

СОГЛАСОВАНО

Заместитель директора ФГБУ «ВНИИМС»

Ф.В. Бульгин

«30» 01 2023 г.



Государственная система обеспечения единства измерений
Хроматографы жидкостные УВЭЖХ Elite
Методика поверки

МП 009-35-22

Москва

2023 г.

1 ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Настоящая методика распространяется на хроматографы жидкостные УВЭЖХ Elite с детектором на диодной матрице DAD и рефрактометрическим детектором RID и устанавливает методику их первичной и периодической поверки.

Используемые средства поверки - СО состава кофеина обеспечивает прослеживаемость хроматографов к единице величины «массовая доля», воспроизводимой ГЭТ 208 Государственным первичным эталоном единиц массовой (молярной) доли и массовой (молярной) концентрации органических компонентов в жидких и твердых веществах и материалах на основе жидкостной и газовой хромато-масс-спектрометрии с изотопным разбавлением и гравиметрии, обеспечена проведением прямых измерений на ГВЭТ 208-1 Государственном вторичном эталоне единиц массовой доли и массовой (молярной) концентрации органических компонентов в жидких и твердых веществах и материалах на основе газовой и жидкостной хроматографии, а СО состава раствора антрацена в ацетонитриле обеспечивает прослеживаемость хроматографов к ГПЭ единицы массы-килограмма – ГЭТ 3-2020, что обеспечивается посредством использования поверенных весов через неразрывную цепь поверок в соответствии с ГПС для СИ массы, утвержденной приказом Росстандарта № 1622 от 04.07.2022 г.

2. ОПЕРАЦИИ ПОВЕРКИ

2.1. При проведении поверки должны выполняться операции, указанные в таблице 1.

Таблица 1

Наименование операции поверки	Обязательность выполнения операции поверки при		Номер пункта методики поверки, в соответствии с которым выполняется операция поверки
	первичной поверке	периодической поверке	
Внешний осмотр	Да	Да	7.1
Контроль условий поверки (при подготовке к поверке и опробовании средства измерений)	Да	Да	7.2
Опробование	Да	Да	7.3
Проверка идентификационных данных программного обеспечения	Да	Да	7.4
Определение метрологических характеристик:	Да	Да	7.5-6.6
– Определение чувствительности(отношения сигнал/шум)	Да	Да	7.5
– Определение относительного среднего квадратического отклонения выходного сигнала (площади пика) при вводе пробы через хроматограф	Да	Да	7.6

Подтверждение соответствия метрологических требованиям	Да	Да	8
--	----	----	---

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

3. МЕТРОЛОГИЧЕСКИЕ И ТЕХНИЧЕСКИЕ ТРЕБОВАНИЯ К СРЕДСТВАМ ПОВЕРКИ

3.1. При проведении поверки применяют основные и вспомогательные средства поверки, указанные в таблице 2.

Таблица 2

Операции поверки, требующие применение средств поверки	Метрологические и технические требования к средствам поверки, необходимые для поверки	Перечень рекомендуемых средств поверки
п. 5.2 Подготовка контрольных растворов	Средство измерений массы по ГОСТ OIML R 76-1-2011 с верхним пределом взвешивания 200 г класса точности 1 - специальный	Весы СРА225D-0СЕ, рег. №54391-13
	Средства измерений объема вместимостью 100 мл, 2-го класса точности по ГОСТ 1770-74	Колбы мерные вместимостью 100 мл
	Средства измерений объема вместимостью 100 мл и 1000 мл, 2-го класса точности по ГОСТ 1770-74	цилиндры 2-100-2, 2-500-2, 2-1000-2
	Средства измерений объема вместимостью до 1 мл и до 10 мл 1-го класса точности по ГОСТ 29227-91	пипетки градуированные 1-1-1-1, 1-2-1-10
	Стандартный образец состава кофеина с аттестованным значением массовой доли 99,97 %	ГСО № 11872-2022
	Стандартный образец состава раствора антрацена в ацетонитриле массовая концентрация антрацена 0,200 мг/см ³	ГСО № 8749-2006
	Средства измерений объема вместимостью 50 мл со шкалой по ГОСТ 25336-82	Стаканы В-1-50ТС
	квалификация «ос.ч» по ТУ 6-09-5449-89	Ацетонитрил для жидкостной хроматографии
	ГОСТ Р 52501-2005	Вода для лабораторного анализа
п. 7.5 Определение метрологических характеристик	С18 (4,6 x 250 мм, 5 мкм)	Хроматографическая колонка
п. 7.2 Проверка условия проведения поверки	Рабочие средства измерений температуры окружающего воздуха по ГПС в соответствии с ГОСТ 8.558-2009. Диапазон измерений температуры от 0 до	Измеритель комбинированный Testo 176-P1 ФИФ №48550-11

	+ 50 °С, предел допускаемой погрешности измерений ± 0,5 °С Рабочие средства измерений относительной влажности окружающего воздуха по ГПС в соответствии с приказом Росстандарта от 15 декабря 2021 г. № 2885. Рабочие средства измерений атмосферного давления по ГПС в соответствии с приказом Росстандарта от 6 декабря 2019 г. № 2900	
Допускается использовать при поверке другие утвержденные и аттестованные эталоны единиц величин, средства измерений утвержденного типа и поверенные, утвержденного типа стандартные образцы, удовлетворяющие метрологическим требованиям, указанным в таблице.		

4. УСЛОВИЯ ПОВЕРКИ

4.1 При проведении поверки соблюдают следующие условия:

– температура окружающего воздуха, °С	от 15 до 25
– атмосферное давление, кПа	от 84 до 106,0
– относительная влажность воздуха, %	от 20 до 80

5. ПОДГОТОВКА К ПОВЕРКЕ

5.1 Подготовку хроматографа к поверке выполняют в соответствии с Руководством по эксплуатации.

5.2. Перед проведением поверки готовят контрольные растворы по методике, указанной в приложении А. Назначение растворов и содержание в них анализируемых компонентов и условия приведены в таблице 2.

Таблица 2

Устанавливаемые параметры	Детектор	
	DAD	RID
Постоянная времени, с	1	-
Раствор	антрацена в ацетонитриле	кофеина в метаноле
Массовая концентрация контрольного вещества, мг/дм ³	2,5	1000
Объем дозирования пробы, мм ³	10	4
Элюент	ацетонитрил 80 % : вода 20 %	метанол 15,5 % : вода 84,5 %
Скорость потока, см ³ /мин	0,4	1,4
Длина волны, нм	254	-

6. ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ

6.1 Требования безопасности должны соответствовать рекомендациям, изложенным в Руководстве по эксплуатации хроматографов жидкостных УВЭЖХ Elite.

6.2 К проведению поверки допускаются лица, имеющие опыт работы с жидкостными хроматографами, изучившие НД по их эксплуатации и методику поверки, имеющие техническое образование и навыки работы с прибором.

7. ПРОВЕДЕНИЕ ПОВЕРКИ

7.1. Внешний осмотр

При внешнем осмотре устанавливают:

- соответствие комплектности хроматографа паспортным данным;
- четкость маркировки, включая наличие на хроматографе обозначения (наименования) и заводского номера;
- отсутствие внешних повреждений и дефектов, влияющих на работоспособность хроматографа.

Хроматограф считают выдержавшим внешний осмотр, если он соответствует перечисленным выше требованиям.

7.2. Проверяют условия проведения поверки

7.3. Опробование

При опробовании хроматографа необходимо проделать следующие операции:

- включить питание прибора;
- осуществить прогрев прибора в соответствии с техническим описанием на прибор;
- установить поток $1 \text{ см}^3/\text{мин}$ и проверить отсутствие течей подвижной фазы в местах соединений;
- удостовериться в стабильности давления подвижной фазы на входе в колонку при скорости потока $1 \text{ см}^3/\text{мин}$.

Хроматограф допускается к дальнейшей поверке, если результаты тестирования положительные.

7.4. Проверка идентификационных данных ПО

Запускают ПО Kromstation, открывают вкладку About (выделена красным) и считывают идентификационные данные ПО.

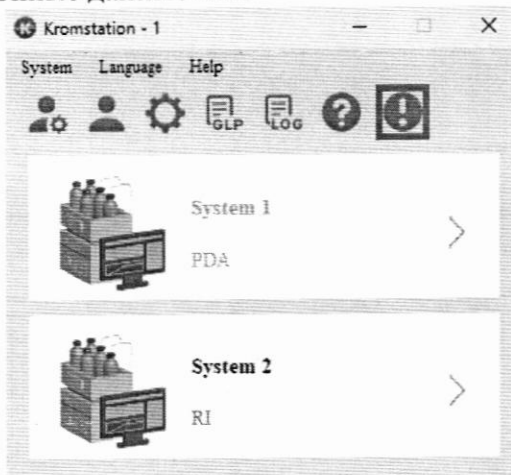


Рисунок 1- Главное окно ПО

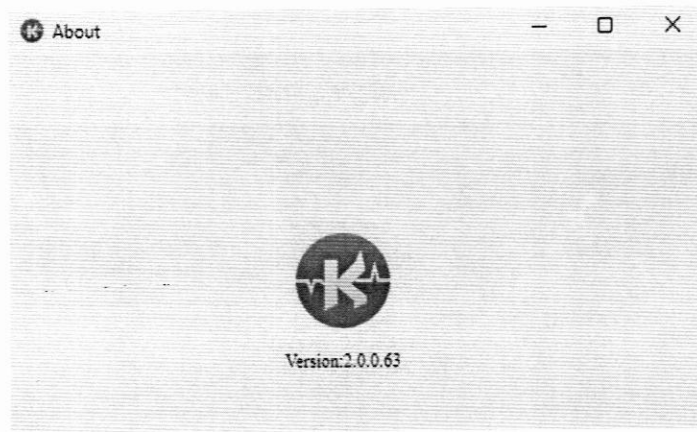


Рисунок 2- Окно с идентификационными данными ПО

С помощью программного комплекса **Windows Power Shell ISE** вычисляют цифровой идентификатор подпрограммы **Core.dll**, расположенной в папке lib программного обеспечения Kromstation:

Для вычисления контрольной суммы выделяют значок подпрограммы **Core.dll** в папке Kromstation/lib и правой кнопкой мыши выбирают вкладку свойства (**Properties**). В свойствах выбирают вкладку **Shortcut**. Из строчки **target** вкладки копируют путь к исполняемому файлу –рисунок 3.

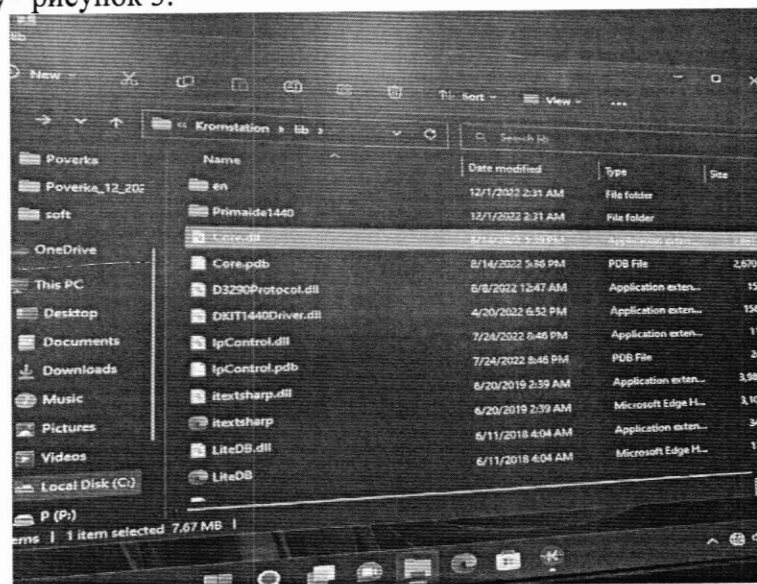


Рисунок 2- расположение метрологически значимого файла **Core.dll**

Через кнопку **Пуск** находят папку **Windows Power Shell** и запускают из нее программу **Windows Power Shell ISE** – рисунок 3.

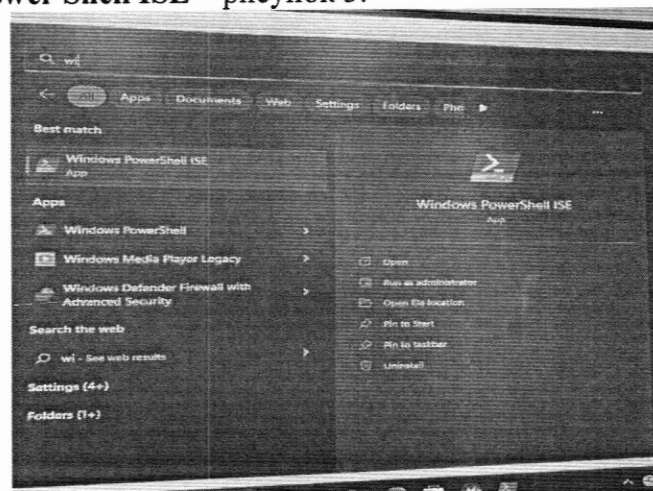


Рисунок 3 – Запуск программы Windows Power Shell ISE

После запуска программы Windows Power Shell ISE во вкладке **Commands** в меню команд кликают строку **Gett-FileHash** – рисунок 4.

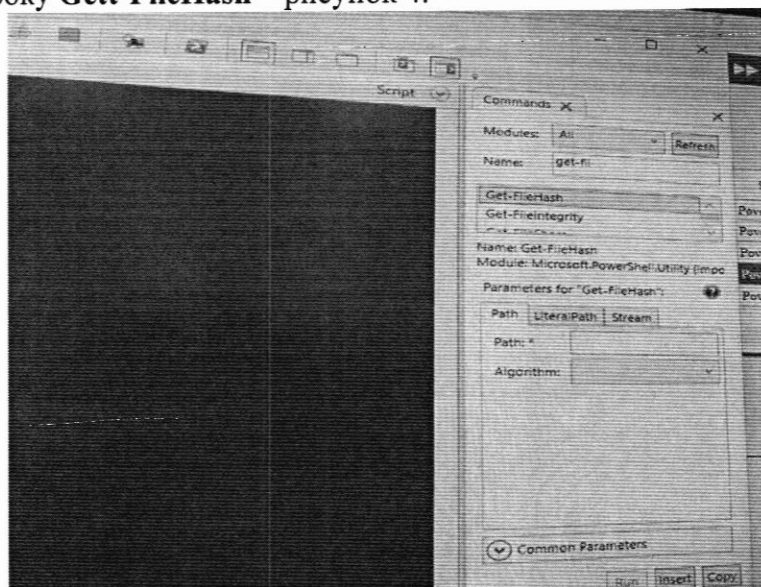


Рисунок 4 – выбор команды из меню программы Windows Power Shell ISE

В открывшемся окне вставляют в строчку **Path** скопированный ранее «ПУТЬ К ФАЙЛУ\ «НАЗВАНИЕ ФАЙЛА» в кавычках.

Выбирают **Algorithm** – **MD5** и нажимают в правом углу кнопку **Run**. В синем окне появляется контрольная сумма – рисунок 5.

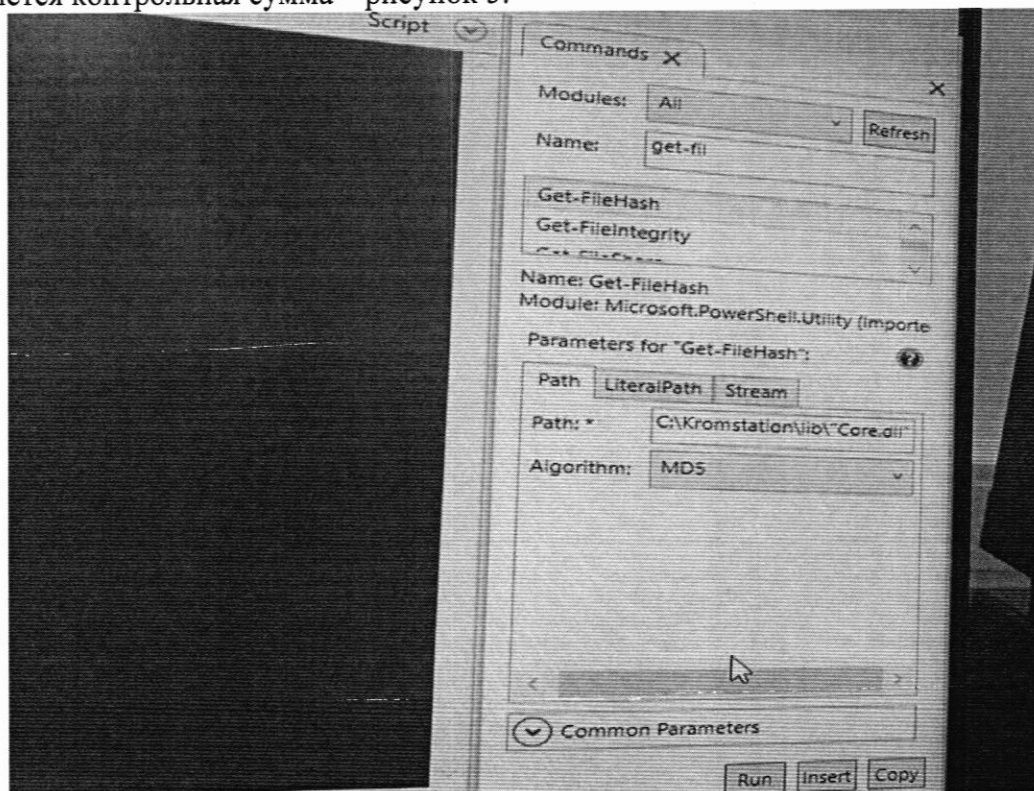


Рисунок 5 – выбор алгоритма вычисления контрольной суммы.

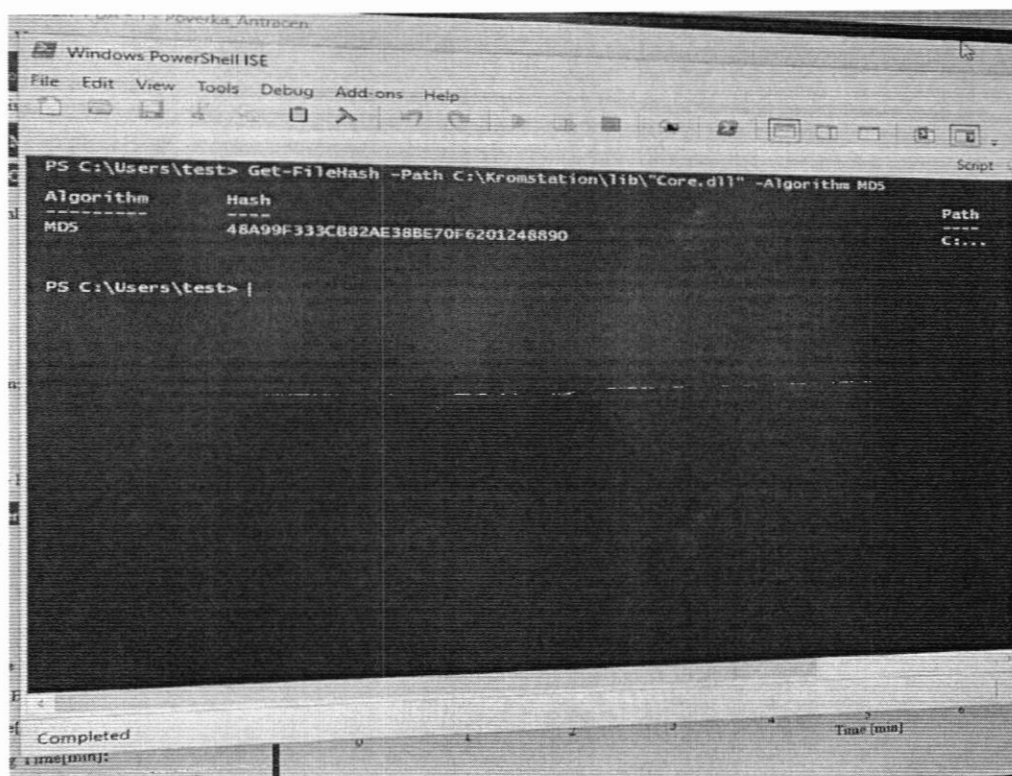


Рисунок 6 - вычисленная программой Windows Power Shell ISE контрольная сумма метрологически значимой подпрограммы Core.dll

7.5. Определение метрологических характеристик

7.5.1. Определение уровня флуктуационных шумов и дрейфа нулевого сигнала.

Хроматографы готовят к работе в соответствии с инструкцией по эксплуатации. После присоединения колонки, хроматограф выдерживают 1 час (для уравнивания всех процессов, протекающих в колонке) до момента записи шума и дрейфа нулевого сигнала.

Определение производят при условиях, указанных в таблице 3.

Таблица 3

Устанавливаемые параметры	Детектор	
	DAD	RID
Постоянная времени, с	1	-
Элюент	ацетонитрил 80 % : вода 20 %	метанол 15,5 % : вода 84,5 %
Скорость потока, см ³ /мин	0,4	1,4
Длина волны, нм	254	-

Уровень флуктуационных шумов нулевого сигнала (Δx) измеряют в течение 30 минут после выхода прибора на режим методом peak to peak.

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

7.5.2. Определение предела детектирования.

Предел детектирования определяют при условиях, указанных в таблице 2.

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

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

Предел детектирования рассчитывают по формуле (1)

$$C_{\text{мин.}} = \frac{2 \cdot \Delta x \cdot G}{h \cdot \mu_{0,5} \cdot V} \text{ или } C_{\text{мин.}} = \frac{2 \cdot \Delta x \cdot G}{S \cdot V} \quad (1)$$

где G – масса вещества, г; $G = C \cdot V$ (C – массовая концентрация контрольного вещества, мг/дм³, V – объем дозы, дм³)

V – скорость потока элюента, см³/мин;

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

Δx – уровень флуктуационных шумов нулевого сигнала, определенный по п.6.4.1, е.о.п. или единиц. рефр.; уровень флуктуационных шумов определяют на участке нулевой линии до ввода контрольного вещества;

h – значение высоты пика контрольного вещества, е.о.п. или единиц.рефр.;

S – значение площади пика контрольного вещества, е.о.п.·с или единиц.рефр.·с.

7.5.3. Определение относительного среднего квадратического отклонения (СКО) выходного сигнала.

Измерения проводят после выхода хроматографа на режим. Колонку выбирают в соответствии с разделом 2, элюент и типовое вещество выбирают в соответствии с таблицей 2.

Контрольный раствор вводят в хроматограф не менее 6 раз, измеряют значения выходного сигнала (X_i) (площади пика, высоты пика и времени удерживания) и вычисляют их среднее арифметическое значение (\bar{X}).

Относительное СКО выходного сигнала (площади пика, высоты пика и времени удерживания) (σ) рассчитывают по формуле (2)

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

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

X_i – значение параметра выходного сигнала (площади пика, высоты пика и времени удерживания);

n – число измерений.

7.5.4. Определение относительного изменения выходного сигнала за 4 часа непрерывной работы.

Проводят операции, описанные в разделе 6.5.4. Через 4 часа непрерывной работы повторяют измерения. Относительное изменение выходного сигнала за 4 часа непрерывной работы хроматографа рассчитывают по формуле (3)

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

где \bar{X} – среднее арифметическое значение параметра выходного сигнала (площади пика); \bar{X}_t – среднее арифметическое значение параметра выходного сигнала (площади пика), полученное через 4 часа непрерывной работы.

8. ПОДТВЕРЖДЕНИЕ СООТВЕТСТВИЯ СРЕДСТВА ИЗМЕРЕНИЙ МЕТРОЛОГИЧЕСКИМ ТРЕБОВАНИЯМ

Хроматограф считается прошедшим поверку, если выполняются условия, изложенные в пунктах 8.1-8.6.

8.1 Условия поверки соответствуют п. 4.1

8.2 Идентификационные данные соответствуют указанным в таблице 4.

Таблица 4 – Идентификационные данные программного обеспечения

Идентификационные данные (признаки)	Значение
Наименования программного обеспечения	Kromstation
Идентификационное наименование ПО	Kromstation.exe
Номер версии (идентификационный номер) ПО	Не ниже Kromstation 2.0.0.63
Цифровой идентификатор подпрограммы Core.dll	48A99F333CB82AE38BE70F6201248890
Алгоритм вычисления	MD5

8.3 Полученные значения уровня флуктуационных шумов и дрейфа нулевого сигнала не превышают значений, приведенных в таблице 5.

Таблица 5

Детектор	Уровень флуктуационных шумов нулевого сигнала	Дрейф нулевого сигнала
на диодной матрице DAD	$5 \cdot 10^{-5}$ е.о.п.	$1 \cdot 10^{-2}$ единиц.рефр./ч
рефрактометрический RID	$2 \cdot 10^{-8}$ единиц.рефр.	$1 \cdot 10^{-5}$ единиц.рефр.

8.4 Полученные значения предела детектирования не превышают значений, приведенных в таблице 6.

Таблица 6

Детектор	Предел детектирования, г/см ³
на диодной матрице DAD	$2 \cdot 10^{-8}$
рефрактометрический RID	$1 \cdot 10^{-6}$

8.5 Полученные значения относительного СКО выходного сигнала (σ) хроматографа не должны превышать значений, приведенных в таблице 7.

8.6 Полученные значения относительного изменения выходного сигнала за 4 часа непрерывной работы хроматографа не должны превышать значений, приведенных в таблице 7.

Таблица 7

Детектор	Предел допускаемого относительного СКО выходного сигнала, %		Пределы допускаемого относительного изменения выходного сигнала за 4 часа непрерывной работы, %
	площади высоты пика	времени удерживания	
на диодной матрице DAD	2	1	±3
рефрактометрический RID	3	2	±5

9. ОФОРМЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ПОВЕРКИ

9.1 Положительные результаты поверки хроматографов оформляют в соответствии с приказом Минпромторга РФ № 2510 от 20.11.2020 г.

9.2 Хроматограф, не удовлетворяющий требованиям настоящей методики поверки, к эксплуатации не допускается.

9.3 Сведения о результатах поверки передаются в Федеральный информационный фонд по обеспечению единства измерений. По заявке Заказчика допускается выдача извещения о непригодности с указанием причин непригодности.

9.4 После ремонта хроматографы подвергают поверке.

Начальник лаборатории



Е.В. Кулябина

МЕТОДИКА ПРИГОТОВЛЕНИЯ КОНТРОЛЬНЫХ РАСТВОРОВ

А.1 СРЕДСТВА ИЗМЕРЕНИЙ, ПОСУДА, РЕАКТИВЫ

А.1.1 ГСО 8749-2006 состава раствора антрацена в ацетонитриле, массовая концентрация антрацена 0,200 мг/см³.

А.1.2 ГСО состава кофеина 11872-2022 с аттестованным значением массовой доли %

А.1.3 Весы лабораторные по ГОСТ 24104-01, с верхним пределом взвешивания 200 г.

А.1.4 Колбы мерные наливные 2-100-2, 2-200-2, 2-500-2, 2-1000-2 по ГОСТ 1770-74.

А.1.5 Пипетки градуированные 1-2-1-1, 1-2-2-10 по ГОСТ 29227 (I).

А.1.6 Стаканы В-1-50ТС по ГОСТ 25336-82.

А.1.7 Вода для лабораторного анализа, ГОСТ Р 52501-2005.

А.1.8 Ацетонитрил для жидкостной хроматографии, квалификация «ос.ч» по ТУ 6-09-5449-89.

А.2 ПРОЦЕДУРА ПРИГОТОВЛЕНИЯ

А.2.1 Приготовление контрольных растворов

А.2.1.1 Приготовление контрольного раствора антрацена в ацетонитриле с массовой концентрацией антрацена 2,5 мг/дм³.

Взвешивают в стакане около 100 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

$$C_0 = \frac{m}{V_{100} \cdot 10^{-3}} = \frac{m}{0,1} \quad (4),$$

где m – масса антрацена, мг

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

10 см³ исходного раствора антрацена переносят пипеткой вместимостью 10 см³ в мерную колбу вместимостью 100 см³. Доводят раствором А до метки, перемешивают.

Массовую концентрацию в мг/дм³ антрацена в контрольном растворе (C_1) находят следующим образом:

$$C_1 = \frac{C_0 \cdot V_n}{V}, \quad (5)$$

где V_n – вместимость пипетки, $V_n = 10$ см³;

V – вместимость мерной колбы, см³.

А.2.1.2 Приготовление контрольного раствора кофеина с массовой концентрацией 1000 мг/дм³.

Взвешивают в стакане около 100 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

$$C_0 = \frac{m}{V_{100} \cdot 10^{-3}} = \frac{m}{0,1} \quad (6),$$

где m – масса антрацена, мг

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

10 см^3 исходного раствора антрацена переносят пипеткой вместимостью 10 см^3 в мерную колбу вместимостью 100 см^3 . Доводят раствором А до метки, перемешивают.

Массовую концентрацию в мг/дм^3 антрацена в контрольном растворе (C_1) находят следующим образом:

$$C_1 = \frac{C_0 \cdot V_n}{V}, \quad (7)$$

где V_n – вместимость пипетки, $V_n = 10 \text{ см}^3$;

V – вместимость мерной колбы, см^3 .

А.2.2 Приготовление растворов элюентов

А.2.2.1 Приготовление раствора элюента ацетонитрил 80 % : вода 20 %.

В мерную колбу вместимостью 100 см^3 вносят 100 см^3 воды, а затем переносят воду в мерный цилиндр емкостью 500 см^3 .

В другой мерный цилиндр вместимостью 500 см^3 вносят 400 см^3 ацетонитрила. Затем переносят примерно 300 см^3 ацетонитрила в цилиндр с водой, перемешивают. Оставляют смесь на несколько минут до восстановления температуры смеси до комнатной, доливают до метки ацетонитрилом, перемешивают.

А.2.2.2 Приготовление раствора элюента метанол 15,5 % : вода 84,5 %.

В мерную колбу вместимостью 200 см^3 вносят 155 см^3 метанола, затем метанол переносят в мерный цилиндр емкостью 1000 см^3 .

В другой мерный цилиндр вместимостью 1000 см^3 вносят 900 см^3 воды. Затем переносят примерно 500 см^3 воды в цилиндр с метанолом, перемешивают. Оставляют смесь на несколько минут до восстановления температуры смеси до комнатной, доливают до метки водой, перемешивают.