$, млн$^{-1}$ (мг/кг), и $\bar{X}_{2лаб}$, млн$^{-1}$ (мг/кг), на идентичных пробах разными операторами с использованием различных экземпляров оборудования должно соответствовать условию:

$$|\bar{X}_{1лаб} - \bar{X}_{2лаб}| \le 0,01 \cdot \bar{X}_{лаб} \cdot R_{отн}, \quad (27)$$

где 0,01 — коэффициент пересчета;

$\bar{X}_{лаб}$ — среднеарифметическое значение результатов измерений в двух лабораториях, млн$^{-1}$ (мг/кг);

$R_{отн}$ — относительное значение предела воспроизводимости, %, указанное в таблице 3.

При выполнении этого условия приемлемы оба результата измерений, и в качестве окончательного может быть использовано их среднеарифметическое значение. Если это условие не соблюдается, могут быть использованы методы оценки приемлемости результатов измерений согласно ГОСТ Р ИСО 5725-6—2002 (раздел 5).

9.11 Контроль качества результатов измерений

Контроль качества результатов измерений — по 8.16.

Приложение А
(справочное)

Перевод катионита в Н-форму для варианта А

В коническую колбу вместимостью 250 $см^3$ помещают 30—40 г катионита и заливают дистиллированной водой на 30—40 мин. Воду сливают, добавляют 100 $см^3$ смеси воды с соляной кислотой в соотношении 1 : 6 по объему и выдерживают 5 мин. Кислоту сливают, а катионит промывают дистиллированной водой до значения pH не менее 4 ед. pH (контроль по универсальному индикатору).

Подготовленный таким образом катионит хранят в стеклянной посуде с пришлифованной пробкой под слоем воды. Срок хранения — три недели.

Приложение Б
(справочное)

Таблица Стьюдента

Б.1 Значения коэффициентов Стьюдента приведены в таблице Б.1

Т а б л и ц а Б.1 — Значения коэффициента Стьюдента (*t*-критерия) для различного числа степеней свободы $v = n - 1$ при доверительной вероятности $P = 0,95$

v	*t*	*v*	*t*	*v*	*t*	*v*	*t*
1	12,71	8	2,31	15	2,13	40	2,02
2	4,30	9	2,26	16	2,12	50	2,01
3	3,18	10	2,23	17	2,11	75	1,99
4	2,78	11	2,20	18	2,10	100	1,98
5	2,57	12	2,18	19	2,09	200	1,97
6	2,45	13	2,16	20	2,09	500	1,96
7	2,36	14	2,14	30	2,04	1000	1,96

УДК 636.085.3:006.354 ОКС 65.120 С19

Ключевые слова: зерно, продукты переработки зерна, комбикорм, дезоксиниваленол, ВЭЖХ, хроматографическая колонка, изократическое элюирование, градиентное элюирование

БЗ 8—2017/133

Редактор *Л.В. Коретникова*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *М.И. Першина*
Компьютерная верстка *А.А. Ворониной*

Сдано в набор 18.09.2017. Подписано в печать 11.10.2017. Формат 60×84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,79. Уч.-изд. л. 2,52. Тираж 25 экз. Зак. 1931.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Издано и отпечатано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123001 Москва, Гранатный пер., 4.

gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru