



ВОСТОЧНО-СИБИРСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ФИЗИКО-ТЕХНИЧЕСКИХ И РАДИОТЕХНИЧЕСКИХ ИЗМЕРЕНИЙ

СВИДЕТЕЛЬСТВО

об аттестации МВИ

№ 04 - 2002

Методика выполнения измерений массовой концентрации водорастворимых витаминов в водных растворах, разработанная Лимнологическим институтом СО РАН и представленная в рекомендации "ГСИ. МАССОВАЯ КОНЦЕНТРАЦИЯ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ВИТАМИНОВ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ. МВИ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ" аттестована в соответствии с ГОСТ Р 8.563-96. Аттестация проведена по результатам метрологической экспертизы названного документа и анализа погрешностей измерений.

В результате экспертизы установлено, что методика соответствует предъявляемым к ней требованиям и обладает следующими метрологическими характеристиками:

- Объект измерения - водные растворы водорастворимых витаминов;
- Измеряемая величина - массовые концентрации витаминов В₁, В₂, В₃, В₅, В₆, В_С и К₃ в водных растворах;

- Диапазоны измерения массовых концентраций витаминов:

В₁, В₃, В₅, В₆, К₃ - 0,01÷0,5 г/л

В₂ - 0,01÷0,04 г/л

В_С - 0,01÷0,10 г/л

- Относительная погрешность измерения массовой концентрации - не более ± 7,0 %.

Аттестованная методика выполнения измерений может использоваться в сферах, подлежащих государственному метрологическому контролю и надзору.

Директор ВС НИИФТРИ

Главный метролог



О.И. Гудков

И.А. Соков

28.07.02.

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
ЛИМНОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ



РЕКОМЕНДАЦИЯ


ГОСУДАРСТВЕННАЯ СИСТЕМА ОБЕСПЕЧЕНИЯ
ЕДИНСТВА ИЗМЕРЕНИЙ

МАССОВАЯ КОНЦЕНТРАЦИЯ
ВОДОРАСТВОРИМЫХ ВИТАМИНОВ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ

МЕТОДИКА ВЫПОЛНЕНИЯ ИЗМЕРЕНИЙ
МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

МВИ.№04-2002

Заведующий отделом

 Г.И.Барам
« » 2002 г.

Главный специалист

 Г.А.Федорова
« » 2002 г.

ИРКУТСК

2002

1. РАЗРАБОТАНА

Лимнологическим институтом Сибирского отделения РАН

Директор М.А.Грачев

Заведующий отделом Г.И.Барам

Главный специалист Г.А.Федорова

2. АТТЕСТОВАНА

Восточно-Сибирским научно-исследовательским институтом физико-технических и радиотехнических измерений

Свидетельство об аттестации № 04-2002 от 28 июля 2002 г.

3. ЗАРЕГИСТРИРОВАНА

Настоящая рекомендация устанавливает методику выполнения измерений массовой концентрации водорастворимых витаминов - B_1 , B_2 , B_3 , B_5 , B_6 , B_C и водорастворимой формы витамина K_3 в водных растворах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в диапазонах, приведенных в таблице 1.

Таблица 1

Витамин	Диапазон измеряемых концентраций, г/л
B_1	0,01 – 0,50
B_2	0,01 – 0,04
B_3	0,01 – 0,50
B_5	0,01 – 0,50
B_6	0,01 – 0,50
B_C	0,01 – 0,10
K_3 (водорастворимая форма)	0,01 – 0,50

1. Нормы погрешности измерений

Методика обеспечивает выполнение измерений с погрешностью, не превышающей 5%.

2. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

2.1. Средства измерений

Жидкостный хроматограф "Милихром А-02" с колонкой $\varnothing 2 \times 75$ мм, упакованной сорбентом Нуклеосил 100-5 С18	ТУ 25-7405.0040-95
Весы аналитические Сарториус ВР-221S, класс точности 1	ГОСТ 24104-88
Механические микродозаторы переменного объема 2-20; 20-200; 200-1000; 1000-5000 мкл	БИОНИТ PROLINE, Финляндия
Колбы мерные, 2-100-2, 2-200-2, 2-500-2, 2-1000-2	ГОСТ 1770-74
Пипетки градуированные 5-1-1, 5-2-10, 5-2-25	ГОСТ 20292-74
pH-метр-милливольтметр pH-673	ТУ 25-05-1181-76
Стандартные вещества производства SIGMA-ALDRICH Chemie, Германия, содержание основного вещества 98%:	Номер по каталогу SIGMA, 1999 г
Никотиновая кислота (витамин B_3)	N 4126
Пантотенат кальция (витамин B_5)	P 2250
Пиридоксингидрохлорид (витамин B_6)	P 9755
Фолиевая кислота (витамин B_C)	F 7876
Рибофлавин (витамин B_2)	R 4500
Тиамингидрохлорид (витамин B_1)	T 4625
Стандартные вещества производства SIGMA-ALDRICH Chemie, Германия, содержание основного вещества 95%:	Номер по каталогу SIGMA, 1999 г
Менадион, бисульфит натрия (Витамин K_3 , водорастворимая форма)	M 2518

2.2. Вспомогательные устройства

Колбы конические с притертыми пробками объемом 10, 50 и 100 мл	ГОСТ 25336-82
Химические стаканы емкостью 100, 500 и 1000 мл	ГОСТ 25336-82
Сушильный шкаф лабораторный	ГОСТ 13474-79
Холодильник бытовой с морозильной камерой	
Фильтр пористый стеклянный, пористость 100	

2.3. Реактивы и материалы

Ацетонитрил для ВЭЖХ, "сорт 0 или 1"	"Криохром", С.-Петербург
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709--77
Литий хлорнокислый, 3-х водный (перхлорат лития), "хч"	ТУ 6-09-3361-84

Кислота ортофосфорная, ($d=1,70$ кг/л), "хч"	ГОСТ 6552-80
Кислота серная, ($d=1,84$ кг/л), "хч"	ГОСТ 4204-77
Калий двухромовокислый (бихромат), "хч"	ГОСТ 4220-75
Калий фосфорнокислый, однозамещенный, "хч"	ГОСТ 4198-75
Калия гидроокись, "хч"	ГОСТ 9285-78
Аргон газообразный	ГОСТ 10157-79

Примечание: Допускается использование средств измерений, оборудования, материалов и реактивов, отличающихся от указанных, но не уступающих им по характеристикам.

3. Метод измерения

Измерения массовой концентрации водорастворимых витаминов B_1 , B_2 , B_3 , B_5 , B_6 , B_C и водорастворимой формы витамина K_3 в водных растворах выполняют методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе "Милихром А-02".

Исследуемый раствор перед проведением хроматографического анализа центрифугируют или фильтруют для удаления механических примесей, затем вводят в хроматограф, где витамины разделяются на колонке с обращенно-фазным сорбентом С18. Хроматограммы записывают одновременно на 6 длинах волн - 210, 220, 250, 260, 280 и 300 нм. Примеры получаемых хроматограмм приведены в Приложениях 1 и 2.

Перед выполнением измерений хроматограф градуируют по градуировочным растворам, приготовленным из стандартных веществ по п.7.4, для расчета спектральных отношений и для установления зависимости между концентрациями определяемых витаминов и площадями их пиков при соответствующей длине волны.

Длина волны определения для каждого из витаминов приведена в таблице 2.

Таблица 2

Витамин	Длина волны определения, нм
B_1, B_2, B_3, B_C	260
B_5, B_6, K_3	210

При проведении измерений полученные величины спектральных отношений используют для идентификации витаминов на хроматограммах образцов, а градуировочные характеристики - для расчета массовых концентраций витаминов по площадям их пиков.

4. Требования безопасности

При выполнении измерений по настоящей методике соблюдают требования безопасности, регламентированные:

- руководством по эксплуатации хроматографа "Милихром А-02";
- инструкциями предприятия по технике безопасности по выполняемым видам работ (работа с концентрированными кислотами);

Все действия с кислотами и работы по очистке реактивов должны проводиться в вытяжном шкафу.

5. Требования к квалификации оператора

К выполнению измерений и обработке их результатов допускаются лица, имеющие квалификацию не ниже лаборанта-химика, навыки и опыт работы в химической лаборатории, прошедшие обучение хроматографическим методам анализа, стажировку на хроматографе "Милихром А-02" и изучившие настоящую методику.

6. Условия выполнения измерений

При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

- температура воздуха от 15 до 35°C;

- атмосферное давление 84-107 кПа (630-800 мм рт.ст);
- относительная влажность воздуха от 30 до 80%;
- напряжение переменного тока, питающего хроматограф (220±22) В; частота питающей сети (50±1) Гц.

Место установки хроматографа должно быть удалено от источников тепла и прямых потоков воздуха (сквозняков), во время проведения анализов должна быть исключена возможность попадания прямого солнечного света на хроматограф.

7. Подготовка к выполнению измерений

7.1. Перед выполнением измерений по настоящей методике проводят следующие работы: подготовку (очистку) посуды, растворителей и реактивов; приготовление рабочих растворов; приготовление растворов для градуировки хроматографа; градуировку.

7.2. Подготовка посуды. Используемую при анализе стеклянную посуду моют, последовательно ополаскивают хромовой смесью, водопроводной, дистиллированной водой и сушат в сушильном шкафу при температуре 120-150°C. Посуду из полипропилена обрабатывают аналогичным образом и сушат в сушильном шкафу при температуре 60°C.

7.3. Приготовление рабочих растворов

7.3.1. *Раствор перхлората лития в воде 2,0 М.* Навеску 160±1 г LiClO₄ помещают в мерную колбу объемом 500 мл, растворяют в 300-400 мл дистиллированной воды и доводят до метки дистиллированной водой.

7.3.2. *Раствор ортофосфорной кислоты, 1,0 М.* В мерную колбу объемом 100 мл с помощью градуированной стеклянной пипетки помещают 13,6 мл H₃PO₄ (85%) и доводят до метки дистиллированной водой.

7.3.3. *Раствор гидроокиси калия, 1,0 М.* Навеску 5,6±0,1 г гидроокиси калия помещают в мерную колбу объемом 100 мл, растворяют в 50-60 мл дистиллированной воды и доводят до метки дистиллированной водой.

7.3.4. *Раствор гидроокиси калия, 0,005 М.* В мерную колбу объемом 500 мл с помощью механического дозатора вносят 2,5 мл раствора гидроокиси калия с концентрацией 1,0 М, приготовленного по п.7.3.3 и доводят до метки дистиллированной водой.

7.3.5. *Буферный раствор фосфата калия в воде 1,0 М с рН3,2.* Навеску 13,6±0,1 г КН₂РО₄ растворяют в 70-80 мл дистиллированной воды, добавляют по каплям раствор Н₃РО₄ с концентрацией 1 М, приготовленный по п.7.3.2 до рН3,2 (измерение рН раствора проводят с помощью рН-метра), количественно переносят раствор в мерную колбу объемом 100 мл и доводят до метки дистиллированной водой.

7.3.6. *Буферный раствор фосфата калия в воде 1,0 М с рН6,5.* Навеску 13,6±0,1 г КН₂РО₄ растворяют в 70-80 мл дистиллированной воды, добавляют по каплям раствор гидроокиси калия с концентрацией 1,0 М, приготовленный по п.7.3.3 до рН6,5 (измерение рН раствора проводят с помощью рН-метра), количественно переносят раствор в мерную колбу объемом 100 мл и доводят до метки дистиллированной водой.

7.3.7. *Буферный раствор фосфата калия в воде 0,01 М с рН6,5.* В мерную колбу объемом 100 мл с помощью механического дозатора вносят 1,0 мл буферного раствора фосфата калия в воде с концентрацией 1,0 М с рН6,5, приготовленного по п.7.3.6 и доводят до метки дистиллированной водой.

7.3.8. *Раствор А, содержащий 0,2 М перхлората лития и 0,01 М фосфата калия, рН3,2.* В стеклянный стакан объемом 1000 мл с помощью стеклянной пипетки помещают 10 мл буферного раствора фосфата калия, приготовленного по п.7.3.5, 100 мл раствора перхлората лития, приготовленного по п.7.3.1, добавляют 800-900 мл дистиллированной воды, перемешивают и уточняют рН приготовленного раствора по рН-метру. При необходимости добавляют по каплям раствор ортофосфорной кислоты с концентрацией 1 М, приготовленный по п.7.3.2 до рН3,2, количественно переносят раствор в мерную колбу

объемом 1000 мл и доводят до метки дистиллированной водой. Перед использованием этого раствора в качестве растворителя для приготовления градуировочных растворов витаминов его насыщают аргоном для удаления кислорода воздуха.

7.4. Приготовление градуировочных растворов

7.4.1. *Исходный раствор витамина V_1 для градуировки, 2,0 г/л.* В коническую колбу с пришлифованной пробкой объемом 50 мл берут навеску $0,02 \pm 0,001$ г витамина V_1 и с помощью механического дозатора добавляют такой объем раствора А, приготовленного по п.7.3.8, чтобы концентрация витамина V_1 в растворе составила 2,0 г/л. Объем добавляемого раствора рассчитывают по формуле

$$V = 1000 \frac{m}{C},$$

где V - объем раствора А, мл; m - масса навески, г; C - концентрация раствора, г/л.

Раствор готовят перед использованием.

7.4.2. *Исходный раствор витамина V_2 для градуировки, 0,04 г/л.* В мерную колбу объемом 500 мл берут навеску $0,02 \pm 0,001$ г витамина V_2 , добавляют 400-450 мл раствора А, приготовленного по п.7.3.8, нагревают до $70-80^\circ\text{C}$ до полного растворения витамина, охлаждают и доводят до метки раствором А. Концентрацию витамина V_2 в приготовленном растворе рассчитывают по навеске. Раствор готовят перед использованием.

7.4.3. *Исходный раствор витамина V_3 для градуировки, 2,0 г/л.* В коническую колбу с пришлифованной пробкой объемом 50 мл берут навеску $0,02 \pm 0,001$ г витамина V_3 и с помощью механического дозатора добавляют такой объем раствора А, приготовленного по п.7.3.8, чтобы концентрация витамина V_3 в приготовленном растворе составила 2,0 г/л. Объем добавляемого раствора рассчитывают по формуле, как в п.7.4.1. Раствор готовят перед использованием.

7.4.4. *Исходный раствор витамина V_6 для градуировки, 2,0 г/л.* В коническую колбу с пришлифованной пробкой объемом 50 мл берут навеску $0,02 \pm 0,001$ г витамина V_6 и с помощью механического дозатора добавляют такой объем раствора А, приготовленного по п.7.3.8, чтобы концентрация витамина V_6 в приготовленном растворе составила 2,0 г/л. Объем добавляемого раствора рассчитывают по формуле, как в п.7.4.1. Раствор готовят перед использованием.

7.4.5. *Исходный раствор витамина V_5 для градуировки, 1,0 г/л.* В коническую колбу с пришлифованной пробкой объемом 50 мл берут навеску $0,02 \pm 0,001$ г витамина V_5 и с помощью механического дозатора добавляют такой объем буферного раствора фосфата калия с концентрацией 0,01 М, рН6,5, приготовленного по п.7.3.7, чтобы концентрация витамина V_5 в приготовленном растворе составила 1,0 г/л. Объем добавляемого раствора рассчитывают по формуле, как в п.7.4.1. Раствор готовят перед использованием.

7.4.6. *Исходный раствор витамина K_3 для градуировки, 1,0 г/л.* В коническую колбу с пришлифованной пробкой объемом 50 мл берут навеску $0,02 \pm 0,001$ г витамина K_3 и с помощью механического дозатора добавляют такой объем буферного раствора фосфата калия с концентрацией 0,01 М, рН6,5, приготовленного по п.7.3.7, чтобы концентрация витамина K_3 в приготовленном растворе составила 1,0 г/л. Объем добавляемого раствора рассчитывают по формуле, как в п.7.4.1. Раствор готовят перед использованием.

7.4.7. *Исходный раствор витамина V_C для градуировки, 0,1 г/л.* В мерную колбу объемом 200 мл берут навеску $0,02 \pm 0,001$ г витамина V_C , добавляют 150-180 мл раствора гидроксида калия с концентрацией 0,005 М, приготовленного по п.7.3.4, перемешивают до полного растворения витамина и доводят до метки этим же раствором гидроксида калия. Концентрацию витамина V_C в приготовленном растворе уточняют по навеске. Готовят перед использованием.

7.4.8. *Головной раствор водорастворимых витаминов V_1 , V_3 и V_6 для градуировки, содержащий по 0,5 г/л каждого из витаминов.* В коническую колбу с пришлифованной

пробкой объемом 10 мл с помощью механического дозатора вносят по 2 мл исходных растворов для градуировки витамина B_1 , приготовленного по п.7.4.1, витамина B_3 , приготовленного по п.7.4.3, витамина B_6 , приготовленного по п.7.4.4 и 2 мл раствора А, приготовленного по п.7.3.8. Готовят перед использованием.

7.4.9. Головной раствор водорастворимых витаминов B_5 и K_3 для градуировки, содержащий по 0,5 г/л каждого из витаминов. В коническую колбу с шлифованной пробкой объемом 10 мл с помощью механического дозатора вносят по 2 мл исходных растворов для градуировки витамина B_5 , приготовленного по п.7.4.5 и витамина K_3 , приготовленного по п.7.4.6. Готовят перед использованием.

7.4.10. Рабочие растворы витаминов B_1 , B_2 , B_3 , и B_6 для градуировки. Рабочие растворы для градуировки хроматографа готовят в конических колбах вместимостью 10 мл. Для этого в каждую колбу механическим дозатором вносят головной раствор для градуировки витаминов B_1 , B_3 и B_6 и исходный раствор для градуировки витамина B_2 в соответствии с таблицей 3, добавляют раствор А, приготовленный по п.7.3.8 и тщательно перемешивают. В качестве рабочего раствора для градуировки №1-1 используют головной раствор витаминов B_1 , B_3 и B_6 для градуировки, а №1-2 - исходный раствор витамина B_2 для градуировки. Растворы готовят перед использованием.

Таблица 3

Номер рабочего раствора для градуировки		1-1	1-2	2	3	4
Объем исходного раствора витамина B_2 для градуировки, мл				1	1	
Объем головного раствора витаминов B_1, B_3 и B_6 для градуировки, мл				1	1	1
Объем раствора А, мл					2	9
Концентрация витамина в рабочем растворе для градуировки, г/л	B_1	0,5		0,25	0,125	0,05
	B_3	0,5		0,25	0,125	0,05
	B_6	0,5		0,25	0,125	0,05
	B_2		0,04	0,02	0,01	

7.4.11. Рабочие растворы витаминов B_5 и K_3 для градуировки. Рабочие растворы для градуировки хроматографа готовят в конических колбах вместимостью 10 мл. Для этого в каждую колбу механическим дозатором вносят головной раствор для градуировки витаминов B_5 и K_3 и буферный раствор фосфата калия с концентрацией 0,01 М, рН6,5, приготовленный по п.7.3.7 в соответствии с таблицей 4. В качестве градуировочного раствора № 1 используют головной раствор витаминов B_5 и K_3 для градуировки. Растворы готовят перед использованием.

Таблица 4

Номер рабочего раствора для градуировки		1	2	3	4
Объем головного раствора для градуировки, мл			2	1	1
Объем буферный раствора фосфата калия, 0,01 М (рН6,5), мл			2	3	9
Концентрация витамина в рабочем растворе для градуировки, г/л	Витамин B_5	0,5	0,25	0,125	0,05
	Витамин K_3	0,5	0,25	0,125	0,05

7.4.12. Рабочие растворы витамина B_C для градуировки. Рабочие растворы для градуировки хроматографа готовят в конических колбах вместимостью 10 мл. Для этого в каждую колбу механическим дозатором вносят головной раствор витамина B_C для градуировки и раствор гидроксида калия с концентрацией 0,005 М, приготовленный по п.7.3.4 в соответствии с таблицей 5. В качестве градуировочного раствора № 1 используют исходный раствор витамина B_C для градуировки. Растворы готовят перед использованием.

Таблица 5

Номер рабочего раствора для градуировки		1	2	3	3
Объем головного раствора для градуировки, мл			2	1	1
Объем раствора гидроокиси калия, 0,005 М, мл			2	4	9
Концентрация витамина в рабочем растворе для градуировки, г/л	Витамин B_C	0,1	0,05	0,02	0,01

7.5. Градуировка хроматографа

7.5.1. Градуировочную характеристику устанавливают по рабочим растворам для градуировки, приготовленных по п.7.4.10 для витаминов B_1 , B_2 , B_3 и B_6 , по п.7.4.11 - для витаминов B_5 и K_3 , по п.7.4.12 – для витамина B_C .

7.5.2. Для каждого градуировочного раствора проводят два параллельных измерения по п.8.1.1.

7.5.3. Каждую хроматограмму обрабатывают в соответствии с компьютерной программой, определяя времена удерживания, спектральные отношения и площади пиков.

7.5.4. Рассчитывают среднее значение площади пика для каждой концентрации каждого витамина.

7.5.5. Экспериментальные данные обрабатывают в соответствии с компьютерной программой и рассчитывают уравнение градуировочной зависимости в виде

$$S_i = A_i + B_i C_i,$$

где S_i - площадь пика витамина в условных единицах; C_i - концентрация этого витамина в градуировочном растворе, г/л; A_i, B_i - коэффициенты регрессии.

Рассчитывают коэффициент корреляции r . В случае, если $r < 0,92$, выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, устраняют их и повторяют эксперимент.

8. Выполнение измерений

8.1. Измерение массовой концентрации водорастворимых витаминов в исследуемом растворе выполняют следующим образом:

8.1.1. 2 мкл исследуемого раствора вводят в подготовленный к работе жидкостный хроматограф и записывают хроматограмму в следующих условиях:

Элюент А:	по п.7.3.8
Элюент Б:	Ацетонитрил
Градиент	6 мин 2% Б, от 2 до 25 % Б за 18 мин
Скорость подачи элюента:	100 мкл/мин.
Предпроба:	Элюент А
Объем предпробы:	5 мкл
Длины волн детектора:	210, 220, 250, 260, 280 и 300 нм.
Время интегрирования:	0,34 с.
Температура:	35°C

8.1.2. Проводят идентификацию хроматографических пиков по п.8.2.

8.1.3. В случае положительного результата идентификации грубо оценивают концентрацию витаминов B_1 , B_3 , B_6 или B_5 и K_3 в исследуемом растворе.

Массовая концентрация этих витаминов в исследуемом растворе не должна превышать 0,5 г/л. В случае превышения исследуемый раствор, содержащий витамины B_1 , B_3 , B_6 с помощью механического дозатора разбавляют раствором А, приготовленным по п.7.3.8 в рассчитанное количество раз; а исследуемый раствор, содержащий витамины B_5 и K_3 разбавляют буферным раствором фосфата калия, приготовленным по п.7.3.7 и проводят хроматографический анализ разбавленных растворов. Если массовая концентрация

витаминов B_1 , B_2 , B_3 , B_5 , B_6 , B_C или K_3 в исследуемом растворе ниже, чем 0,01 г/л, объем вводимой в хроматограф пробы необходимо увеличить до 4-10 мкл.

8.2. Идентификацию пиков хроматограммы исследуемого раствора проводят сравнением с хроматограммой рабочего раствора для градуировки по двум параметрам: времени удерживания и спектральному отношению R .

8.2.1. Если времена удерживания и спектральные отношения пиков хроматограммы исследуемого раствора совпадают в пределах допустимых отклонений ($\Delta R \leq 0,05$, $\Delta t_R \leq 3\%$) с временами удерживания и спектральными отношениями соответствующих им пиков хроматограммы раствора для градуировки, результат идентификации считают положительным.

8.2.2. Если спектральные отношения совпадают в пределах допустимого отклонения, а разница времен удерживания пиков хроматограммы исследуемого раствора и хроматограммы раствора для градуировки больше допустимого отклонения, проводят хроматографический анализ соответствующего раствора для градуировки по п. 8.1.1 и сравнивают времена удерживания. В случае совпадения в дальнейшем используют новую хроматограмму в качестве образца.

В случае повторного несовпадения времен удерживания используют метод добавок, для чего к исследуемому раствору добавляют известные количества определяемых витаминов с концентрацией, сравнимой с концентрацией "сомнительных" пиков и анализируют в точном соответствии с прописью методики.

Если на хроматограмме пробы с добавкой площади "сомнительных" пиков увеличились на величину, соответствующую величине добавки, эти пики относятся к определяемым компонентам.

Если на хроматограмме пробы с добавкой наряду с "сомнительными" пиками присутствуют пики, времена удерживания и спектральные отношения которых совпадают с соответствующими параметрами добавленных компонентов, сомнительные пики не относятся к определяемым компонентам.

8.2.3. Если времена удерживания соответствующих пиков хроматограммы исследуемого раствора и хроматограммы раствора для градуировки совпадают в пределах допустимого отклонения, а разница спектральных отношений больше допустимого отклонения, настоящая методика неприменима к данному образцу.

9. Обработка результатов измерений

9.1. Обработку результатов измерений проводят в соответствии с инструкцией по эксплуатации к компьютерной программе.

9.2. Массовую концентрацию витамина в растворе рассчитывают по соответствующему градуировочному уравнению.

9.3. Допустимое расхождение между результатами двух параллельных измерений не должно превышать норматив d , равный $0,03 \bar{C}_i$.

Если $|C_{i,1} - C_{i,2}| \leq d$, результаты измерения усредняют:

$$\bar{C}_i = \frac{C_{i,1} + C_{i,2}}{2}$$

В случае превышения норматива d эксперимент повторяют. При повторном превышении указанного норматива выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам анализа, устраняют их и повторяют эксперимент.

10. Оформление результатов анализа

Результат измерений оформляют записью в журнале и выдают в виде

$$C_i(z/l) = \bar{C}_i \pm \Delta C$$

где ΔC - доверительный интервал, равный $0,05 \bar{C}_i$.

11. Контроль точности измерений

11.1. Оперативный контроль сходимости

Оперативный контроль сходимости осуществляют постоянно путем оценки расхождения параллельных результатов по п.9.3.

11.2. Оперативный контроль точности

Оперативный контроль точности осуществляют 1 раз в месяц методом добавок, для чего к исследуемому раствору добавляют известные количества определяемых компонентов и анализируют в точном соответствии с прописью методики.

Результаты считают удовлетворительными, если выполняется соотношение

$$|\bar{C}_{доб} - \bar{C} - \mu| \leq K$$

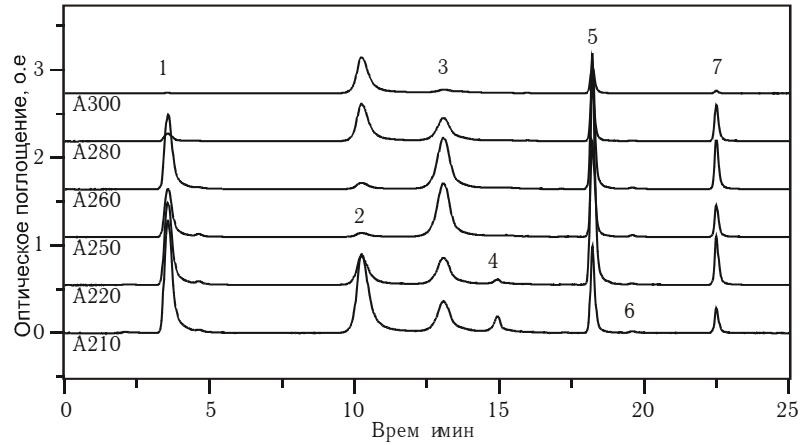
где $\bar{C}_{доб}$ - результат анализа пробы с добавкой; \bar{C} - результат анализа пробы без добавки; μ - величина добавки; K - норматив оперативного контроля.

Норматив оперативного контроля рассчитывают по формуле

$$K = 0.84 \sqrt{(\Delta C_{доб})^2 + (\Delta C)^2}$$

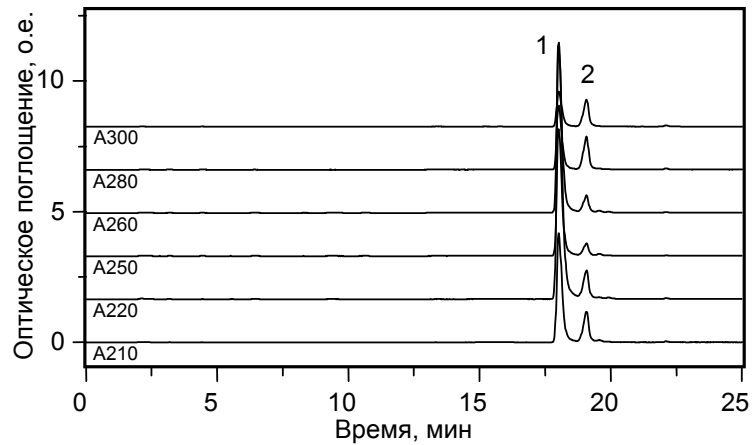
где $\Delta C_{доб}$ и ΔC - доверительные интервалы проб с добавкой и без добавки, соответственно.

Если соотношение не выполняется, повторяют эксперимент. При повторном превышении норматива K выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам анализа, устраняют их и повторяют эксперимент. При необходимости проводят переградуировку хроматографа.



Хроматограмма водорастворимых витаминов.

1- B_3 (никотиновая кислота); 2- B_6 (пиридоксингидрохлорид); 3- B_1 (тиамингидрохлорид); 4- B_5 (пантотенат кальция); 5- K_3 (водорастворимая форма); 6- B_C (фолиевая кислота); 7- B_2 (рибофлавин)

Хроматограмма витаминов B_C и K_3 :

1- K_3 (водорастворимая форма); 2- B_C (фолиевая кислота)

Времена удерживания и спектральные отношения витаминов B_1 , B_2 , B_3 , B_5 , B_6 , B_C и K_3 .

Витамин	t_R , мин	Спектральные отношения (R)				
		S_{220}/S_{210}	S_{250}/S_{210}	S_{260}/S_{210}	S_{280}/S_{210}	S_{300}/S_{210}
B_3	14,94	0,284	0,005	0,001	0,001	0,001
B_6	10,24	0,395	0,063	0,099	0,606	0,595
K_3	18,20	2,741	1,091	1,468	0,544	0,300
		S_{210}/S_{260}	S_{220}/S_{260}	S_{250}/S_{260}	S_{280}/S_{260}	S_{300}/S_{260}
B_1	13,06	0,430	0,435	1,094	0,378	0,002
B_2	22,48	0,519	0,984	0,648	0,745	0,050
B_3	3,56	1,065	0,824	0,640	0,109	0,005
B_C	19,59	1,286	1,362	0,723	1,948	1,595

Значения в таблице даны в качестве примера. Для других колонок и хроматографов они могут отличаться.