

УТВЕРЖДАЮ

Руководитель ЦИ СИ ФГУП ВНИИМС

В.Н.Яншин

2011 г.



Яншин

ИНСТРУКЦИЯ

ХРОМАТОГРАФЫ ЖИДКОСТНЫЕ

LC-30 NEXERA

Методика поверки

Москва 2011 г.

Настоящая методика распространяется на хроматографы жидкостные LC-30 NEXERA фирмы "SHIMADZU", Япония, фирмы "SHIMADZU U.S.A. MANUFACTURING, INC.", США (далее – хроматографы) и устанавливает методику их первичной и периодической поверок.

Межповерочный интервал – 1 год.

1 ОПЕРАЦИИ ПОВЕРКИ

1.1 При проведении поверки выполняют операции, указанные в таблице 1.

Таблица 1

Наименование операции	Номер пункта методики
Внешний осмотр	4.1
Опробование:	4.2
– определение уровня флуктуационных шумов и дрейфа нулевого сигнала	4.2.1
– определение отношения сигнал/шум (для МСД)	4.2.2
– определение предела детектирования	4.2.3
Определение метрологических характеристик:	4.3
– определение относительного среднего квадратического отклонения выходного сигнала	4.3.1 - 4.3.3
– определение относительного изменения выходного сигнала за 8 часов непрерывной работы	4.4

2 СРЕДСТВА ПОВЕРКИ

2.1 При проведении поверки применяют следующие средства поверки:

- ГСО 8749-2006 состава антрацена в ацетонитриле, массовая концентрация антрацена 0,200 мг/см³;
- кофеин фармакопейный; ФС 42-0248-07, содержание основного вещества не менее 98%;
- папаверин гидрохлорид, ГФ-11 (фармакопейная статья);
- п-нитрофенол ТУ 6-09-3973-75 или CAS 100-02-7;

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;
- метанол ГОСТ 6995-75
- ацетатный буфер, pH = 5;
- азот газообразный очищенный, ГОСТ 9293-74, высший сорт;
- колонка для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), применяемая для варианта обращенофазовой или нормальнофазовой ВЭЖХ, например, Pathfinder AS column (50 x 4,6 мм, средний размер частиц 2,5 мкм), Shim-pack VP-ODS (150 x 4,6 мм, средний размер частиц 5 мкм);
- термометр типа ТЛ4 № 2 по ГОСТ 215-73;
- психрометр типа ПГ-1БМ по ГОСТ 6353-85;
- барометр-анероид БАММ-1 по ТУ 25-04-1618-72.

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 следующие условия, указанные в таблице 2:

Таблица 2.

	Жидкостные хроматографы	Жидкостные хроматографы с масс-спектрометрическими детекторами LCMS-2020
– температура окружающего воздуха, °С	20 ± 5	20 ± 5
– атмосферное давление, кПа	$84 + 106,7$	$84 + 106,7$
– относительная влажность воздуха, %	$30 - 90$	$40 - 70$
– напряжение переменного тока, В	$220 \pm 10\%$	$220 \pm 5 \%$
– частота сети, Гц	$50 \pm 1\%$	$50 \pm 0,5 \%$

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 допускаются дефекты, которые могут повлиять на работоспособность прибора.

4.2 Опробование

При опробовании определяют уровень флуктуационных шумов, дрейф нулевого сигнала и предел детектирования (отношение сигнал/шум для МСД). При определении уровня флуктуационных шумов и дрейфа нулевого сигнала хроматографическую колонку заменяют на стальной или полиэтиленовый капилляр (сталь марки 316 или материал РЕЕК) длиной (30 – 50) см и внутренним диаметром (0,1 – 0,3) мм.

4.2.1 Уровень флуктуационных шумов и дрейф нулевого сигнала детектора определяют при условиях, указанных в таблице 2. После выхода хроматографа на режим записывают в течение 30 мин нулевой сигнал каждого детектора на наиболее чувствительной шкале прибора.

Таблица 2

Масс-спектрометрический LCMS-2020

	Спектрофотометрический SPD-20A UFLC/M20A	Флуориметрический RF-20A/20Axs	Масс-спектрометрический LCMS-2020					
			Режим ESI (электроспрей)		Режим APCI (химическая ионизация)		Режим DUIS ESI (опция)	
			SIM отрицательная ионизация	SIM положительная ионизация	SIM отрицательная ионизация	SIM положительная ионизация	SIM отрицательная	SIM положительная
Элюент	вода	вода	вода/ацетонитрил 10/90	метанол/вода 50/50	вода/ацетонитрил 10/90	вода/ацетонитрил 10/90	вода/ацетонитрил 10/90	
Скорость потока элюента, см ³ /мин	1	1	0,2	1	0,2	0,2	0,2	
Длина волны, нм	272 предел детектирования, 250 дрейф нулевого сигнала	350 нм (возб.) 450 (эмис.)						
Постоянная времени, с	2	0,5	138,00	340,15	138,00	340,15	138,00	
Масса, а.е.м	-	-	250	250	250	200	250	
Температура DL, °C	-	-	200	200	200	200	200	
Температура блока нагревателей, °C	-	-	350	350	350	350	-	
Температура интерфейса, °C	-	-						

Масс-спектрометрический LCMS-2020								
	Спектрофотометрический SPD-20A UFLC/M20A	Флуориметрический RF-20A/20Axs	Режим ESI (электроспрей)		Режим APCI (химическая ионизация)		Режим DUIS ESI (опция)	
			SIM ионизация	SIM положительная ионизация	SIM отрицательная ионизация	SIM положительная ионизация	SIM отрицательная	SIM положительная
Время сканирования, с	-	-	0,5	0,5	0,2	0,2	0,5	0,5
Напряжение на детекторе, полученное при автотюнинге, кВ)	-	-	+ 0,2	+ 0,2	+ 0,5	+ 0,5	+ 0,2	+ 0,2
Расход осушающего газа, л/мин	-	-	Без осушающего газа		15,0	5,0	15,0	15,0

Уровень флуктуационных шумов нулевого сигнала (Δx) принимают равным амплитуде h повторяющихся колебаний нулевого сигнала с периодом не более 20 с. Программное обеспечение "LC solution" 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 Определение предела детектирования, отношения сигнал/шум и метрологических характеристик выполняют на хроматографе, укомплектованном соответствующим детектором и аналитической колонкой.

Отношение сигнал-шум измеряют для масс-спектрометрического детектора при условиях, указанных в таблицах 2 и 3. В хроматограф вводят пробу контрольного вещества. Находят значение отношения сигнал/шум (S/N) для пика со значением m/z по таблице 2, используя встроенный в программу обработки данных калькулятор (S/N Check).

Значения S/N должны быть не менее указанных в приложении Б для первичной проверки и указанных в приложении В для проверки в условиях эксплуатации.

4.2.3 Предел детектирования оценивают с использованием контрольных растворов и условий, указанных в таблице 3.

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

Предел детектирования в $г/см^3$ рассчитывают по формулам

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

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 Приложениях Б и В.

S – площадь пика контрольного вещества, мкВ·с, мм·с, условных единицах·с, либо в единицах, указанных в Приложениях Б и В, умноженных на секунду;

G – количество контрольного вещества, г;

$$G = C \cdot V_{доз.},$$

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

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

Результаты определения признают положительными, если полученные значения предела детектирования не превышают значений для первичной проверки и для проверки в условиях эксплуатации, указанных в приложении Б.

Таблица 3

Контрольный раствор	Массовая концентрация мг/дм ³	Объем пробы, мкл	Элюент	Скорость потока элюента, см ³ /мин	Детектор
Раствор кофеина в воде	10	10	ацетонитрил/вода 2:8 (для колонки с обращенной фазой) н-гептан (для колонки с нормальной фазой)	1	Спектрофотометрический SPD-20A UFLC/M20A Длина волны 272 нм
Раствор антрацена в ацетонитриле	0,5	5	Ацетонитрил:вода 4:1	1	Флуориметрический RF-20A/20Axs
Раствор папаверина	0,01	1	Режим ESI: (электроспрей) вода/ацетонитрил	0,2	Масс-спектрометрический LCMS-2020 SIM, положительная
Раствор п-нитрофенола	0,02	1	10/90	0,2	Масс-спектрометрический LCMS-2020 SIM, отрицательная
Раствор папаверина	0,002	5	Режим APCI (опция) вода/метанол	1	Масс-спектрометрический LCMS-2020 SIM, положительная
Раствор п-нитрофенола, мг/дм ³	0,004	5	50/50	1	Масс-спектрометрический LCMS-2020 SIM, отрицательная
Раствор папаверина гидрохлорида	0,01	1	Режим DUIS ESI (опция) вода/ацетонитрил	0,2	Масс-спектрометрический LCMS-2020 SIM, положительная
Раствор п-нитрофенола	0,02	1	10/90	0,2	Масс-спектрометрический LCMS-2020 SIM, отрицательная

4.3 Определение относительного среднего квадратического отклонения (СКО) выходного сигнала

4.3.1 Контрольный раствор (табл. 3.) 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}).

4.3.2 Относительное среднее квадратическое отклонение выходного сигнала рассчитывают по формуле

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

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

Значения относительного среднего квадратического отклонения выходных сигналов не должны превышать значений для первичной поверки и для поверки в условиях эксплуатации, указанных в приложении В.

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

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

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

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

Значения относительного изменения выходного сигнала не должно превышать значений, приведенных в приложении В.

5. ОФОРМЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ПОВЕРКИ

5.1. Результаты поверки хроматографов заносят в протокол.

5.2. Положительные результаты поверки хроматографов оформляют выдачей свидетельства в соответствии с ПР 50.2.006.

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.

5.4. После ремонта хроматограф подвергают поверке.

Начальник отдела ФГУП "ВНИИМС"

Начальник сектора ФГУП "ВНИИМС"



Ш.Р. Фаткудинова

О.Л. Рутенберг

ПРИЛОЖЕНИЕ А

МЕТОДИКА ПРИГОТОВЛЕНИЯ КОНТРОЛЬНЫХ РАСТВОРОВ

Методика предназначена для приготовления контрольных растворов антрацена, папаверина, п-нитрофенола, кофеина.

1 СРЕДСТВА ИЗМЕРЕНИЙ, ПОСУДА, РЕАКТИВЫ

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

1.5 Кофеин фармакопейный; ФС 42-0248-07, содержание основного вещества не менее 98 %.

1.6 Папаверин гидрохлорид, ГФ-11 (фармакопейная статья).

1.7 п-нитрофенол по ТУ 6-09-3973-75 или CAS 100-02-7.

1.8 Весы лабораторные по ГОСТ Р 53228–2008, с верхним пределом взвешивания 200 г.

1.9 Мера массы (гири), 2–01 класс точности, ГОСТ 7328-2001.

1.10 Колбы мерные наливные 2–100–2, , 2–500–2, 2–1000–2, 2–2000–2 по ГОСТ 1770-74.

1.11 Пипетки градуированные 1–1–2–1 по ГОСТ 29227-91(1).

1.12 Стаканы В–1–50ТС по ГОСТ 25336-82.

1.13 Вода для лабораторного анализа (бидистиллированная), ГОСТ Р 52501-2005.

1.14 Дистиллированная вода по ГОСТ 6709-72.

2 ПРОЦЕДУРА ПРИГОТОВЛЕНИЯ

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

2.1.1 Взвешивают в стакане 20,0 мг папаверина, добавляют в стакан 25 см³ воды, перемешивают. Полученный раствор переносят в мерную колбу вместимостью 2000 см³. Ополаскивают стакан водой, раствор переносят в мерную колбу, доводят до метки водой, перемешивают.

2.1.2 Приготовление контрольного раствора папаверина

1 см³ раствора, приготовленного по п.2.1.1, переносят в мерную колбу вместимостью 1000 см³ и доводят до метки водой.

Массовая концентрация полученного раствора 0,01 мг/дм³.

Погрешность приготовления контрольного раствора ± 4,9 %.

2.2. Приготовление растворов п-нитрофенола

2.2.1 Приготовление исходного раствора п-нитрофенола

Навеску п-нитрофенола 20,0 мг переносят в мерную колбу вместимостью 1000 см³, объём колбы доводят до метки элюентом (табл.2).

Массовая концентрация п-нитрофенола 20 мг/дм³.

2.2.2 Приготовление контрольного раствора п-нитрофенола

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

Массовая концентрация п-нитрофенола в полученном растворе 0,02 мг/дм³.

Погрешность приготовления контрольного раствора ± 4,9 %.

Раствор хранят при комнатной температуре в течение не более 2 дней.

2.3 Приготовление контрольного раствора антрацена

2.3.1 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.

Погрешность приготовления контрольного раствора ± 2,2 %.

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 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 контрольного 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 водой до метки, перемешивают.

Погрешность приготовления контрольного раствора ± 1,5 %.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Прибор (детектор)	Уровень флуктуационных шумов	Дрейф нулевого сигнала	Предел детектирования, не более	Уровень флуктуационных шумов	Дрейф нулевого сигнала	Предел детектирования, не более	В процессе эксплуатации	
							При первичной поверке	
SPD-20A UFLC, SPD-20AV	$\pm 0,5 \cdot 10^{-5}$ е.о.п.	$2 \cdot 10^{-4}$ е.о.п./ч	$3 \cdot 10^{-10}$ г/см ³ (по кофеину)	$\pm 0,5 \cdot 10^{-5}$ е.о.п.	$2 \cdot 10^{-4}$ е.о.п./ч	$3 \cdot 10^{-9}$ г/см ³ (по кофеину)		
SPD-M20A	$\pm 2,5 \cdot 10^{-5}$ е.о.п.	$2 \cdot 10^{-3}$ е.о.п./ч	$3 \cdot 10^{-10}$ г/см ³ (по кофеину)	$\pm 2,5 \cdot 10^{-5}$ е.о.п.	$2 \cdot 10^{-3}$ е.о.п./ч	$3 \cdot 10^{-9}$ г/см ³ (по кофеину)		
RF-20A			Отношение сигнал:шум для Рамановского спектра дистиллированной воды 1200:1			Соотношение сигнал:шум для Рамановского спектра дистиллированной воды 600:1		
RF-20Axs			Отношение сигнал:шум для Рамановского спектра дистиллированной воды 2000:1			Соотношение сигнал:шум для Рамановского спектра дистиллированной воды 1000:1		
Масс-спектрометрический детектор LCMS-2020			Соотношение сигнал:шум ESI положительный режим 1500:1			Соотношение сигнал:шум ESI положительный режим 900:1		

Прибор (детектор)	Уровень флуктуационных шумов	Дрейф нулевого сигнала	Предел детектирования, не более	Уровень флуктуационных шумов	Дрейф нулевого сигнала	Предел детектирования, не более
			отрицательный режим 60:1 АСПИ положительный режим 400:1 отрицательный режим 100:1 DUIS (ESI), положительный режим (папаверин) 600:1 отрицательный режим (п-нитрофенол) 20:1			отрицательный режим 30:1 АСПИ положительный режим 200:1 отрицательный режим 50:1 DUIS (ESI) положительный режим (папаверин) 300:1 отрицательный режим 10:1

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Прибор (детектор)	Относительное СКО выходного сигнала (%) при первичной поверке		Относительное изменение выходного сигнала за 8 часов непрерывной работы при первичной поверке		Относительное СКО выходного сигнала (%) в условиях эксплуатации		Относительное изменение выходного сигнала за 8 часов непрерывной работы в условиях эксплуатации	
	Время удерживания	Площадь пика	Площадь пика	Площадь пика	Время удерживания	Площадь пика	Время удерживания	Площадь пика
SPD-20A, SPD-20 AV	0,5	1	± 2	± 2	1	1,5	1	± 3
SPD-M20A	0,5	1	± 2	± 2	1	1,5	1	± 3
Масс-спектрометрический детектор серии LCMS-2020	–	5	–	–	–	10	–	–