

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

СОГЛАСОВАНО



И.о. генерального директора
ФГУП «ВНИИМ
им. Д.И. Менделеева»


А.Н. Пронин

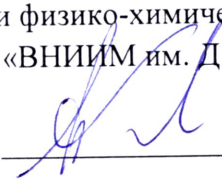
» 26 07 2021 г.

Государственная система обеспечения единства измерений

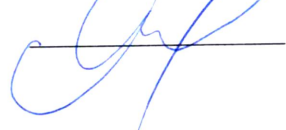
Приборы для тонкослойной хроматографии с денситометром "Сорбфил"

МЕТОДИКА ПОВЕРКИ
МП-242-2435-2021

И.о. руководителя НИО Госэталонов
в области физико-химических измерений
ФГУП «ВНИИМ им. Д.И. Менделеева»


А.В. Колобова

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


М.А. Мешалкин

Санкт-Петербург
2021 г

Настоящая методика поверки распространяется на «Приборы для тонкослойной хроматографии с денситометром «Сорбфил» (далее по тексту – приборы) и устанавливает методы и средства их первичной поверки при вводе в эксплуатацию и после ремонта и периодической поверке в процессе эксплуатации.

Методика поверки должна обеспечивать прослеживаемость поверяемых приборов к государственному первичному эталону ГЭТ 208-2014 «Государственный первичный эталон единиц массовой (молярной) доли и массовой (молярной) концентрации органических компонентов в жидких и твёрдых веществах и материалах на основе жидкостной и газовой хромато-масс-спектрометрии с изотопным разбавлением и гравиметрии»

Метод, обеспечивающий реализацию методики поверки – косвенное измерение поверяемым средством величины, воспроизводимой стандартным образцом.

Методикой поверки не предусмотрена возможность проведения поверки отдельных измерительных каналов и (или) отдельных автономных блоков из состава средства измерений или поверка для меньшего числа измеряемых величин или на меньшем числе поддиапазонов измерений.

1. Перечень операций поверки

Таблица 1 – Операции поверки

Наименование операции	Номер пункта	Проведение операции при поверке	
		первичной	периодической
Внешний осмотр	6	Да	Да
Подготовка к поверке и опробование	7	Да	Да
Проверка программного обеспечения	8	Да	Да
Определение метрологических характеристик	9	Да	Да

2. Требования к условиям проведения поверки

При проведении поверки должны быть соблюдены следующие условия:

- 2.1. Температура окружающего воздуха от +15 до +25 °С.
- 2.2. Относительная влажность окружающего воздуха от 30 до 80 %.
- 2.3. Атмосферное давление от 84 до 106 кПа.

3. Требования к специалистам, осуществляющим поверку

3.1. К работе с приборами и проведению поверки допускаются лица, ознакомленные с руководством по эксплуатации поверяемого средства измерений и инструкциями (руководствами) по применению средств измерений, стандартных образцов и вспомогательных средств поверки и имеющие квалификацию не ниже бакалавра (инженера) и прошедшие инструктаж по технике безопасности. Для получения данных, необходимых для поверки, допускается участие в поверке оператора, обслуживающего прибор или сервис-инженера (под контролем поверителя).

4. Метрологические и технические требования к средствам поверки

- 4.1. При проведении поверки применяют средства, указанные ниже.

Таблица 2 - Средства поверки

Номер пункта методики поверки	Наименование эталонного средства измерений или вспомогательного средства поверки, номер документа, регламентирующего технические требования к средству, метрологические и технические характеристики
7, 9	Основные средства поверки: – СО состава раствора афлатоксина В1 в смеси бензола и ацетонитрила ГСО 7936-2001; – СО состава раствора зеараленона в бензоле ГСО 7944-2001 (аттестованная характеристика – массовая характеристика лактона (6-(10-гидрокси-6-оксо-транс-I-ундецил)-β-резорциловой кислоты).
7	Растворители и реактивы: – хлороформ, ГОСТ 20015-88, ч.д.а. – толуол, ГОСТ 5789-78, ч.д.а. – ацетон, ГОСТ 2603-79, ч.д.а. – гексан, ТУ 2631-001-04715285-2012, ч.д.а. – этилацетат, ГОСТ 22300-76, ч.д.а. – муравьиная кислота, ГОСТ 5848-48-73, ч.д.а. – этиловый спирт, ГОСТ 5962-2013, ч.д.а. – прочный красный ЖЖ (Диазоль красный ЖЖ), содержание красящего вещества более 90 %, (C ₆ H ₄ N ₃ O ₂ хBF ₄ п-нитрофенилдиазония тетрафторборат, стабилизированная соль), ГОСТ 15972-79, ч.д.а.
7	Средства измерений: - меры вместимости: пипетки 2 класса точности по ГОСТ 29227-91, колбы наливные 2 класса точности по ГОСТ 1770-74: - колба мерная 2-100-2, ГОСТ 1770-74 - колба мерная 2-10-2, ГОСТ 1770-74 - пипетки 6-10-5, ГОСТ 29227-91 - пипетки 6-1-5, ГОСТ 29227-91 - весы лабораторные высокого класса точности по ГОСТ OIML R 76-1-2011
7	Вспомогательные средства поверки: микрошприц МШ-10, ТУ 2.833.106 - аппликатор, ТУ 4215-005-16943775 - пульверизатор стеклянный для обработки пластин ТСХ - пластины ПТСХ-АФ-В-УФ, ТУ 26-11-17-89 - пластины ПТСХ-АФ-В, ТУ 26-11-17-89 - камера хроматографическая для пластин 10x10 см ТУ 4320-012-29508133-2009 - нагревательное устройство УСП-1, (НПФД 03.00.00 ТУ)
2	- термогигрометр электронный или гигрометр психрометрический, зарегистрированные в Федеральном фонде по обеспечению единства измерений (например, ФИФ №22129-09; ФИФ № 69566-17 или аналогичные);

4.1.1. Допускается применение других средств поверки, обеспечивающих определение метрологических характеристик поверяемых приборов с требуемой точностью.

4.1.2. Все средства измерений, используемые при поверке, должны быть поверены, а ГСО действующий паспорт.

5. Требования (условия) по обеспечению безопасности проведения поверки

5.1. При проведении поверки требуется следовать правилам безопасности, изложенным в разделе 1 Руководства по эксплуатации приборов

6. Внешний осмотр средства измерений

6.1. При внешнем осмотре устанавливается соответствие приборов следующим требованиям:

- отсутствие внешних повреждений, влияющих на работоспособность;
- исправность органов управления;
- четкость надписей на лицевой панели.
- маркировка должна соответствовать требованиям эксплуатационной документации.

6.2. Прибор считают выдержавшими внешний осмотр, если он соответствует указанным выше требованиям.

7. Подготовка к поверке и опробование

7.1. Включить питание прибора, следуя порядку действий, указанному в Руководстве по эксплуатации приборов.

7.2. Прибор включают и устанавливают в режимы работы видимой области и УФ диапазоне на длинах волн 254 и 365 нм. Подготавливают пластину к измерению в соответствии с п. 9.1.1 Помещают пластину с афлатоксином В1 в денситометр.

7.3. Прибор считается выдержавшим опробование, если визуальный анализ пятен на дисплее персонального компьютера наблюдаются пятна контрольного вещества афлатоксина В1.

8. Проверка соответствия программного обеспечения

8.1. Ввод на экран сведений о версиях ПО осуществляется нажатием кнопки «?»; выпадающем контекстном меню необходимо выбрать вкладку «О программе»

8.2. Вид главного окна приведен на рисунке 1. Вид окна информации приведен на рисунке 2.

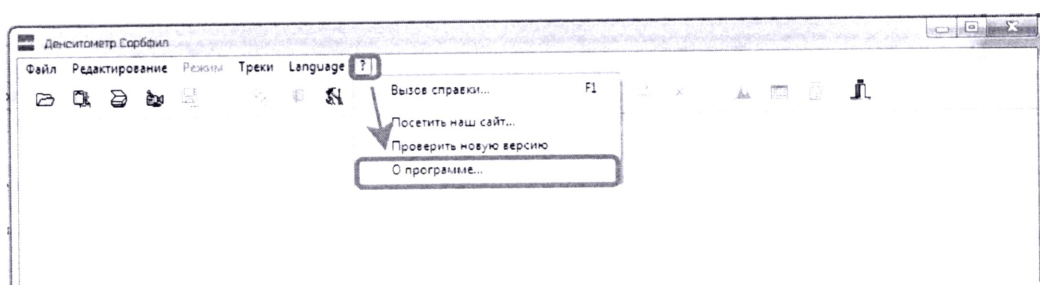


Рисунок 1 – Главное окно



Рисунок 2 – Окно с версией ПО

8.3. Прибор считается выдержавшим проверку по п. 8, если версия ПО не ниже 3.0.0.3036

9. Определение метрологических характеристик

9.1. Определение отношения сигнал/шум.

9.1.1. Пластины размером 100x100 мм (ПТСХ-АФ-В, ТУ 26-11-17-89, для афлатоксина и ПТСХ-АФ-В-УФ, ТУ 26-11-17-89, для зеараленона (ГСО 7944-2001) предварительно очищают в ацетоне и сушат при 25 °С до исчезновения запаха ацетона. Очистку проводить элюированием в хроматографической камере при подъеме элюента на всю высоту пластины. На погружаемой в элюент стороне пластины обрезать уголки размером 7x7 мм.

9.1.2. На подготовленную пластину микрошприцем наносят 5 пятен по 2 мкл афлатоксина В1 (ГСО 7936-2001) с расстоянием 20 мм от края пластины и 15 мм между пятнами.

9.1.3. Пластины при нанесении проб располагают на нагревательном устройстве УСП-1 при температуре 55 °С.

9.1.4. В хроматографическую камеру помещают смесь растворителей хлороформ: ацетон: гексан в объёмном соотношении 9:1:1 (36 см³ хлороформа, 4 см³ ацетона, 4 см³ гексана). Время насыщения камеры - не менее 30 мин.

9.1.5. В подготовленную хроматографическую камеру помещают пластину с нанесённым контрольным раствором, элюируют в темноте (высота подъема фронта – 60 мм) и затем сушат в течение 5 минут при 25 °С, закрыв от источников света.

9.1.6. Пятна афлатоксина В1 должны светиться ярко синим цветом в УФ диапазоне при длине волны 365 нм.

9.1.7. Подготавливают пластину по п. 9.1.1

9.1.8. На подготовленную пластину микрошприцем наносят 5 пятен по 10 мкл зеараленона (ГСО 7944-2001) с расстоянием 20 мм от края пластины и 15 мм между пятнами.

9.1.9. В хроматографическую камеру помещают смесь растворителей толуол: этилацетат: муравьиная кислота в объёмном соотношении 6:3:1 (30 см³ толуол, 15 см³ этилацетат, 5 см³ муравьиная кислота). Время насыщения камеры - не менее 30 мин.

9.1.10. Помещают пластину в камеру и элюируют

9.1.11. Пятна зеараленона должны быть темными на зеленом фоне подложки в УФ диапазоне при длине волны 254 нм.

9.1.12. Пластины с зеараленоном (ГСО 7944-2001) высушить при температуре 25 °С в течение 5-10 минут.

9.1.13. Опрыскивают пластину проявляющим реагентом (0,5% спиртовой раствор ЖЖ красного прочного) с помощью пульверизатора, входящего в комплект поставки. Обработка проявителем строго после приготовления его раствора.

9.1.14. Обработанную проявителем пластину поместить в шкаф при температуре 105°C на 5 минут.

9.1.15. Пятна зеараленона (ГСО 7944-2001) должны представлять собой пятна желтого цвета, отчетливо видимые в дневном свете.

9.1.16. Регистрацию, измерение сигналов денситометра осуществляют с помощью компьютерной системы обработки хроматографического сигнала, входящей в комплект поставки системы. Запись изображения производить с помощью видеокамеры, высота изображения пластины должна быть равна высоте кадра.

9.1.17. В случае регистрации в видимой области при нанесении на пластину 10 мкл зеараленона (ГСО 7944-2001) с концентрацией раствора 100 мкг/см³ соотношение сигнал/шум не менее 5/1. Соотношение определяют (рис.1, Приложение 3), используя программное обеспечение “денситометр “Сорбфил” (см. приложение к программному обеспечению).

9.1.18. В случае регистрации в УФ диапазоне при длине волны 254 нм при нанесении на пластину 10 мкл зеараленона (ГСО 7944-2001) с концентрацией раствора 100 мкг/см³ соотношение сигнал/шум должно быть не менее 5/1.

9.1.19. В случае регистрации в УФ диапазоне при длине волны 365 нм при нанесении на пластину 2 мкл афлатоксина В1 (ГСО 7936-2001) с концентрацией раствора 10 мкг/см³ отношение сигнал/шум должно быть не менее 5/1.

9.2. Определение относительного СКО выходного сигнала (по площади пика).

9.2.1. Подготавливают пластины к измерению (по п. 9.1.1.)

9.2.2. Регистрацию, измерение площадей сигналов осуществляют в течение 24 часов с момента подготовки пластин.

9.2.3. Регистрацию, измерение площадей сигналов осуществляют в видимой области и в УФ диапазоне при длинах волн 254 и 365 нм с помощью автономного ПО, устанавливаемого на компьютер.

9.2.4. При сканировании пластины определяют площадь всех пяти пятен на пластине и средние их значения для данного сканирования. Сканирования одной и той же пластины проводят 5 раз. Установочный параметр метода калибровки – воспроизводимость. Определяют средние значения площади для всех измерений.

9.2.5. Относительное СКО площади сигналов S вычисляют по формуле:

$$\delta = \frac{100}{\bar{S}} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^5 (\bar{S}_i - \bar{S})^2}{4}} \quad (1)$$

где \bar{S} и \bar{S}_i - средние арифметические значения площади соответственно для всех сканирований и сканирования i.

10 Подтверждение соответствия прибора метрологическим требованиям

10.1 Результаты поверки считаются положительными, если полученные значения отношения сигнал/шум и ОСКО площади пятна, не превышают значений, указанных в таблице 3 и таблице 4.

Таблица 3 – Предельные допускаемые значения метрологических характеристик

Контрольное вещество	Объем Пробы	Массовая концентрация	Отношение сигнал/шум		
			Видимая область	УФ 254 нм	УФ 365 нм
Зеараленон	10 мкл	100 мкг/мл	не менее 5/1	не менее 5/1	-
Афлатоксин В1	2 мкл	10 мкг/мл	-	-	не менее 5/1

Таблица 4 – Относительное СКО выходного сигнала (площади пятна)

Контрольное вещество	Относительное СКО по площади пятна, %		
	Видимая область	УФ 254 нм	УФ 365 нм
Зеараленон	5,0	5,0	-
Афлатоксин В1	-	-	5,0

11 Оформление результатов поверки

11.1 Данные, полученные при поверке, оформляются в форме протокола в соответствии с требованиями, установленными в организации, проводящей поверку.

11.2 Прибор, удовлетворяющий требованиям настоящей методики поверки, признается годным к применению. Прибор, не удовлетворяющий требованиям настоящей методики, не допускается к применению.

11.3 Результаты поверки средств измерений подтверждаются сведениями о результатах поверки средств измерений, включенными в Федеральный информационный фонд по обеспечению единства измерений. По заявлению владельца средства измерений или лица, представившего его на поверку, на средство измерений наносится знак поверки, и (или) выдается свидетельство о поверке средства измерений, и (или) в паспорт средства измерений вносится запись о проведенной поверке, заверяемая подписью поверителя и знаком поверки, с указанием даты поверки, или выдается извещение о непригодности к применению средства измерений.

11.4 Знак поверки (по заявлению владельца) наносится на верхнюю панель денситометра и (или) на свидетельство о поверке.

Приготовление проявляющего реагента

Взвешивают 12,5 мг ЖЖ красного прочного и переносят в мерную колбу 25 см³. Добавляют 50 % этиловый спирт до метки. Массовая концентрация раствора 0,5 мг/см³. Раствор готовят непосредственно перед использованием.

Метрологические характеристики приборов для тонкослойной хроматографии с денситометром «Сорбфил»

Таблица 2 – Отношение сигнал/шум

Контрольное вещество	Объем Пробы	Массовая концентрация	Отношение сигнал/шум		
			Видимая область	УФ 254 нм	УФ 365 нм
Зеараленон	10 мкл	100 мкг/мл	не менее 5/1	не менее 5/1	-
Афлатоксин В1	2 мкл	10 мкг/мл	-	-	не менее 5/1

Таблица 3 – Относительное СКО выходного сигнала (площади пятна)

Контрольное вещество	Относительное СКО по площади пятна, %		
	Видимая область	УФ 254 нм	УФ 365 нм
Зеараленон-100	5,0	5,0	-
Афлатоксин В1	-	-	5,0

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

Определение соотношения сигнал/шум при помощи программного обеспечения Денситометра Сорбфил.

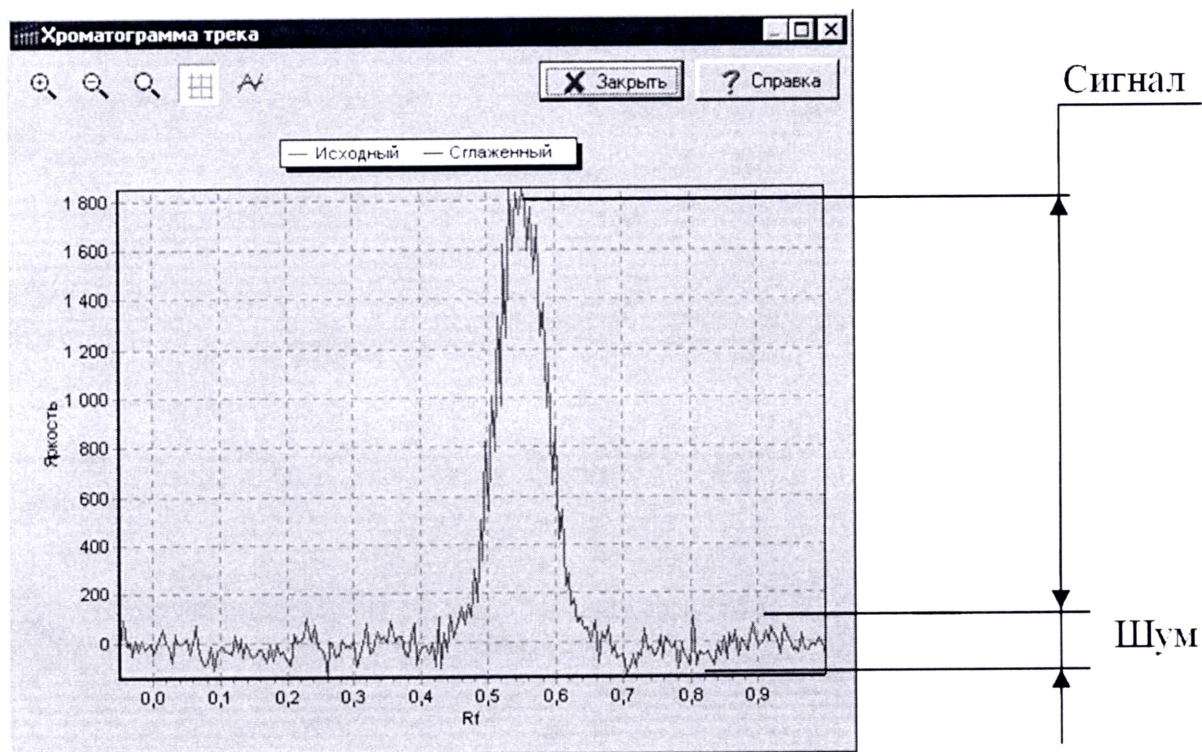


Рис. 3 – Определение соотношения сигнал/шум.