

УТВЕРЖДАЮ

Директор БелГИМ

Н.А.Жагора

” *mas* 2007



**Система высокоэффективной жидкостной
хроматографии Waters фирмы Waters, США**

МРБ МП. 1684-2007

СОДЕРЖАНИЕ

1 Введение	3
2 Операции поверки	3
3 Средства поверки.....	3
4 Требования к квалификации поверителей.....	4
5 Требования безопасности	4
6 Условия поверки.....	5
7 Подготовка к поверке	5
8 Проведение поверки.....	6
9 Оформление результатов поверки.....	9
Приложение А... Методика приготовления жидких смесей контрольных веществ.....	11
Приложение Б Форма протокола поверки.....	12

1 Введение

Настоящая методика распространяется на системы высокоэффективной жидкостной хроматографии Waters (далее - хроматографы) с детектором поглощения ультрафиолетового диапазона 2487 (далее - 2487), масс-спектрофотометрическим детектором Quattro Micro (далее - Quattro Micro), детектором на диодной матрице 2996 (далее - 2996), рефрактометрическим детектором 2410 (далее 2410) и флуоресцентным детектором 2475 (далее - 2475) и устанавливает методику их первичной и периодической поверок.

Межповерочный интервал 12 месяцев.

2 Операции поверки

При проведении поверки должны быть выполнены операции поверки, указанные в таблице 1.

Таблица 1

Наименование операции	Номер пункта методики	Обязательность проведения операций поверки	
		первичная	периодическая
1 Внешний осмотр	8.1	Да	да
2 Опробование:			
- определение уровня флуктуационных шумов нулевого сигнала и дрейфа нулевого сигнала;	8.2	да	да
- определение предела детектирования			
3 Определение метрологических	8.4		

характеристик:			
- определение относительного среднею квадратического отклонения (далее ОСКО)			
выходных сигналов (площадь пиков и время удерживания);	8.4.1	да*	*
- определение изменения выходного сигнала за 8 ч непрерывной работы;	8.4.2	да	да
- определение погрешности результатов аналитических измерений	8.4.3	нет	да**

Примечания

1 * При отсутствии методики выполнения измерений (МВИ) по ГОСТ

3 Средства поверки

При проведении поверки должны применяться основные и вспомогательные средства, указанные в таблице 2. Таблица 2

Наименование и тип средства поверки	Документ, регламентирующий технические требования к нему	Технические характеристики
Весы лабораторные		Кл.точн. 2, предел взвешивания 200 г, ц.д. 0,2 мг
Колонка	Symmetry C18	4,6x75 мм
Колонка	Symmetry C18	3,5 мкм

8.010-99. 3 ** При наличии методики выполнения измерений (МВИ) по ГОСТ 8.010-99.

Ацетонитрил	ТУ 6-09-14-2167-84	Для жидкостной хроматографии	
Антрацен	ГСО РБ 690-02	1 мг/л (ацетонитрил/вода - 70:30) для 2475	
Кофеин	Sigma	99,9 % осн.в-ва (вода чистоты для ЖХ) для 2410	
Ацетофенон		1 мг/л для 2487	
ацетон	WAT042881 (используют при тестировании на линейность)	1 мг/л (метанол/вода 60:40) для 2487	
Ацетофенон (acetophenone)		10,3 мг/л (метанол/вода 60:40) для 2487	
Прорифенон (propiorphenone)		10,1 мг/л (метанол/вода 60:40) для 2487	
Бутирофенон (butyrophenone)		10,2 мг/л (метанол/вода 60:40) для 2487	
Propyl paraben		5,01 мг/л; 10,0 мг/л; 15,0 мг/л; 20,0 мг/л; 25,1 мг/л; 30,1 мг/л (метанол) для 2487 и 2996	
Сульфадиметоксин	S7007	для Quatro-Micro	
ESI Sensivity Reserpine	reserpine	5 мг (+10%, -0%) для Quatro-Micro	
API Setup Solution	reserpine PPG-1000 (использую! при тестировании на линейность)	2 нг/мкл 25 нг/мкл	ацетонитрил/вода - 50:50 для Quatro-Micro
Вода чистоты для ЖХ	(HPLC grade water)	Дегазированная	
Бюретка	ГОСТ 29169-91	1-2-100-0,2	

Пипетки	ГОСТ 29227-91	Кл.точн. 2, номинальная вместимость 0,1; 1, 2, 10 мл
Колбы мерные	ГОСТ 1770-91	Кл. точн. 2, вместимость 25, 50, 100, 500, 1000 мл
Термометр лабораторный	ГОСТ 28498-90	ц.д. 0,1 °С, диапазон от 0 до 55 °С
Программное обеспечение		Empower (для 2487, 2996, 2410, 2475) и MassLYNX (для Quatro-Micro)
Примечания 1 Допускается применять другие средства поверки, прошедшие метрологическую аттестацию или поверку в органах государственных метрологических служб и удовлетворяющие по точности требованиям настоящей методики. 2 Допускается применять вместо ГСО реактивы квалификации не хуже х.ч. при соблюдении нормированных в методике соотношений.		

Если при проведении той или иной операции поверки получают отрицательный результат, дальнейшую поверку прекращают.

4 Требования к квалификации поверителей

К проведению поверки и обработке результатов измерений допускают лиц, аттестованных в качестве поверителей в области физико-химических измерений в порядке, установленном Госстандартом Республики Беларусь.

5 Требования безопасности

5.1 При проведении поверки должны быть соблюдены правила при работе в химических лабораториях.

5.2 Лица, проводящие поверку, должны быть ознакомлены с правилами (условиями) безопасной работы хроматографа и средств поверки, приведенными в их эксплуатационной документации.

6 Условия поверки

При проведении поверки должны быть соблюдены следующие условия:

- температура окружающего воздуха, °С 20 ± 5 ;
- относительная влажность окружающего воздуха, % от 30 до 80;
- атмосферное давление, КПа от 84 до 106,7;
- напряжение питания сети, В 230 ± 10 %;
- частота питающей сети, Гц 50 ± 1 .
- механические воздействия, внешние электрические и магнитные поля, влияющие на работу хроматографа, не допускаются.

7 Подготовка к поверке

7.1 Подготовить эталонные средства измерений к работе в соответствии с их техническим описанием или инструкцией по эксплуатации.

7.2 Подготовить поверяемый хроматограф к работе в соответствии с технической документацией фирмы. Перед проведением поверочных работ хроматограф с поверяемым детектором должен пройти тестовые проверки в соответствии с документацией фирмы, входящей в комплект поставки и программным обеспечением Empower (для 2487, 2996, 2410, 2475) и MassLYNX (для Quatro-Micro).

7.3 Приготовить жидкие смеси контрольных веществ в соответствии с методикой приготовления изложенной в **приложении А** с содержанием анализируемых компонентов согласно **таблице 3**,

Антрацен	0,1 мг/л	20 мкл	HPLC grade water,	1	для 2475
----------	----------	--------	-------------------	---	----------

Таблица 3

Контрольный компонент	Массовая концентрация компонента в контрольном растворе	Объем пробы, мкл	Элюент	Скорость потока, мл/мин	Примечание
		20 мкл	может быть:	1	для 2487 и 2996
Ацетофенон (acetophenone)	10,3 мг/л		-метанол/вода 60:40 HP GC grade water -		
Прорифенон (propiorphenone) Бутирофенон (butyrophenone)	10.1 мг/л 10.2 мг/л		400 мл минимум HPLC grade methanol - 600 мл минимум; propyl paraben мин. 5 мг/л; -вода (HPLC grade water)		
Кофеин	25 мкг/мл	20 мкл	вода (HPLC grade water)	1	для 2410
(anthracene) Ацетофенон (2487)			300 мл минимум HPLC grade ацетонитрил (acetonitrile), 700 мл минимум		для 2487 и 2996
Сульфадиметоксин	1 мкг/л (пг/мкл) 100 мкг/л			1	для Quatro-Micro
-reserpine; PPG-1000; -triacetyl-B-cyclodextrin; -октафторнафтал и н	2 нг/мкл 25 нг/мкл 50 нг/мкл	1 мкл	ацетонитрил/вода 50:50	1	для Quatro-Micro
в изооктане	1 пг/мкл	1 мкл			

8 Проведение поверки

8.1. Внешний осмотр

При проведении внешнего осмотра должно быть установлено соответствие хроматографа следующим требованиям: четкость маркировки; отсутствие механических повреждений; соответствие комплектности требованиям технической документации фирм - изготовителя и паспортным данным.

8.2 Опробование

При опробовании проводят:

- а) определение уровня флуктуационных шумов нулевого сигнала детектора, дрейфа нулевого сигнала и предела детектирования (для 2487, 2996, 2410),
- б) определение Рамановского отношения сигнала к шуму ASTM для воды чистоты для ЖХ и предела детектирования (для 2475)
- в) отношение сигнал/шум (для Quattro-Micro)

8.2.1 После выхода хроматографа на режим записывают в течение 1 часа нулевой сигнал на наиболее чувствительной шкале. Значение дрейфа нулевого сигнала принимают равным смещению нулевого сигнала в течение 1 часа.

Полученные значения дрейфа нулевого сигнала за 1 час не должны превышать:

для 2487 - $1 \cdot 10^4$ е.п./ч

для 2996- $1 \cdot 10^3$ е.п./ч

для 2410- $2,5 \cdot 10^1$ ед. рефр/ч.

8.2.2 Уровень флуктуационных шумов нулевого сигнала (ДХ) определяют после выхода хроматографа на режим.

Полученные значения уровней шумов нулевого сигнала не должны превышать: для

2487- $2,5 \cdot 10^5$ е.о.п для 2996- $1,5 \cdot 10^5$ е.о.п для 2410- $2,5 \cdot 10^8$ ед. рефр/ч.

8.2.3 Значение Рамановского отношения сигнала к шуму (S) для воды чистоты для ЖХ (100 % HPLC grade water) определяется при скорости потока 1,0 мл/мин по формуле (1).

Уровень Рамановского тока (H) - Уровень темнового тока (H₀)

$$s = \frac{H - H_0}{\text{Шум AS I M}} \quad (1)$$

Полученное расчетное значение S должно быть не менее 800.

8.2.4 Отношение сигнал-шум (h/Ах) для Quattro Micro измеряют с использованием 3-х проб указанных в таблице 3.

Значение (h/Ах) должно быть не менее 20:1,

8.2.5 Определение предела детектирования (минимальной измеряемой концентрации контрольного вещества в стандартном режиме) выполняют при дозировании соответствующей смеси контрольного вещества. Каждая смесь дозируется не менее 6 раз.

Предел детектирования рассчитывают по формуле (2)

$$C_{\min} \approx \frac{2 AX \times G}{S \cdot V} \quad (2)$$

где C_{mi,-} - предел детектирования, г/мл

G - масса контрольного вещества, г

S - площадь под пиком, усл.ед. • с

AX - уровень флуктуационных шумов, усл.ед.

V - скорость потока (расход) элюента, мл/с Масса контрольного вещества при использовании жидкой пробы определяется по формуле (3):

$$G = V \cdot C \quad (3)$$

где V - объем аттестованной смеси, мл;

C - концентрация определяемого компонента, г/мл

Полученное значение (C_{\min}) не должно превышать:
 для 2487 - $1,0 \cdot 10^{-9}$ г/мл по антрацену (или ацетофенон)
 для 2996 - $2,0 \cdot 10^{-9}$ г/мл по антрацену
 для 2475 - $1,0 \cdot 10^{-12}$ г/мл по антрацену
 для 2410 - $1,0 \cdot 10^{-6}$ г/мл по кофеину.

8.4 Определение метрологических характеристик

8.4.1 Определение относительного среднего квадратического отклонения (ОСКО) выходных сигналов хроматографа

В зависимости от наименования детектора ОСКО определяют по времени удерживания, площади и высоте пиков для чего используются материалы и комплектующие, приведенные в таблице 4.

Таблица 4

Наименование детектора	Применяемые материалы	комплектующие	условия	Примечание
2487	HPLC grade water Ацетофенон (acetophenone) Прориофенон (proprionophenone) Бутирофенон (butyrophenone) Антрацен	Колонка Symmetry C18, 4,6x75 мм Мембранный фильтр, нейлон, 0,20 мкм Насос 1525 Инжектор 2690	скорость потока 1 мл/мин.	6 инъекций по 20 мкл

ПРИЛОЖЕНИЕ А (рекомендуемое)

МЕТОДИКА приготовления жидких смесей контрольных веществ

7

А.1 Растворы в диапазоне концентраций свыше 1 мг/мл готовят методом объемно-весовым методом. Массовую концентрацию определяемого компонента C_0 определяют по формуле

$$C_0 = \frac{m_i}{V} \quad (1)$$

где m_i - масса контрольного компонента, мг
 V - объем приготовленного раствора, мл

Исходные вещества, используемые для приготовления растворов, должны содержать не менее 99,5% основного вещества; растворители - не менее 98% основного вещества.

А.2 Температура окружающей среды при приготовлении жидких смесей должна находиться в диапазоне от 18 до 22 °С.

А.3 Мерную колбу на 100 мл взвешивают на аналитических весах (m_1), вносят рассчитанное количество определяемого компонента и вновь взвешивают колбу (m_2). Массу определяемого компонента (m) вычисляют по формуле

$$m = m_2 - m_1 \quad (2)$$

в колбу с определяемым компонентом вводят 20-25 мл соответствующего растворителя, перемешивают содержимое и доводят объем раствора до метки. Тщательно перемешивают раствор.

Массовую концентрацию определяемого компонента рассчитывают по формуле (1).

А.4 Растворы в диапазоне концентраций менее 1 мг/мл приготавливают объемным методом путем последовательного разбавления более концентрированных растворов. Массовая концентрация определяемого компонента в растворах определяется по формуле

$$C_n = \frac{C_{n-1} \cdot v_n}{100} \quad (3)$$

где n - номер ступени разбавления исходного раствора смеси с концентрацией C_0 ,
 v_n - аликвотная доля раствора с концентрацией C_{n-1} , мг/мл

Перед каждым разбавлением рассчитывают значение аликвотной доли раствора v_n , исходя из заданного значения концентрации определяемого компонента C_n и концентрации разбавляемого раствора.

А.5 Растворы с концентрацией определяемого компонента свыше 1 мг/мл хранят 3 - 5 дней в чистых сухих склянках с притертыми пробками в холодильнике. Смеси меньших концентраций используются свежеприготовленными и хранению не подлежат

Продолжение таблицы 4

2475	HPLC grade water, 300 мл минимум HPLC grade ацетонитрил (acetonitrile), 600 мл минимум Антрацен	Колонка Symmetry C18, 3,5 мкм, 4,6x75 мм Мембранный фильтр, нейлон, 0,20 мкм Хроматографический модуль 2695 Насос Alliance Инжектор Alliance	скорость потока 1 мл/мин.	6 инъекций по 20 мкл
2996	Антрацен Erbium Perchlorate 100 мкг/л HPLC grade water и 3 мл 10- г/л Erbium Perchlorate	Насос 1525 Автосамплер 717 Колонка Symmetry C18, 3,5 мкм, 4,6x75 мм	скорость потока 1 мл/мин.	6 инъекций по 20 мкл
2410	Кофеин Вода (HPLC grade water)	Мембранный фильтр, нейлон, 0,20 мкм Хроматографический модуль 2695 Насос Alliance Инжектор Alliance	скорость потока 1 мл/мин.	6 инъекций по 20 мкл
Quattro-Micro	reserpine; Сульфадиметоксин 1 мкг/л (пг/мкл) 100 мкг/л	Хроматографический модуль 2695 Насос Alliance Инжектор Alliance	скорость потока 1 мл/мин.	6 инъекций

Используя полученные результаты и программное обеспечение Empower (для 2487, 2996, 2410, 2475) и MassLYNX (для Quattro-Micro) вычисляют ОСКО выходных сигналов.

ОСКО рассчитывают по формуле (4)

$$J = \frac{100}{X_{cp}} \sqrt{\frac{\sum (X_{cp} - X_i)^2}{(n-1)}}$$

где X_i - значение параметра выходного сигнала (с / усл.ед./с) Значение ОСКО выходных сигналов не должно превышать значений, приведенных в таблице 5

Таблица 5

Детектор	ОСКО, %	
	по времени удерживания	по площадям пиков
2487	1,0	1,0
2410	1,0	1,5
Quattro-Micro	2,0	5,0
2475	1,0	1,0
2996	1,0	1,5

(4)

8.4.2 Определение изменения выходного сигнала за 8 часов непрерывной работы

После выхода хроматографа на режим дозируют три раза аттестованную смесь в соответствии с таблицей 4 в зависимости от наименования поверяемого детектора и определяют среднее арифметическое значение (X_{cp}) выходного сигнала хроматографа (площадь пиков). Через 8 часов непрерывной работы снова в тех же условиях дозируют три раза смесь и определяют среднее арифметическое значение (X_{cp1}) выходного сигнала. Относительное изменение выходного сигнала определяют по формуле:

$$\delta_1 = \frac{X_{cp1} - X_{cp}}{X_{cp}} \cdot 100 \quad (5)$$

8.4.3 Определение погрешности результатов аналитических измерений.

Определение погрешности результатов аналитических измерений проводят при наличии методик выполнения измерений (МВИ), разработанных и аттестованных в установленном порядке. Условия проведения измерений и применяемые образцы для контроля должны соответствовать установленным в МВИ. Образцы (тестовые смеси с известным содержанием C_d контрольного компонента) для контроля погрешности должны удовлетворять требованиям МИ 2335-95.

На вход хроматографа подают образец для контроля и определяют в нем содержание контрольного компонента по процедуре, указанной в МВИ.

Результат измерений содержания контрольного компонента C должен удовлетворять условию

$$|C - C_d| \leq K \quad (6)$$

где C_d - действительное значение содержания компонента,

K - норматив оперативного контроля погрешности измерения, установленный в МВИ.

9 Оформление результатов поверки

9.1. Результаты поверки заносят в протокол, форма которого приведена в **приложении Б**.

9.2. Результаты поверки считают положительными и хроматограф признают годным к применению, если он отвечает требованиям настоящей методики. Положительные результаты поверки оформляют путем выдачи свидетельства о поверке по форме, установленной СТБ 8003-93 (приложение В).

9.3. При отрицательных результатах поверки выдается извещение о непригодности по форме, установленной СТБ 8003-93 (приложение Г) с указанием причин не соответствия. Хроматограф, не прошедший поверку, к применению не допускается. Предыдущее свидетельство аннулируется.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б
(рекомендуемое)

Форма протокола поверки

Протокол поверки № _____ от " ____ " _____ 200 ____ г

системы высокоэффективной жидкостной хроматографии Waters жидкостного хроматографа,
тип детектора комплектующие заводской №
принадлежащего _____

При поверке, проведенной _____
наименование предприятия, организации, проводившей поверку

по методике поверки _____

сведения о методике поверки

применялись следующие средства измерений:

- 1 _____
Наименование, тип, класс точности, разряд, пределы измерений и заводской номер)
- 2 _____
- 3 _____
- 4 _____

Условия поверки:

- температура окружающей среды, °С - _____ ;
- давление, кПа (мм.рт.ст.) - _____ ;
- влажность воздуха, % - _____ ;
- напряжение сети, В - _____ ;
- частота питающей сети, Гц _____ ;

Результаты поверки:

1 При проведении внешнего осмотра установлено _____

2 При проведении опробования установлено _____

Состав аттестованной смеси _____

уровень флуктуационных шумов _____

дрейф нулевого сигнала _____ детектирования

4 Определение относительного среднего квадратического отклонения выходного сигнала

Значение анализируемого компонента в смеси, Ао	Показания хроматографа	Полученное значение ОСКО	Допустимое значение ОСКО

5 Определение изменения выходного сигнала за 8 часов непрерывной работы

ЗАКЛЮЧЕНИЕ:

Выдано свидетельство № _____ от " _____ " _____ 200__ г.

Поверку провел

Ф.И.О., должность

подпись