ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

СТБ ИСО 17993-2005

КАЧЕСТВО ВОДЫ

Определение 15-ти полициклических ароматических углеводородов (ПАУ)
Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуоресцентным детектированием после экстракции жидкость-жидкость

ЯКАСЦЬ ВАДЫ

Вызначэнне 15-ці поліцыклічных араматычных вуглевадародаў (ПАВ)
Метад высокаэфектыўнай вадкаснай храматаграфіі з флуарэсцэнтным дэтэктыраваннем пасля экстракцыі вадкасць-вадкасць

(ISO 17993:2002, IDT)

Издание официальное

БЗ 8-2005



Госстандарт
Минск

gost.e-ecolog.ru

УДК 628.16.09:543.544.5.068.7(083.74)(476) МКС 13.060.01 КП 06 IDT

Ключевые слова: качество воды, углеводороды полициклические ароматические, хроматография жидкостная, детектирование флуоресцентное, экстракция жидкость-жидкость

Предисловие

Цели, основные принципы, положения по государственному регулированию и управлению в области технического нормирования и стандартизации установлены Законом Республики Беларусь «О техническом нормировании и стандартизации».

1 ПОДГОТОВЛЕН республиканским унитарным предприятием «Белорусский государственный институт метрологии (БелГИМ)»

ВНЕСЕН отделом стандартизации Госстандарта Республики Беларусь

2 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ постановлением Госстандарта Республики Беларусь от 27 октября 2005 г. № 48

3 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ISO 17993:2002 «Water quality. Determination of 15 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in water by HPLC with fluorescence detection after liquid-liquid extraction» (ИСО 17993:2002 «Качество воды. Определение 15-ти полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) в воде методом ВЭЖХ с флуоресцентным детектированием после экстракции жидкость-жидкость»)

Международный стандарт подготовлен техническим комитетом ТК 147 «Качество воды», подкомитетом ПК 2.

Перевод с английского языка (en).

Официальные экземпляры международных стандартов, на основе которых подготовлен настоящий стандарт, и стандартов, на которые даны ссылки, имеются в БелГИСС.

Степень соответствия – идентичная (IDT)

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Настоящий стандарт не может быть тиражирован и распространен без разрешения Госстандарта Республики Беларусь

Издан на русском языке

Содержание

Введение IV
1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Принцип метода 1
4 Влияющие факторы 3
5 Реактивы 3
6 Оборудование 5
7 Отбор проб 5
8 Порядок работы 6
9 Расчет результатов 9
10 Прецизионность 10
11 Отчет об испытаниях 11
Приложение А (справочное) Примеры хроматографических условий и колонок 12
Приложение В (справочное) Примеры конструкции специального оборудования 16

Введение

Полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) встречаются практически во всех видах вод.

Эти соединения адсорбируются на твердой фазе (донные отложения, взвешенные вещества), а также растворяются в жидкой фазе.

Некоторые ПАУ могут вызывать онкологические заболевания. Согласно Директиве Совета 98/83/ЕС по качеству воды максимально допустимый уровень бензо(а)пирена – 0,010 мкг/л, а суммы содержания четырех ПАУ [бензо(b)флуорантена, бензо(k)флуорантена, бензо(ghi)перилена, индено(1,2,3-cd)-пирена] – 0,100 мкг/л.

Предупреждение. Некоторые определяемые соединения предположительно могут быть канцерогенами. Ацетонитрил и гексан токсичны. Лица, использующие настоящий стандарт, должны быть знакомы со стандартной лабораторной практикой. Настоящий стандарт не ставит своей целью решение всех проблем безопасности, сопряженных с его использованием. Организация надлежащей практики обеспечения безопасности, охраны труда и обеспечения соответствия национальным законодательным постановлениям относится к сфере ответственности пользователя.

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

КАЧЕСТВО ВОДЫ
Определение 15-ти полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуоресцентным детектированием после экстракции жидкость-жидкость

ЯКАСЦЬ ВАДЫ
Вызначэнне 15-ці поліцыклічных араматычных вуглевадародаў (ПАВ) Метад высокаэфектыўнай вадкаснай храматаграфіі з флуарэсцэнтным дэтэктыраваннем пасля экстракцыі вадкасць-вадкасць

Water quality
Determination of 15 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in water by HPLC with fluorescence detection after liquid-liquid extraction

Дата введения 2006-05-01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (далее – ВЭЖХ) с флуоресцентным детектированием после экстракции жидкость-жидкость для определения 15-ти полициклических ароматических углеводородов (далее – ПАУ) (см. таблицу 1) в питьевой, поверхностной и подземных водах в массовых концентрациях более 0,005 мкг/л (для каждого отдельного соединения) и в поверхностных водах в массовой концентрации выше 0,01 мкг/л.

С некоторыми модификациями этот метод применяется для анализа сточных вод.

Метод применим для других ПАУ при условии проверки правильности метода для каждого случая.

2 Нормативные ссылки

Настоящий стандарт содержит датированные и недатированные ссылки на стандарты и положения других документов. Нормативные ссылки, перечисленные ниже, приведены в соответствующих местах в тексте. Для датированных ссылок последующие изменения их или пересмотр применяют в настоящем стандарте только при внесении в него изменений или пересмотре. Для недатированных ссылок применяют их последние издания.

В настоящем стандарте использованы ссылки на следующие стандарты:

ИСО 5667-2 Качество воды. Отбор проб. Часть 2. Руководство по составлению методик выборочного контроля

ИСО 5667-3 Качество воды. Отбор проб. Часть 3. Руководство по хранению и обращению с пробами воды

ИСО 8466-1 Качество воды. Калибрование и оценка аналитических методов и определение эксплуатационных характеристик. Часть 1. Статистический метод оценки линейной калибровочной функции

3 Принцип метода

Присутствующие в воде ПАУ извлекают гексаном. Экстракт концентрируется выпариванием, затем гексан заменяется на растворитель, используемый для анализа методом ВЭЖХ.

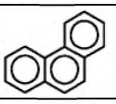
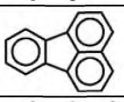
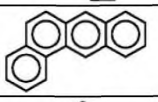
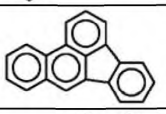
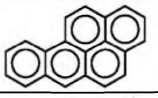
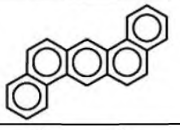
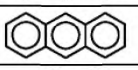
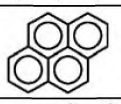
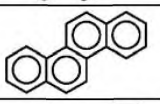
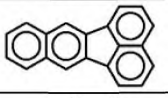
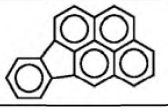
При необходимости экстракты поверхностных или других более загрязненных вод перед анализом очищаются на силикагеле.

Издание официальное

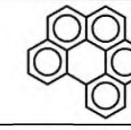
ПАУ разделяют методом ВЭЖХ на соответствующей стационарной фазе с использованием градиентного элюирования. Идентификацию и количественное определение осуществляют с помощью флуоресцентного детектора с программируемыми длинами волн как возбуждения, так и испускания.

Примечание – Если определяют ограниченное число ПАУ, то анализ можно проводить также и при изократических условиях.

Таблица 1 – Полициклические ароматические углеводороды, определяемые данным методом

Название	Химическая формула	Молярная масса	Процентное содержание углерода	Номер по классификации CAS	Структура молекулы
Нафталин	$C_{10}H_8$	128,17 г/моль	93,75 % C	091-20-3	
Аценафтен	$C_{12}H_{10}$	154,21 г/моль	93,05 % C	083-32-9	
Фенантрен	$C_{14}H_{10}$	178,23 г/моль	94,05 % C	085-01-8	
Флуорантен	$C_{16}H_{10}$	202,26 г/моль	95,0 % C	206-44-0	
Бензо(a)антрацен	$C_{18}H_{12}$	228,29 г/моль	94,45 % C	056-55-3	
Бензо(b)флуорантен[a]	$C_{20}H_{12}$	252,32 г/моль	95,2 % C	205-99-2	
Бензо(a)пирен[a]	$C_{20}H_{12}$	252,32 г/моль	95,2 % C	050-32-8	
Дибензо(a,h) антрацен	$C_{22}H_{14}$	278,35 г/моль	94,7 % C	053-70-3	
Флуорен	$C_{13}H_{10}$	166,22 г/моль	93,59 % C	086-73-7	
Антрацен	$C_{14}H_{10}$	178,23 г/моль	94,05 % C	120-12-7	
Пирен	$C_{16}H_{10}$	202,26 г/моль	95,0 % C	129-00-0	
Хризен	$C_{18}H_{12}$	228,29 г/моль	94,45 % C	218-01-9	
Бензо(k)флуорантен	$C_{20}H_{12}$	252,32 г/моль	95,2 % C	207-08-9	
Индено(1,2,3-cd) пирен[a]	$C_{22}H_{12}$	276,34 г/моль	95,6 % C	193-39-5	

Окончание таблицы 1

Название	Химическая формула	Молярная масса	Процентное содержание углерода	Номер по классификации CAS	Структура молекулы
Бензо(ghi)перилен	$C_{22}H_{12}$	276,34 г/моль	95,6 % C	191-24-2	
Примечание – 15 ПАУ, анализируемые этим методом, являются веществами из списка соединений Агентства по охране окружающей среды США (US EPA), за исключением аценафтилена. Аценафтилен не может быть определен этим методом, так как он флуоресцирует.					
[a] Соединения указаны в Директиве Совета 98/83/EC.					

4 Влияющие факторы

4.1 Отбор проб и экстракция

Для отбора проб используют посуду, изготовленную из материалов (предпочтительно сталь или стекло), которые не оказывают влияния на пробу. Необходимо избегать контакта с пластмассой и другими органическими материалами во время отбора проб, их хранения и экстракции.

При использовании автоматических пробоотборников нельзя применять резиновые или силиконовые трубки. Если невозможно избежать использования этих материалов, то контакт с ними необходимо свести к минимуму. Перед отбором пробы пробоотборное оборудование промывают отбираемой водой.

В качестве руководства используют ИСО 5667-2 и ИСО 5667-3.

Анализируемые пробы хранятся в местах, защищенных от прямого солнечного света и длительного воздействия света. Во время хранения проб возможны потери ПАУ вследствие адсорбции на стенках сосудов. Величина потерь зависит от продолжительности хранения.

4.2 Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

Соединения, которые флуоресцируют, ослабляют сигнал и совместно элюируются с анализируемыми ПАУ, создают помехи при их определении. Эти влияющие факторы могут привести к недостаточному разрешению сигнала, что ведет к наложению пиков, и в зависимости от их величины могут повлиять на точность и прецизионность аналитических результатов. Пики несимметричной формы, а также более широкие, чем пики эталонных соединений свидетельствуют о мешающем влиянии. Такая проблема может возникнуть для нафталина и фенантрена в зависимости от селективности используемых фаз колонок.

Неполное удаление используемых при пробоподготовке растворителей (гексана, ацетона, хлористого метилена) может стать причиной плохой воспроизводимости времени удерживания, расширения формы пиков или появления двойных пиков, особенно в случае ПАУ, имеющих в своей структуре 2 или 3 кольца.

Разделение пиков дибензо(ah)антрацена и индено(1,2,3-cd)пирена может быть критичным.

При неполном разрешении проверяется и, если необходимо, корректируется интегрирование пиков.

Обычно наблюдается плохое разрешение пиков перилена и бензо(b)флуорантена, но при выборе селективной длины волны (см. таблицу А.1) пик перилена гасится.

Так как перилен определяется изократическим методом для оценки ПАУ в питьевой воде (см. рисунок А.3), он должен включаться в этап калибровки.

5 Реактивы

При возможности используют реактивы только известной степени чистоты, например реактивы «для анализа следовых количеств» или «для ВЭЖХ анализа», а также дистиллированную воду или воду эквивалентной степени чистоты с минимальной флуоресценцией.

Наблюдения за холостой пробой дают гарантию того, что в реактивах не содержатся определяемые концентрации ПАУ (см. 8.9).

5.1 Растворители

5.1.1 Экстракционные растворители для экстракции:
– гексан, C_6H_{14};
– другие летучие растворители, если они обеспечивают эквивалентное или лучшее извлечение.
5.1.2 Растворители для очистки экстракта:
– дихлорметан, CH_2Cl_2 (см. примечание);
– гексан, C_6H_{14};
– N, N-диметилформамид, $(CH_3)_2NCHO$;
– ацетон, C_3H_6O.

Примечание – Дихлорметан часто содержит стабилизаторы, например этанол или амилен, которые могут влиять на степень элюирования. В отсутствие стабилизаторов могут образовываться радикалы, которые вызывают разложение ПАУ. Наличие хлористого водорода является индикатором радикалов. Он экстрагируется водой из дихлорметана и измеряется значение pH воды.

5.1.3 Растворители для ВЭЖХ:
– ацетонитрил, CH_3CN;
– метанол CH_3OH.

5.2 Натрия тиосульфат пентагидрат, $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$.

5.3 Натрия сульфат, Na_2SO_4, безводный, предварительно прокаленный при 500 °С.

5.4 Азот с объемным содержанием вещества, 99,999 % (об.).

5.5 Силикагель со средним размером частиц около 40 мкм, хранящийся в эксикаторе для обеспечения максимальной активности.

Примечание – Могут быть использованы готовые картриджи с силикагелем.

5.6 Молекулярные сита с диаметром пор 0,4 нм, полностью активированные.

5.7 Эталонные соединения (таблица 1).

Так как эти соединения являются токсичными веществами по своей природе, рекомендуется использовать готовые, предпочтительно сертифицированные стандартные растворы. Необходимо избегать их контакта с кожей.

5.8 Основные стандартные растворы

Растворы по 5.8.1 и 5.8.2 стабильны по крайней мере в течение года при хранении в темноте при комнатной температуре и в герметичных условиях.

5.8.1 Однокомпонентные основные стандартные растворы веществ, приведенные в таблице 1, приготовлены в ацетонитриле (5.1.3) в определенной массовой концентрации, например 10 мкг/мл.

Эти растворы используют для идентификации на хроматограмме одного из ПАУ.

5.8.2 Многокомпонентный основной стандартный раствор сертифицирован и приготовлен в ацетонитриле (5.1.3) в определенной массовой концентрации, например 10 мкг/мл для каждого отдельного соединения.

5.9 Рабочие стандартные растворы

Разбавлением основного стандартного раствора (5.8.2) метанолом или ацетонитрилом (5.1.3) приготавливают, как минимум, пять калибровочных растворов.

Выбор растворителя зависит от состава мобильной фазы ВЭЖХ.

Например, переносят 50 мкл основного стандартного раствора в мерную колбу объемом 5 мл и доводят до метки ацетонитрилом. В 1 мкл этого рабочего стандартного раствора содержится 100 пг соответствующих индивидуальных компонентов.

При хранении в темноте при комнатной температуре и в герметичных условиях эти растворы остаются стабильными по крайней мере в течение года.

Проверка массовой концентрации ПАУ в основном стандартном растворе возможна только путем сравнения с независимым, предпочтительно сертифицированным, стандартным раствором.

6 Оборудование

Стандартную лабораторную стеклянную посуду моют для исключения вредных воздействий. Стеклянную посуду моют, например, моющим нейтральным средством в горячей воде и высушивают при температуре 120 °С в течение 15 – 30 мин. После охлаждения посуду промывают ацетоном, закрывают и хранят в чистоте.

Нельзя использовать для анализов питьевой воды посуду, в которой находились пробы сточных вод или пробы с высокими концентрациями ПАУ.

6.1 Бутыли предпочтительно известной массы, объемом 1000 мл из темного стекла, с узким горлышком, плоским дном, со стеклянной пробкой.

6.2 Магнитная мешалка со стержнями, покрытыми стеклом или политетрафторэтиленом (далее – ПТФЭ), используемая для перемешивания при экстракции растворителем.

6.3 Делительная воронка объемом 1000 мл с краном из ПТФЭ и стеклянной пробкой.

6.4 Конические колбы объемом 100 мл и 250 мл со стеклянными пробками.

6.5 Микрошприцы объемом 500 мкл и 1000 мкл.

6.6 Колба для концентрирования объемом 100 мл (рисунок В.1).

6.7 Центрифуга с ротором и центрифужными пробирками с коническим дном объемом 50 мл (рисунок В.2).

6.8 Пипетки Пастера.

6.9 Испарительное устройство, например роторный испаритель с вакуумным стабилизатором и водяной баней.

6.10 Шейкирующее устройство с регулируемой скоростью вращения.

6.11 Микрофильтр с гидрофильной мембраной, устойчивой к действию растворителей, с размером пор 0,45 мкм.

6.12 Стеклянные пробирки для автодозатора объемом около 2 мл с химически инертной крышкой, например с прокладкой из ПТФЭ.

6.13 Полипропиленовые или стеклянные картриджи, заполненные как минимум 0,5 г силикагеля (5.5).

6.14 Стеклянные пробирки, например градуированные центрифужные пробирки (цена деления – 0,1 мл), номинальным объемом 10 мл со стеклянными пробками.

6.15 Высокоэффективный жидкостный хроматограф (ВЭЖХ) с флуоресцентным детектором и системой обработки данных, который включает:

6.15.1 Дегазатор для дегазации вакуумом или гелием.

6.15.2 Аналитический насос, способный обеспечивать бинарное градиентное элюирование.

6.15.3 Термостат для колонки, способный обеспечивать постоянство температуры с точностью ± 0,5 °С.

6.15.4 Флуоресцентный детектор, оборудованный монохроматором и пригодный для программирования по меньшей мере шести пар длин волн, включая ослабление/усиление сигнала.

6.16 Аналитическая хроматографическая колонка, обеспечивающая разделение пиков в соответствии с требованием 8.5.2 (примеры приведены в приложении А).

7 Отбор проб

Пробы питьевой воды из водопроводного крана отбирают до стерилизации крана, которая проводится перед отбором проб для бактериологического анализа.

Пробу отбирают в бутыль из темного стекла (6.1). Для удаления хлора в пробы воды добавляют около 50 мг тиосульфата натрия (5.2).

Бутыль заполняют пробой (приблизительно 1000 мл) и хранят при температуре 4 °С в защищенном от света месте до проведения экстракции. Экстракцию проводят в течение 24 ч после отбора пробы во избежание потерь за счет адсорбции. Если невозможно проанализировать пробу в течение 24 ч, необходимо провести следующее: удалить часть пробы из бутыли, чтобы остаток составлял приблизительно (1000 ± 10) мл, определить массу анализируемой пробы путем взвешивания бутыли; затем добавить 25 мл гексана (5.1.2) и хорошо встряхнуть. Подготовленную таким образом пробу хранить в течение 72 ч при температуре 4 °С в защищенном от света месте.

8 Порядок работы

8.1 Экстракция

Пробы гомогенизируют, например, при помощи магнитной мешалки. Затем удаляют часть пробы из бутыли, чтобы остаток составлял приблизительно (1000 ± 10) мл, определяют массу анализируемой пробы взвешиванием бутыли; затем добавляют 25 мл гексана (5.1.2) и хорошо встряхивают. Для экстракции можно также использовать другие летучие растворители при условии, что они позволяют обеспечить эквивалентное или лучшее извлечение.

В пробу помещают перемешивающий стержень и бутыль закрывают крышкой. Затем тщательно перемешивают анализируемую пробу, используя магнитную мешалку (6.2) при установленных максимальных параметрах (1000 мин$^{-1}$) в течение 60 мин. Затем пробу переносят в делительную воронку (6.3) и позволяют фазам разделиться в течение как минимум 5 мин. Разделение гексана с водой также может быть проведено с использованием микросепаратора (пример приведен на рисунке В.3).

Если в течение процесса экстракции образуется стойкая эмульсия, ее собирают в центрифужную пробирку (6.14) и центрифугируют в течение 10 мин при 3000 мин$^{-1}$. Воду удаляют пипеткой Пастера (6.8), экстракт переносят в коническую колбу объемом 100 мл (6.4). Экстракт высушивают в соответствии с 8.2.

Для экстракции проб сточных вод, а также проб воды с большим содержанием ПАУ, гомогенизированную пробу объемом 10 – 100 мл переносят в коническую колбу объемом 250 мл (6.4) с помощью пипетки и разбавляют водой до 200 мл. Затем добавляют 25 мл гексана (5.1.2) и продолжают процедуру, описанную выше.

8.2 Высушивание экстракта

Экстракт пробы в гексане, полученный в соответствии с 8.1, переносят в коническую колбу объемом 100 мл (6.4). Делительную воронку и центрифужную пробирку ополаскивают 5 мл гексана (5.1.2) и добавляют к экстракту.

Экстракт высушивают с помощью сульфата натрия (5.3) интенсивным встряхиванием в течение не менее 30 мин.

Высушенный экстракт декантируют в концентрационную колбу (6.6). Коническую колбу дважды ополаскивают 5 мл гексана (5.1.2) и добавляют в концентрационную колбу.

8.3 Обогащение

Высушенный экстракт пробы в гексане, полученный в соответствии с 8.2, выпаривают, например, при помощи роторного испарителя (6.9) с температурой бани 30 °С и постепенным понижением давления до 200 гПа до тех пор, пока экстракт не останется только в коническом дне концентрационной колбы (что соответствует объему около 2 мл).

Нельзя выпаривать экстракты досуха, поскольку это может привести к потере соединений, в структуру которых входит 2 или 3 кольца.

Осадок, образующийся на стенках стекла, растворяют при помощи шейкирующего устройства (6.10).

Очистку экстрактов проб сточных вод и проб неизвестной природы проводят методом, приведенным в 8.4.

В сконцентрированный экстракт добавляют 250 мкл N, N-диметилформамида (5.1.2), затем 500 мкл ацетона (5.1.2) и гомогенизируют смесь. Для гомогенизации вместо ацетона можно использовать дихлорметан (5.1.2) после добавления N, N-диметилформамида.

Гексан и ацетон полностью выдувают в слабом потоке азота (5.4), чтобы довести объем экстракта до 200 – 250 мкл. Обогащенный экстракт не должен содержать следовые количества гексана или ацетона, так как присутствие этих растворителей в анализируемом образце приводит к появлению мешающего влияния при анализе методом ВЭЖХ (4.2).

Экстракт доводят до известного объема (например, 2 мл) растворителем, который используется для приготовления рабочих стандартных растворов (5.9). Во избежание расширения формы пиков на хроматограмме объемная доля диметилформамида не должна превышать 20 %.

Обогащенный экстракт переносят в стеклянную пробирку для автодозатора (6.12), а при необходимости экстракт фильтруют через микрофильтр (6.11). Экстракт хранят в прохладном и темном месте до выполнения анализа.

8.4 Очистка экстракта

Для очистки экстракта используют колонки (пипетки Пастера (6.8)) или картриджи (6.13), заполненные не менее 0,5 г силикагеля (5.5). Силикагель в колонке или картридже промывают пятикратным объемом смеси дихлорметана/гексана (1:1), промывают таким же объемом гексана (5.1.2), не позволяя силикагелю высохнуть.

Растворители, используемые для очистки экстракта, высушивают с помощью активированных молекулярных сит (5.6).

Экстракт пробы в гексане (8.3) концентрируют до объема (500 ± 50) мкл в слабом потоке азота (5.4).

Концентрированный экстракт переносят при помощи пипетки Пастера (6.8) на промытый гексаном силикагель и позволяют экстракту осесть на нем. Собирают элюат в стеклянную пробирку (6.14).

Концентрационную колбу ополаскивают 500 мкл гексана (5.1.2) и этот раствор переносят на колонку, позволяя ему осесть на частицах силикагеля.

ПАУ элюируют из колонки смесью дихлорметана/гексана (1:1). Картриджи, содержащие 0,5 г силикагеля, для элюирования ПАУ промывают смесью дихлорметана/гексана (1:1) объемом не менее 3 мл.

Можно использовать другие смеси растворителей-элюентов, если они обеспечивают такое же или лучшее извлечение.

К элюату добавляют 250 мкл *N*, *N*-диметиформамида (5.1.2), смесь гомогенизируют встряхиванием и концентрируют (8.3) до объема 2 мл с использованием, например, роторного испарителя (6.9), а затем потока азота (5.4) – до объема 200 – 250 мкл.

Экстракт разбавляют до известного объема (например, 2 мл) таким же растворителем, который используется для приготовления рабочих стандартных растворов (5.9).

8.5 Условия работы ВЭЖХ

8.5.1 Общие положения

Систему ВЭЖХ настраивают в соответствии с инструкциями фирмы-производителя. Регулярно контролируют шум и дрейф нулевой линии на соответствие спецификации изготовителя. Если результаты испытаний не удовлетворяют допустимым величинам, необходимо выявить и устранить причины.

8.5.2 Хроматографическое разделение

Используют колонку и хроматографические условия, обеспечивающие эффективное разделение. Для выбора колонок и соответствующих градиентов (см. приложение А).

Величину разрешения $R_{A,B}$ между двумя хроматографическими пиками для соединений А и В определяют по формуле

$$R_{A,B} = \frac{2(t_{r,B} - t_{r,A})}{w_{b,A} + w_{b,B}}, \quad (1)$$

где $t_{r,A}$, $t_{r,B}$ – соответствующее время удерживания соединений А и В, выраженное в минутах ($t_{r,A} > t_{r,B}$);

$w_{b,A}$, $w_{b,B}$ – соответствующая ширина оснований пиков соединений А и В, выраженная в минутах.

Необходимо обеспечить такое разделение аценафтена (ac) и флуорена (fl), чтобы величина разрешения $R_{ac,fl}$ = 1. Величина разрешения для остальных соединений $R_{A,B}$ = 1,5. Величина разрешения хроматографических пиков, для которых происходило изменение длины волны и/или затухание сигнала, должна быть по крайней мере 2,5. Для обеспечения повторяемости результатов разделение производят при постоянной температуре (± 0,5 °С).

Разделение бензо(ghi)перилена и индено(1,2,3-cd)пирена можно улучшить оптимизацией температуры колонки.

Максимальный объем инжекции зависит от внутреннего диаметра хроматографической колонки. Объем инжекции выбирают так, чтобы степень расширения сигнала была минимальной (типичная инжекция 10 мкл для колонки с внутренним диаметром 3 мм).

Для разделения шести ПАУ, указанных в руководстве ЕС для питьевой воды, можно использовать изократический режим элюирования (рисунок А.3).

8.5.3 Детектирование

Для детектирования применяют флуоресцентный детектор, выбирают длины волн возбуждения и испускания, обеспечивающие соответствующие чувствительность и селективность. Типичная программа для длин волн представлена в таблице А.1.

При программировании длины волны следует избегать появления помех нулевой линии. Поэтому изменения в программу вносят тогда, когда величина разрешения между пиками составляет как минимум 2,5 (8.5.2).

Растворенный в элюенте кислород может вызвать уменьшение флуоресцентного сигнала, т. е. изменения концентрации кислорода влияет на воспроизводимость. Содержание кислорода в элюенте должно быть минимальным и постоянным, что достигается дегазацией элюента, например при помощи гелия или вакуума.

Изменение длины волны производят в момент, когда флуоресценция низкая. При высоком сигнале флуоресценции изменение длины волны может привести к смещению нулевой линии. После изменения длины волны повторная настройка нулевой линии влияет на параметры интегрирования и следовательно на результаты количественного анализа. Для обеспечения постоянной высоты пика можно изменить длину волны и ослабление сигнала одновременно. Условия ослабления сигнала являются одними из критериев детектирования, которые не должны изменяться после калибровки. Если ослабление низкое, результирующее увеличение шума не должно привести к ухудшению интегрирования сигнала.

8.5.4 Идентификация индивидуальных соединений

Отсутствие пика на характеристическом для него времени удерживания при нормальной по всем другим аспектам хроматограмме предполагает отсутствие данного соединения в пробе. Если время удерживания соединения на хроматограмме анализируемой пробы совпадает с временем удерживания соединения на хроматограмме стандартного раствора, которая получена при тех же условиях (допустимое значение $\pm$ 1 %, максимум 10 с), то предполагают, что данное соединение в пробе присутствует.

При необходимости результат проверяют одним из следующих методов:

– сравнением спектров возбуждения и испускания соединения в анализируемой пробе с такими же спектрами соединения в стандартном растворе при совпадении времени удерживания при тех же условиях;

– при более высоких концентрациях используется другой детектор, который не является причиной мешающего действия расширения флуоресцентного пика, например фотодиодная матрица, и сравниваются спектры поглощения веществ в анализируемой пробе и в стандартном растворе;

– применяя независимый метод, например газовую хроматографию.

8.6 Калибровка

8.6.1 Общие положения

При оценке достоверности калибровки различают начальную калибровку, стандартную калибровку и стандартный контроль калибровки.

Начальную калибровку выполняют для определения рабочего диапазона концентраций и линейности функции калибровки в соответствии с ИСО 8466-1, например, когда метод ВЭЖХ применяют впервые. В результате устанавливают окончательный рабочий диапазон концентраций и проводят стандартную калибровку. Эту калибровку необходимо повторять после технического обслуживания (например, замены колонки), после ремонта системы ВЭЖХ и в случае, если система не была в эксплуатации в течение длительного времени, а также при несоответствии критериям текущего контроля.

Проверка правильности начальной калибровки проводится с помощью стандартного контроля калибровки в каждой серии анализируемых проб.

8.6.2 Начальная калибровка

Предварительный рабочий диапазон калибровки устанавливают в результате анализа как минимум пяти рабочих стандартных растворов (5.9). Проверку линейности калибровки осуществляют в соответствии с ИСО 8466-1.

8.6.3 Стандартная калибровка

После установления конечного рабочего диапазона калибровки анализируют не менее пяти рабочих стандартных калибровочных смесей (5.9). Рассчитывают функцию калибровки путем анализа линейной регрессии скорректированных площадей пиков. Фактическую чувствительность метода можно оценить по рассчитанной функции регрессии.

8.6.4 Стандартный контроль калибровки

Стандартный контроль проводят для того, чтобы установить, достоверна ли функция калибровки. Для этого анализируют один стандартный раствор после десяти испытуемых проб каждой аналитической серии. Концентрация этого стандартного раствора должна быть в пределах от 40 % до 80 % рабочего диапазона калибровки. Функцию калибровки считают достоверной, если результат не отклоняется

более чем на 10 % от рабочей калибровочной кривой. Если это требование не выполняется, проводят перекалибровку системы в соответствии с 8.6.3.

8.7 Определение

Перед анализом проб систему ВЭЖХ стабилизируют и настраивают программу для длин волн в соответствии с найденными временами удерживания.

Примечание – Воспроизводимые значения времен удерживания обычно получают после двух или трех инжекций стандартного раствора (5.9).

Проводят анализ исследуемой пробы, калибровочных растворов и холостой пробы методом ВЭЖХ.

Пики каждой исследуемой пробы должны быть правильно проинтегрированы, при необходимости делают корректировку.

Если рассчитанная массовая концентрация вещества в испытуемой пробе превышает калибровочный диапазон, пробу разбавляют и повторяют измерение.

8.8 Извлечение

К 1000 мл воды добавляют, например, 2 мл рабочего стандартного раствора, приготовленного в соответствии с 5.9, и далее действуют как приведено в 8.1 – 8.5.

Определение извлечения ПАУ в пробах поверхностных вод проводят по методу стандартных добавок.

Среднее значение извлечения вещества *i*, $\overline{\eta}_i$ определяют по формулам:

$$\eta_{i,N} = \frac{\rho_{i,Ncal}}{\rho_{i,Nsp}}, \tag{2}$$

$$\overline{\eta}_i = \frac{\sum_{N=1}^{n} \eta_{i,N}}{n}, \tag{3}$$

где $\eta_{i,N}$ – извлечение вещества *i* при концентрационном уровне *N*;

$\rho_{i,Ncal}$ – измеренная массовая концентрация вещества *i* при концентрационном уровне *N* и рассчитанная с использованием функции калибровки, мкг/л;

$\rho_{i,Nsp}$ – массовая концентрация добавки вещества *i* при концентрационном уровне *N*, мкг/л;

n – число концентрационных уровней.

Для метода экстракции, приведенного в 8.1 – 8.5, среднее извлечение составляет 95 %. При выполнении этого условия поправочный коэффициент для извлечения η может быть опущен (раздел 9).

8.9 Измерение холостой пробы

Для контроля реактивов и правильности работы прибора регулярно проводят измерения холостых проб, анализируя 1000 мл воды, не содержащей ПАУ, обработанной в соответствии с 8.1 – 8.5.

Если в холостых пробах обнаруживают любое из анализируемых веществ, выявляют причину и устраняют любые источники загрязнения.

9 Расчет результатов

Массовую концентрацию вещества *i*, ρ_i в пробе воды, выраженную в мкг/дм^3, рассчитывают по формуле (4)

$$\rho_i = \frac{(y_i - b_i)V_e}{a_i \cdot V_s \cdot \overline{\eta}_i}, \tag{4}$$

где y_i – измеренная величина сигнала вещества *i*, выраженная, например, как площадь пика;

a_i – угол наклона функции калибровки вещества *i*, так называемый фактор отклика данного вещества, выраженный, например, как площадь пика / (пг/мкл);

b_i – отрезок, отсекаемый функцией калибровки на оси ординат, выраженный, например, как площадь пика;

V_e – объем экстракта, из которого была сделана инжекция, мл;

V_s – объем анализируемой пробы, мл;

$\overline{\eta}_i$ – среднее значение извлечения.

В отчете указывают массовую концентрацию ПАУ, выраженную в мкг/дм^3, с точностью не более двух значащих цифр. Для массовых концентраций < 0,01 мкг/л производят округление до самого близкого к 0,0001 мкг/дм^3 значения. Примеры округления результатов приведены в таблице 2.

10 Прецизионность

Статистические данные, полученные по результатам межлабораторных испытаний, выполненных в Германии в 1996 г., представлены в таблицах 3 и 4.

Таблица 2 – Примеры представления результатов

Измеренное значение, мкг/дм^3	Отчетное значение, мкг/дм^3
13,54	14
1,354	1,4
0,1354	0,14
0,0135	0,014
0,0085	0,009

Таблица 3 – Статистические данные определения ПАУ в сертифицированном стандартном растворе методом ВЭЖХ

Соединение	l	n	o, %	ρ_{exp}, пг/мкл	$\bar{\rho}$, пг/мкл	η, %	s_r, пг/мкл	Повторяемость CV, %	s_R, пг/мкл	Воспроизводимость CV, %
Нафталин	34	136	0	50	49,49	99,0	1,392	2,8	3,391	6,85
Аценафтен	34	136	0	25	24,44	97,8	0,750	3,1	2,227	9,11
Флуорен	34	136	0	40	38,30	95,7	0,952	2,5	3,133	8,18
Фенантрен	32	128	5,88	30	29,35	97,8	0,785	2,7	1,394	4,75
Антрацен	34	136	0	25	24,82	99,3	0,753	3,0	1,712	6,90
Флуорантен	34	136	0	40	39,78	99,4	1,138	2,9	2,486	6,25
Пирен	34	135	0,74	40	39,59	99,0	1,194	3,0	3,061	7,73
Бензо(а) антрацен	34	135	0,74	10	9,76	97,6	0,349	3,6	0,910	9,33
Хризен	33	132	2,94	20	19,77	98,9	0,635	3,2	1,241	6,27
Бензо(b) флуорантен	34	135	0,74	25	24,41	97,6	0,577	2,4	1,168	4,79
Бензо(k) флуорантен	34	136	0	10	9,57	95,7	0,187	2,0	0,734	7,67
Бензо(а) пирен	34	136	0	20	18,74	93,7	0,523	2,8	1,227	6,49
Дибензо(ah) антрацен	33	132	2,94	40	38,41	96,0	0,889	2,3	2,042	5,32
Бензо(ghi) перилен	34	136	0	25	23,74	95,0	0,811	3,4	1,749	7,32
Индено (1,2,3-cd) пирен	34	136	0	25	24,37	97,5	1,210	5,0	2,278	9,35

l – число лабораторий после исключения выпавших результатов;
n – число результатов после исключения выпавших результатов;
o – выпавшие результаты;
ρ_{exp} – ожидаемое значение;
$\bar{\rho}$ – общее среднее значение всех результатов после исключения выпавших результатов;
η – извлечение;
s_r – стандартное отклонение повторяемости;
s_R – стандартное отклонение воспроизводимости;
CV – коэффициент вариации.

Таблица 4 – Статистические данные для питьевой воды с добавками низких концентраций ПАУ

Соединение	l	n	o, %	ρ_{exp}, нг/л	$\overline{\rho}$, нг/л	η^a, %	s_r, нг/л	Повторяемость CV %	s_R, нг/л	Воспроизводимость CV, %
Нафталин	33	128	3,03	60	52,85	88,1	7,412	14,0	15,50	29,33
Аценафтен	33	126	3,82	30	24,64	82,1	2,264	9,2	5,289	21,47
Флуорен	33	128	3,03	48	40,81	85,0	4,139	10,1	8,771	21,49
Фенантрен	31	119	8,46	36	38,95	108	3,522	9,0	7,504	19,26
Антрацен	33	124	0	30	26,84	89,5	1,887	7,0	4,474	16,67
Флуорантен	30	117	10,0	48	46,48	96,8	2,189	4,7	4,225	9,09
Пирен	33	127	0	48	45,44	94,7	3,954	8,7	7,186	15,81
Бензо(a) антрацен	32	124	3,13	12	11,54	96,1	1,095	9,5	2,810	24,35
Хризен	32	122	6,15	24	22,20	92,5	2,069	9,3	3,743	16,86
Бензо(b) флуорантен	33	126	3,08	30	27,41	91,3	2,450	8,9	4,719	17,22
Бензо(k) флуорантен	32	123	3,15	12	10,87	90,6	1,148	10,6	2,382	21,91
Бензо(a) пирен	33	126	3,08	24	20,43	85,1	1,912	9,4	4,170	20,42
Дибензо(ah) антрацен	32	121	6,92	48	39,53	82,3	3,139	7,9	6,952	17,59
Бензо(ghi) перилен	32	122	6,15	30	25,21	84,0	2,765	11,0	5,941	23,57
Индено (1,2,3-cd) пирен	29	111	12,0	30	26,31	87,7	2,675	10,2	4,417	17,93

Определения символов приведены в таблице 3.

[a] Приведенные в данной таблице значения извлечения являются средними значениями извлечения на этапе экстракции для всех лабораторий, так как при оценке отдельных результатов поправка с учетом $\overline{\eta}_i$ не учитывалась.

11 Отчет об испытаниях

Отчет об испытаниях должен включать следующее:

a) ссылку на настоящий стандарт;

b) детальную информацию, необходимую для полной идентификации пробы;

c) информацию, касающуюся отбора и хранения анализируемых проб;

d) массовую концентрацию всех определяемых ПАУ, рассчитанную и выраженную в соответствии с разделом 9;

e) все проводимые операции, не включенные в настоящий стандарт, которые могут повлиять на конечный результат.

Приложение А
(справочное)

Примеры хроматографических условий и колонок

Два примера (А и Б) хроматографических условий ВЭЖХ, программа градиентного элюирования и колонки, позволяющие разделять 16 ПАУ, приведены на рисунках А.1 и А.2. Типичные хроматограммы, полученные при этих условиях, также приведены на рисунках А.1 и А.2. Программируемые длины волн, используемые в этих хроматографических условиях и хроматограммах А и Б, представлены в таблице А.1.

Третий пример хроматографических условий ВЭЖХ, условий работы детектора и колонок, при которых могут разделяться ПАУ, находящиеся в питьевой воде, а также типичная хроматограмма приведены на рисунке А.3. Для этого разделения использован изократический режим.

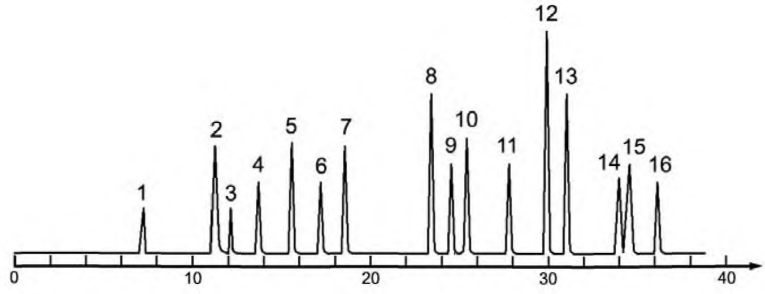
Таблица А.1 – Программируемые длины волны для хроматограмм А и Б

Соединение		Длина волны, нм	
		Возбуждение	Испускание
1	Нафталин	275	350
2	Флуорен		
3	Аценафтен		
4	Фенантрен		
5	Антрацен	260	420
6	Флуорантен	270	440
7	Пирен		
8	Бензо(а)антрацен	260	420
9	Хризен		
10	6-метилхризен[a]		
11	Бензо(b)флуорантен	290	430
12	Бензо(k)флуорантен		
13	Бензо(а)пирен		
14	Бензо(ah)антрацен		
15	Бензо(ghi)перилен		
16	Индено(1,2,3-cd)пирен	250	500

Инструмент ВЭЖХ: HEWLETT-PACKARD HP 1046 FLD, щелевой; возбуждение: 12,5 нм; испускание: 25 нм.

Примечание – Инструмент HP 1046 FLD приведен в качестве примера подходящей и коммерчески доступной системы ВЭЖХ с флуоресцентным детектором. Эта информация предоставляется для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением ИСО качества данной продукции.

[a] Дополнительный компонент.



а) t, мин

Идентификация пиков

1 – нафталин;
2 – аценафтен;
3 – флуорен;
4 – фенантрен;
5 – антрацен;
6 – флуорантен;
7 – пирен;
8 – бензо(а) антрацен;
9 – хризен;
10 – 6-метилхризен;
11 – бензо(b)флуорантен;
12 – бензо(k)флуорантен;
13 – бензо(а)пирен;
14 – дибензо(ah)антрацен;
15 – бензо(ghi)перилен;
16 – индено(1,2,3-cd)пирен

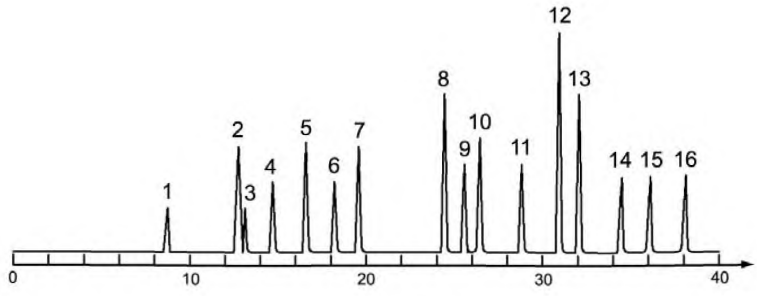
Операционные условия

Инжекция: 5 мкл калибровочного раствора с ρ_i = 100 пг/мкл.
Колонка: «Bakerbond PAH 16 plus» длиной 250 мм и диаметром 3 мм.
Скорость потока растворителя: 0,5 мл/мин.
Температура: 25 °С.
Программа градиентного элюирования:

Время (мин):	0	5	35	45
Соотношение объемов:	50:50	50:50	100:00	100:00
Градиент:	Начальные условия	Изократический	Линейный	Изократический
Элюент:	Ацетонитрил/вода			

Примечание – Колонка «Bakerboard PAH 16 plus» приведена в качестве примера подходящего и коммерчески доступного материала. Эта информация предоставляется для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением ИСО качества данной продукции.

Рисунок А.1 – Хроматограмма А



а) *t*, мин

Идентификация пиков

1 – нафталин;
2 – аценафтен;
3 – флуорен;
4 – фенантрен;
5 – антрацен;
6 – флуорантен;
7 – пирен;
8 – бензо(а)антрацен;
9 – хризен;
10 – 6-метилхризен;
11 – бензо(b)флуорантен;
12 – бензо(k)флуорантен;
13 – бензо(а)пирен;
14 – дибензо(ah)антрацен;
15 – бензо(ghi)перилен;
16 – индено(1,2,3-cd)пирен

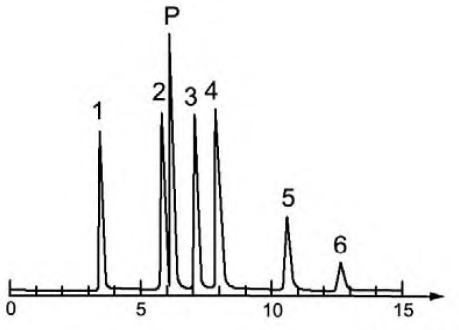
Операционные условия

Инжекция: 5 мкл калибровочного раствора с ρ_i = 100 пг/мкл.
Колонка: «Nucleosil 5 C18 PAH» длиной 250 мм и диаметром 3 мм.
Скорость потока растворителя: 0,5 мл/мин.
Температура: 25 °С.
Программа градиентного элюирования:

Время (мин):	0	35	45
Соотношение объемов:	60:40	100:00	100:00
Градиент:	Начальные условия	Линейный	Изократический
Элюент:	Ацетонитрил/вода		

Примечание – Колонка «Nucleosil 5 C18 PAH» приведена в качестве примера подходящего и коммерчески доступного материала. Эта информация предоставляется для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением ИСО качества данной продукции.

Рисунок А.2 – Хроматограмма Б



а) *t*, мин

Идентификация пиков
1 – флуорантен;
2 – бензо(b)флуорантен;
3 – бензо(k)флуорантен;
4 – бензо(a)пирен;
5 – бензо(ghi)перилен;
6 – индено(1,2,3-cd)пирен;
7 – перилен

Операционные условия
Инжекция: 5 мкл калибровочного раствора с ρ_i = 100 пг/мкл.
Колонка: «Bakerbond PAH 16 plus» длиной 250 мм и диаметром 3 мм.
Скорость потока растворителя: 0,5 мл/мин.
Температура: 20 °C.
Изократическая программа: соотношение объемов: 50:50.
Элюент: ацетонитрил/вода.
Детектирование: длина волны возбуждения: 365 нм, щель 25 нм;
длина волны испускания: 470 нм, щель 50 нм.

Примечание – Колонка «Bakerboard PAH 16 plus» приведена в качестве примера подходящего и коммерчески доступного материала. Эта информация предоставляется для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением ИСО качества данной продукции.

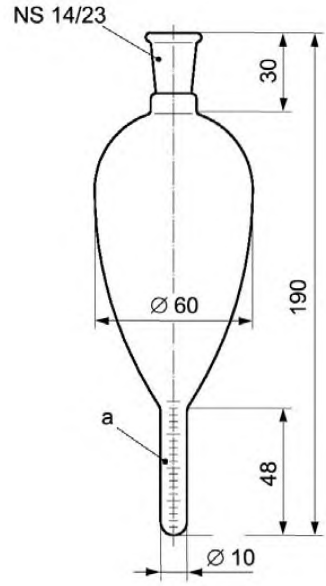
Рисунок А.3 – Хроматограмма С разделения ПАУ, обнаруженных в питьевой воде

Приложение В
(справочное)

Примеры конструкции специального оборудования

Примеры конструкции специального оборудования приведены на рисунках В.1 – В.3.

Размеры в миллиметрах



[a] Общий градуированный объем 2 мл с ценой деления 0,1 мл.

Рисунок В.1 – Колба для концентрирования

Размеры в миллиметрах

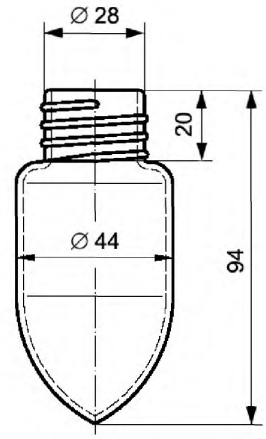
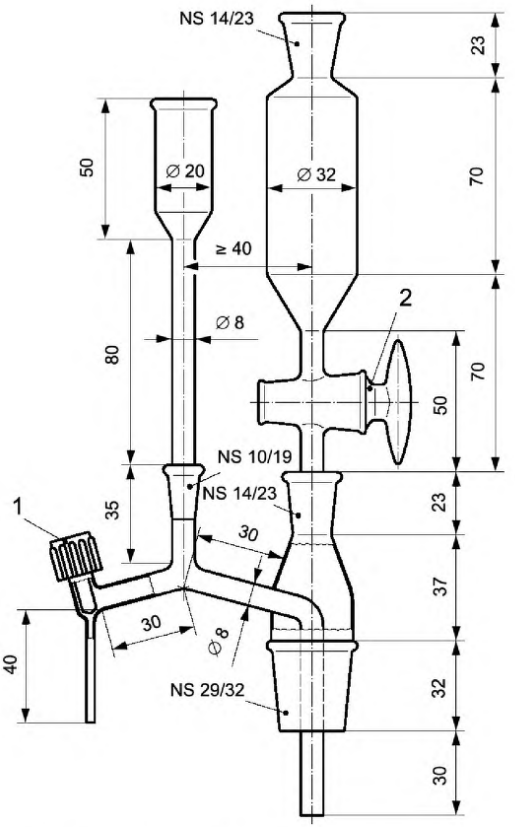


Рисунок В.2 – Центрифужная пробирка с коническим дном и закручивающейся крышкой

Размеры в миллиметрах



1 – винтовой кран из политетрафторэтилена (ПТФЭ);
2 – запорный кран из политетрафторэтилена (ПТФЭ)

Рисунок В.3 – Микросепаратор

Ответственный за выпуск *В.Л. Гуревич*

Сдано в набор 04.11.2005 Подписано в печать 26.12.2005 Формат бумаги 60×84/8. Бумага офсетная.
Печать ризографическая Усл. печ. л. 2,79 Уч.-изд. л. 1,10 Тираж экз. Заказ

Издатель и полиграфическое исполнение:
НП РУП "Белорусский государственный институт стандартизации и сертификации (БелГИСС)"
Лицензия № 02330/0133084 от 30.04.2004

БелГИСС, 220113, г. Минск, ул. Мележа, 3

gost.e-ecolog.ru