



**ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ И МЕТРОЛОГИИ**

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УНИТАРНОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ

**ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
МЕТРОЛОГИЧЕСКОЙ СЛУЖБЫ**

119361 Москва, Озёрная ул., д. 46

E-mail: analyt-vm@vniims.ru

Тел. (095) 437 9419

Факс: (095) 437 5666

СВИДЕТЕЛЬСТВО № 38-03

ОБ АТТЕСТАЦИИ МВИ

**ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ И СПЕКТРАЛЬНЫЕ ПАРАМЕТРЫ
УФ-ПОГЛОЩАЮЩИХ ВЕЩЕСТВ**

**МЕТОДИКА ВЫПОЛНЕНИЯ ИЗМЕРЕНИЙ МЕТОДОМ
ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ**

Методика выполнения измерений хроматографических и спектральных параметров УФ-поглощающих веществ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, разработанная Лимнологическим институтом Сибирского отделения РАН, аттестована в соответствии с ГОСТ Р 8.563-96 и ГОСТ Р ИСО 5725-2002(Части 1-6).

Аттестация осуществлена по результатам экспериментальных исследований МВИ.

В результате аттестации установлено, что МВИ соответствует предъявляемым к ней метрологическим требованиям и обладает основными метрологическими характеристиками, приведенными на обороте настоящего свидетельства.

При реализации методики в лаборатории обеспечивают контроль стабильности результатов анализа (на основе контроля стабильности стандартного отклонения повторяемости).

Дата выдачи 10 декабря 2003 г.

Заместитель директора



В. Н. Яншин

РЕЗУЛЬТАТЫ МЕТРОЛОГИЧЕСКОЙ АТТЕСТАЦИИ

№ п/п	Наименование параметра X	Диапазон измерений	Границы погрешности измерений		Предел повторяе- мости, ($n=2, P=0,95$)		Предел воспроиз- водимости, ($m=2, P=0,95$)	
			относит., %, δ	абсолютн. Δ	относит., %, r	абсолютн. $r_{\text{абс}}$	относит., %, R	абсолютн. $R_{\text{абс}}$
1	Массовая кон- центрация, мг/мл	0,2	± 8		4		10	
2	Удельная площадь пика S_{a210} , е.о.п.·мкл мг/мл	125-1250	± 5		3		7	
3	Объем удер- живания V_R , мкл	150-4300	± 10		4		10	
4	Спектральное отношение S_λ/S_{210}	0,10-1,00 св.1,00-10,0	± 8	$\pm 0,03$	4	0,02	10	0,03
5	Площадь пика S_{210} , е.о.п.·мкл	25-250	± 5		3		7	

Начальник сектора



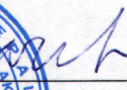
О. Л. Рутенберг

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
ЛИМНОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ

"СОГЛАСОВАНО"
Заместитель директора
ФГУП ВНИИМС

В.Н. Яншин
" _____ 2003 г.



"УТВЕРЖДАЮ"
Директор ЛИН СО РАН
академик

М.А. Грачев
" _____ 2003 г.



ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ И СПЕКТРАЛЬНЫЕ ПАРАМЕТРЫ
УФ-ПОГЛОЩАЮЩИХ ВЕЩЕСТВ

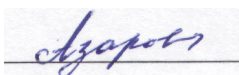
МЕТОДИКА ВЫПОЛНЕНИЯ ИЗМЕРЕНИЙ МЕТОДОМ
ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Заведующий отделом, д.х.н.

 Г.И. Барам

" 08 " декабря 2003г.

Научный сотрудник

 И.Н. Азарова

" 08 " декабря 2003г.

ИРКУТСК
2003

1. РАЗРАБОТАНА

Лимнологическим институтом Сибирского отделения Российской Академии наук

Директор, академик М.А.Грачев

Заведующий отделом Г.И.Барам

Научный сотрудник И.Н.Азарова

2. АТТЕСТОВАНА

Всероссийским научно-исследовательским институтом метрологической службы
Госстандарта РФ. Свидетельство об аттестации № 38-03 от 10.12.2003 года

3. УТВЕРЖДЕНА

Лимнологическим институтом Сибирского отделения Российской Академии наук

4. ЗАРЕГИСТРИРОВАНА

в Федеральном реестре методик выполнения измерений, применяемых в сферах
распространения государственного метрологического контроля и надзора,
под № ФР.1.31.2003.00951

Настоящая методика регламентирует процедуру измерений хроматографических параметров (объемов удерживания, высот, удельных площадей и коэффициентов асимметрии хроматографических пиков) и спектральных характеристик (спектральных отношений) УФ-поглощающих веществ, включенных в базу данных "БД-2003", методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в обращенно-фазовом режиме с детектированием на 8 длинах волн.

1. Метрологические характеристики методики

При соблюдении регламентированных условий методики гарантированы метрологические характеристики, приведенные в таблице 1.

Таблица 1.

№ п/п	Наименование параметра X	Диапазон измерений	Границы погрешности измерений ($P=0,95$)		Предел повторяемости, ($n=2, P=0,95$)		Предел воспроизводимости, ($m=2, P=0,95$)	
			относит., %, δ	абсолют. Δ	относит., %, r	абсолют. $r_{абс}$	относит., %, R	абсолют. $R_{абс}$
1	Массовая концентрация, мг/мл	0,2	± 8		4		10	
2	Удельная площадь пика S_{a210} , $\frac{\text{е.о.п.} \cdot \text{мкл}}{\text{мг/мл}}$	125-1250	± 5		3		7	
3	Объем удерживания V_R , мкл	150-4300	± 10		4		10	
4	Спектральное отношение S_λ/S_{210}	0,10-1,00 св.1,00-10,0	± 8	$\pm 0,03$	4	0,02	10	0,03
5	Площадь пика S_{210} , е.о.п.·мкл	25-250	± 5		3		7	

2. Средства измерений, реактивы и материалы

2.1. Средства измерений

Хроматограф жидкостный "Милихром А-02" с колонкой хроматографической из нержавеющей стали, заполненной обращенно-фазовым сорбентом С18, тип "БД-2003"
Лабораторные весы "Сарториус ВР221S", класс точности 1
Пипетки градуированные 5-1-1; 5-1-5; 5-2-10; 5-2-25
Колбы мерные 2-25-2; 2-50-2; 2-100-2; 2-200-2; 2-250-2; 2-500-2
Стакан вместимостью 1 дм³

ТУ 25-7405.0040-95

ГОСТ 24104-01

ГОСТ 29227-91

ГОСТ 1770-74

ГОСТ 10394-63

2.2. Вспомогательные устройства

Шкаф сушильный "СНОЛ"
Дистиллятор, тип "ДЗ-4-2М"

ГОСТ 13474-79

ТУ 64-1-721-79

Мембраны фильтровальные пористостью 0,45 мкм, тип *HA*, производства "Millipore Corporation", США

2.3. Реактивы и материалы

Вода дистиллированная	ГОСТ 6709-72
Ацетонитрил для ВЭЖХ, "сорт 0" или "сорт 1"	НПК "Криохром", С.-Петербург
Метанол, "х.ч."	ГОСТ 6995-77
Кислота соляная, стандарт-титр	ТУ 6-09-2540-72
Натрия гидроокись, "х.ч."	ГОСТ 4328-77
Реактивы производства "ALDRICH", США:	Номер по каталогу ALDRICH 2003-2004 гг.
Перхлорат лития, тригидрат	20,530-3
Кислота хлорная, массовая доля основного вещества 70%	32,043-9
Калий бромистый, массовая доля основного вещества 98%	20,768-3
Уридин, массовая доля основного вещества 99%	U288-1
Кофеин, массовая доля основного вещества 99%	C5-3
2-Нитроанилин, массовая доля основного вещества 98%	N978-0
3-Нитроанилин, массовая доля основного вещества 98%	N982-9

Для формирования базы данных используют хроматографически чистые (по ВЭЖХ) реактивы с содержанием основного вещества не менее 95%.

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

3. Метод измерений

Метод основан на измерении хроматографических (объемов удерживания, высот, удельных площадей хроматографических пиков) и спектральных параметров (спектральных отношений) аттестованных растворов с массовой концентрацией УФ-поглощающих веществ 0,2 мг/мл на колонке с обращенной фазой C18 "БД-2003" и с УФ-детектированием на 8 длинах волн: 210, 220, 230, 240, 250, 260, 280 и 300 нм. Полученные значения объемов удерживания, удельных площадей пиков и спектральных отношений S_λ/S_{210} используют для формирования базы данных "БД-2003".

4. Требования безопасности

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

- "Руководством по эксплуатации" хроматографа "Милихром А-02";
- правилами работы в химических лабораториях (работа с концентрированными кислотами, хромовой смесью, щелочами, органическими растворителями).

5. Требования к квалификации оператора

К выполнению измерений и обработке их результатов допускают лиц, имеющих квалификацию не ниже лаборанта-химика, навыки и опыт работы в химической лаборатории, прошедших обучение хроматографическим методам анализа, стажировку на хроматографе "Милихром А-02" и изучивших настоящую методику.

6. Условия выполнения измерений

6.1. Измерения выполняют при следующих условиях:

6.1.1. Условия окружающей среды:

- температура воздуха: от 18 до 25°C;
- атмосферное давление: 84-107 кПа (630-800 мм рт.ст.);
- относительная влажность воздуха: от 30 до 80%;
- отсутствие попадания прямого солнечного света на хроматограф.

6.1.2. Режимные параметры хроматографа "Милихром А-02"

Элюент в насосе "А" хроматографа	раствор № 3 (п.7.3.)
Элюент в насосе "Б" хроматографа	ацетонитрил
Длина волны детектора, λ	210, 220, 230, 240, 250, 260, 280 и 300 нм
Расход элюента	100 мкл/мин
Температура термостата колонки	40°C
Постоянная времени	0,18 с
Конфигурация анализа:	
промывка иглы	"вкл."
промывка инжектора	"вкл."
объем буфера	"откл."
Метод	однолучевой
Режим	нормальный
Кювета	верхняя
Напряжение переменного тока, питающего хроматограф	220±22 В
Частота переменного тока	50±1 Гц

7. Подготовка к выполнению измерений

7.1. Перед выполнением измерений по настоящей методике проводят следующие работы: подготовку (очистку) посуды, приготовление элюента "А", аттестованной смеси "БД-2003" и аттестованных растворов УФ-поглощающих веществ.

7.2. Подготовка посуды

Используемую при анализе посуду тщательно моют хромовой смесью, последовательно ополаскивают водопроводной и дистиллированной водой и сушат в сушильном шкафу при температуре 120-150°C.

7.3. Приготовление элюента "А"

7.3.1. Раствор №1 (4,1М водный раствор перхлората лития). В стакан вместимостью 1 дм³ вносят 330 г $LiClO_4 \cdot 3H_2O$, растворяют в дистиллированной воде при перемешивании и нагревании до 50°C (конечный объем 450 см³), количественно переносят раствор в мерную колбу вместимостью 500 см³, охлаждают до комнатной температуры и доводят объем до метки дистиллированной водой. Раствор фильтруют через мембранный фильтр пористостью 0,45 мкм.

7.3.2. Раствор №2 (4М водный раствор $LiClO_4$ в 0,1М $HClO_4$). 2,2 см³ хлорной кислоты вносят стеклянной пипеткой вместимостью 5 см³ в мерную колбу вместимостью 250 см³ и доводят до метки раствором №1, приготовленным по п.7.3.1.

7.3.3. Раствор №3 (элюент "А"). 10 см³ раствора №2, приготовленного по п.7.3.2., вносят стеклянной пипеткой в мерную колбу вместимостью 200 см³, доводят объем раствора до метки дистиллированной водой и перемешивают.

Состав полученного раствора: 0,2M LiClO₄-0,005M HClO₄.

7.4. Приготовление аттестованной смеси "БД-2003"

7.4.1. Приготовление раствора *орто*-нитроанилина и *мета*-нитроанилина с массовой концентрацией 1 мг/мл каждого в 20%-ном водном ацетонитриле. В мерную колбу вместимостью 25 мл вносят по 25 мг (точные навески) *орто*- и *мета*-нитроанилинов, добавляют 5 мл ацетонитрила и перемешивают. Доводят объем раствора до метки дистиллированной водой.

7.4.2. В мерную колбу вместимостью 100 мл вносят точные навески: калия бромистого 20 мг, уридина 20 мг, кофеина 100 мг. Добавляют около 50 мл дистиллированной воды, нагревают до (35-40)°С и перемешивают до полного растворения. Раствор охлаждают до комнатной температуры, добавляют 10 мл раствора *орто*- и *мета*-нитроанилинов, приготовленного по п.7.4.1., и доводят объем до метки дистиллированной водой. Раствор фильтруют через мембранный фильтр пористостью 0,45 мкм. Метрологические характеристики аттестованной смеси "БД-2003" приведены в таблице 2.

Таблица 2.

Наименование компонента	Массовая концентрация, мг/см ³	Границы относительной погрешности, % (P=0,95)
Калия бромид	0,2	±1,5
Уридин	0,2	±1,5
Кофеин	1,0	±1,3
<i>мета</i> -Нитроанилин	0,1	±1,8
<i>орто</i> -Нитроанилин	0,1	±1,8
Растворитель: смесь ацетонитрила с водой с объемной долей ацетонитрила 2%		

7.5. Приготовление аттестованных растворов УФ-поглощающих веществ

7.5.1. Готовят растворы веществ в воде или метаноле, в зависимости от растворимости. Допускается приготовление растворов в разбавленных HCl или NaOH с концентрацией кислоты или щелочи не более 0,01M.

7.5.2. 20 мг образца помещают в мерную колбу вместимостью 100 см³ и доводят объем до метки соответствующим растворителем из числа указанных в п.7.5.1. При необходимости растворение проводят при нагревании. Перед выполнением измерений анализируемый раствор фильтруют через мембранный фильтр пористостью 0,45 мкм для удаления механических примесей.

7.5.3. Элюент "А" и аттестованную смесь "БД-2003" хранят в герметично закрытых стеклянных емкостях при комнатной температуре не более 12 месяцев. Аттестованные растворы хроматографируют сразу после приготовления.

7.6. Подготовка хроматографа

7.6.1. Подготовку хроматографа выполняют в соответствии с руководством по его эксплуатации.

7.6.2. Перед проведением анализа записывают хроматограмму в условиях п.6. и

п.8.2.1. без введения образца для проверки наличия УФ-поглощающих примесей в элюенте. Элюент считается пригодным, если высота пиков примесей на любой из 8 длин волн детектирования не превышает 0,02 е.о.п. Такую хроматограмму рекомендуется записывать после проведения 50 анализов, а также после замены элюентов.

8. Выполнение измерений

8.1. Аттестованная смесь "БД-2003" выполняет функции градуировочного раствора, при помощи которого устанавливают и контролируют характеристики хроматографической системы (Таблица 3).

Таблица 3.

Компоненты смеси "БД-2003"	Наименование параметра X	Контролируемые характеристики хроматографической системы
1. Бромид-ион	Объем удерживания	Свободный объем
2. Уридин	Спектральное отношение S_{280}/S_{250}	Точность настройки детектора в диапазоне от 250 до 280 нм
3. Кофеин	Спектральное отношение S_{260}/S_{280}	Линейный диапазон детектора
4. <i>м</i> -Нитроанилин	Спектральное отношение S_{260}/S_{230}	Пригодность элюента "А"
5. <i>о</i> -Нитроанилин	Объем удерживания	Отклонение градиента от заданной формы
	Спектральное отношение S_{220}/S_{210}	Точность настройки детектора в диапазоне от 210 до 300 нм
	Спектральное отношение S_{230}/S_{210}	
	Спектральное отношение S_{240}/S_{210}	
	Спектральное отношение S_{250}/S_{210}	
	Спектральное отношение S_{260}/S_{210}	
	Спектральное отношение S_{280}/S_{210}	
	Спектральное отношение S_{300}/S_{210}	
	Площадь пика S_{210}	Точность дозирования образца
	Асимметрия пика $A_{10\%}$	Нарушения в упаковке колонки

Спектральные характеристики компонентов смеси установлены на основании закона Ламберта-Бэра; хроматографические (объемы удерживания, высоты, удельные площади и коэффициенты асимметрии хроматографических пиков) определены на хроматографе "Милихром А-02" экспериментально на колонке, заполненной сорбентом С18, типа "БД-2003". Метрологические характеристики спектральных и хроматографических параметров оценены по результатам межлабораторного эксперимента и приведены в таблице 4.

Таблица 4.

Вещество	Наименование параметра X	Аттестованное значение параметра	Границы относительной погрешности, %, $P=0,95$	Предел повторяемости, %, r ($n=2$, $P=0,95$)	Предел воспроизводимости, %, R ($m=2$, $P=0,95$)
1. Бромид-ион	Объем удерживания, мкл	150	± 6	4	6
2. Уридин	Спектральное отношение S_{280}/S_{250}	0,50	± 6	2	8
3. Кофеин	Спектральное отношение S_{260}/S_{280}	0,76	± 5	2	6
4. <i>m</i> -Нитроанилин	Спектральное отношение S_{260}/S_{230}	0,60	± 4	4	5
5. <i>o</i> -Нитроанилин	Объем удерживания, мкл	1525	± 4	2	4
	Спектральное отношение S_{220}/S_{210}	1,69	± 3	1	3
	Спектральное отношение S_{230}/S_{210}	1,74	± 5	1	7
	Спектральное отношение S_{240}/S_{210}	1,07	± 7	1	9
	Спектральное отношение S_{250}/S_{210}	0,57	± 7	1	8
	Спектральное отношение S_{260}/S_{210}	0,39	± 6	1	7
	Спектральное отношение S_{280}/S_{210}	0,59	± 4	1	5
	Спектральное отношение S_{300}/S_{210}	0,31	± 7	2	9
	Асимметрия пика, $A_{10\%}$	1,04	± 7	3	8
	Выходной сигнал S_{210} , е.о.п.·мкл	24,8	± 4	3	6

8.2. Градуировка хроматографа

8.2.1. Процедура градуировки хроматографа заключается в воспроизведении на нем спектральных и хроматографических параметров компонентов аттестованной смеси "БД-2003" (Таблица 4).

4 мкл аттестованной смеси "БД-2003" вводят при помощи автосамплера в хроматограф и хроматографируют при градиентном элюировании с параметрами, приведенными в таблице 5. Максимальное давление во время хроматографирования не должно превышать 5,0 МПа. Если давление больше указанного значения, производят замену входного фильтра в колонке.

Таблица 5.

Степень градиента (шаг)	Объем, мкл	Доля элюента "Б", %
Регенерация	800	5
0	0	5
1	4000	100
2	4300	100

8.2.2. Полученную хроматограмму обрабатывают при помощи программы обработки данных. Рассчитывают расхождения между полученными экспериментальными значениями хроматографических и спектральных параметров (X_i) и значениями $X_{i_{0.БД-2003}}$, установленными таблице 4 (п.8.1.) для аттестованной смеси "БД-2003" (Таблица 4, п.8.1.).

Полученные расхождения не должны превышать значения предела воспроизводимости (R_i), установленного для каждого параметра смеси "БД-2003". Пример хроматограммы смеси "БД-2003" приведен в Приложении.

Если условие

$$\frac{|X_{i_{1.БД-2003}} - X_{i_{0.БД-2003}}| \cdot 200}{X_{i_{1.БД-2003}} + X_{i_{0.БД-2003}}} \leq R_{i_{БД-2003}} \quad (1)$$

выполняется, то хроматографическая система считается пригодной для использования данной методики.

Если условие (1) не выполняется, то требуется настройка режимных параметров хроматографа в соответствии с инструкцией по эксплуатации и настоящей методикой (п.6.).

8.3. Выполнение измерений хроматографических и спектральных параметров УФ-поглощающих веществ.

8.3.1. 4 мкл аттестованного раствора, приготовленного по п.7.5., вводят в хроматограф. Измерения выполняют в соответствии с п. 8.2.1. Пробу анализируют дважды, используя две закрытые пробками пробирки для автосамплера.

8.3.2. После проведения серии анализов аттестованных растворов повторяют анализ смеси "БД-2003". Если для смеси "БД-2003" выполняется условие

$$\frac{|X_{i_{1.БД-2003}} - X_{i_{2.БД-2003}}| \cdot 200}{X_{i_{1.БД-2003}} + X_{i_{2.БД-2003}}} \leq r_{i_{БД-2003}} \quad (2)$$

то переходят к обработке результатов измерений хроматографических и спектральных параметров УФ-поглощающих веществ.

Если условие (2) не выполняется, то результаты анализов серии аттестованных растворов считаются непригодными для обработки; требуется настройка режимных параметров хроматографа в соответствии с инструкцией по эксплуатации и настоящей методикой (п.6.).

9. Обработка результатов измерений

9.1. Хроматограммы аттестованных растворов УФ-поглощающих веществ обрабатывают, используя прилагаемую к прибору программу обработки.

9.2. Результаты измерений считают приемлемыми, если для каждого параметра выполняется условие

$$\frac{|X_{i_1} - X_{i_2}| \cdot 200}{X_{i_1} + X_{i_2}} \leq r_i \text{ или } |X_{i_1} - X_{i_2}| \leq r_{абс} \quad (3)$$

Если условие (3) выполняется, то за результат измерений каждого параметра принимают среднее арифметическое значение результатов двух определений.

Если условие не выполняется, то повторяют операции по п.п. 8.2. и 8.3.

10. Оформление результатов измерений

Результат измерений представляют в виде

$$X_i \pm 0,01 \delta_i X_i$$

где X_i - среднее значение из двух измерений i -того параметра;

δ_i - границы относительной погрешности измерений i -того параметра. Значения δ_i приведены в таблице 1.

11. Контроль качества результатов измерений при реализации методики в лаборатории

Периодичность контроля устанавливается планом контроля точности результатов измерений лаборатории.

11.1. Контроль стабильности результатов измерений

Контроль стабильности результатов измерений в лаборатории осуществляют по ГОСТ ИСО 5725-6, используя метод контроля стабильности стандартного отклонения повторяемости и правильности при реализации методики в лаборатории по п.п. 6.2.3., 6.2.4. ГОСТ ИСО 5725-6. Проверку стабильности осуществляют с применением контрольных карт Шухарта.

Рекомендуется устанавливать контролируемый период так, чтобы количество результатов контрольных измерений было от 20 до 30.

При неудовлетворительных результатах контроля, например, превышении предела действия или регулярном превышении предела предупреждения, выясняют причины этих отклонений, в том числе проводят смену реактивов, проверяют работу оператора.

Хроматограмма аттестованной смеси "БД-2003"

