

**УТВЕРЖДАЮ**

**Заместитель директора ФГУП ВНИИМС**

**В.Н.Яншин**



**15 мая 2015 г.**

**Хроматографы жидкостные Nexera-i, Prominence-i**

**Методика поверки**

*н.р 61273-15*

**г. Москва  
2015 г.**

Настоящая методика распространяется на хроматографы жидкостные Nexera-i, Prominence-i фирмы "SHIMADZU CORPORATION", Япония, фирмы "SHIMADZU U.S.A. MANUFACTURING, INC.", США, (далее – хроматографы) и устанавливает методику их первичной и периодической поверок.

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 <sup>1)</sup>
- определение дрейфа нулевого сигнала	4.2.2	Да	Да <sup>1)</sup>
- определение отношения сигнал/шум Рамановского спектра воды	4.2.3	Да	Да
- определение предела детектирования	4.2.4	Да	Да <sup>1)</sup>
Определение метрологических характеристик:	4.3		
- определение относительного среднего квадратического отклонения (СКО) выходного сигнала	4.3.1	Да	Да <sup>1)</sup>
- определение относительного изменения параметров выходного сигнала за 8 ч непрерывной работы хроматографа	4.3.2	Да	Да <sup>1)</sup>
- определение показателей точности результатов измерений	4.3.3	Нет	Да <sup>2)</sup>

Примечание:

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

<sup>2)</sup>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/см<sup>3</sup>;
- ГСО 7346-96 состава фенола, массовая концентрация фенола 1 г/дм<sup>3</sup>;
- МСО 0389:2002 состава водного раствора глюкозы, молярная концентрация глюкозы 10,00 ммоль/дм<sup>3</sup>;
- кофеин с содержанием основного вещества не менее 98 %.

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 деионизованная), 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 405132.001ТУ;
- 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	20 ± 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 хроматографов.

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, дрейф нулевого сигнала, отношение сигнал/шум Рамановского спектра воды (флуориметрический детектор) 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 удастся 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 ( $\Delta x$ ) принимают равным амплитуде  $h$  повторяющихся колебаний нулевого сигнала с периодом не более 20 с. Программное обеспечение "LabSolution" позволяет получать значение уровня флуктуационных шумов с помощью функции "Параметры проверки базовой линии". 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
Встроенный спектрофотометрический детектор хроматографа Prominence-i LC-2030, LC-2030 C	вода	1	Длина волны 250 нм. постоянная времени 2 с. Температура проточной кварцевой ячейки детектора 40 °С. Ширина полосы пропускания $\pm 4$ нм. Длина волны сравнения ВЫКЛ. Ширина щели 8 нм.
Встроенный диодно-матричный детектор хроматографа Prominence-i LC-2030C 3D	вода		
Встроенный спектрофотометрический детектор хроматографа Nexera-i LC-2040 C	вода		
Встроенный диодно-матричный детектор хроматографа Nexera-i LC-2040C 3D	вода		
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 400 °С.
Электрохимические детекторы Decade Elite, Decade Lite	Ячейка заполненная воздухом или имитатор ячейки	-	$E_{ox} = 0,80$ V. Диапазон чувствительности 100 нА.
Флуориметрический RF-20A/20Axs (определение Рамановского спектра воды)	вода	1	Длина волны 350 нм (возб.). Длина волны 450 (эмис.). постоянная времени 0,5 с.

4.2.3 Рамановский спектр воды определяют в соответствии с руководством по эксплуатации флуориметрического детектора (раздел 7.5.6)

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/см<sup>3</sup> рассчитывают по формулам:

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

где  $V$  – скорость элюента, см<sup>3</sup>/мин;

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

$\Delta x$  – уровень флуктуационных шумов нулевого сигнала, определенный до ввода контрольного вещества;

$H$  – высота пика контрольного вещества;

$\Delta X$  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/дм<sup>3</sup>;

$V_{\text{доз.}}$  – 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.

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 <sup>3</sup>	Объем <sup>1)</sup> вводимой пробы, мкл	Элюент <sup>2)</sup>	Скорость потока элюента <sup>3)</sup> , см <sup>3</sup> /мин	Режимные параметры
Встроенный спектрофотометрический детектор хроматографа Prominence-i LC-2030, LC-2030 C	Раствор кофеина в воде 20 мг/дм <sup>3</sup>	5	Ацетонитрил : вода в объемном соотношении 1: 4	1	Длина волны 272 нм. Температура термостага колонки 400 °С. Температура проточной кварцевой ячейки детектора 400 °С. Хроматографическая колонка Shim-pack XR-ODS II 150 x 3 мм. Постоянная времени 0,320 с. Ширина щели 8 нм.
Встроенный диодно-матричный детектор хроматографа Prominence-i LC-2030C 3D					
Встроенный спектрофотометрический детектор хроматографа Nexera-i LC-2040 C 3D					
Встроенный диодно-матричный детектор хроматографа Nexera-i LC-2040C					
Рефрактометрический RID-20A	Водный раствор глюкозы 90 мг/дм <sup>3</sup>	10	Ацетонитрил : вода в объемном соотношении 3:1 или элюент, подходящий для используемой колонки	1	Температура термостага колонки 400 °С. Температура ячейки детектора 400 °С. Хроматографическая колонка Supelcosil-LC-NH2 (250 мм x 4,6 мм), заполненная модифицированными частицами силикагеля размером около 5 мкм или любая колонка, обеспечивающая удержание глюкозы. Постоянная времени 1,5 с.
	Раствор антрацена в гептане 100 мг/дм <sup>3</sup> .	10	Гептан	1	Постоянная времени 1,5 с. Колонка, заполненная нормально-фазовым сорбентом, например, Supelcosil-LC-NH2 или аналогичная с другими размерами.

Наименование детектора/хроматографа	Контрольный раствор, массовая концентрация, мг/дм <sup>3</sup>	Объем <sup>1)</sup> вводимой пробы, мкл	Элюент <sup>2)</sup>	Скорость потока элюента <sup>3)</sup> , см <sup>3</sup> /мин	Режимные параметры
Рефрактометрический RID-20A	Раствор кофеина 250 мг/дм <sup>3</sup>	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 <sup>3</sup>	20	Ацетонитрил/ацетатный буфер (pH=5) в объемном соотношении 33:67	1	Eox = 0,80 V. Диапазон чувствительности 20 нА.
Флуориметрические детекторы RF-20A/20Axs	Раствор антрацена в ацетонитриле 1 мг/дм <sup>3</sup>	5	Ацетонитрил : вода в объемном соотношении 4:1	1	Температура термостата колонки 400 °С. Температура. ячейки 30 °С (только для RF-20Axs). Длина волны возбуждения 360 нм. Длина волны эмиссии 450 нм. Отклик 3 (0.5 с). 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.

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

<sup>2)</sup> 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).

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

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 ПР 50.2.006-94.

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 ПР 50.2.006-94.

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/см<sup>3</sup>.
- 1.2 ГСО 7346-96 состава фенола, массовая концентрация фенола 1 г/дм<sup>3</sup>.
- 1.3 МСО 0389:2002 состава водного раствора глюкозы (10,00 ммоль/дм<sup>3</sup>).
- 1.4 Кофеин фармакопейный; содержание основного вещества не менее 98 %.
- 1.5 Весы лабораторные по ГОСТ OIML R 76-1-2011, с наибольшим пределом взвешивания 200 г.
- 1.6 Колбы мерные наливные 2-100-2, 2-200-2 по ГОСТ 1770-74.
- 1.7 Пипетки градуированные 1-2-2-1, 1-2-2-10 по ГОСТ 29227- 91 (I).
- 1.8 Стаканы В-1-50ТС по ГОСТ 25336-82.
- 1.9 Вода для лабораторного анализа (бидистиллированная или деионизованная), ГОСТ Р 52501- 2005.
- 1.10 Дистиллированная вода по ГОСТ 6709-72.

### 2 ПРОЦЕДУРА ПРИГОТОВЛЕНИЯ

- 2.1 Приготовление раствора с массовой концентрацией фенола 5 мг/дм<sup>3</sup>
  - 2.1.1 Пипеткой вместимостью 1 см<sup>3</sup> переносят 1 см<sup>3</sup> ГСО фенола в этаноле в мерную колбу вместимостью 200 см<sup>3</sup> и доводят содержимое колбы до метки ацетонитрилом.
- 2.2. Приготовление раствора глюкозы с массовой концентрацией 90 мг/дм<sup>3</sup>
  - 10 см<sup>3</sup> МСО раствора глюкозы пипеткой вместимостью 10 см<sup>3</sup> переносят в мерную колбу вместимостью 200 см<sup>3</sup> и доводят содержимое колбы до метки деионизированной водой.
- 2.3 Приготовление контрольных растворов антрацена
  - 2.3.1 Приготовление раствора антрацена в ацетонитриле
    - 1 см<sup>3</sup> ГСО состава антрацена в ацетонитриле с массовой концентрацией 200 мг/дм<sup>3</sup> помещают в мерную колбу вместимостью 200 см<sup>3</sup>.
    - Массовая концентрация антрацена – 1 мг/дм<sup>3</sup>.
- 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 см<sup>3</sup>. Ополаскивают стакан дистиллированной водой, переносят ее в мерную колбу, доводят до метки дистиллированной деионизированной водой, перемешивают.
  - Содержание кофеина в исходном растворе ( $C_0$  мг/дм<sup>3</sup>) 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,  $V = 100$  см<sup>3</sup>.

2.4.2 Приготовление аттестованного раствора кофеина с массовой концентрацией 10 мг/дм<sup>3</sup>.

1 см<sup>3</sup> исходного раствора кофеина переносят пипеткой вместимостью 1 см<sup>3</sup> в мерную колбу вместимостью 200 см<sup>3</sup>. Доводят дистиллированной деионизированной водой до метки, перемешивают.

## ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Прибор (детектор)	Уровень флуктуационных шумов	Дрейф нулевого сигнала	Предел детектирования, не более
LC-2030, LC-2030C	$2 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$3 \cdot 10^{-10}$ г/см <sup>3</sup> (по кофеину)
LC-2040C	$3 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$3 \cdot 10^{-10}$ г/см <sup>3</sup> (по кофеину)
LC-2030C 3D	$5 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^{-3}$	$3 \cdot 10^{-10}$ г/см <sup>3</sup> (по кофеину)
LC-2040C 3D	$7,5 \cdot 10^{-4}$	$4 \cdot 10^{-3}$	$3 \cdot 10^{-10}$ г/см <sup>3</sup> (по кофеину)
RID-20A	$1 \cdot 10^{-7}$ ед.рефр.	$5 \cdot 10^{-7}$ ед.рефр./ч	$2 \cdot 10^{-6}$ г/см <sup>3</sup> (по глюкозе) $3 \cdot 10^{-6}$ г/см <sup>3</sup> (по антрацену) $1 \cdot 10^{-6}$ г/см <sup>3</sup> (по кофеину)
Decade Elite, Decade Lite	$2 \cdot 10^{-12}$ А	-	$5 \cdot 10^{-10}$ г/см <sup>3</sup> (по фенолу)
RF-20A			Отношение сигнал:шум для Рамановского спектра дистиллированной воды 600:1
RF-20Axs			Отношение сигнал/ шум для Рамановского спектра дистиллированной воды 1000:1

## ПРИЛОЖЕНИЕ В

Прибор (детектор)	Относительное СКО выходного сигнала (%)		Относительное изменение выходного сигнала за 8 часов непрерывной работы
	Время удерживания	Площадь пика	
Хроматографы с детекторами: LC-2030, LC-2030C, LC-2040C, LC-2030C 3D, LC-2040 3D	0,5	1	± 2
RID-20A	1	2	± 2
Decade Elite, Decade Lite	1	3	± 5
RF-20A, RF-20Axs	0,5	2	± 4