

СОГЛАСОВАНО
Заместитель директора ФГУП «ВНИИМС»
по производственной метрологии

_____ Н.В. Иванникова
« 24 » _____ 03 2021 г.

Государственная система обеспечения единства измерений

Хроматографы жидкостные Asquity

Методика поверки

009-29-20 МП

Москва
2020 г.

1 ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Настоящая методика распространяется на хроматографы жидкостные (далее-хроматографы) Acquity с детекторами:

- ультрафиолетовый с переменной длиной волны Acquity TUV;
 - на диодной матрице Acquity PDA;
 - флуоресцентный Acquity FLR;
 - рефрактометрический Acquity RI;
 - испарительного светорассеяния Acquity ELS,
- и устанавливает методику их первичной и периодических проверок.

Интервал между поверками 1 год.

Используемые средства проверки обеспечивают прослеживаемость хроматографов к эталонам единиц массы и объема, что обеспечивается посредством использования поверенных средств измерений: весов и мерных колб через неразрывную цепь проверок в соответствии с ГПС для СИ массы, утвержденной приказом Росстандарта №2818 от 29.12.2018 и ГПС для СИ массы и объема жидкости в потоке, объема жидкости и вместимости при статических измерениях, массового и объемного расхода жидкости, утвержденной приказом Росстандарта №256 от 07.02.2018.

Метод проверки основан на ГОСТ Р 8.772-2011 и включает применение средств измерений и стандартных образцов утвержденных типов, приготовление контрольных растворов с известной концентрацией, определение уровня флуктуационных шумов, дрейфа нулевого сигнала, пределов детектирования и отношения сигнал/шум для каждого детектора; определение относительного среднего квадратического отклонения выходного сигнала. Рассчитанные на основании полученных данных метрологические характеристики сравниваются с нормированными в Описании типа. В случае их соответствия средство измерений признается поверенным.

2 ПЕРЕЧЕНЬ ОПЕРАЦИЙ ПОВЕРКИ

2.1 При проведении проверки должны выполняться операции, указанные в табл. 1

Таблица 1

Наименование операции	Номер пункта методики	При первичной проверке	При периодической проверке
Внешний осмотр	7	Да	Да
Опробование:	8.4	Да	Да
- проверка идентификационных данных программного обеспечения	9	Да	Да
- определение уровня флуктуационных шумов нулевого сигнала и дрейфа нулевого сигнала	8.4.1-8.4.4	Да	Да
- определение предела детектирования	8.4.5	Да	Нет
Определение метрологических характеристик:	10	Да	Да

квадратического отклонения выходного сигнала			
– определение относительного изменения выходного сигнала за 4 часа непрерывной работы	10.4	Да	Да

Возможность проведения поверки отдельных измерительных каналов для меньшего числа величин или на меньшем числе поддиапазонов измерений для данных СИ не предусматривается.

3 ТРЕБОВАНИЯ К УСЛОВИЯМ ПОВЕРКИ

3.1 При проведении поверки соблюдают следующие условия:

– температура окружающего воздуха, °С	от 25 до 25
– атмосферное давление, кПа	от 84 до 106,7
– относительная влажность воздуха, %	от 20 до 80

4 ТРЕБОВАНИЯ К СПЕЦИАЛИСТАМ, ОСУЩЕСТВЛЯЮЩИМ ПОВЕРКУ

К выполнению измерений и обработке их результатов допускаются лица, владеющие методом анализа, знающие принцип действия, конструкцию и правила эксплуатации хроматографов.

5 МЕТРОЛОГИЧЕСКИЕ И ТЕХНИЧЕСКИЕ ТРЕБОВАНИЯ К СРЕДСТВАМ ПОВЕРКИ

5.1 При проведении поверки применяют следующие основные и вспомогательные средства поверки:

№ п/п	Основные и вспомогательные средства поверки	Метрологические и технические требования
1	лабораторные весы класса точности 1 - специальный.	ГОСТ OIML R 76-1-2011, с верхним пределом взвешивания 200
2	Колбы мерные наливные	ГОСТ 1770-74, 2-100-2, 2-250-2, 2-500-2, 2-1000-2
3	Дозаторы медицинские лабораторные с варьируемым объемом	ГОСТ 28311-89 на 1000 см ³ , 5000 см ³
4	цилиндры	ГОСТ 1770-74, 2-100-2, 2-500-2, 2-1000-2
5	ГСО 8749-2006 раствора антрацена в ацетонитриле	с аттестованным значением массовой концентрации 200 мкг/см ³
6	ацетонитрил для ВЭЖХ	ТУ 6-09-14-2167-84 или Фишер Оптима для ВЭЖХ
7	кофеин	ФС 42-0249-07 с содержанием основного вещества не менее 98 %
8	вода дистиллированная	ГОСТ 6709-72 или Бейкер для ВЭЖХ
9	метанол для ВЭЖХ	ТУ 20.14.22-003-62112778-2020 Метанол химически чистый, сухой и особо чистый

		для газовой хроматографии, жидкостной хроматографии, УФ-спектроскопии, пре-паративной и градиентной ВЭЖХ
10	ACQUITY UPLC колонка C18	(2,1 x 50 мм, 1,7 мкм, номер 186002350)
11	бутыль 1 л	-
12	Стаканы В-1-50ТС по	ГОСТ 25336-82

Допускается применение аналогичных средств поверки, обеспечивающих определение метрологических характеристик поверяемых СИ с требуемой точностью.

6 ТРЕБОВАНИЯ (УСЛОВИЯ) ПО ОБЕСПЕЧЕНИЮ БЕЗОПАСНОСТИ ПРОВЕДЕНИЯ ПОВЕРКИ

Все токоведущие части должны быть защищены от случайного прикосновения.

Металлические нетоковедущие части, которые могут вследствие повреждения изоляции оказаться под электрическим напряжением опасной величины, должны быть заземлены по ГОСТ 12.2.007.0-75.

Подаваемое напряжение питания должно соответствовать указанному на заводской бирке прибора. Аварийный выключатель напряжения питания должен быть четко обозначен и расположен вблизи прибора.

Эксплуатация оборудования, имеющего повреждения, не допускается.

Устранение любых неисправностей должно выполняться только специально обученным персоналом соответствующей квалификации.

7 ВНЕШНИЙ ОСМОТР СРЕДСТВА ИЗМЕРЕНИЙ

При внешнем осмотре устанавливают:

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

8 ПОДГОТОВКА К ПОВЕРКЕ И ОПРОБОВАНИЕ СРЕДСТВА ИЗМЕРЕНИЙ

Перед проведением поверки выполняют следующие подготовительные работы.

8.1 Приготовление подвижной фазы

8.1.1 Для обеспечения требуемой чувствительности хроматографов жидкостных Acquity и детекторов применяют растворители и воду в соответствии с 2.1. Все растворители фильтруют через мембранный фильтр непосредственно перед использованием.

Для предотвращения загрязнений изделия из стекла и мерную посуду не моют моющими средствами. Посуду промывают растворителями, которые будут использоваться при поверке.

8.1.2 Приготовление раствора А

В мерный цилиндр вместимостью 100 см³ вносят 100 см³ ацетонитрила, а затем переносят ацетонитрил в мерный цилиндр вместимостью 1 дм³.

В другой мерный цилиндр вместимостью 1 дм³ вносят 900 см³ воды. Затем переносят примерно 700 см³ воды в цилиндр с ацетонитрилом, перемешивают. Оставляют смесь на несколько минут до восстановления температуры смеси до комнатной, доли-

вают до метки водой, перемешивают. Переливают полученный раствор в бутылку вместимостью 1 дм³ и закрывают крышкой.

На бутылку наклеивают этикетку «Раствор А – ацетонитрил : вода = 10 : 90».

8.2 Перед проведением поверки готовят контрольные растворы, содержание анализируемых компонентов в которых приведены в таблице 2. Относительная погрешность приготовления не более 5 %. Процедура приготовления контрольных растворов приведена в приложении 1.

Таблица 2

Контрольный раствор	Массовая концентрация, мг/дм ³	Объем пробы, мкл	Элюент	Скорость потока элюента, см ³ /мин	Детектор
Антрацен в ацетонитриле	2,5	10	Ацетонитрил : вода = 80 : 20	0,4	TUV
Антрацен в ацетонитриле	2,5	10	Ацетонитрил : вода = 80 : 20	0,4	PDA
Антрацен в ацетонитриле	0,01	5	Ацетонитрил : вода = 80 : 20	0,4	FLR
Кофеин в ацетонитриле	160	10	Ацетонитрил : вода = 10 : 90	0,4	ELS
Кофеин в метаноле	1000	4	Метанол : вода = 15,5 : 84,5	1,4	RI

8.3 Хроматографы готовят к работе в соответствии с разделом 3 руководства по эксплуатации.

8.3.1 Капилляры для подачи растворителей от подающих головок А1 и В2 насоса, капилляры «Seal Wash», «Weak Wash» и «Strong Wash» опускают в резервуар с раствором А; капилляры от подающих головок А2 и В1 – в резервуар со 100 % ацетонитрилом.

Промывают систему подачи растворов, насос, автоинжектор и иглу следующим образом:

- капилляры системы подачи растворителей промывают указанными выше растворами в течение 10 минут со скоростью 2 мл/мин;
- насос промывки плунжеров промывают несколько минут раствором А;
- раствором А промывают иглу;
- автоинжектор промывают не менее 5 раз.

Виалы с контрольными растворами помещают в термостатируемое отделение для анализируемых образцов.

8.3.2 Промывка системы

Промывают капилляры системы подачи растворителей от подающих головок А1 и В1, используя смесь от подающих головок А1и В1 состава А1:В1=50:50 со скоростью потока 2 мл/мин в течение 10 минут. Повторяют промывку для капилляров системы подачи растворителей А2 и В2 в тех же условиях.

10 мкл раствора А вводят 10 раз. После каждого ввода промывают систему раствором А объемом 2000 мкл.

8.3.3 Подсоединяют колонку с колоночным фильтром в соответствии с руководством по эксплуатации. Следят за правильным подсоединением во избежание выхода из строя ячейки детектора. Помещают колонку в термостат колонки.

Перед присоединением выхода колонки к детектору колонку промывают 100 % ацетонитрилом со скоростью потока 0,1 мл/мин не меньше 1 часа.

После присоединения колонки, хроматограф выдерживают 1 час (до уравнивания всех процессов, протекающих в колонке) до момента записи шума и дрейфа нулевой линии.

8.4 Опробование

При опробовании проводят идентификацию данных программного обеспечения, определяют уровень флуктуационных шумов, дрейф нулевого сигнала и предел детектирования.

8.4.1 Уровень флуктуационных шумов, дрейф нулевого сигнала и отношение сигнал/шум определяют при условиях, указанных в таблице 3, после выхода детектора на режим.

Таблица 3

Устанавливаемые параметры	Детектор			
	TUV, PDA	FLR	ELS	RI
Элюент	ацетонитрил : вода = 80 : 20	ацетонитрил : вода = 80 : 20	Ацетонитрил : вода = 10 : 90	метанол : вода = 15,5 : 84,5
Длина волны, нм	254	246 (возбуждения) 402 (эмиссии)	-	
Скорость потока, см ³ /мин	0,4	0,4	0,4	1,4
Постоянная времени, с	1	1	Fast	-

8.4.2 Уровень флуктуационных шумов и дрейф нулевого сигнала измеряют в течение 30 мин на наиболее чувствительной шкале в координатах оптическая плотность (ток, напряжение) – время.

Уровень флуктуационных шумов нулевого сигнала (ΔX) принимают равным амплитуде (h) повторяющихся колебаний нулевого сигнала с периодом не более 20 секунд

Значения дрейфа нулевого сигнала принимают равным смещению нулевого сигнала в течение 1 часа.

8.4.3 Значение уровня флуктуационных шумов нулевого сигнала (peak to peak) не должно превышать значений, приведенных ниже:

- TUV $6 \cdot 10^{-5}$ е.о.п.;
- PDA $8 \cdot 10^{-5}$ е.о.п.;
- FLR 5 мВ;
- RI $2 \cdot 10^{-8}$ ед. рефр.;
- ELS 0,5 ед. светорассеивания.

8.4.4 Значение дрейфа нулевого сигнала не должно превышать значений, приведенных ниже:

- TUV $6 \cdot 10^{-4}$ е.о.п./ч.;
- PDA $1 \cdot 10^{-2}$ е.о.п./ч.;
- FLR 10 мВ/ч.;
- RI $1 \cdot 10^{-5}$ ед. рефр./ч.;
- ELS 1 ед. светорассеивания/ч

8.4.5 Предел детектирования определяют с использованием контрольных веществ и условий, указанных в таблице 2.

В хроматограф вводят пробу контрольного вещества, определяют высоту и ширину пика на половине его высоты ($\mu_{0,5}$)

Предел детектирования рассчитывают по формуле:

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

- где G – масса вещества, г; $G=C \cdot V$ (C – массовая концентрация контрольного вещества, мг/дм³, V – объем дозы, дм³)
- 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, мВ, е.о.п., ед. рефр., ед. светорассеивания в зависимости от детектора;
- S – площадь пика, усл. ед. · с; мВ·с, е.о.п.·с, ед. рефр.·с, ед. светорассеивания·с в зависимости от детектора.

Полученные результаты не должны превышать приведенных ниже значений предела детектирования:

- TUV по антрацену, 254 нм, при объеме пробы 0,2 мм ³	1·10 ⁻⁸ г/мл
- PDA по антрацену, 254 нм, при объеме пробы 1 мм ³	2·10 ⁻⁸ г/мл
- FLR по антрацену, 254 нм, при объеме пробы 0,2 мм ³	5·10 ⁻¹⁰ г/мл
- ELS по кофеину, при объеме пробы 0,7 мм ³	2·10 ⁻⁴ г/мл
- RI по кофеину, при объеме пробы 0,1 мм ³	4·10 ⁻⁷ г/мл

9 ПРОВЕРКА ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ

При запуске хроматографа на мониторе отображается идентификационное название ПО и номер версии,

С помощью предустановленной программы по вычислению контрольной суммы, вычисляется контрольная сумма. Результаты должны соответствовать приведенным в таблице 4.

Таблица 4

Идентификационные данные	Значение	Значение
Идентификационное наименование ПО	Empower	Empower
Номер версии (идентификационный номер) ПО	FR4	FR5
Цифровой идентификатор ПО	5801195F	1A139F9A
Алгоритм вычисления идентификатора ПО	CRC32	CRC32

10 ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕТРОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК СРЕДСТВ ИЗМЕРЕНИЙ

10.1 Определение относительного среднего квадратического отклонения выходных сигналов.

Измерения проводят после выхода хроматографа на режим. Условия выполнения измерений должны соответствовать приведенным в разделе 3.

10.2 Контрольный раствор (таблица 2) вводят в хроматограф не менее 6 раз, измеряют значения выходных сигналов (времен удерживания и площадей пиков) вычисляют среднее арифметическое значение выходных сигналов (\bar{X}).

10.3 Определение относительного изменения выходных сигналов за 4 часа непрерывной работы.

Условия измерения аналогичны описанным в разделе 3. Проводят операции по 10.2. Через 4 часа непрерывной работы повторяют измерения по 10.2.

11 ПОДТВЕРЖДЕНИЕ СООТВЕТСТВИЯ СРЕДСТВА ИЗМЕРЕНИЙ МЕТРОЛОГИЧЕСКИМ ТРЕБОВАНИЯМ

11.1 Относительное среднее квадратическое отклонение выходных сигналов, полученных по процедуре п.10.2 рассчитывают по формуле:

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

где \bar{X} – среднее арифметическое значение параметра выходного сигнала (площади пика, времени удерживания).

Значения относительного среднего квадратического отклонения выходных сигналов не должны превышать по времени выхода 1 % и по площади пика 1,5 %.

11.2 Относительное изменение выходного сигнала по площади пика за 4 часа непрерывной работы, полученные по п.10.3 хроматографа рассчитывают по формуле:

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

Значения относительного изменения выходных сигналов не должны превышать 3 %.

12 ОФОРМЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ПОВЕРКИ

12.1 Положительные результаты поверки хроматографа оформляют в соответствии с приказом Минпромторга № 2510 от 20.11.2020.

12.2 Хроматографы, не удовлетворяющие требованиям настоящих рекомендаций, к эксплуатации не допускаются. Хроматографы изымаются из обращения. свидетельство о поверке изымают и оформляют извещение о непригодности с указанием причин в соответствии с приказом Минпромторга № 2510 от 20.11.2020.

12.4 После ремонта хроматографы подвергают поверке.

Начальник лаборатории



Е.В. Кулябина

Ведущий инженер

О.Н. Мелкова

Приложение 1

МЕТОДИКА ПРИГОТОВЛЕНИЯ КОНТРОЛЬНЫХ РАСТВОРОВ

Методика предназначена для приготовления контрольных растворов антрацена и кофеина.

1 ПРОЦЕДУРА ПРИГОТОВЛЕНИЯ

1.1 Приготовление контрольного раствора антрацена с массовой концентрацией 200 мг/дм³.

Взвешивают в стакане объемом 25 мл около 20 мг антрацена, добавляют в стакан 25 мл раствора А, перемешивают. Полученный раствор переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³. Ополаскивают стакан раствором А, переносят его в мерную колбу, доводят до метки, перемешивают.

Содержание антрацена в исходном растворе (C_0 , мг/дм³) рассчитывают по формуле

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

где m – масса антрацена, мг

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

1.2 Приготовление раствора антрацена в ацетонитриле с массовой концентрацией 2,5 мг/дм³

1,25 см³ ГСО состава антрацена или контрольный раствор антрацена (2.1) в ацетонитриле с массовой концентрацией 200 мг/дм³ помещают в мерную колбу вместимостью 100 см³.

Рассчитывают количественное содержание по формуле (2) массовая концентрация – 2,5 мг/дм³.

$$C_1 = \frac{C_0 \cdot V_n}{V}, \quad (2)$$

где C_0 – количественное содержание антрацена в растворе ГСО или растворе полученном в п 2.1;

V_n – объем отобранного раствора, $V_n = 1,25$ см³;

V – вместимость мерной колбы, 100 см³.

1.3 Приготовление раствора антрацена в ацетонитриле с массовой концентрацией 0,01 мг/дм³

1,0 см³ контрольного раствора антрацена в ацетонитриле с массовой концентрацией 2,5 мг/дм³ (2.2) помещают в мерную колбу вместимостью 250 см³.

Рассчитывают количественное содержание по формуле (3) массовая концентрация = 0,01 мг/дм³.

$$C_2 = \frac{C_1 \cdot V_n}{V}, \quad (3)$$

где C_1 – количественное содержание антрацена в растворе полученном в п 2.2.

V_n – объем отобранного раствора, $V_n = 1,0$ см³;

V – вместимость мерной колбы, 250 см³.

1.4 Приготовление раствора кофеина в ацетонитриле с массовой концентрацией 160 мг/дм^3

Взвешивают в стакане объемом 25 мл около 16 мг кофеина, добавляют в стакан 25 мл раствора А, перемешивают. Полученный раствор переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3 . Ополаскивают стакан раствором А, переносят его в мерную колбу, доводят до метки, перемешивают.

Содержание кофеина в растворе (C_1 , мг/дм^3) рассчитывают по формуле

$$C_1 = \frac{m}{V_{100} \cdot 10^{-3}} = \frac{m}{0,10}, \quad (4)$$

где m – масса кофеина, мг

V_{100} – вместимость мерной колбы, $V = 100 \text{ см}^3$.

1.5 Приготовление раствора кофеина в метаноле с массовой концентрацией 1000 мг/дм^3

Взвешивают в стакане объемом 25 мл около 100 мг кофеина, добавляют в стакан 25 мл раствора метанола (2.8), перемешивают. Полученный раствор переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3 . Ополаскивают стакан раствором метанола (2.8) три раза, и все смывы переносят в мерную колбу, доводят до метки, перемешивают.

Содержание кофеина в растворе (C_1 , мг/дм^3) рассчитывают по формуле (4).

1.6 Приготовление раствора «ацетонитрил : вода = 80 : 20»

В мерную колбу вместимостью 500 см^3 вносят 400 см^3 ацетонитрила, а затем переносят ацетонитрил в мерный цилиндр емкостью 500 см^3 .

В другой мерный цилиндр вместимостью 100 см^3 вносят 100 см^3 воды. Затем переносят примерно 50 см^3 воды в цилиндр с ацетонитрилом, перемешивают. Оставляют смесь на несколько минут до восстановления температуры смеси до комнатной, доливают до метки водой, перемешивают.

1.7 Приготовление раствора «ацетонитрил : вода = 10 : 90»

В мерную колбу вместимостью 50 см^3 вносят 50 см^3 ацетонитрила, а затем переносят ацетонитрил в мерный цилиндр емкостью 500 см^3 .

В другой мерный цилиндр вместимостью 500 см^3 вносят 450 см^3 воды. Затем переносят примерно 350 см^3 воды в цилиндр с ацетонитрилом, перемешивают. Оставляют смесь на несколько минут до восстановления температуры смеси до комнатной, доливают до метки водой, перемешивают.

1.8 Приготовление раствора «метанол : вода = 15,5 : 84,5»

В мерный цилиндр вместимостью 250 см^3 вносят 155 см^3 метанола, а затем переносят ацетонитрил в мерный цилиндр емкостью 1000 см^3 .

В другой мерный цилиндр вместимостью 1000 см^3 вносят 845 см^3 воды. Затем переносят примерно 750 см^3 воды в цилиндр с метанолом, перемешивают. Оставляют смесь на несколько минут до восстановления температуры смеси до комнатной, доливают до метки водой, перемешивают.