

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель ГЦИ СИ ФГУП
«ВНИИМ им. Д.И. Менделеева»



Ханов Н.И.

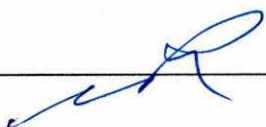
«15» октября 2012 г.

ХРОМАТОГРАФЫ ЖИДКОСТНЫЕ

«ЛЮМАХРОМ»

МЕТОДИКА ПОВЕРКИ
МП-242-1428-2012

Руководитель отдела
ГЦИ СИ ФГУП "ВНИИМ им.Д.И.Менделеева"

 Л.А.Конопелько

Старший научный сотрудник
ГЦИ СИ ФГУП "ВНИИМ им.Д.И.Менделеева"

 М.А.Мешалкин

Санкт - Петербург
2012

Настоящая методика поверки распространяется на хроматографы жидкостные «Люмахром» (далее – хроматографы), выпущенные после 01.01.2013 года и предназначенные для измерения содержания различных компонентов в пробах веществ и материалов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в изократическом и градиентом режимах.

Интервал между поверками – 1 год.

1 ОПЕРАЦИИ ПОВЕРКИ

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

Таблица 1

Наименование операции	Номер пункта	Проведение операции при поверке	
		первичной	периодической
Внешний осмотр	6.1	Да	Да
Опробование	6.2	Да	Да
Проверка соответствия программного обеспечения ¹⁾	6.3	Да	Да
Определение метрологических характеристик	6.4		
--- Определение относительного среднего квадратического отклонения выходного сигнала хроматографа	6.4.1	Да	Да ²⁾
---- Определение метрологических характеристик хроматографа по нормативному документу на методику (метод) измерений	6.4.2	Нет	Да ³⁾
¹⁾ Проводится только при отсутствии стандартизированной (аттестованной) методики (метода) измерений с использованием хроматографа.			
²⁾ Проводится при наличии стандартизированной (аттестованной) методики (метода) измерений с использованием хроматографа.			

1.2 Согласно МИ 2531-99 «ГСИ. Анализаторы состава веществ и материалов универсальные. Общие требования к методикам поверки в условиях эксплуатации», допускается проводить периодическую поверку в соответствии с разделами «Контроль точности» аттестованных в установленном порядке методик (методов) измерений или разделов «Контроль точности (погрешности, прецизионности, неопределенности)» или «Обработка результатов измерений» стандартизованных методик (методов) измерений, реализованных на поверяемом хроматографе (см. примечание к табл.1).

1.3 Допускается проведение первичной поверки только с теми блоками, которые входят в состав комплектации хроматографа в соответствии с заказом. Проведение периодической поверки допускается только с теми блоками, с которыми хроматограф эксплуатируется в течение межповерочного интервала.

1.4 При отрицательных результатах поверки по какому-либо пункту настоящей методики дальнейшая поверка хроматографа прекращается, и он признается прошедшим поверку с отрицательным результатом.

2 СРЕДСТВА ПОВЕРКИ

2.1 При проведении поверки применяют следующие средства поверки:

2.1.1 Государственный стандартный образец состава раствора антрацена в ацетонитриле ГСО 8749-2006 (массовая концентрация от 0,19 до 0,21 мг/см³, границы относительной погрешности $\pm 2\%$ при доверительной вероятности $P = 0,95$).

2.1.2 Колбы мерные вместимостью 50 и 100 см³ 2-го класса точности по ГОСТ 1770-74.

2.1.3 Пипетки градуированные вместимостью 1 и 5 см³ 2-го класса точности по ГОСТ 29227-91.

2.1.4 Цилиндр мерный вместимостью 250 см³ 2-го класса точности по ГОСТ 1770-74.

2.2 При проведении поверки применяют следующие вспомогательные средства и химические реактивы:

2.2.1 Тест-колонка хроматографическая длиной 50 мм внутренним диаметром 2,1 мм, заполненная сорбентом Kromasil C18 (5 мкм).

2.2.2 Система сбора и обработки хроматографических данных на основе персонального компьютера.

2.2.3 Вода дистиллированная по ГОСТ 6709 – 72.

2.2.4 Ацетонитрил для жидкостной хроматографии ос.ч. по ТУ 6-09-5449-89.

2.3 Допускается применение других средств измерений, стандартных образцов и вспомогательных средств, метрологические и технические характеристики которых не хуже указанных п.2.1 и 2.2.

3 ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ

При проведении поверки хроматографов необходимо соблюдать требования «Межотраслевых правил по охране труда (правила безопасности) при эксплуатации электроустановок» ПОТ Р М-016-2001, правила техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007-76, а также требования, изложенные в Руководстве по эксплуатации хроматографов.

4 УСЛОВИЯ ПОВЕРКИ

4.1 При проведении поверки должны соблюдаться следующие условия:

- температура окружающей среды $(20 \pm 5)^\circ\text{C}$;
- относительная влажность воздуха не более 80%;
- атмосферное давление от 84 до 106 кПа;
- напряжение сети питания (220 ± 22) В, частота (50 ± 1) Гц;
- содержание вредных веществ в воздухе помещения, где проводится поверка, не должно превышать установленных по ГОСТ 12.1.005-88 значений предельно допустимых концентраций.

4.2 Для получения экспериментальных данных, необходимых для поверки, допускается участие в поверке операторов, обслуживающих хроматограф (под контролем поверителя).

4.3 Перед проведением поверки необходимо изучить Руководство по эксплуатации хроматографов и настоящую методику, и обеспечить выполнение условий поверки и требований техники безопасности.

5 ПОДГОТОВКА К ПРОВЕДЕНИЮ ПОВЕРКИ

При подготовке к проведению поверки проделявают следующие операции:

- подготавливают хроматограф к работе согласно Руководству по эксплуатации. В качестве хроматографической колонки используют тест-колонку по п.2.2.1;
- подготавливают средства поверки, перечисленные в разделе 2;
- приготавливают подвижную фазу согласно Приложению А;
- приготавливают поверочные растворы согласно Приложению А;
- подготавливают к приему данных компьютер и программное обеспечение (далее – ПО) согласно Руководству пользователя программного обеспечения.

6 ПРОВЕДЕНИЕ ПОВЕРКИ

6.1 Внешний осмотр

При внешнем осмотре проверяют отсутствие механических повреждений, могущих влиять на работоспособность и метрологические характеристики хроматографа.

6.2 Опробование

6.2.1 При опробовании проводят определение предела детектирования антрацена с каждым детектором, входящим в состав хроматографа.

6.2.2 После выхода хроматографа на режим записывают нулевой сигнал в течение 15 мин. Измеряют максимальную величину уровня флуктуационных шумов хроматографа на участке с минимальным количеством выбросов (этот участок должен быть равен, по меньшей мере, трем минутам; Приложение В). Полученное значение используется при расчете предела детектирования по формуле (1) для каждой зарегистрированной хроматограммы.

П р и м е ч а н и я

1. Допускается определение максимального уровня флуктуационных шумов хроматографа непосредственно на хроматограмме контрольного вещества, на участке с минимальным количеством выбросов. Этот участок должен быть равен, по крайней мере, трем минутам.

2. Если программное обеспечение позволяет подсчитать S_{ϕ} – среднее квадратическое отклонение флуктуационных шумов нулевого сигнала хроматографа, то уровень флуктуационных шумов может быть оценена как $4S_{\phi}$.

6.2.3 Затем вводят в хроматограф 5 раз ($N = 5$) поверочный раствор антрацена в подвижной фазе по п.А.2 Приложения А. Условия регистрации хроматограмм выбирают в соответствии с Приложением Б.

6.2.4 Регистрируют хроматограммы для каждого ввода и при помощи программного обеспечения определяют высоту и площадь хроматографического пика. При этом проверяют автоматическую разметку пика и при необходимости корректируют ее вручную.

6.2.5 Рассчитывают предел детектирования ($C_{min,i}$, нг/см³) для каждого ввода по формуле:

$$C_{min,i} = \frac{2 \cdot \Delta_{h,i} \cdot C_2 \cdot V_n}{S_i \cdot \left(\frac{u}{60} \right)}, \quad (1)$$

где $\Delta_{h,i}$ - уровень флуктуационных шумов детектора по п.6.2.2 для i -ой хроматограммы, единицы выходного сигнала;

C_2 - массовая концентрация поверочного раствора антрацена (по п.А.3.2 Приложения А), нг/см³;

V_n - объем дозирующей петли в соответствии с документацией на хроматограф, мм³;

S_i - площадь пика антрацена по п.6.2.4, единицы выходного сигнала · с;

u - объемная скорость подачи подвижной фазы, мм³/мин.

6.2.6 За предел обнаружения антрацена C_{min} , нг/см³, принимают наибольшее из значений, полученных по п.6.2.5.

6.2.7 Хроматограф считается прошедшим поверку в части опробования с положительным результатом, если рассчитанные значения предела детектирования для каждого детектора не превышают значений, приведенных в таблице 2.

Таблица 2 – Нормированные значения пределов детектирования антрацена

Тип детектора	Предел детектирования антрацена, нг/см ³ , не более
Спектрофотометрический	1
Флуориметрический	2
Спектрофлуориметрический	0,5

6.3 Проверка соответствия программного обеспечения

6.3.1 При подтверждении соответствия программного обеспечения устанавливают наименование и версию программного обеспечения (далее - ПО).

6.3.2 Для ПО «МультиХром», используя стандартные средства операционной системы, в меню «Пуск» выбирают подменю «Все Программы», находят в нем элемент, соответствующий ПО «МультиХром» (например, «Система МультиХром») и, раскрыв его, запускают утилиту «Проверка инсталляции ПО», которая выводит на экран компьютера требуемую информацию в форме отчета. При необходимости отчет может быть распечатан.

6.3.3 При использовании ПО «ПикЭксперт» запускают его стандартными средствами операционной системы, в главном меню выбирают элемент *Информация/О программе* и в появившемся диалоге нажимают кнопку «Проверка». При этом появится окно с информацией о программном обеспечении.

6.3.4 Результат проверки считают положительным, если номер версии ПО соответствует идентификационным данным, указанным в разделе «Программное обеспечение» описания типа средства измерений» или выше.

6.4 Определение метрологических характеристик

6.4.1 Определение относительного среднего квадратического отклонения выходного сигнала хроматографа

6.4.1.1 При определении относительного среднего квадратического отклонения выходного сигнала хроматографа (далее - ОСКО) используют результаты, полученные по п.6.2.3. При помощи программного обеспечения на каждой хроматограмме фиксируют значения выходного

сигнала хроматографа - время удерживания хроматографического пика контрольного вещества (t_i , мин) и его площадь (S_i).

6.4.1.2 Вычисляют среднее арифметическое полученных значений площади пика $\bar{S}$ и времени удерживания $\bar{t}$:

$$\bar{S} = \frac{\sum_{i=1}^N S_i}{N} \quad (2)$$

$$\bar{t} = \frac{\sum_{i=1}^N t_i}{N} \quad (3)$$

и ОСКО выходного сигнала по формулам:

$$CKO_S = \frac{100}{\bar{S}} \cdot \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (S_i - \bar{S})^2}{N - 1}} \quad (4)$$

$$CKO_t = \frac{100}{\bar{t}} \cdot \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (t_i - \bar{t})^2}{N - 1}}, \quad (5)$$

где CKO_S - ОСКО площади пика на хроматограмме, %;

CKO_t - ОСКО времени удерживания пика на хроматограмме, %.

6.4.1.3 Хроматограф считается прошедшим поверку в части определения среднего квадратического отклонения выходного сигнала, если значения ОСКО выходного сигнала хроматографа по 6.4.1.2 для каждого детектора не превышают значений, приведенных в таблице 3.

Таблица 3 – Пределы допускаемых значений ОСКО выходного сигнала хроматографа

Тип детектора	По времени удерживания, %	По площади пика, %
Спектрофотометрический	1,5	2
Флуориметрический	1,5	4
Спектрофлуориметрический	1,5	4

6.4.2 Определение метрологических характеристик хроматографа по нормативному документу на методику (метод) измерений

6.4.2.1 Определение метрологических характеристик по нормативному документу на методику (метод) измерений проводят только при наличии стандартизованной или аттестованной в установленном порядке методики (метода) измерений.

6.4.2.2 Определение метрологических характеристик проводится в соответствии с требованиями, указанными:

- в разделе «Контроль точности» аттестованных методик (методов) измерений;
- в разделах «Контроль точности (погрешности, прецизионности, неопределенности)», «Обработка результатов измерений» или в других разделах стандарта, содержащих требования к контролю точности (погрешности, прецизионности, неопределенности) результатов измерений.

6.4.2.3 Хроматограф считается прошедшим поверку в части определения метрологических характеристик по нормативному документу на методику (метод) измерений, если результаты измерений не превышают установленных в методике/стандарте контрольных нормативов.

6.4.2.4 Если результаты определения метрологических характеристик по п.6.4.2.2 признаются неудовлетворительными, то проводят операции поверки по п.6.4.1. Выводы на основании этих результатов считаются окончательными.

7 ОФОРМЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ПОВЕРКИ

7.1 Результаты поверки хроматографа заносят в протокол по форме Приложения Г. При этом в протокол включают только те блоки, которым укомплектованверяемый экземпляр хроматографа.

7.2 Хроматограф, прошедший поверку с положительными результатами, признается годным и допускается к дальнейшему использованию. На него оформляется свидетельство о поверке установленного образца.

7.3 Хроматограф, прошедший поверку с отрицательным результатом, к дальнейшей эксплуатации не допускается, и на него оформляется извещение о непригодности установленного образца.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

(обязательное)

Приготовление подвижной фазы и поверочных растворов

А.1 Подготовка стеклянной посуды

Посуду для приготовления и хранения элюента и поверочных растворов моют только концентрированной серной кислотой (без применения других моющих средств), тщательно ополаскивают дистиллированной водой и сушат 15-30 мин при температуре 105°C.

А.2 Приготовление подвижной фазы (элюента)

Тщательно вымытый согласно п.А.1 цилиндр вместимостью 250 см³ ополаскивают примерно 20 см³ ацетонитрила. Отмеряют с его помощью 200 см³ ацетонитрила и переносят в заранее подготовленную плотно закрывающуюся стеклянную емкость для постоянного хранения подвижной фазы. Этим же цилиндром отмеряют 50 см³ дистиллированной воды, выливают в ту же емкость и тщательно перемешивают. Недопустимо использование резиновых, корковых и полимерных пробок (за исключением фторопластовых).

Перед употреблением элюент выдерживают для дегазации не менее 4 часов либо проводят вакуумирование, поместив емкость с элюентом на ультразвуковую баню.

Срок хранения в условиях, исключающих испарение компонентов смеси – 6 месяцев.

А.3 Приготовление поверочных растворов

А.3.1 Приготовление раствора антрацена в ацетонитриле массовой концентрации 1 мкг/см³

При помощи градуированной пипетки номинальной вместимостью 1 см³ переносят 0,5 см³ стандартного образца состава раствора антрацена в ацетонитриле с номинальным значением массовой концентрации 200 мкг/см³ (действительное значение указано в формуляре) в мерную колбу с притертой пробкой вместимостью 100 см³, разбавляют до метки ацетонитрилом и перемешивают. Срок хранения раствора в холодильнике - 3 месяца.

Действительное значение массовой концентрации антрацена в растворе (C_1 , мг/см³) вычисляют по формуле:

$$C_1 = C_o \cdot \frac{V_o}{V_k}, \quad (\text{A.1})$$

где C_o - действительное значение массовой концентрации стандартного образца состава раствора антрацена, мкг/см³;

V_o - объем исходного раствора, использованный для приготовления данного раствора (0,5 см³);

V_k - объем приготовленного раствора (100 см³).

А.3.2 Приготовление раствора антрацена в подвижной фазе массовой концентрации 50 нг/см³

В мерную колбу вместимостью 50 см³ с притертой пробкой при помощи градуированной пипетки номинальной вместимостью 5 см³ помещают 2,5 см³ раствора антрацена в ацетонитриле массовой концентрации 1 мкг/см³ по п.А.3.1, разбавляют до метки подвижной фазой, приготовленной по п.А.2, и перемешивают. Раствор используют в день приготовления.

Действительное значение массовой концентрации антрацена в растворе (C_2 , нг/см³) вычисляют по формуле:

$$C_2 = 1000 \cdot C_1 \cdot \frac{V_1}{V_k}, \quad (\text{A.2})$$

где V_1 - объем промежуточного раствора антрацена массовой концентрации C_1 , мкг/см³, приготовленного по п. А.3.1, использованный для приготовления данного раствора (2,5 см³);

V_k - объем приготовленного раствора (50 см³).

1000 - коэффициент согласования размерности единиц массы.

Относительная погрешность массовой концентрации антрацена в приготовленном растворе не превышает $\pm 3\%$.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

(обязательное)

Настройки блоков хроматографа и программного обеспечения при регистрации хроматограмм

Б.1 Необходимые настройки насоса и детекторов приведены в таблице Б.1.

Таблица Б.1

Параметр	Значение
Насос «Люмахром Н 1730»	
Режим	Изократический
Верхний предел избыточного давления $P_{\text{макс}}$, МПа	10,0
Нижний предел избыточного давления $P_{\text{мин}}$, МПа	0
Начальное давление P_0 , МПа	1,0
Начальный расход (объемная скорость) подвижной фазы Q_0 , мм ³ /мин	1000
Конечное давление $P_{\text{кон}}$, МПа	0,5
Скорость сброса Q_P , мм ³ /мин	1000
Расход подвижной фазы при регистрации, мм ³ /мин	100
Спектрофотометрический детектор «Люмахром СФД 3220»	
Режим работы	Ручной
Длина волны, нм	252
Протокол обмена	1 (МультиХром)
Флуориметрический детектор «Люмахром ФЛД 2410 Флюорат-02-2М» Флуориметрический детектор «Люмахром ФЛД 2420 Флюорат-02-4М»	
Светофильтры	Канал возбуждения – № 1, канал регистрации – ХТ
Режим	Хроматография
Время регистрации, мин	10
Сглаживание	10
Чувствительность	Средняя
Коррекция опорн.	Нет
Коррекция проп.	Есть

Продолжение таблицы Б.1

Параметр	Значение
Спектрофлуориметрический детектор «Люмахром СФЛД 2310 Флюорат-02-Панорама»	
Длина волны возбуждения, нм	250
Длина волны регистрации, нм	400
Чувствительность	Средняя
Длительность измерения	10
Интервал усреднения, с	1
Каналы	Флюориметрия
Коррекция	На опору
Примечание – Рекомендуется провести выбор оптимальных длин волн возбуждения и регистрации антрацена для спектрофлуориметрического детектора согласно Приложению Д.	

Б.2 Условия хроматографического анализа при проведении проверки приведены в таблице Б.2.

Таблица Б.2

Параметр	Значение
Колонка и подвижная фаза	
Колонка (длина/внутренний диаметр), мм	50/2,1
Состав подвижной фазы	Ацетонитрил – вода 4:1 (об.)
Расход подвижной фазы, мм ³ /мин	100
Объем дозирующей петли, мм ³	В соответствии с формуляром
Поверочный раствор	
Вещество	Антрацен
Массовая концентрация, нг/см ³	50
Растворитель	Подвижная фаза

ПРИЛОЖЕНИЕ В

(обязательное)

Пример обработки хроматограмм

В.1 Для нахождения уровня флуктуационных шумов нулевого сигнала хроматографа необходимо распечатать листинг хроматограммы, выбрав масштаб по оси Y таким образом, чтобы вертикальный размер распечатки визуально не превышал ширину шумовой дорожки более чем в 5-7 раз. При распечатке хроматограмм поверочных растворов не обращают внимания на то, что пик рабочего вещества при этом «срезается».

В.2 На рис.В.1 приведен пример нахождения уровня флуктуационных шумов нулевого сигнала хроматографа (Δ_{hi}) при использовании флуориметрического и спектрофлуориметрического детекторов.

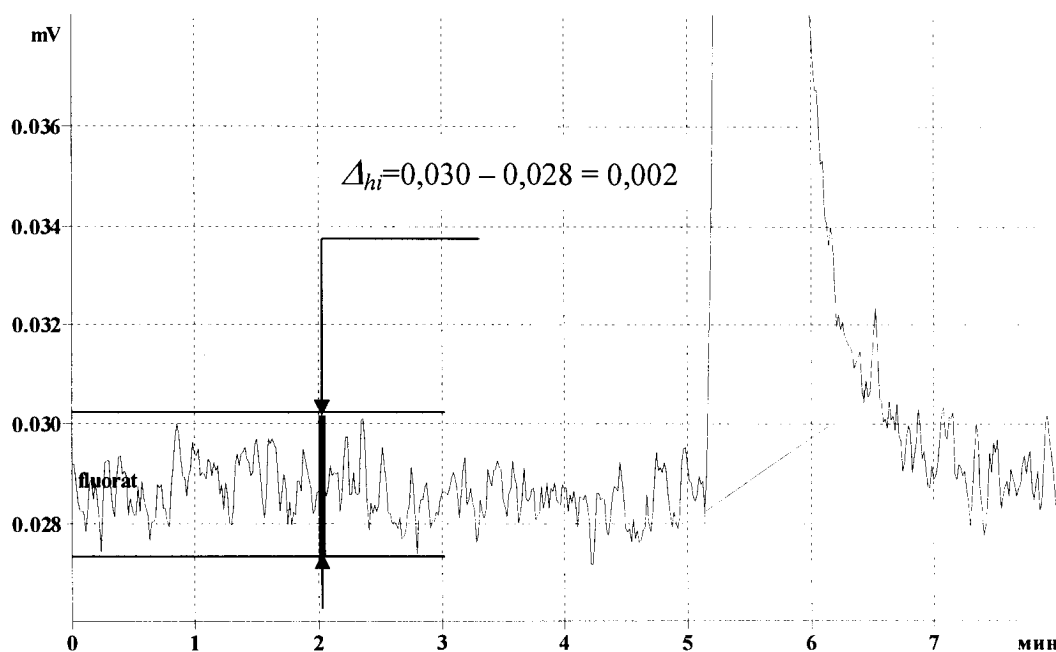


Рис. В.1. Пример нахождения уровня флуктуационных шумов нулевого сигнала флуориметрического детектора

В.3 На рис.В.2 приведен пример нахождения уровня флуктуационных шумов нулевого сигнала хроматографа (Δ_h) при использовании спектрофотометрического детектора.

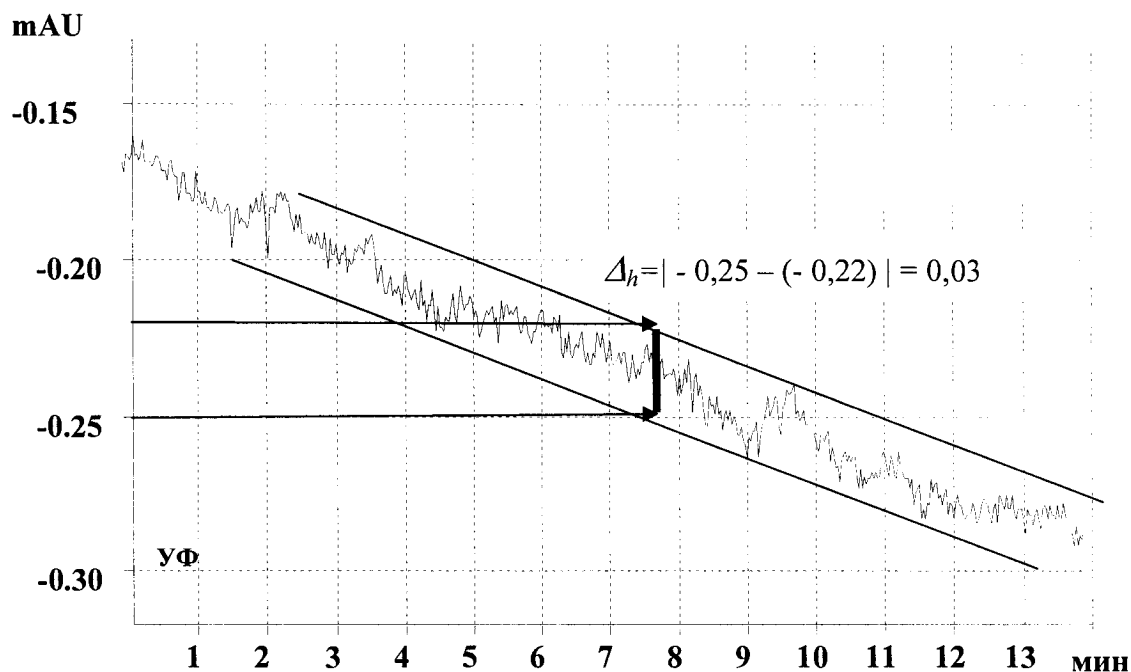


Рис. В.2. Пример нахождения уровня флуктуационных шумов спектрофотометрического детектора

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

(обязательное)

Форма протокола поверки хроматографа

Протокол № ____ от _____
поверки хроматографа жидкостного «Люмахром», зав. № ____

Детекторы: _____

Условия поверки: температура окружающего воздуха, ____°С, атмосферное давление, _____ кПа, относительная влажность _____ %.

Средства поверки:

1. Раствор антрацена в подвижной фазе, массовая концентрация 50 нг/см³, приготовленный из стандартного образца состава раствора антрацена

Внешний осмотр: _____

Проверка соответствия ПО.

Наименование и версия ПО _____

Опробование: определение предела детектирования

Спектрофотометрический детектор

№	Высота пика h_i , ед.выходного сигнала	Δh_i , ед.выходного сигнала	Предел детектирования, нг/см ³	Предел детектирования, максимальное значение, нг/см ³	Предел детектирования по формуле, нг/см ³
1					1,0
2					
3					
4					
5					

Флуориметрический детектор

№	Высота пика h_i , ед.выходного сигнала	Δh_i , ед.выходного сигнала	Предел детектирования, нг/см ³	Предел детектирования, максимальное значение, нг/см ³	Предел детектирования по формуле, нг/см ³
1					2,0
2					
3					
4					
5					

Спектрофлуориметрический детектор

№	Высота пика h_i , ед.выходного сигнала	Δh_i , ед.выходного сигнала	Предел детектирования, нг/см ³	Предел детектирования, максимальное значение, нг/см ³	Предел детектирования по формуле, нг/см ³
1					0,5
2					
3					
4					
5					

Определение относительного среднего квадратического отклонения выходного сигнала

Спектрофотометрический детектор

№	Значение выходного сигнала		Относительное СКО выходного сигнала, %			
			Рассчитано		Предел	
	t_i , мин	S_i	По времени	По площади	По времени	По площади
1					1,5	2,0
2						
3						
4						
5						

Флуориметрический детектор

№	Значение выходного сигнала		Относительное СКО выходного сигнала, %			
			Рассчитано		Предел	
	t_i , мин	S_i	По времени	По площади	По времени	По площади
1					1,5	4,0
2						
3						
4						
5						

Спектрофлуориметрический детектор

№	Значение выходного сигнала		Относительное СКО выходного сигнала, %			
			Рассчитано		Предел	
	t_i , мин	S_i	По времени	По площади	По времени	По площади
1					1,5	4,0
2						
3						
4						
5						

Заключение по результатам поверки _____

Выдано свидетельство о поверке (извещение о непригодности) № _____ от « » _____ 201 _ г.

Поверитель _____

ПРИЛОЖЕНИЕ Д

(рекомендуемое)

Оптимизация условий регистрации флуоресценции антрацена при помощи спектрофлуориметрического детектора

Д.1 Подготавливают спектрофлуориметрический детектор к работе и помещают в кюветное отделение кварцевую кювету с раствором антрацена по п.А.3.2 Приложения А. Устанавливают монохроматор возбуждения на длину волны 250 нм.

Д.2 После запуска программного обеспечения в окне «Спектральные измерения» устанавливают следующие параметры: сканирование - «по регистрации», канал «флюориметрия», коррекция - «на опору», усреднение «50», чувствительность ФЭУ - «низкая».

Д.3 Регистрируют спектр флуоресценции раствора антрацена массовой концентрации 50 нг/см³ в диапазоне сканирования от 375 до 415 нм, шаг сканирования 1 нм, и находят его максимум в области 395 – 405 нм.

Д.4 Устанавливают режим сканирования «по возбуждению», монохроматор регистрации выставляют на длину волны, соответствующую зарегистрированному по Д.3 максимуму спектра флуоресценции и регистрируют спектр возбуждения в диапазоне сканирования от 230 до 270 нм. Остальные параметры выбирают аналогично п.Д.2. Определяют максимум спектра возбуждения флуоресценции.

Д.5 Найденные по п.Д.3 и Д.4 значения длин волн, соответствующие максимумам спектров возбуждения и регистрации флуоресценции, используют при регистрации хроматограмм по п.6.2.3.