

УТВЕРЖДАЮ



Заместитель директора ФГУП «ВНИИМС»  
по производственной метрологии

\_\_\_\_\_ Н.В. Иванникова

\_\_\_\_\_ 2018 г.

**Системы капиллярного электрофореза РА 800 Plus**  
Методика поверки  
МП 009-15-18

г. Москва, 2018 г.

Настоящая методика распространяется на Системы капиллярного электрофореза PA 800 Plus (далее – системы капиллярного электрофореза) фирмы SCIEX LLC, США, и устанавливает методику их первичной и периодической поверки.

Интервал между поверками – 1 год.

## 1 ОПЕРАЦИИ ПОВЕРКИ

1.1 При проведении поверки выполняют операции, указанные в таблице 1.

Таблица 1

| Наименование операции  | Номер пункта методики | Проведение операции при |                       |
|--|-----------------------|-------------------------|-----------------------|
|  |                       | первичной поверке       | периодической поверке |
| 1 Внешний осмотр   | 7.1                   | да                      | да                    |
| 2 Опробование  | 7.2                   | да                      | да                    |
| 2.1 Определение отношения сигнал/шум   | 7.2.1                 | да                      | нет                   |
| 2.2 Определение предела детектирования   | 7.2.2                 | да                      | да                    |
| 2.3 Определение отношения сигнал/шум (s/n) флуоресцентного детектора с лазерным возбуждением         | 7.2.3                 | да                      | да                    |
| 2.4 Проверка идентификационных данных ПО   | 7.2.4                 | да                      | да                    |
| 3 Определение метрологических характеристик:   | 7.3                   |                         |                       |
| - определение относительного среднего квадратического отклонения выходного сигнала (по площади пика) | 7.3.1                 | да                      | да                    |
| - определение относительного изменения выходного сигнала (по площади пика) за 8 часов работы         | 7.3.3                 | да                      | да                    |

## 2 СРЕДСТВА ПОВЕРКИ

2.1 При проведении поверки применяют основные средства поверки:

– ГСО 5504-90 удельной энергии сгорания (бензойная кислота К-3), молярная доля 99,990 %;

– ГСО 6687-93/6689-93 состава водных растворов хлорид-ионов 1 г/дм<sup>3</sup>;

– весы лабораторные по ГОСТ OIML R 76-1-2011, класс точности – I;

– рН-метр, диапазон рН от 1,00 до 12,00, погрешность ± 0,05;

– картридж OPCAL.

2.2 Допускается применение других средств измерений, оборудования, реактивов с техническими и метрологическими характеристиками не хуже указанных.

Все используемые средства измерений должны иметь действующие свидетельства о поверке.

### **3. ТРЕБОВАНИЯ К КВАЛИФИКАЦИИ ПОВЕРИТЕЛЕЙ**

К проведению поверки систем капиллярного электрофореза допускаются лица, изучившие эксплуатационные документы на них, имеющие достаточные знания и опыт работы с ними и аттестованные в качестве поверителя.

### **4 ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ**

4.1 Требования безопасности должны соответствовать рекомендациям, изложенным в руководстве по эксплуатации на прибор.

4.2 При выполнении поверки соблюдают правила техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007-76, требования электробезопасности по ГОСТ 12.1.019-79 и пожаробезопасности по ГОСТ 12.1.004-91.

### **5 УСЛОВИЯ ПОВЕРКИ**

При проведении поверки в лаборатории должны соблюдаться следующие нормальные условия измерений:

- температура окружающей среды, °С .....20±5
- относительная влажность воздуха, %, не более .....80
- напряжение переменного тока, В.....220 ± 22
- содержание вредных веществ в воздухе в месте проведения поверки не должно превышать предельно допустимых концентраций по ГОСТ 12.1.005-88.

### **6 ПОДГОТОВКА К ПОВЕРКЕ**

6.1 Подготавливают прибор к работе в соответствии с требованиями руководства по эксплуатации.

6.2 Готовят контрольные растворы бензойной кислоты и тетраборатного буферного раствора для систем с положительной полярностью источника высокого напряжения; хлорид-ионов и хроматного буферного раствора для систем с отрицательной полярностью источника высокого напряжения в соответствии с Приложением А.

### **7 ПРОВЕДЕНИЕ ПОВЕРКИ**

При эксплуатации СИ в режиме использования одного или нескольких детекторов в ограниченном диапазоне измерений, в соответствии с приказом Минпромторга РФ № 1815 от 02.07.2015, допускается проведение периодической поверки только используемых детекторов в рабочем диапазоне значений с обязательным указанием в свидетельстве о поверке информации об объеме проведенной поверки.

#### **7.1 Внешний осмотр**

При внешнем осмотре устанавливают:

- соответствие комплектности системы капиллярного электрофореза требованиям

технической документации;

– четкость маркировки;

– исправность механизмов и крепежных деталей.

Не допускаются дефекты, которые могут повлиять на работоспособность прибора.

## 7.2 Опробование

Уровень флуктуационных шумов и дрейф нулевого сигнала определяют после выхода системы РА 800 Plus на режим. Данная процедура проводится для фотометрических детекторов – детектора с диодной матрицей (PDA детектора), детектора с переключаемой длиной волны (UV детектора).

7.2.1 Уровень флуктуационных шумов, дрейф нулевого сигнала фотометрических детекторов определяют, используя картридж OPCAL с апертурой 100 x 800 мкм. Устанавливают длину волны 214 нм.

Уровень флуктуационных шумов нулевого сигнала ( $\Delta X$ ) измеряют после выхода прибора на режим в течение 30 мин и принимают равным амплитуде (h) повторяющихся колебаний нулевого сигнала с периодом не более 20 секунд. Используются встроенные в 32 Karat методы и обрабатывают при помощи системы обработки данных 32 Karat.

Значения дрейфа нулевого сигнала (D) принимают равным смещению нулевого сигнала в течение 10 минут.

Значения уровня флуктуационных шумов и дрейфа нулевого сигнала фотометрических детекторов с переключаемой длиной волны не должны превышать следующих значений:  $5 \cdot 10^{-5}$  е.о.п. для шума и  $1 \cdot 10^{-3}$  е.о.п./10 мин для дрейфа соответственно (спецификация Руководства пользователя).

В программе 32 Karat приведены встроенные методы и алгоритмы, применяемые для обсчета шума/дрейфа.

### 7.2.2 Определение предела детектирования

В зависимости от полярности источника напряжения системы измерения проводят с использованием различных буферных растворов и рабочих веществ:

- бензойной кислоты и боратного буферного раствора для систем с положительной полярностью источника высокого напряжения;

- хлорид-ионов и хроматного буферного раствора для систем с отрицательной полярностью источника высокого напряжения.

Перед измерением все растворы фильтруют через целлюлозно-ацетатные фильтры и/или дегазируют центрифугированием (*скорость вращения - 5000 об/мин, время 10 мин*).

Перед началом проведения измерений промывают капилляр согласно Приложению Б.

Рекомендуется перед началом проведения поверки получить пробную электрофореграмму, по которой можно определить время миграции пика рабочего вещества.

В зависимости от выбранной полярности источника высокого напряжения регистрируют пробную электрофореграмму раствора № 3 бензойной кислоты (п.А.3.6) в условиях согласно (табл.2) или раствора № 2 хлорид-ионов (п.А.4.5) в условиях согласно (табл.3).

Время миграции ( $T_{\text{миг}}$ , мин) пика бензойной кислоты не должно превышать 10 мин, пика хлорид-ионов 5 мин. При невыполнении этих условий промывку капилляра продолжают.

После регистрации пробной электрофореграммы промывают капилляр в соответствии с Приложением Б и переходят к п.7.2.2.1 в случае положительной полярности источника напряжения системы капиллярного электрофореза или к п.7.2.2.2 в случае отрицательной полярности источника напряжения системы.

7.2.2.1 Выполнение измерений при положительной полярности источника высоко-

кого напряжения (рис.1) и ниже.

Initial Conditions | PDA Detector Initial Conditions | Time Program

|   | Time (min) | Event              | Value    | Duration | Inlet vial | Outlet vial | Summary  | Comments                                      |
|---|------------|--------------------|----------|----------|------------|-------------|--|---|
| 1 |            | Rinse - Pressure   | 20.0 psi | 2.00 min | BI:D1      | BO:D1       | forward, In / Out vial inc 16                        | Rinse with Borate Separation Buffer           |
| 2 |            | Inject - Pressure  | 0.5 psi  | 10.0 sec | SI:A1      | BO:C1       | Override, forward                                    | Sample hydrodynamically injection by Pressure |
| 3 | 0.00       | Separate - Voltage | 30.0 KV  | 6.50 min | BI:E1      | BO:B1       | 1.00 Min ramp, normal polarity, In / Out vial inc 16 | Separation process                            |
| 4 | 2.00       | Autozero           |          |          |            |             |  |   |
| 5 | 6.50       | End                |          |          |            |             |  |   |

Рис. 1 - Рекомендуемый метод при положительной полярности в программе 32 Karat

Рекомендуемая программа метода при положительной полярности:

- 2 минуты промывки буферным раствором по п.А.3.4 при 20 psi;
- 10 сек. вкол раствора бензойной кислоты при 0,5 psi;
- 6,5 минут буферным раствором по п.А.3.4 выдержать напряжение 30 кВ
- на 2 минуте применить обнуление сигнала детектора

Если пик не успевает появиться на электрофореграмме, то допускается увеличить время выдержки напряжением с 6.5 до 10 минут.

В соответствии с Руководством по эксплуатации системы регистрируют по пять электрофореграмм поверочного раствора бензойной кислоты № 3, приготовленного по п.А.3.7 в условиях, указанных в таблице 2.

После регистрации каждой электрофореграммы капилляр промывают по п.Б.3.

Таблица 2. Условия проведения измерений при положительной полярности источника высокого напряжения

|                          |  |
|--------------------------|--|
| Рабочее вещество         | Бензойная кислота  |
| капилляр                 | Кварцевый, непокрытый, внутренний диаметр 75 мкм, общая длина 60 см, эффективная длина 50 см |
| Оптическая апертура, мкм | 100 x 800  |
| Длина волны, нм          | 200  |
| Сигнал абсорбции         | Прямой(direct)   |
| Температура, °С          | 25   |
| Ввод пробы               | Давление 35,5 мбар (0,5psi), время 10 с  |
| Напряжение, кВ           | 30   |
| Ведущий электролит       | Буферный раствор по п.А.3.4  |
| Время анализа, мин       | T <sub>миг</sub> + 1   |

Затем переходят к обработке результатов.

7.2.2.2 Выполнение измерений при отрицательной полярности источника высокого напряжения (рис.2.1) и ниже.

Initial Conditions | PDA Detector Initial Conditions | Time Program

|    | Time (min) | Event              | Value    | Duration | Inlet vial | Outlet vial | Summary                           | Comments                                      |
|----|------------|--------------------|----------|----------|------------|-------------|-----------------------------------|---|
| 1  |            | Rinse - Pressure   | 20.0 psi | 1.00 min | BI:A1      | BO:A1       | forward, In / Out vial inc 10     | Rinse with Regenerator: 0.1N NaOH             |
| 2  |            | Rinse - Pressure   | 20.0 psi | 2.00 min | BI:D1      | BO:D1       | forward, In / Out vial inc 10     | Rinse with Chromate-CTAB Separation Buffer    |
| 3  |            | Inject - Pressure  | 0.8 psi  | 12.0 sec | SI:A1      | BO:C1       | Override, forward                 | Sample hydrodynamically injection by Pressure |
| 4  |            | Wait               |          | 0.00 min | BI:F1      | BO:C1       | In / Out vial inc 10              |   |
| 5  |            | Inject - Pressure  | 0.1 psi  | 10.0 sec | BI:C1      | BO:C1       | No override, forward, In / Out vi | Protective Post-Injection with Water          |
| 6  | 0.00       | Separate - Voltage | 20.0 KV  | 4.00 min | BI:E1      | BO:B1       | 1.00 Min ramp, reverse polarity,  | Separation process                            |
| 7  | 1.50       | Autozero           |          |          |            |             |                                   |   |
| 8  | 4.00       | Stop data          |          |          |            |             |                                   |   |
| 9  | 4.00       | Rinse - Pressure   | 20.0 psi | 1.00 min | BI:B1      | BO:A1       | forward, In / Out vial inc 10     | Rinse with Water                              |
| 10 | 5.00       | End                |          |          |            |             |                                   |   |

Рис. 2.1 - Рекомендуемый метод при отрицательной полярности в программе 32 Karat

Рекомендуемая программа метода при отрицательной полярности:

- 1 минута промывки раствором гидроксида натрия по п.А.2.1 при 20 psi;
- 2 минуты промывки буферным раствором по п.А.4.3 при 20 psi;
- 12 сек. вкол раствора хлорид-ионов при 0,8 psi;
- 10 сек. вкол дистиллированной воды при 0,1 psi;
- 4 минуты буферным раствором по п.А.4.3 выдержать напряжение 20 Кв (обратная полярность)
- после сбора данных 1 минуту промыть дистиллированной водой при 20 psi;
- на 1,5 минуте применить обнуление сигнала детектора

Если пик не успевает появиться на электрофореграмме, то допускается увеличить время выдержки напряжением с 4 до 5 минут.

В соответствии с Руководством по эксплуатации системы регистрируют по пять электрофореграмм поверочного раствора хлорид-ионов № 2, приготовленного по п.А.4.5 в условиях, указанных в таблице 3.

После регистрации каждой электрофореграммы капилляр промывают по п.Б.3.

Таблица 3. Условия проведения измерений при отрицательной полярности источника высокого напряжения

| Рабочее вещество         | Хлорид-ионы  |
|--------------------------|--|
| капилляр                 | Кварцевый, непокрытый, внутренний диаметр 75 мкм, общая длина 60 см, эффективная длина 50 см |
| Оптическая апертура, мкм | 100 x 800  |
| Длина волны, нм          | 254  |
| Сигнал абсорбции         | Обратный(indirect)   |
| Температура, °С          | 25   |
| Ввод пробы               | Давление 55,5 мбар (0,8psi), время 12 с  |
| Напряжение, кВ           | 20   |
| Ведущий электролит       | Буферный раствор по п.А.4.3  |
| Время анализа, мин       | $T_{\text{миг}} + 1$   |

Затем переходят к обработке результатов.

#### 7.2.2.3 Обработка результатов

На полученных электрофореграммах проверяют правильность автоматической разметки пиков рабочих веществ и, если необходимо, корректируют её.

Используя программное обеспечение, находят:

- высоту пика  $H_i$  рабочего вещества;
- максимальное значение уровня флуктуации шумов нулевого сигнала  $H_{\text{шум}}$  на участке с минимальным количеством выбросов; этот участок должен быть не менее 30 с для хлорид-ионов и не менее 60 с для бензойной кислоты (см. рис.2.2).

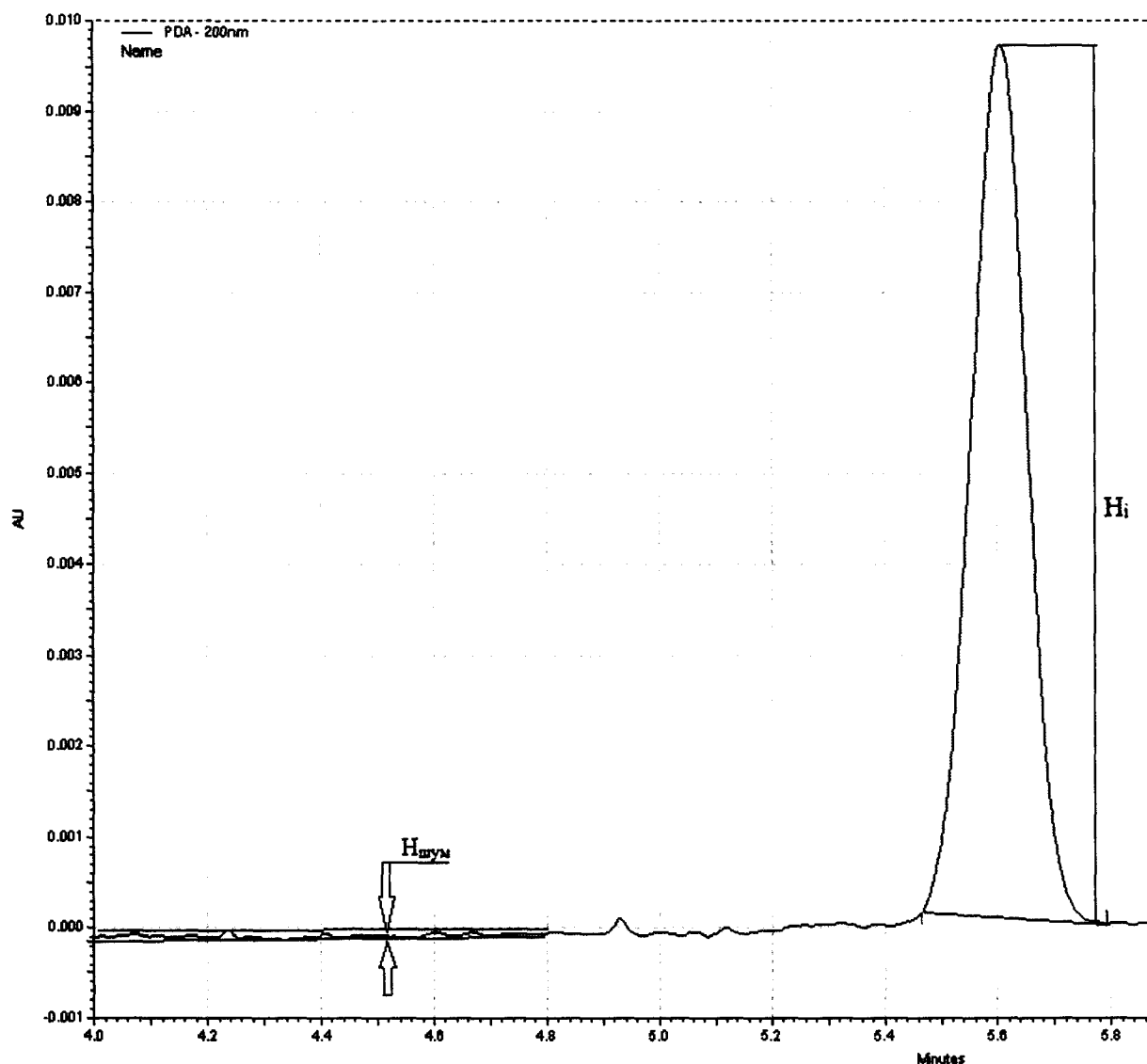


Рис.2.2 Пример определения высоты пика и уровня флуктуации шума  $H_i$  - высота пика, отсчитываемая от линии нулевого сигнала;  $H_{шум}$  - уровень флуктуационных шумов нулевого сигнала.

*Примечание:* Кратковременные изменения выходного сигнала, имеющие характер одиночных импульсов, при оценке уровня флуктуационных шумов нулевого сигнала не учитываются.

Для каждой электрофореграммы вычисляют предел детектирования ( $C_{min,i}$ , мкг/см<sup>3</sup>) по формуле:

$$C_{min,i} = \frac{2 \cdot H_{шум} \cdot C}{H_i} \quad (1)$$

где  $H_{шум}$  - уровень флуктуационных шумов нулевого сигнала на  $i$ -ой электрофореграмме ( $i = 1, \dots, 5$ );

$H_i$  - высота пика бензойной кислоты (или хлорид-ионов), отсчитываемая от линии нулевого сигнала на  $i$ -ой электрофореграмме  $i = 1, \dots, 5$ ;

$C$  - массовая концентрация раствора бензойной кислоты (или хлорид-ионов), мкг/см<sup>3</sup>.

За предел детектирования бензойной кислоты (или хлорид-ионов) ( $C_{min}$ , мкг/см<sup>3</sup>) принимают наибольшее из значений.

7.2.2.4 При получении значений пределов детектирования:

- бензойной кислоты (при положительной полярности высоковольтного блока) при отношении сигнал/шум 3:1, не более  $0,5 \text{ мкг/см}^3$ ,
  - хлорид-ионов (при отрицательной полярности высоковольтного блока) при отношении сигнал/шум 3:1, не более  $1,0 \text{ мкг/см}^3$ ,
- система капиллярного электрофореза считается прошедшей поверку.

7.2.3 Определение отношения сигнал/шум флуоресцентного детектора с лазерным возбуждением (LIF детектора) проводят с использованием контрольного вещества и при условиях, указанных в таблице 4:

Таблица 4

|                          |  |
|--------------------------|--|
| Рабочее вещество         | Флуоресцеин натрия в воде  |
| Капилляр                 | Кварцевый, непокрытый, внутренний диаметр 75 мкм, общая длина 60 см, эффективная длина 50 см |
| Оптическая апертура, мкм | 100 x 800  |
| Длина волны/фильтры, нм  | 488 - возбуждения, 520 - излучения   |
| Сигнал абсорбции         | Прямой(direct)   |
| Температура, °С          | 25   |
| Ввод пробы               | Давление 35,5 мбар (0,5psi), время 5 с   |
| Напряжение, кВ           | 30   |
| Ведущий электролит       | Буферный раствор по п.А.3.4  |
| Время анализа, мин       | $T_{\text{миг}} + 1$   |

Перед проведением испытания, рекомендуется провести автоматическую калибровку LIF детектора в меню конфигурации системы (рис. 3)

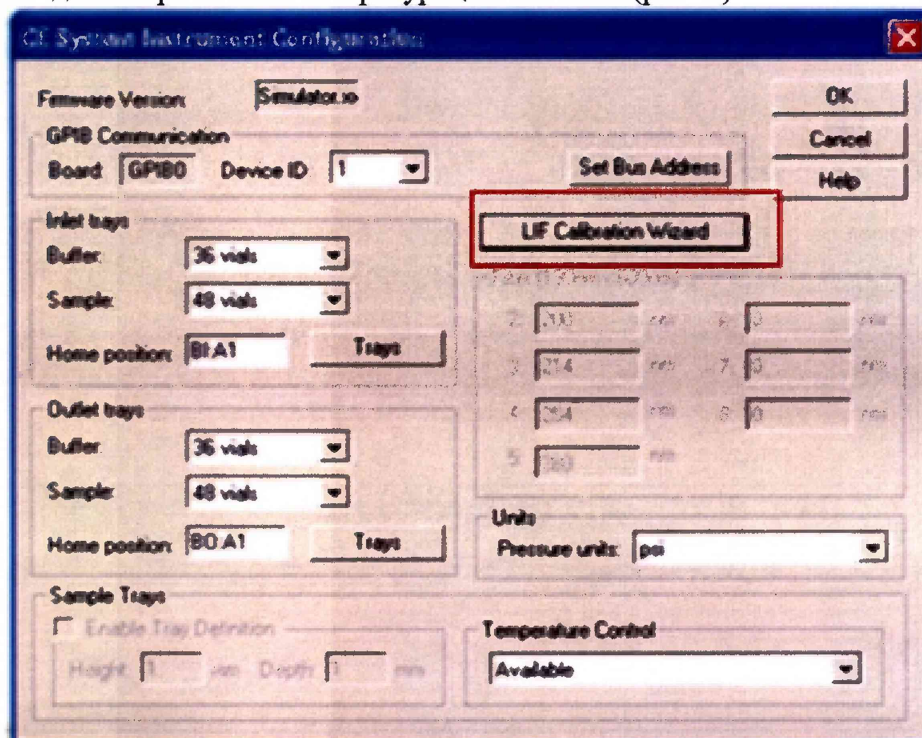


Рис. 3 Красным цветом выделена кнопка калибровки LIF-детектора.

После этого регистрируют электрофореграмму раствора флуоресцеина натрия №3, приготовленного по п.А.5.3 в условиях, указанных в таблице 4.

После регистрации электрофореграммы капилляр промывают по п.Б.3.

Затем переходят к обработке результатов.



В программе 32 Karat есть встроенные метод и алгоритм, которые можно применить для расчета значения s/n.

Полученное значение s/n должно быть не менее 10000:1.

7.2.4 Проверка идентификационных данных программного обеспечения системы капиллярного электрофореза.

7.2.4.1 Наименование программного обеспечения: 32 Karat

Номер версии (идентификационный номер) программного обеспечения: 10.1.

Номер версии ПО определяют следующим образом - в главном окне программы в командной строке выбрать **Help**. В открывшемся окне щелкнуть мышью по строке **About 32Karat Software**, в результате откроется окно, в котором приведены идентификационное название ПО и номер версии. Копия экрана с окном приведена на рисунке 4.

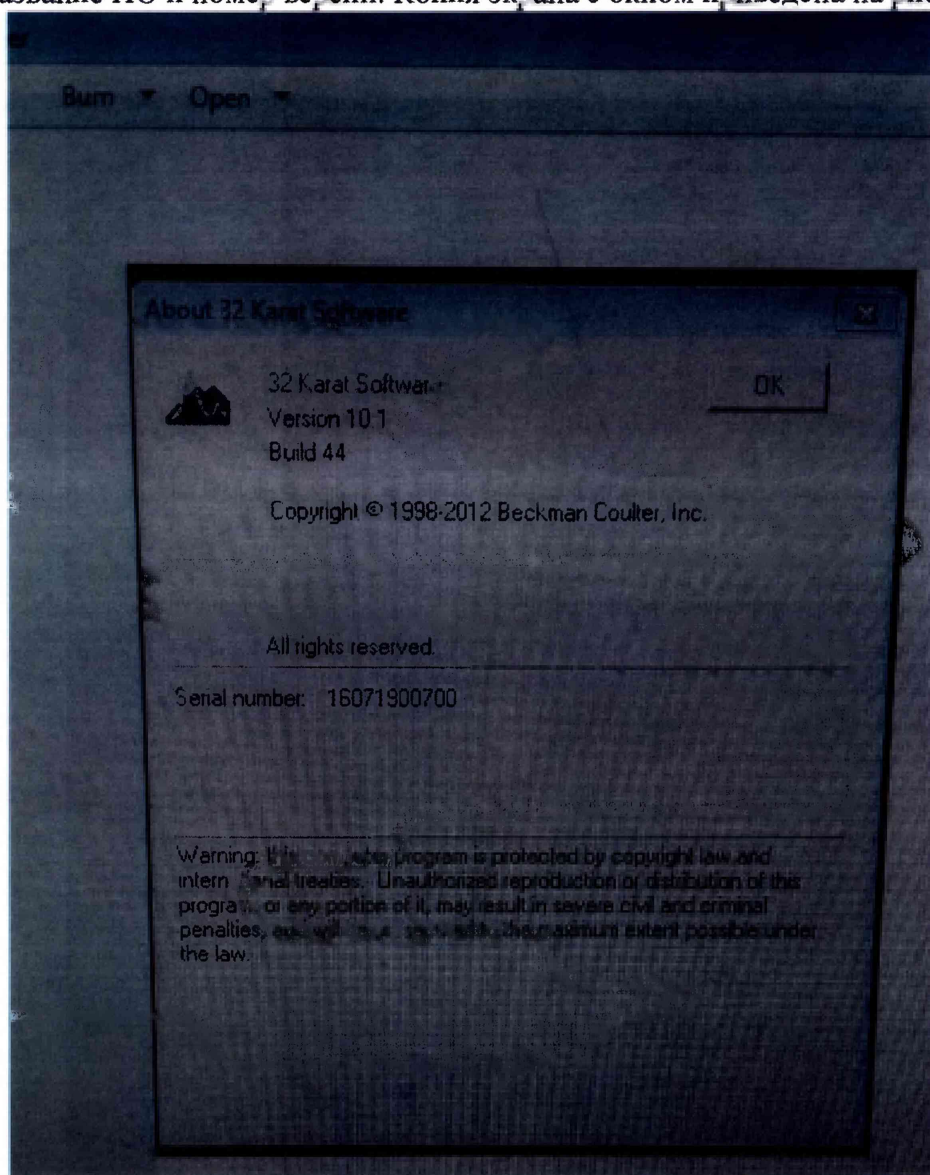


Рис.4 Окно с названием и номером версии ПО

7.2.4.2 Проверка контрольной суммы файла **CSMain.exe** осуществляется по алгоритму MD5.

Для расчета контрольной суммы используется программа HashTab версии 6.0.

При использовании программы HashTab порядок действий следующий:

- в папке, в которой находятся файлы программы 32 Karat, найти файл **CSMain.exe** и установить на него курсор;

- нажать правую кнопку мыши и выбрать пункт «свойства»;
- в открывшемся окне выбрать закладку «File Hashes», в которой выбрать строку MD5;
- из указанной строки считать значение хеш-суммы (цифрового идентификатора ПО).

Совпадение идентификационных данных запущенного ПО с данными, приведенными в таблице 5 является положительным результатом проверки идентификационных данных ПО.

Таблица 5 - Идентификационные данные программного обеспечения

|   |                                      |              |
|---|--------------------------------------|--------------|
| Идентификационное наименование ПО         | 32 Karat                             | 32 Karat     |
| Номер версии (идентификационный номер) ПО | 10.1                                 | Не ниже 10.X |
| Цифровой идентификатор ПО                 | 17743FF80361BFD1F<br>037D14DF66058B9 | -            |
| Алгоритм вычисления идентификатора ПО     | MD5                                  | MD5          |

### 7.3 Определение метрологических характеристик

7.3.1 Определение относительного среднего квадратического отклонения выходных сигналов (по площади пика)

Измерения проводят после выхода прибора на режим. Условия выполнения измерений для фотометрических детекторов должны соответствовать приведенным в п.7.2.2.1-7.2.2.2, для LIF детектора – приведенным в таблице 4.

Для проверки относительного среднего квадратического отклонения выходного сигнала ГМ или PDA детекторов используют электрофореграммы раствора бензойной кислоты, зарегистрированные по 7.2.2.1.

Для LIF детектора регистрируют пять раз электрофореграмму аттестованного раствора флуоресцеина натрия №3, приготовленного по п.А.5.3 в условиях, указанных в таблице 4. На полученных электрофореграммах проверяют правильность автоматической разметки пиков и, если необходимо, корректируют её.

При помощи программного обеспечения определяют площадь пика и время миграции контрольного вещества на всех электрофореграммах этого раствора.

Измеряют значения выходных сигналов  $x_i$  (времени миграции или площади пика) и вычисляют среднее арифметическое выходных сигналов ( $\bar{X}$ ) и относительное СКО:

$$\sigma = \frac{100}{\bar{X}} \sqrt{\frac{\sum_i (x_i - \bar{X})^2}{n-1}}, \quad (2)$$

где  $\sigma$  – относительное среднее квадратическое отклонение выходного сигнала, %;

$x_i$  –  $i$ -ое значение выходного сигнала (времени миграции или площади пика);

$\bar{X}$  – среднее значение выходного сигнала;

$n$  – число измерений.

7.3.2 Значения относительного среднего квадратического отклонения выходных сигналов по детекторам не должны превышать:

- по времени миграции 2 %,
- по площади пика 3 %.

7.3.3 Определение допустимого относительного изменения выходного сигнала по площади пика за 8 часов работы

Условия измерения аналогичны описанным в п.7.2.2.1-7.2.2.2. Проводят операции по 7.3.1. Через 8 часов непрерывной работы повторяют измерения по 7.3.1.

Относительное изменение выходного сигнала за 8 часов непрерывной работы рассчитывают по формуле (3):

$$\delta = \frac{|\overline{X}_t - \overline{X}|}{\overline{X}} \cdot 100 \quad (3)$$

7.3.4 Значения относительного изменения выходных сигналов не должны превышать 10 %.

## 8 ОФОРМЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ПОВЕРКИ

8.1 Результаты поверки заносят в протокол (Приложение В).

8.2 Положительные результаты поверки оформляют выдачей свидетельства по форме, установленной приказом Минпромторга РФ № 1815 от 02.07.2015.

8.3 Системы капиллярного электрофореза, не удовлетворяющие требованиям настоящих рекомендаций, к эксплуатации не допускаются. Системы капиллярного электрофореза изымают из обращения. Свидетельство о поверке изымают и выдают извещение о непригодности.

8.4 После ремонта средства измерений подвергают поверке.

8.5 Знак поверки наносится на заднюю панель СИ.

Начальник лаборатории 009 ФГУП «ВНИИМС»



Е.В. Кулябина

## Приготовление контрольных растворов

А1 Для приготовления контрольных растворов используют следующие средства измерений, реактивы и вспомогательные устройства:

Весы лабораторные по ГОСТ OIML R 76-1-2011, класс точности – 1

рН-метр

Термостат (водяная баня)

Колбы мерные вместимостью 10, 25, 50, 100 по ГОСТ 1770-74

Стакан из термостойкого стекла вместимостью 50 см<sup>3</sup> по ГОСТ 25336-82

Автоматические пипеточные дозаторы переменного объема 100-1000 мкл, 1-10 мл

Пробирки полипропиленовые с крышкой типа "Эппендорф" объемом 1,5 мл

Вода дистиллированная деионизированная по ГОСТ 6709-72

Гидроксид натрия, х.ч. по ГОСТ 4328-77

Натрий хромовокислый, ч.д.а. по ТУ 6-09-91-84

Цетилтриметиламмоний бромид (ЦТАБ) по ТУ 6-09-13-452

Натрий тетраборнокислый, стандарт-титр по ТУ 6-09-2540-87

Натрия хлорид (NaCl), х.ч. по ГОСТ 4233-77

Борная кислота по ГОСТ 9656-75

Флуоресцеин натрия соль по ТУ 2463-289-00204197-2003

#### А.2 Приготовление растворов для промывки капилляра

Все растворы готовят с использованием дистиллированной деионизированной воды, ГОСТ 6709-72.

##### *А.2.1 Раствор гидроксида натрия для промывки капилляра*

В мерную колбу вместимостью 50 см<sup>3</sup> помещают 0,2 г гидроксида натрия доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают. Молярная концентрация раствора 0,1 моль/дм<sup>3</sup>.

Срок хранения в посуде из полиэтилена 6 месяцев.

#### А.3 Приготовление растворов для проведения испытаний при ПОЛОЖИТЕЛЬНОЙ полярности источника высокого напряжения

##### *А.3.1 Раствор натрия тетраборнокислого, молярная концентрация 0,05 моль/дм<sup>3</sup>*

Раствор готовят из стандарт-титра по прилагаемой к нему инструкции. Раствор хранят в полиэтиленовой посуде в условиях, исключающих поглощение диоксида углерода.

Срок хранения 6 месяцев.

**П р и м е ч а н и е :** Допускается приготовление раствора из 10-ти водного тетрабората натрия Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O, навеска которого составляет 0,995 г. Навеску добавляют в мерную колбу 50 мл, растворяют водой и доводят до риски.

##### *А.3.2 Раствор борной кислоты №1, 100 мМ борной кислоты*

В мерную колбу вместимостью 50 см<sup>3</sup> помещают 0,309 г борной кислоты, доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

Молярная концентрация раствора приблизительно 0,1 моль/дм<sup>3</sup>.

Срок хранения 1 месяц.

##### *А.3.3 Раствор борной кислоты №2, 50 мМ борной кислоты*

В мерную колбу вместимостью 50 см<sup>3</sup> добавляют 25 см<sup>3</sup> раствора борной кислоты

№1 (п.А.3.2), доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.  
Молярная концентрация раствора приблизительно 0,05 моль/дм<sup>3</sup>.  
Срок хранения 1 месяц.

#### *А.3.4 Боратный буферный раствор, рН 8,5*

В чистый сухой стакан вместимостью 50 см<sup>3</sup> добавляют 3 см<sup>3</sup> раствора натрия тетраборнокислого, приготовленного по п.А.3.1 и 19 см<sup>3</sup> раствора борной кислоты №2, приготовленного по п.А.3.3, тщательно перемешивают. Измеряют значение рН раствора.

Буферный раствор используется для проведения поверки при положительной полярности источника высокого напряжения.

Срок хранения 1 месяц.

#### *А.3.5 Приготовление запасного раствора бензойной кислоты №1 (массовая концентрация 1000 мкг/см<sup>3</sup>)*

Навеску бензойной кислоты массой 100 мг растворяют в дистиллированной воде при нагревании на водяной бане, переносят в мерную колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup> охлаждают до комнатной температуры, доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

Срок хранения раствора в холодильнике 1 месяц.

**П р и м е ч а н и е :** Допускается приготовление раствора № 1 из бензоата натрия, навеска которого составляет 118 мг. При его использовании нагревание для полного растворения, как правило, не требуется.

*А.3.6 Приготовление запасного раствора бензойной кислоты №2 (массовая концентрация 100 мкг/см<sup>3</sup>)* В мерную колбу вместимостью 50 см<sup>3</sup> помещают добавляют 5 см<sup>3</sup> запасного раствора №1 (п.А.3.4), доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

Срок хранения раствора в холодильнике 1 месяц.

*А.3.7 Приготовление поверочного раствора бензойной кислоты №3 (массовая концентрация 4 мкг/см<sup>3</sup>)* В мерную колбу вместимостью 25 см<sup>3</sup> добавляют 1 см<sup>3</sup> запасного раствора №2 (п.А.3.5), доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

Растворы используют в день приготовления.

**А.4 Приготовление растворов для проведения поверки при ОТРИЦАТЕЛЬНОЙ полярности источника высокого напряжения**

#### *А.4.1 Раствор хромовокислого натрия, молярная концентрация 0,1 моль/дм<sup>3</sup>*

В мерную колбу вместимостью 10 см<sup>3</sup> помещают навеску 0,162 г хромовокислого натрия, растворяют в 5 - 6 см<sup>3</sup> дистиллированной воды, затем доводят до метки дистиллированной водой.

Срок хранения раствора в плотно закрытом полиэтиленовом сосуде не ограничен.

#### *А. 4.2 Раствор цетилтриметиламмония бромид (ЦТАБ), молярная концентрация 0,01 моль/дм<sup>3</sup>*

В мерную колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup> помещают 0,364 г ЦТАБ, добавляют примерно 50 см<sup>3</sup> дистиллированной воды, выдерживают на водяной бане при 40°С до полного растворения, доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают.

Срок хранения раствора в пластиковой посуде в условиях, исключающих поглощение углекислого газа из воздуха, в холодильнике - 6 месяцев.

При последующем использовании нужно прогреть раствор перед применением, чтобы растворить образующиеся кристаллы.

#### *А. 4.3 Хроматный буферный раствор*

В мерную колбу вместимостью 25 см<sup>3</sup> помещают 1,25 см<sup>3</sup> раствора хромовокислого натрия, приготовленного по п.А.4.1, 250 мкл раствора ЦТАБ, приготовленного по п.А.4.2, и доводят до метки дистиллированной водой. Тщательно перемешивают и центрифугируют 10 минут. Сразу после смешения раствор фильтруют через мембранный фильтр, используя медицинский шприц, в пластиковую посуду с закрывающейся крышкой. Приготовленный раствор содержит 5 ммоль/дм<sup>3</sup> хромовокислого натрия и 0,1 ммоль/дм<sup>3</sup> ЦТАБ.

Буферный раствор используется для проведения поверки при отрицательной полярности источника высокого напряжения.

Срок хранения 1 день.

#### *А.4.4 Приготовление запасного раствора хлорид-ионов №1 (массовая концентрация 100 мкг/см<sup>3</sup>)*

В мерную колбу вместимостью 50 см<sup>3</sup> добавляют 5,0 см<sup>3</sup> ГСО состава раствора хлорид-ионов, доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают.

Срок хранения раствора в холодильнике 1 месяц.

**П р и м е ч а н и е :** Допускается приготовление раствора № 1 из хлорида натрия (NaCl), навеска которого составляет 165 мг в мерной колбе вместимостью 1000 см<sup>3</sup>

*А.4.5 Приготовление поверочного раствора хлорид-ионов №2 (массовая концентрация 4 мкг/см<sup>3</sup>)* В мерную колбу вместимостью 25 см<sup>3</sup> помещают добавляют 1 см<sup>3</sup> запасного раствора №1 (п.А.4.4), доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

Растворы используют в день приготовления.

**А.5 Приготовление растворов для проведения испытаний по определению отношения сигнал/шум флуоресцентного детектора с лазерным возбуждением (LIF детектора).**

#### *А.5.1 Приготовление запасного раствора флуоресцеина натрия №1 (массовая концентрация 0,36 мг/см<sup>3</sup>)*

Навеску флуоресцеина натрия массой 36 мг растворяют в дистиллированной воде, переносят в мерную колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup>, доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

Срок хранения раствора в темной посуде и холодильнике 1 месяц.

#### *А.5.2 Приготовление запасного раствора флуоресцеина натрия №2 (массовая концентрация 0,0036 мг/см<sup>3</sup>)*

В мерную колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup> помещают добавляют 1 см<sup>3</sup> запасного раствора №1 (п.А.5.1), доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

Срок хранения раствора в темной посуде и холодильнике 1 месяц.

*А.5.3 Приготовление раствора флуоресцеина натрия №3 (массовая концентрация  $3,6 \cdot 10^{-7}$  г/см<sup>3</sup>)* В мерную колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup> добавляют 10 см<sup>3</sup> запасного раствора №2 (п.А.5.2), доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

Раствор используют в день приготовления.

## Подготовка капилляра

## Б.1 Подготовка нового капилляра к работе (рис. Б1.1 и Б1.2)

Initial Conditions | PDA Detector Initial Conditions | Time Program

|    | Time (min) | Event               | Value    | Duration  | Inlet vial | Outlet vial | Summary                        | Comments   |
|----|------------|---------------------|----------|-----------|------------|-------------|--------------------------------|--|
| 1  |            | Rinse - Pressure    | 20.0 psi | 1.00 min  | BI:A1      | BO:A1       | forward                        | Rinse with Regenerator/Conditioner: 0.1N NaOH    |
| 2  | 0.00       | Separate - Pressure | 1.0 psi  | 3.00 min  | BI:A1      | BO:A1       | forward                        | Pressure Capillary Conditioning with Regenerator |
| 3  | 3.00       | Rinse - Pressure    | 20.0 psi | 2.00 min  | BI:A1      | BO:A1       | forward                        | Rinse with Regenerator/Conditioner               |
| 4  | 5.00       | Separate - Voltage  | 10.0 KV  | 10.00 min | BI:F1      | BO:F1       | 0.17 Min ramp, normal polarity | Voltage Capillary Conditioning with Regenerator  |
| 5  | 15.00      | Rinse - Pressure    | 20.0 psi | 1.00 min  | BI:D1      | BO:D1       | forward                        | Rinse with Separation Buffer                     |
| 6  | 16.00      | Rinse - Pressure    | 1.0 psi  | 3.00 min  | BI:D1      | BO:D1       | forward                        | Pressure Conditioning with Separation Buffer     |
| 7  | 19.00      | Rinse - Pressure    | 20.0 psi | 2.00 min  | BI:D1      | BO:D1       | forward                        | Rinse with Separation Buffer                     |
| 8  | 21.00      | Separate - Voltage  | 25.0 KV  | 10.00 min | BI:E1      | BO:B1       | 0.17 Min ramp, normal polarity | Voltage Conditioning with Separation Buffer      |
| 9  | 31.00      | Stop data           |          |           |            |             |                                |  |
| 10 | 31.00      | Wait                |          | 0.00 min  | BI:F6      | BO:F6       |                                | Water dip step in Home position                  |
| 11 | 31.00      | End                 |          |           |            |             |                                |  |

Рис. Б.1.1 Рекомендуемый метод подготовки нового капилляра к работе при положительной полярности в программе 32 Karat

Initial Conditions | PDA Detector Initial Conditions | Time Program

|    | Time (min) | Event               | Value    | Duration  | Inlet vial | Outlet vial | Summary                         | Comments   |
|----|------------|---------------------|----------|-----------|------------|-------------|---------------------------------|--|
| 1  |            | Rinse - Pressure    | 20.0 psi | 1.00 min  | BI:A1      | BO:A1       | forward                         | Rinse with Regenerator/Conditioner: 0.1N NaOH    |
| 2  | 0.00       | Separate - Pressure | 1.0 psi  | 3.00 min  | BI:A1      | BO:A1       | forward                         | Pressure Capillary Conditioning with Regenerator |
| 3  | 3.00       | Rinse - Pressure    | 20.0 psi | 2.00 min  | BI:A1      | BO:A1       | forward                         | Rinse with Regenerator/Conditioner               |
| 4  | 5.00       | Separate - Voltage  | 10.0 KV  | 10.00 min | BI:F1      | BO:F1       | 0.17 Min ramp, normal polarity  | Voltage Capillary Conditioning with Regenerator  |
| 5  | 15.00      | Rinse - Pressure    | 20.0 psi | 1.00 min  | BI:D1      | BO:D1       | forward                         | Rinse with Separation Buffer                     |
| 6  | 16.00      | Rinse - Pressure    | 1.0 psi  | 3.00 min  | BI:D1      | BO:D1       | forward                         | Pressure Conditioning with Separation Buffer     |
| 7  | 19.00      | Rinse - Pressure    | 20.0 psi | 2.00 min  | BI:D1      | BO:D1       | forward                         | Rinse with Separation Buffer                     |
| 8  | 21.00      | Separate - Voltage  | 25.0 KV  | 10.00 min | BI:E1      | BO:B1       | 0.17 Min ramp, reverse polarity | Voltage Conditioning with Separation Buffer      |
| 9  | 31.00      | Stop data           |          |           |            |             |                                 |  |
| 10 | 31.00      | Wait                |          | 0.00 min  | BI:F6      | BO:F6       |                                 | Water dip step in Home position                  |
| 11 | 31.00      | End                 |          |           |            |             |                                 |  |

Рис. Б.1.2 Рекомендуемый метод подготовки нового капилляра к работе при отрицательной полярности в программе 32 Karat

Новый капилляр последовательно промывают:

- 1 минута раствором гидроксида натрия по п.А.2.1 при 20 psi;
- 3 минуты раствором гидроксида натрия по п.А.2.1 при 1 psi;
- 2 минуты раствором гидроксида натрия по п.А.2.1 при 20 psi;
- 10 минут раствором гидроксида натрия по п.А.2.1 выдержать напряжение 10 кВ;
- 1 минута буферным раствором по п.А.3.4 или А.4.3 при 20 psi;
- 3 минуты буферным раствором по п.А.3.4 или А.4.3 при 1 psi;
- 2 минуты буферным раствором по п.А.3.4 или А.4.3 при 20 psi;
- 10 минут буферным раствором по п.А.3.4 или А.4.3 выдержать напряжение 25 кВ(положительная полярность для боратного буфера и отрицательная полярность для хроматного буфера);

Рекомендовано использовать два разных картриджа для положительной и отрицательной полярности.

## Б.2 Промывка капилляра, ранее использованного в работе (Рис. Б.2)

Initial Conditions | PDA Detector Initial Conditions | Time Program

|   | Time (min) | Event               | Value    | Duration  | Inlet vial | Outlet vial | Summary                        | Comments  |
|---|------------|---------------------|----------|-----------|------------|-------------|--------------------------------|---|
| 1 | 0.00       | Separate - Pressure | 20.0 psi | 4.00 min  | BI:A1      | BO:A1       | forward                        | Pressure Capillary Conditioning with Regenerator: 0.1N NaOH |
| 2 | 4.00       | Rinse - Pressure    | 20.0 psi | 6.00 min  | BI:D1      | BO:D1       | forward                        | Rinse with Borate Separation Buffer                         |
| 3 | 10.00      | Separate - Voltage  | 25.0 KV  | 10.00 min | BI:E1      | BO:B1       | 0.17 Min ramp, normal polarity | Voltage Conditioning with Borate Separation Buffer          |
| 4 | 20.00      | Stop data           |          |           |            |             |                                |   |
| 5 | 20.00      | Wait                |          | 0.00 min  | BI:F6      | BO:F6       |                                | Water dip step in Home position                             |
| 6 | 20.00      | End                 |          |           |            |             |                                |   |

Рис. Б.2 Рекомендуемый метод промывки капилляра, ранее использованного в работе в программе 32 Karat

Все операции промывки проводят при 1,38 бар (20 psi) при температуре 25°C.

Если использовали буферные растворы без модифицирующих добавок, то капилляр промывают по следующей схеме:

- 4 минуты 0,1 н раствором гидроксида натрия (по п. А.2.1)
- 6 минут буферным раствором по п.А.3.4 или А.4.3 в зависимости от полярности используемого источника напряжения.

• Для установления равновесия на внутренней поверхности капилляра выдержать напряжение 25 кВ между буферными растворами в течение 10 минут (положительная полярность для боратного буфера и отрицательная полярность для хроматного буфера);

### Б.3 Промывка капилляра между измерениями и по окончании поверки

Промывка капилляра между измерениями зависит от полярности буферного раствора.

При положительной полярности непосредственно перед измерением капилляр промывают боратным буферным раствором в течение 2 минут.

При отрицательной полярности непосредственно перед измерением капилляр промывают 1 минуту 0,1Н раствором гидроксида натрия, затем хроматным буферным раствором в течение 2 минут.

Все операции промывки проводят при 1,38 бар (20 psi) при температуре 25°C.

По окончании поверки, для хранения капилляр промывают по схеме:

- 2 минуты раствором гидроксида натрия по п.А.2.1 при 50 psi ;
- 5 минут дистиллированной водой при 100 psi;
- 10 минут продувка воздухом(пустые виалы) при 100 psi.



ПРОТОКОЛ ПОВЕРКИ

Системы капиллярного электрофореза РА 800 Plus \_\_\_\_\_

Зав. номер \_\_\_\_\_

Дата выпуска \_\_\_\_\_

Дата поверки \_\_\_\_\_

Условия поверки:

температура окружающего воздуха \_\_\_\_\_ °С

относительная влажность \_\_\_\_\_ %

РЕЗУЛЬТАТЫ ПОВЕРКИ

1. Результаты внешнего осмотра
2. Результаты опробования
3. Результаты определения относительного среднего квадратического отклонения выходного сигнала (по площади пика):

| Значение относительного среднего квадратического отклонения выходного сигнала (по площади пика), полученное при поверке, % | Предел допускаемых значений относительного среднего квадратического отклонения выходного сигнала (по площади пика), % |
|--|---|
|  |   |

4. Заключение

Поверитель \_\_\_\_\_