



УТВЕРЖДАЮ
Заместитель директора ФГУН "ВНИИМС"

В.Н.Яншин

18 ноября _____ **2015 г.**

Хроматографы жидкостные Prominence

Методика поверки

н.р.63431-16

Москва
2015 г.

Настоящая методика распространяется на хроматографы жидкостные Prominence фирмы "SHIMADZU CORPORATION", Япония, фирмы "SHIMADZU U.S.A. MANUFACTURING, INC.", США, (далее – хроматографы) 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	Обязательность проведения операции	
		при выпуске из производства и из ремонта	при периодической поверке
Внешний осмотр	4.1	Да	Да
Опробование:	4.2		
- определение уровня флуктуационных шумов нулевого сигнала	4.2.1	Да	Да ¹⁾
- определение дрейфа нулевого сигнала	4.2.2	Да	Да ¹⁾
- определение отношения сигнал/шум масс-спектрометрических детекторов	4.2.3	Да	Да
- определение предела детектирования	4.2.4	Да	Да ¹⁾
Определение метрологических характеристик:	4.3		
- определение относительного среднего квадратического отклонения (СКО) выходного сигнала	4.3.1	Да	Да ¹⁾
- определение относительного изменения параметров выходного сигнала за 8 ч непрерывной работы хроматографа	4.3.2	Да	Да ¹⁾
- определение показателей точности результатов измерений	4.3.3	Нет	Да ²⁾

Примечание:

¹⁾При отсутствии НД на методику измерений, утвержденного в установленном порядке по ГОСТ Р 8.563 -2009.

²⁾При наличии НД на методику измерений.

2 СРЕДСТВА ПОВЕРКИ

2.1 При проведении поверки применяют средства поверки:

- ГСО 8749-2006 состава антрацена в ацетонитриле, массовая концентрация антрацена 0,200 мг/см³;
- ГСО 7346-96 состава фенола, массовая концентрация фенола 1 г/дм³;
- МСО 0389:2002 состава водного раствора глюкозы, молярная концентрация глюкозы 10,00 ммоль/дм³;
- кофеин с содержанием основного вещества не менее 98 %;
- резерпин фармакопейный;

- папаверина гидрохлорид фармакопейный.

2.2 При проведении поверки применяют следующие вспомогательные средства поверки:

- ацетонитрил для жидкостной хроматографии, ТУ 6-09-14-2167-84;
- вода для лабораторного анализа (бидистиллированная или деионизированная), ГОСТ Р 52501-2005;
- азот газообразный очищенный, ГОСТ 9293-74, высший сорт;
- колонки для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ):
- Discovery C18 (250 мм x 4,6 мм средний размер частиц 5 мкм);
- Shim-pack VP-ODS (150 мм x 4,6 мм, средний размер частиц 5 мкм);
- Pathfinder AS column (50 мм x 4,6 мм, средний размер частиц 2.5 мкм);
- Supelcosil-LC-NH2 (250 мм x 4,6 мм, средний размер частиц 5 мкм);
- термометр типа ТЛ4 № 2, ТУ 25-2021.003-88;
- психрометр аспирационный М-34-М по ГРПИ 405132.001 ТУ;
- барометр-анероид БАММ-1 по ТУ 25-04-1618.

Допускается применять другие средства поверки, технические и метрологические характеристики которых соответствуют указанным выше.

3 УСЛОВИЯ ПОВЕРКИ И ПОДГОТОВКА К НЕЙ

3.1 При проведении поверки соблюдают условия, указанные в таблице 2.

Таблица 2

- температура окружающего воздуха, °С	23 ± 5
- атмосферное давление, кПа	от 84 до 106,7
- относительная влажность воздуха, %	от 30 до 90
- напряжение переменного тока, В	220 ± 10 %
- частота сети, Гц	50 ± 1 %

3.2 Подготовительные работы выполняют в соответствии с руководством по эксплуатации хроматографа.

3.3 Перед проведением поверки готовят контрольные растворы (методика приготовления контрольных растворов дана в приложении А).

4 ПРОВЕДЕНИЕ ПОВЕРКИ

4.1 Внешний осмотр

При внешнем осмотре устанавливают

- соответствие комплектности хроматографа паспортным данным;
- четкость маркировки;
- исправность механизмов и крепежных деталей.

Не допускается наличие дефектов, которые могут повлиять на работоспособность хроматографа.

4.2 Опробование

При опробовании определяют уровень флуктуационных шумов и дрейф нулевого сигнала, отношение сигнал/шум масс-спектрометрических детекторов и предел детектирования. При определении уровня флуктуационных шумов и дрейфа нулевого сигнала хроматографическую колонку заменяют на капилляр из материала РЕЕК длиной не менее 30-50 см и внутренним диаметром 0,1 мм, который создает необходимое для проведения измерений противодавление. Допускается устанавливать колонку, если при использовании капилляра не удается создать необходимое противодавление.

4.2.1 Уровень флуктуационных шумов и дрейф нулевого сигнала детектора определяют при условиях, указанных в таблице 3. Через час после выхода хроматографа на режим записывают в течение 15 мин нулевой сигнал каждого детектора на наиболее чувствительной шкале прибора.

Уровень флуктуационных шумов нулевого сигнала (Δx) принимают равным амплитуде h повторяющихся колебаний нулевого сигнала с периодом не более 20 с. Уровень флуктуационных шумов определяют в микровольтах с дальнейшим пересчетом в единицы физических величин, приведенные в Приложении Б.

4.2.2 За дрейф нулевого сигнала принимают наибольшее смещение уровня нулевого сигнала в течение 1 ч при регистрации хроматограммы без ввода пробы. Допускается регистрировать нулевой сигнал в течение 30 мин с последующей экстраполяцией до 1 ч.

Таблица 3

Наименование детектора/хроматографа	Элюент	Скорость потока элюента, мл/мин	Параметры детектора
Спектрофотометрический детектор на диодной матрице SPD-M30A	вода	1	Длина волны 250 нм. Постоянная времени 2 с. Температура проточной кварцевой ячейки детектора 40 °С. Ширина полосы пропускания ± 4 нм. Длина волны сравнения ВЫКЛ. Ширина щели 8 нм.
Рефрактометрический детектор RID-20A	вода	-	Ячейки сравнения и измерительная заполнены водой. Вход и выход детектора заглушены. Режим "Аналитический", постоянная времени 3 с, шкала чувствительности 10^{-4} (RIU/V). Температура детектора 40 °С.
Электрохимические детекторы Decade Elite, Decade Lite	Ячейка, заполненная воздухом или имитатор ячейки	-	E _{ох} = 0,80 V. Диапазон чувствительности 20 нА.

4.2.3 Отношение сигнал-шум измеряют при условиях, указанных в таблице 4. Вводят пробу контрольного вещества. Находят значение отношения сигнал/шум (S/N) для пика со значением m/z по таблице 4, используя программное обеспечение "LabSolutions".

4.2.4 Определение предела детектирования и метрологических характеристик выполняют на хроматографе, укомплектованном соответствующим детектором и аналитической колонкой.

Предел детектирования оценивают с использованием контрольных растворов и условий, указанных в таблице 4.

В хроматограф вводят пробу контрольного раствора и определяют высоту или площадь пика (S).

Предел детектирования в г/см³ рассчитывают по формулам

$$C_{\text{мин.}} = \frac{2 \cdot \Delta x \cdot G}{H \cdot \mu_{0,5} \cdot V} \quad \text{или} \quad C_{\text{мин.}} = \frac{2 \cdot \Delta x \cdot G \cdot 60}{S \cdot V},$$

где V – скорость элюента, см³/мин;

$\mu_{0,5}$ – ширина пика на половине высоты, мин;

- Δx – уровень флуктуационных шумов нулевого сигнала, определенный до ввода контрольного вещества;
- H – высота пика контрольного вещества;
- ΔX и H – измеряют в мм, условных единицах, мкВ, либо в единицах, указанных в Приложении Б и В;
- S – площадь пика контрольного вещества, мкВ·с;
- G – количество контрольного вещества, г;

$$G = 10^{-9} C \cdot V_{\text{доз.}},$$

где C – массовая концентрация контрольного вещества, мг/дм³;

$V_{\text{доз.}}$ – объем введенной пробы контрольного вещества, мкл.

10^{-9} – пересчетный множитель.

Результаты определения признают положительными, если полученные значения предела детектирования не превышают значений, указанных в приложении Б.

4.3 Определение метрологических характеристик

4.3.1 Определение относительного среднего квадратического отклонения (СКО) выходных сигналов

Контрольный раствор (табл.4.) вводят в хроматограф не менее 6 раз, измеряют значения выходных сигналов (времени удерживания и площади пиков) и вычисляют среднее арифметическое значение выходных сигналов (\bar{X}).

Относительное среднее квадратическое отклонение выходного сигнала рассчитывают по формуле

$$S = \frac{100}{\bar{X}} \cdot \sqrt{\frac{\sum_i (X_i - \bar{X})^2}{n-1}},$$

где X_i – i -ое значение параметра выходного сигнала (площади пика, времени удерживания).

Значения относительного среднего квадратического отклонения выходного сигнала не должны превышать значений, указанных в приложении В.

4.3.2 Определение относительного изменения выходного сигнала за 8 часов непрерывной работы.

Условия измерений аналогичны, приведенным в разделе 3. Проводят операции, описанные в п.4.3.1. Через 8 часов непрерывной работы повторяют измерения по п.4.3.1.

Таблица 4

Наименование детектора/хроматографа	Контрольный раствор, массовая концентрация, мг/дм ³	Объем ¹⁾ вводимой пробы, мкл	Элюент ²⁾	Скорость потока элюента ³⁾ , см ³ /мин	Режимные параметры
Спектрофотометрический детектор на диодной матрице SPD-M30A	Водный раствор кофеина, 10,0 мг/дм ³	10	Ацетонитрил : вода в объемном соотношении 1:4	1	Длина волны 272 нм. Температура термостата колонки 40 °С. Температура проточной кварцевой ячейки детектора 40 °С. Хроматографическая колонка Shim-pack XR-ODS II 150 x 2 мм.
Рефрактометрический RID-20A ⁴⁾	Водный раствор глюкозы 90 мг/дм ³	10	Ацетонитрил : вода в объемном соотношении 3:1 или элюент, подходящий для используемой колонки	1	Температура термостата колонки 40 °С. Температура ячейки детектора 40 °С. Хроматографическая колонка Supelcosil-LC-NH2 (250 мм x 4,6 мм), заполненная модифицированными частицами силикагеля размером около 5 мкм или любая колонка, обеспечивающая удерживание глюкозы. Постоянная времени 1,5 с.
	Раствор антрацена в гептане 100 мг/дм ³	10	Гептан	1	Постоянная времени 1,5 с. Колонка, заполненная нормально-фазовым сорбентом, например, Supelcosil-LC-NH2 или аналогичная с другими размерами.
	Раствор кофеина 250 мг/дм ³	10	Ацетонитрил/вода в объемном соотношении 1:4	1	Shim-pack VP-ODS, LUNA C18 (2) или эквивалентная колонка с размерами частиц: 5 мкм, размерами: внутр. диаметр 4,6 мм x длина 150 мм или аналогичная.
Электрохимические детекторы Decade Elite, Decade Lite	Раствор фенола в воде 10 мкг/дм ³	20	Ацетонитрил/ацетатный буфер (рН = 5) в объемном соотношении 33:67	1	E _{ox} = 0,80 V. Диапазон чувствительности 20 нА.

Наименование детектора/хроматографа	Контрольный раствор, массовая концентрация, мг/дм ³	Объем ¹⁾ вводимой пробы, мкл	Элюент ²⁾	Скорость потока элюента ³⁾ , см ³ /мин	Режимные параметры
Масс-спектрометрический детектор LCMS 8030: - отношение сигнал/шум - определение среднего квадратичного отклонения	Раствор резерпина в ацетонитриле, 0,001 мг/дм ³ Водный раствор папаверин гидрохлорида, 0,01 мг/дм ³	1	Ацетонитрил : вода в объемном соотношении 7:3	0,4	Масса, а.е.м 609,3 >195,0. Температура блока десольватации (DL), 250 °С. Температура блока нагревателя 400 °С. Расход газа-распылителя 3 дм ³ /мин. Расход осушающего газа 15 дм ³ /мин. Давление в насосе 35 МПа. Хроматографическая колонка Shim – pack XR-ODSII 50 мм x 2,0 мм.
		1	Метанол:вода (0,1% муравьиной кислоты) с объемным соотношением 3:7	0,5	
Масс-спектрометрический детектор LCMS 8040: - отношение сигнал/шум - определение среднего квадратичного отклонения	Раствор резерпина в ацетонитриле, 0,001 мг/дм ³ Водный раствор папаверин гидрохлорида, 0,01 мг/дм ³	1	Ацетонитрил : вода в объемном соотношении 7:3	0,4	Масса, а.е.м 609,3 >195,0. Температура блока десольватации (DL), 250 °С. Температура блока нагревателя 400 °С. Расход газа-распылителя 3 дм ³ /мин. Расход осушающего газа 15 дм ³ /мин. Давление в насосе 35 МПа. Хроматографическая колонка Shim – pack XR-ODSII 50 мм x 2,0 мм.
		5	Метанол:вода (0,1% муравьиной кислоты) с объемным соотношением 3:7	0,5	

¹⁾В том случае, если используют другой объем вводимой пробы (например, установлена петля другой вместимости), допускается соответствующим образом изменить концентрацию контрольного раствора.

²⁾Допускается использовать другой элюент при условии, что значение фактора удерживания (k') будет не менее 2.

$$k' = (t_R - t_0) / t_0,$$

где t_R - время удерживания анализируемого компонента;

t_0 - время элюирования неудерживаемого компонента (мертвое время).

³⁾Допускается использовать иную скорость потока, в случае если конфигурация системы (применяемые колонки и т. п.) не рассчитана на работу с потоком 1 см³/мин.

⁴⁾Контрольное вещество выбирают в зависимости от конфигурации хроматографа.

Относительное изменение выходного сигнала за 8 часов непрерывной работы хроматографа рассчитывают по формуле

$$\delta = \frac{|\bar{X}_i - \bar{X}|}{\bar{X}} \cdot 100,$$

где X_i – i -ое значение параметра выходного сигнала (площади пика, времени удерживания).

Значения относительного изменения выходного сигнала за 8 часов непрерывной работы хроматографа не должно превышать значений, указанных в приложении В.

4.3.3 При проведении периодической поверки хроматографов, эксплуатируемых по НД на методики, отвечающим требованиям ГОСТ Р 8.563-2009, проверяют показатели точности результатов измерений в соответствии с процедурами и нормативами контроля, регламентированными в методике измерений.

5.ОФОРМЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ПОВЕРКИ

5.1. Результаты поверки хроматографа заносят в протокол.

5.2. Положительные результаты поверки хроматографа оформляют выдачей свидетельства в соответствии с Порядком проведения поверки средств измерений, требования к знаку поверки и содержанию свидетельства о поверке (утв. приказом Минпромторга России № 1815 от 02.07.2015 г.).

5.3. Хроматографы, не удовлетворяющие требованиям настоящих рекомендаций, к эксплуатации не допускаются. Хроматограф изымается из обращения. Свидетельство о поверке изымают и выдают извещение о непригодности с указанием причин в соответствии с Порядком проведения поверки средств измерений, требования к знаку поверки и содержанию свидетельства о поверке (утв. приказом Минпромторга России № 1815 от 02.07.2015 г.).

5.4. После ремонта хроматограф подвергают поверке.

Начальник сектора ФГУП "ВНИИМС", к.х.н.



О.Л. Рутенберг

МЕТОДИКА ПРИГОТОВЛЕНИЯ КОНТРОЛЬНЫХ РАСТВОРОВ

Методика предназначена для приготовления контрольных растворов антрацена, кофеина, фенола и глюкозы.

1 СРЕДСТВА ИЗМЕРЕНИЙ, ПОСУДА, РЕАКТИВЫ

- 1.1 ГСО 8749-2006 состава антрацена в ацетонитриле, массовая концентрация антрацена 0,200 мг/см³.
- 1.2 ГСО 7346-96 состава фенола, массовая концентрация фенола 1 г/дм³.
- 1.3 МСО 0389:2002 состава водного раствора глюкозы (10,00 ммоль/дм³).
- 1.4 Кофеин фармакопейный; содержание основного вещества не менее 98 %.
- 1.5 Резерпин, ФС № 423267-96 или резерпин с содержанием основного вещества не менее 99,0, CAS 50-55-5, номер 83580 по каталогу Sigma-Aldrich.
- 1.6 Папаверина гидрохлорид, ФС-420267-07.
- 1.7 Весы лабораторные по ГОСТ OIML R 76-1-2011, с наибольшим пределом взвешивания 200 г.
- 1.8 Колбы мерные наливные 2-100-2, 2-200-2, ГОСТ 1770-74.
- 1.9 Пипетки градуированные 1-2-2-1, 1-2-2-10, ГОСТ 29227- 91 (I).
- 1.10 Стаканы В-1-50ТС, ГОСТ 25336-82.
- 1.11 Вода для лабораторного анализа (бидистиллированная или деионизированная), ГОСТ Р 52501-2005.
- 1.12 Дистиллированная вода, ГОСТ 6709-72.

2 ПРОЦЕДУРА ПРИГОТОВЛЕНИЯ

- 2.1 Приготовление раствора с массовой концентрацией фенола 5 мг/дм³
 - 2.1.1 Пипеткой вместимостью 1 см³ переносят 1 см³ ГСО фенола в этаноле в мерную колбу вместимостью 200 см³ и доводят содержимое колбы до метки ацетонитрилом.
- 2.2 Приготовление раствора глюкозы с массовой концентрацией 90 мг/дм³
 - 10 см³ МСО раствора глюкозы пипеткой вместимостью 10 см³ переносят в мерную колбу вместимостью 200 см³ и доводят содержимое колбы до метки деионизированной водой.
- 2.3 Приготовление контрольных растворов антрацена
 - 2.3.1 Приготовление раствора антрацена в ацетонитриле
 - 1 см³ ГСО состава антрацена в ацетонитриле с массовой концентрацией 200 мг/дм³ помещают в мерную колбу вместимостью 200 см³.
 - Массовая концентрация антрацена – 1 мг/дм³.
- 2.4 Приготовление исходного раствора кофеина
 - 2.4.1 Взвешивают в стакане около 200 мг кофеина, добавляют в стакан 25 мл дистиллированной воды, перемешивают. Полученный раствор переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³. Ополаскивают стакан дистиллированной водой, переносят ее в мерную колбу, доводят до метки дистиллированной деионизированной водой, перемешивают.
 - Содержание кофеина в исходном растворе (C_0 мг/дм³) рассчитывают по формуле

$$C_0 = \frac{m}{V_{100} \cdot 10^{-3}} = \frac{m}{0,1},$$

где m – масса кофеина, мг;

V_{100} – вместимость мерной колбы, $V = 100$ см³.

2.4.2 Приготовление аттестованного раствора кофеина с массовой концентрацией 10 мг/дм³.

1 см³ исходного раствора кофеина переносят пипеткой вместимостью 1 см³ в мерную колбу вместимостью 200 см³. Доводят дистиллированной деионизированной водой до метки, перемешивают.

2.5 Приготовление исходного раствора резерпина с массовой концентрацией 10 мг/дм³

2.5.1 Взвешивают в стакане 10,0 мг резерпина, добавляют 25 см³ ацетонитрила, перемешивают. Полученный раствор переносят в мерную колбу вместимостью 1000 см³. Ополаскивают стакан ацетонитрилом, раствор переносят в мерную колбу, доводят до метки ацетонитрилом, перемешивают.

2.5.2 Приготовление раствора резерпина с массовой концентрацией 0,1 мг/дм³

1 см³ раствора, приготовленного по п.2.1.1, переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³ и доводят до метки ацетонитрилом.

2.5.3 Приготовление контрольного раствора резерпина с массовой концентрацией 0,001 мг/дм³

1 см³ раствора, приготовленного по п.2.1.2, переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³ и доводят до метки ацетонитрилом.

Погрешность приготовления контрольного раствора $\pm 5\%$.

2.6 Приготовление исходного раствора папаверина с массовой концентрацией 10 мг/дм³

2.6.1 Взвешивают в стакане 10,0 мг папаверина, добавляют 25 см³ воды перемешивают. Полученный раствор переносят в мерную колбу вместимостью 1000 см³. Ополаскивают стакан водой, раствор переносят в мерную колбу, доводят до метки водой, перемешивают.

2.6.2 Приготовление контрольного раствора папаверина с массовой концентрацией 0,01 мг/дм³

1 см³ раствора, приготовленного по п.2.2.1, переносят в мерную колбу вместимостью 1000 см³ и доводят до метки водой.

Массовая концентрация полученного раствора 0,01 мг/дм³.

Погрешность приготовления контрольного раствора $\pm 4,9\%$.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Прибор (детектор)	Уровень флуктуационных шумов	Дрейф нулевого сигнала	Предел детектирования, не более
SPD M30	$4 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-9}$ г/см ³ (по кофеину)
RID-20A	$1 \cdot 10^{-7}$ ед.рефр.	$5 \cdot 10^{-7}$ ед.рефр./ч	$2 \cdot 10^{-6}$ г/см ³ (по глюкозе) $3 \cdot 10^{-6}$ г/см ³ (по антрацену) $1 \cdot 10^{-6}$ г/см ³ (по кофеину)
Decade Elite, Decade Lite	$2 \cdot 10^{-12}$ А	-	$5 \cdot 10^{-10}$ г/см ³ (по фенолу)
LCMS 8030	-	-	Отношение сигнал/шум в режиме электроспрей, положительная ионизация при дозировании 1 пг резерпина 200:1
LCMS 8040	-	-	Отношение сигнал/ шум в режиме электроспрей, положительная ионизация при дозировании 1 пг резерпина 1000:1