

Федеральное государственное унитарное предприятие
«Всероссийский научно-исследовательский институт метрологии им. Д.И. Менделеева»
ФГУП «ВНИИМ им.Д.И.Менделеева»

УТВЕРЖДАЮ
И.о. директора ФГУП
«ВНИИМ им. Д. И. Менделеева»
А.Н. Пронин
М.п. «2» _____ 2019 г.

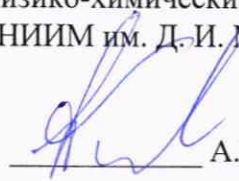


Государственная система обеспечения единства измерений

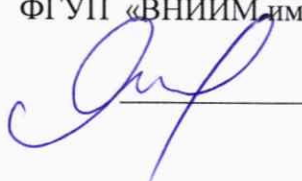
Хроматографы жидкостные Flexar

Методика поверки
МП-242-2297-2019

Заместитель руководителя отдела госэталонов
в области физико-химических измерений
ФГУП "ВНИИМ им. Д.И. Менделеева"


А.В. Колобова

Старший научный сотрудник
ФГУП «ВНИИМ им.Д.И.Менделеева»


М.А. Мешалкин

г. Санкт-Петербург
2019

Настоящая методика поверки распространяется на жидкостные хроматографы Flexar со следующими типами детекторов:

- сканирующий спектрофотометрический детектор (UV-Vis Detector);
- спектрофотометрический детектор с диодной матрицей (PDA Detector);
- рефрактометрический детектор (RI Detector);
- флуоресцентный детектор (FL Detector)

и устанавливает методы и средства их первичной поверки после ввода в эксплуатацию и после ремонта и периодической поверки в процессе эксплуатации. Интервал между поверками - 1 год.

1 ОПЕРАЦИИ ПОВЕРКИ

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

Таблица 1

Наименование операции	Номер пункта методических указаний	Обязательное проведение операции	
		в эксплуатации	после ремонта
Подготовка к поверке	5	да	да
Внешний осмотр	6.1	да	да
Опробование	6.2	да	да
Подтверждение соответствия программного обеспечения	6.2.2	да	да
– определение уровня флуктуационных шумов нулевого сигнала и дрейфа нулевого сигнала	6.2.3-6.2.6	да ¹⁾	да ¹⁾
– определение пределов детектирования детекторов	6.2.7	да ¹⁾	да ¹⁾
Определение метрологических характеристик:	6.3	да	да
– определение относительного среднего квадратичного отклонения выходного сигнала	6.3.1– 6.3.4	да ¹⁾	да ¹⁾
– определение относительного изменения выходного сигнала за 4 часа непрерывной работы	6.3.5– 6.3.6	да ¹⁾	да ¹⁾
Определение метрологических характеристик по НД на методики (методы) измерений	–	да ²⁾	нет
Примечания:			
1) При отсутствии НД на методику (метод) измерений по ГОСТ 8.563-2009.			
2) При наличии НД на методику (метод) измерений по ГОСТ 8.563-2009.			

При наличии нормативных документов по ГОСТ 8.563-2009 на методику выполнения измерений опробование хроматографов проводят путем проверки их работоспособности в соответствии с НД на них, а определение метрологических характеристик, в соответствии с МИ 2531-99 «Анализаторы состава веществ и материалов универсальные. Общие требования к методикам поверки в условиях эксплуатации», проводится с использованием образцов для контроля (ГСО, аттестованные смеси), материалов, реактивов, вспомогательного оборудования в соответствии с требованиями НД на МВИ. При выполнении поверки с использованием МВИ, пункты, отмеченные индексом ¹⁾ в таблице 1, не выполняются.

Поверка проводится только для тех детекторов, которые установлены на поверяемом приборе или в соответствии с указанными в заявке на поверку.

2 СРЕДСТВА ПОВЕРКИ, РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ

2.1. Основные средства поверки:

- ГСО 7814-2000 или ГСО 7333-96 СО состава толуола или толуол (ч.д.а.) по ГОСТ 5789-78.
- ГСО 8749-2006 СО состава раствора антрацена в ацетонитриле.
- Сахароза (ч.д.а. или х.ч.) по ГОСТ 5833-75.

2.2. Растворители для приготовления поверочных растворов

Ацетонитрил для жидкостной хроматографии по ТУ 6-09-14-2167-84.

Вода для лабораторного анализа (бидистиллированная или деионизированная), ГОСТ Р 652501-2005.

2.3. Вспомогательные средства поверки.

Колбы мерные второго класса точности с притертой пробкой по ГОСТ 1770-74.

Пипетки второго класса точности ГОСТ 29227-91.

1-канальные механические дозаторы с переменным объемом дозирования.

Весы лабораторные высокого класса точности по ГОСТ OIML R 76-1-2011.

Барометр, зарегистрированный в Федеральном информационном фонде по обеспечению единства измерений.

Термогигрометр электронный или гигрометр психометрический, зарегистрированные в Федеральном информационном фонде по обеспечению единства измерений.

Колонка для ВЭЖХ/УВЖЭХ (С-18) длина 3 - 25 см, внутренний диаметр 2.1-4.6 мм, размер частиц наполнителя 1.9-5 мкм.

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

3 ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ

Требования безопасности должны соответствовать рекомендациям, изложенным в Руководстве по эксплуатации.

4 УСЛОВИЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПОВЕРКИ

При проведении поверки соблюдают следующие условия:

- температура окружающего воздуха, °С 20 ± 5
- относительная влажность воздуха, % Не более 80

5. Подготовка к поверке и требования к квалификации поверителей

5.1. Приготовить необходимый контрольный раствор, указанный в таблице 2. Методика приготовления контрольных растворов приведена в приложении А к настоящей методике поверки.

Таблица 2

Наименование смеси	Концентрация анализируемого компонента	Детектор
1. Антрацен в ацетонитриле	$1 \times 10^{-7} - 1 \times 10^{-5}$ г/мл	сканирующий спектрофотометрический детектор (UV-Vis Detector), спектрофотометрический детектор с диодной матрицей (PDA Detector)
2. Антрацен в ацетонитриле	$2 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-2}$ г/мл	рефрактометрический детектор (RI Detector)
3. Антрацен в ацетонитриле	$1 \times 10^{-9} - 1 \times 10^{-7}$ г/мл	флуоресцентный детектор (FL Detector)
4. Толуол в ацетонитриле	$2 \times 10^{-5} - 2 \times 10^{-3}$ г/мл	сканирующий спектрофотометрический детектор (UV-Vis Detector), спектрофотометрический детектор с диодной матрицей (PDA Detector)

5. Толуол в ацетонитриле	$2 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-2}$ г/мл	рефрактометрический детектор (RI Detector)
6. Толуол в ацетонитриле	$5 \times 10^{-7} - 2 \times 10^{-5}$ г/мл	флуоресцентный детектор (FL Detector)
7. Сахароза в воде	$2 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-3}$ г/мл	рефрактометрический детектор (RI Detector)

5.2. К проведению измерений по поверке допускаются лица, изучившие руководство по эксплуатации и методику поверки детектора.

Для получения данных, необходимых для поверки, допускается участие операторов, обслуживающих детектор (под контролем поверителя).

5.3 Поверка проводится с использованием одного из вышеприведенных контрольных растворов для каждого конкретного детектора (по выбору владельца).

6. ПРОВЕДЕНИЕ ПОВЕРКИ

6.1. Внешний осмотр

При проведении внешнего осмотра проверяют:

- отсутствие механических повреждений;
- соответствие комплектности прибора технической документации;
- надежность крепления соединительных элементов.

6.2. Опробование

6.2.1. Опробование (самотестирование прибора) производится автоматически после включения питания и запуска программного обеспечения. В случае успешного прохождения опробования (тестирования) на экране монитора появляется стартовое окно программы управления прибором.

6.2.2. Проверка соответствия программного обеспечения

6.2.2.1. Проверка осуществляется следующим образом:

а) При использовании ПО TotalChrom Navigator (WorkStation или Client/Server)

- в главном окне программы TotalChrom Navigator в строке команд щелкнуть мышью на команде «Help». В открывшемся окне щелкнуть мышью по строке About TotalChrom Navigator в результате чего откроется окно, в котором приведены идентификационное название ПО и номер версии. Копия экрана с возможными окнами приведена на рисунке 1.

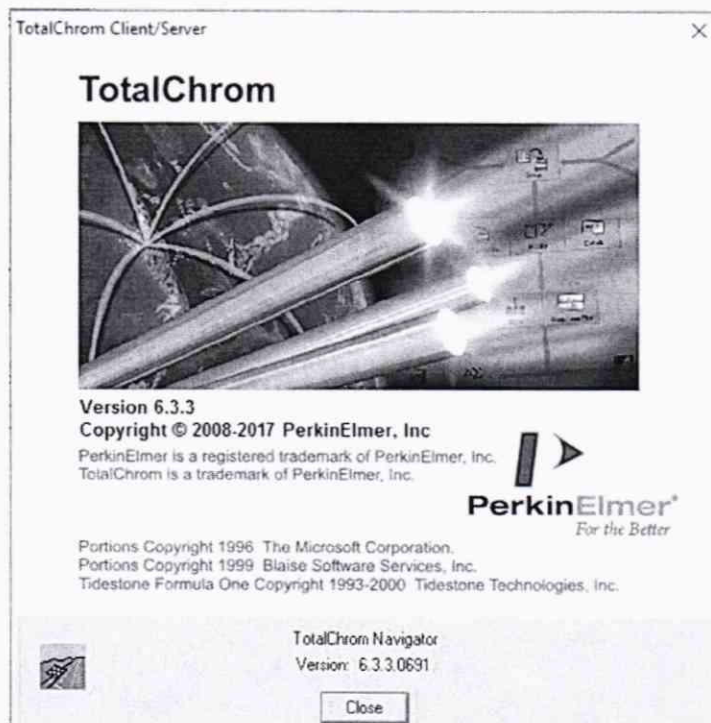
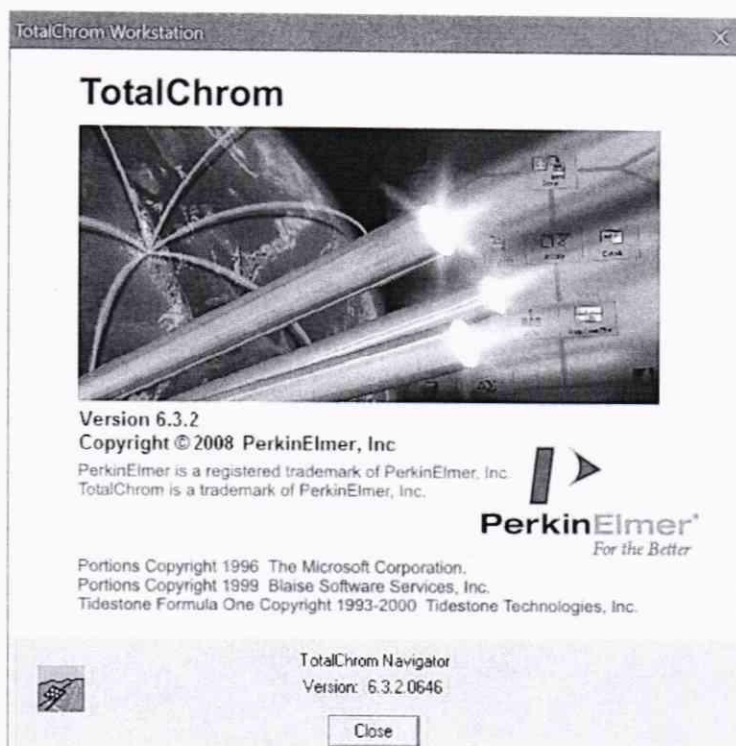


Рисунок 1. Окно с идентификационными данными ПО TotalChrom Navigator (WorkStation или Client/Server).

Детектор считается выдержавшим поверку по п. 6.2.2, если номер версии ПО – 6.3.2.0 или выше.

б) При использовании ПО Chromera

- в главном окне программы Chromera

в строке команд щелкнуть мышью на команде «Help». В открывшемся окне щелкнуть мышью по строке About Chromera в результате чего откроется окно, в котором приведены идентификационное название ПО и номер версии. Копия экрана с возможными окнами приведена на рисунке 2.

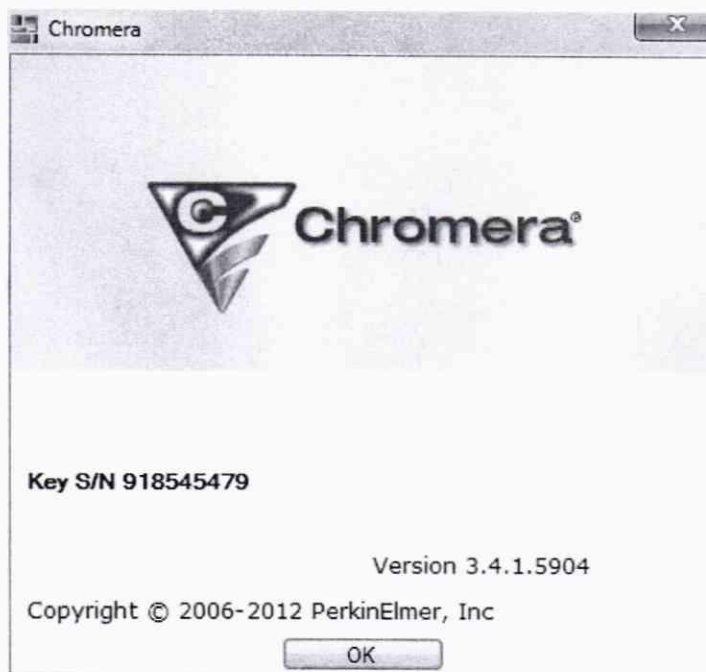


Рисунок 2 - Окно с идентификационными данными ПО Chromera.

Детектор считается выдержавшим поверку по п. 6.2.2, если номер версии ПО – 3.2.0 или выше.

6.2.3 Определение уровней флуктуационных шумов и дрейфа нулевого сигнала.

При опробовании проводят определение уровней флуктуационных шумов и дрейфа нулевого сигнала. Дрейф нулевого сигнала для флуоресцентного детектора (FL Detector) не определяется.

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

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

Значения дрейфа нулевого сигнала (D) принимают равным смещению нулевого сигнала (H) в течение 1 часа.

Для сканирующего спектрофотометрического детектора (UV-Vis Detector), спектрофотометрического детектора с диодной матрицей (PDA Detector), рефрактометрического детектора (RI Detector) процедура измерения шума и дрейфа осуществляется согласно приведенной в пункте 6.2.3.1 процедуре и с помощью программного обеспечения «Chromera» или «Totalchrom Navigator».

Для флуоресцентного детектора процедура измерения шума (дрейф не измеряется) осуществляется согласно приведенной в пункте 6.2.3.2 процедуре и с помощью программного обеспечения «Chromera» или «Totalchrom Navigator».

Все измерения проводятся после выхода хроматографа на режим и стабилизации параметров в течение не менее 1 часа.

6.2.3.1 Описание процедур измерения дрейфа и флуктуационных шумов спектрофотометрического детектора (UV-Vis Detector), спектрофотометрического детектора с диодной матрицей (PDA Detector), рефрактометрического детектора (RI Detector):

а) – заполнить измерительную ячейку (и ячейку сравнения для рефрактометрического детектора) водой.

б) – заглушить выход и вход детектора.

в) – направить элюент из насоса на слив.

г) – задать параметры метода, указанные в таблице 3.

д) – провести обнуление сигнала детектора и оставить прибор в работающем состоянии минимум на 20 минут.

е) – запустить проведение измерения с помощью программы управления хроматографом.

ж) – обработать полученный файл результата вручную или при помощи программы «Chromera» или «Totalchrom Navigator». Результат по шуму и дрейфу для спектрофотометрических детекторов приводится в единицах оптической плотности, для рефрактометрического детектора в единицах рефракции.

Таблица 3

	Детектор		
	UV-Vis Detector	PDA Detector	RI Detector
Элюент	вода	вода	вода
Скорость потока элюента, см ³ /мин	0,1	0,1	0,1
Длина волны, нм	245	245	-
Постоянная времени, с	0,5-1	0,5-1	0,5-1

6.2.3.2 Описание процедур измерения флуктуационных шумов (дрейф не нормируется) флуоресцентного детектора (FL Detector):

а) – установить поток подвижной фазы (вода) в детектор равный 1 мл/мин.

б) – установить длины волн возбуждения и эмиссии $\lambda = 280/390$, провести обнуление сигнала детектора и оставить прибор в работающем состоянии минимум на 20 минут.

в) – запустить проведение измерения с помощью программы управления хроматографом. Время измерения 20 мин.

г) – обработать полученный файл результата вручную или при помощи программы «Chromera» или «Totalchrom Navigator». Результат по шуму приводится в единицах флуоресценции (FLu).

6.2.3.3 Полученные значения уровней флуктуационных шумов и дрейфа нулевого сигнала не должны превышать значений, приведенных в таблице 4.

Таблица 4

Наименование детектора	Шум	Дрейф
сканирующий спектрофотометрический детектор (UV-Vis Detector)	$7,5 \times 10^{-6}$ Б	1×10^{-4} Б/ч
спектрофотометрический детектор с диодной матрицей (PDA Detector)	1×10^{-5} Б	1×10^{-3} Б /ч
рефрактометрический детектор (RI Detector)	$1,5 \times 10^{-9}$ ед. рефр.	4×10^{-7} ед. рефр./ч
флуориметрический (FL Detector)	Не нормируется	

6.2.4 Определение предела детектирования

Предел детектирования определяют с использованием контрольных веществ и условий, указанных в таблице 5 (концентрации контрольных растворов указаны в таблице 2).

Таблица 5

Контрольный раствор	Объем пробы, мкл	Длина волны	Элюент	Скорость потока элюента, см ³ /мин	Детектор
Антрацен-ацетонитрил	10-100	254	Ацетонитрил: вода 60:40 – 90:10	0,5-1,5	UV-Vis Detector PDA Detector
Антрацен-ацетонитрил	10-100	-	Ацетонитрил: вода 60:40 – 90:10	0,5-1,5	RI Detector
Антрацен-ацетонитрил	10-100	250/390 280/390	Ацетонитрил: вода 60:40 – 90:10	0,5-1,5	FL Detector
Толуол-ацетонитрил	10-100	254 263	Ацетонитрил: вода 60:40 – 90:10	0,5-1,5	UV-Vis Detector PDA Detector
Толуол-ацетонитрил	10-100	-	Ацетонитрил: вода 60:40 – 90:10	0,5-1,5	RI Detector
Толуол-ацетонитрил	10-100	254/280 263/280	Ацетонитрил: вода 60:40 – 90:10	0,5-1,5	FL Detector
*Сахароза-вода	10-100	-	Вода	0,5-1,5	RI Detector

* Примечание: при использовании контрольных смесей с сахарозой (рефрактометрический детектор) определение предела детектирования может проводиться без ВЭЖХ колонки. Дозирующее устройство соединяется с детектором напрямую. Для стабилизации работы насоса при измерении метрологических характеристик детектора допускается использовать сопротивление (рестриктор) с противодавлением около 3500-6900 кПа.

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

Предел детектирования (г/см³) рассчитывают по формуле:

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

где G – количество контрольного вещества, г;

V – скорость элюента, см³/сек;

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

Δx – уровень флуктуационных шумов нулевого сигнала, определенный по п.п.6.2.3;

H – высота пика контрольного вещества;

$H \cdot \mu_{0,5}$ - данное произведение может быть заменено площадью пика (S)

Δx и H – измеряют в единицах, соответствующих конкретному детектору.

Полученные результаты предела детектирования не должны превышать значений, приведенных в таблице 6.

Таблица 6

Наименование детектора	Предел обнаружения, г/см ³ , не более
сканирующий спектрофотометрический детектор (UV-Vis Detector)	Антрацен – $1,0 \cdot 10^{-9}$
	Толуол – $1,0 \cdot 10^{-7}$
спектрофотометрический детектор с диодной матрицей (PDA Detector)	Антрацен – $2,0 \cdot 10^{-9}$
	Толуол – $2,0 \cdot 10^{-7}$
рефрактометрический детектор (RI Detector)	Сахароза – $2,0 \cdot 10^{-7}$
	Толуол – $2,0 \cdot 10^{-5}$
	Антрацен – $2,0 \cdot 10^{-5}$
флуориметрический (FL Detector)	Антрацен – $1,0 \cdot 10^{-12}$
	Толуол – $1,0 \cdot 10^{-9}$

6.3 Определение метрологических характеристик

6.3.1 Определение относительного среднего квадратичного отклонения выходных сигналов.

Измерения проводят после выхода хроматографа на режим. Условия выполнения измерений должны соответствовать приведенным в разделе 6.2.4.

6.3.1.2 Контрольный раствор (табл.2.) вводят в хроматограф не менее 6 раз, измеряют значения выходных сигналов (площадей пиков и времен удерживания) и вычисляют их среднее арифметическое значение.

6.3.1.3 Относительное среднее квадратичное отклонение выходного сигнала рассчитывают по формуле:

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

где \bar{X} – значение параметра выходного сигнала (площади пика, времени удерживания),
n – количество измерений.

6.3.1.4. Результаты испытаний по п.6.3.1 считают положительными, если значение ОСКО выходного сигнала детектора по времени удерживания и площади пика не превышают значений, указанных в таблице 7.

Таблица 7

Наименование детектора	ОСКО, %, не более:
сканирующий спектрофотометрический детектор (UV-Vis Detector)	Площади пика – 1,5
	Времени удерживания – 1,0
спектрофотометрический детектор с диодной матрицей (PDA Detector)	Площади пика – 1,5
	Времени удерживания – 1,0
рефрактометрический детектор (RI Detector)	Площади пика – 3,0
	Времени удерживания – 1,0
флуориметрический (FL Detector)	Площади пика – 3,0
	Времени удерживания – 1,0

6.3.2 Определение относительного изменения выходных сигналов за 4 часа непрерывной работы (по площади пика).

Условия измерения аналогичны, описанным в разделе 6.2.4. Через 4 часа непрерывной работы повторяют измерения по п.6.2.4. Контрольный образец вводится в хроматограф не менее 2 –х раз.

Относительное изменение выходного сигнала за 4 часа непрерывной работы хроматографа рассчитывают по формуле

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

где: \bar{X} — среднее арифметическое значение выходного сигнала (площади пика) в начальный момент времени.

\bar{X}_t — среднее арифметическое значение выходного сигнала (площади пика) через 4 часа.

6.3.2.1. Результаты испытаний по п.6.3.2 считают положительными, если значение ОСКО выходного сигнала детектора по времени удерживания и площади пика не превышают значений, указанных в таблице 8.

Таблица 8.

Наименование детектора	Относительное изменение выходного сигнала за 4 часа непрерывной работы (по площади пика), %, не более
сканирующий спектрофотометрический детектор (UV-Vis Detector)	3,0
спектрофотометрический детектор с диодной матрицей (PDA Detector)	3,0
рефрактометрический детектор (RI Detector)	4,0
флуориметрический (FL Detector)	4,0

7. ОФОРМЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ПОВЕРКИ

7.1. Данные, полученные при поверке, оформляются в виде протокола, по форме установленной в организации, поводящей поверку.

7.2. Хроматограф, удовлетворяющий требованиям настоящей методики поверки, признается годным и на него оформляется свидетельство о поверке по установленной форме.

На оборотной стороне свидетельства приводится следующая информация:

- результаты опробования и внешнего осмотра;
- результат подтверждения соответствия ПО;
- результаты определения метрологических характеристик;

7.3. Хроматограф не удовлетворяющие требованиям настоящей методики, к дальнейшей эксплуатации не допускается и на него выдается извещение о непригодности.

7.4. Знак поверки наносится на лицевую панель хроматографа и (или) на свидетельство о поверке.

Методика приготовления контрольных смесей

Настоящая инструкция устанавливает методику приготовления контрольных смесей, предназначенных для определения метрологических характеристик хроматографа.

Диапазон содержания контрольного компонента – от 1×10^{-9} до 1×10^{-2} г/см³. Относительная погрешность массовой концентрации контрольного компонента не превышает 10 %.

1. Процедура приготовления контрольных смесей.

1.1. Контрольные смеси в диапазоне от 1×10^{-3} до 1×10^{-2} г/см³ приготавливают объемно – весовым методом. Массовую концентрацию контрольного компонента (C_i) определяют по формуле

$$C_0 = m_i/V$$

где: m_i – масса контрольного компонента, г;

V – объем приготовленной смеси, см³.

1.2. Исходные вещества, используемые для приготовления контрольной смеси, выдерживают не менее 2 ч в лабораторном помещении.

1.3. Температура окружающей среды при приготовлении контрольных смесей не должна изменяться более, чем на 4°С.

1.4. Определяют массу (m_1) мерной колбы вместимостью 100 мл. Результат взвешивания записывают до третьего десятичного знака.

1.5. В мерную колбу вносят навеску контрольного компонента и вновь взвешивают колбу (m_2).

1.6. Вычисляют массу контрольного компонента (m) в г.

$$m = m_2 - m_1$$

1.7. В колбу с контрольным компонентом вводят от 20 до 25 мл растворителя, перемешивают содержимое и доводят объем раствора до 100 мл. Тщательно перемешивают раствор.

Допускается использовать навески другой массы (но не менее 0,05г) и мерные колбы другого объема.

1.8. Рассчитывают массовую концентрацию контрольного компонента по п. 1.1.

1.9. Контрольные смеси с содержанием контрольного компонента менее 1 мг/см³ приготавливают объемным методом путем последовательного разбавления более концентрированных растворов. Массовую концентрацию контрольного компонента рассчитывают по формулам

$$C_1 = C_0 \times V_{ал1}/V$$

$$C_2 = C_1 \times V_{ал2}/V$$

$$C_n = C_{n-1} \times V_{алn}/V$$

где: n – номер ступени разбавления исходного контрольного раствора с концентрацией C_0 .

$V_{ал1}$, $V_{ал2}$, $V_{алn}$ – объем аликвоты (мл) растворов с концентрацией C_0 , C_1 , C_{n-1} соответственно, г/см³.

V – объем мерной колбы, используемой для разбавления

2.10. Перед каждым разбавлением рассчитывают значение аликвоты раствора (V_1, V_2, V_n), исходя из заданного значения концентрации контрольного компонента (C_0, C_1, C_{n-1}), концентрации разбавляемого раствора и объема мерной колбы, используемой для разбавления.

2.11. В мерную колбу нужного объема (объем варьируется в зависимости от степени разбавления) наливается соответствующий растворитель $1/3 - 1/2$ от объема колбы. Пипеткой или механическим дозатором вносят в колбу аликвоту разбавляемого раствора. после чего доводят растворителем колбу до метки. Растворителем доводят колбу до метки и тщательно перемешивают полученный раствор.