

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФГУП «ВНИИМ
им.Д.И.Менделеева»

Н.И.Ханов

25 сентября 2015 г.



Хроматографы жидкостные
1290 Infinity II LC

МЕТОДИКА ПОВЕРКИ
МП-242-1926 -2015

л.р. 62859-15

Руководитель отдела
ФГУП «ВНИИМ им.Д.И.Менделеева»

Л.А.Конопелько

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

М.А.Мешалкин

С. Петербург
2015 г.

Настоящая методика распространяется на хроматографы жидкостные 1290 Infinity II LC, изготавливаемые фирмой «Agilent Technologies», Германия и устанавливает методы и средства их первичной поверки (до ввода в эксплуатацию и после ремонта) и периодической (в процессе эксплуатации) поверок. Интервал между поверками - 1 год.

1. Операции поверки

№ п/п	Наименование операций	Номер пункта методики	Обязательность проведения	
			в эксплуатации	после ремонта
1.	Внешний осмотр. Проверка комплектности.	6.1	да	да
2.	Подготовка к поверке.	6.2	да	да
3.	Опробование.	6.3	да	да
4.	Определение метрологических характеристик.	6.4	да ¹⁾	да
5.	Определение метрологических характеристик по НД на МВИ	-	да ²⁾	нет

Примечания: ¹⁾ Проводится только при отсутствии стандартизированной (аттестованной) методики выполнения измерений с использованием хроматографа.

²⁾ Проводится при наличии стандартизированной (аттестованной) методики/методик выполнения измерений с использованием поверяемого хроматографа.

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 государственных научными метрологическими центрами методик выполнения измерений (далее – МВИ) или разделов «Контроль точности (погрешности, прецизионности, неопределенности)» или «Обработка результатов измерений» стандартизованных МВИ, реализованных на поверяемом хроматографе (см. примечания к табл.1).

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

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

1. Стандартный образец состава раствора антрацена в ацетонитриле ГСО 8749-2006.
2. Кофеин безводный (ФС 42-0249-07)
3. Стандартный образец состава раствора глюкозы МСО 0389:2002
4. Вода 1-ой степени очистки по ГОСТ Р 52501-2005.
5. Ацетонитрил для жидкостной хроматографии ос.ч. по ТУ 6-09-5449-89.
6. Колба К_н 01-100-14/23-ТСХ, ГОСТ 25336-82.
7. Колба мерная 2(4)-50-2 ГОСТ 1770-74.
8. Пипетка вместимостью 0,5 см³ по ГОСТ 29227-91.
9. Мешалка ММ-5 ТУ25-11-834-80.

10. Термометр лабораторный ТЛ4-Б2 ГОСТ 28498-90, диапазон измерений (0 - 50)° С, цена деления 0,1° С.
11. Барометр-анероид М-98 ТУ 25-11-1316-76.
12. Психрометр аспирационный МБ-4М ГОСТ 6353-52, диапазон измерения относительной влажности (10 - 100) %.

Все средства измерений, используемые при поверке, должны иметь свидетельства о поверке, а ГСО и химические реактивы - действующие паспорта.

Допускается применение других средств поверки, допущенных к применению в РФ, с метрологическими характеристиками не хуже указанных.

Контрольные растворы готовятся согласно Приложению А к настоящей методике.

3. Условия поверки

3.1. При проведении поверки должны быть соблюдены следующие условия:

- температура окружающего воздуха, °С 15 ... 25;
- допустимое изменение температуры в помещении, °С/час не более 1
- атмосферное давление, кПа 84 ... 107;
- относительная влажность воздуха, % 20 ... 80;
- напряжение питания переменного тока, В 220⁺²²₋₃₃;
- частота переменного тока, Гц 49 ... 51.

3.2. Перед проведением поверки прибор следует подготовить в соответствии с требованиями производителя при проведении тестирования оборудования, описанными в руководстве пользователя.

3.3. Установка и подготовка прибора к поверке, включение соединительных устройств, заземление, выполнение операций при проведении контрольных измерений осуществляется в соответствии с эксплуатационной документацией

4. Требования безопасности

Требования безопасности должны соответствовать рекомендациям, изложенным в Руководстве по эксплуатации

5. Подготовка к поверке и требования к квалификации поверителей

5.1. Приготовить поверочные растворы, указанные в таблице 1. Методика приготовления растворов приведена в приложении А к настоящей методике поверки.

Таблица 1

Наименование детектора	Поверочный раствор, массовая концентрация определяемого компонента
Детектор с изменяемой длиной волны - 1290 Infinity II Variable Wavelength Detector (1290 VWD)	Антрацен/ацетонитрил 5 мкг/см ³ или кофеин/ацетонитрил, 12,5 мкг/см ³
Детектор с диодной матрицей - 1290 Infinity II Diode Array Detector FS и 1290 Infinity II Diode Array Detector (1290 DAD)	Антрацен/ацетонитрил 5 мкг/см ³ или кофеин/ацетонитрил, 12,5 мкг/см ³
Детектор по светорассеянию - 1290 Infinity II Evaporative Light Scattering Detector (1290 ELSD)	Сахароза или глюкоза / вода, 200 мкг/см ³ кофеин/ацетонитрил, 12,5 мкг/см ³

К проведению измерений по поверке допускаются лица, изучившие техническое описание и методику поверки хроматографа.

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

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 Перед опробованием хроматографа необходимо проделать следующие операции:

- включить питание прибора;
- осуществить прогрев прибора в соответствии с техническим описанием на прибор;
- установить поток 1 мл/мин и проверить отсутствие течей подвижной фазы в местах соединений;
- удостовериться в стабильности давления подвижной фазы на входе в колонку при скорости потока 1 мл/мин

6.2.2 Подтверждение соответствия программного обеспечения

6.2.2.1 Определение номера версии (идентификационного номера) программного обеспечения.

Определение осуществляется следующим образом:

- в главном окне программы в строке команд щелкнуть мышью на команде «Help» (Помощь). В открывшемся окне щелкнуть мышью по строке «About» (О программе), в результате чего откроется окно, в котором приведены идентификационное название ПО и номер версии. Копия экрана с возможными окнами приведена на рисунках 1,2 и 3.

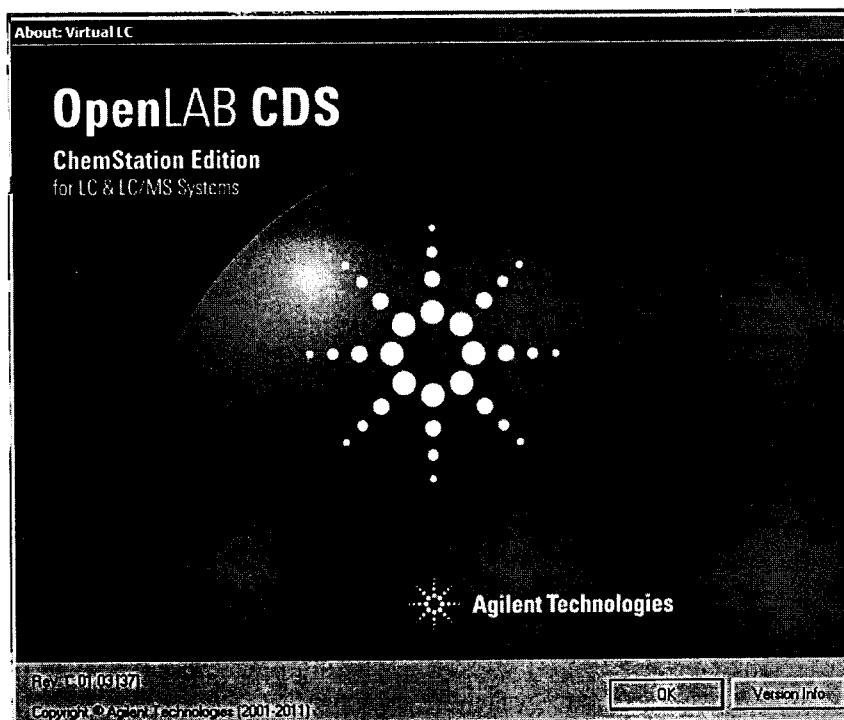


Рис.1 Окно с идентификационными данными OpenLab CDS Chemstation Edition

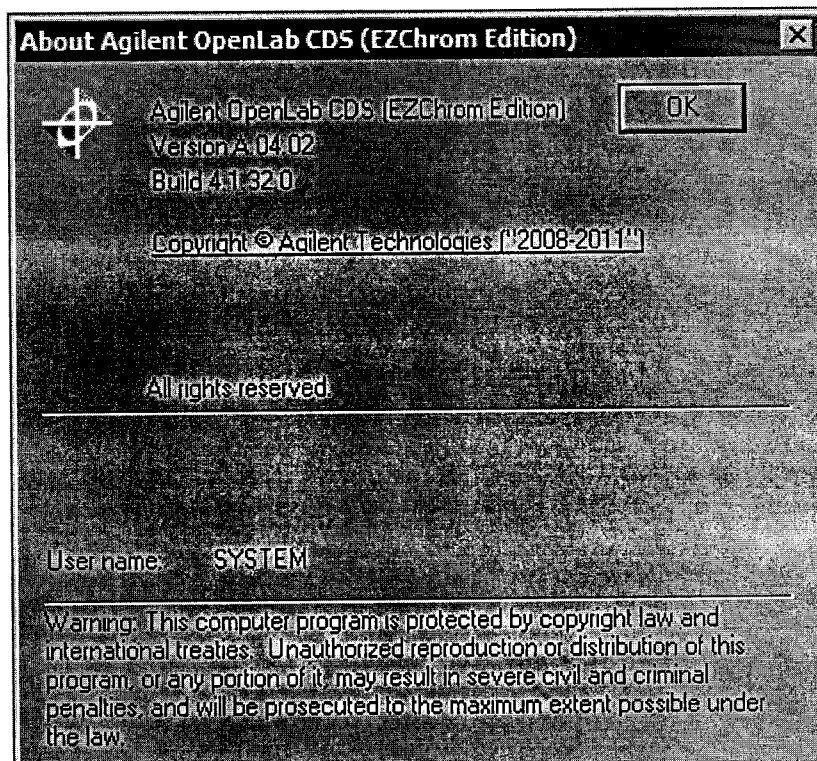


Рис.2 Окно с идентификационными данными OpenLab CDS EZChrom Edition

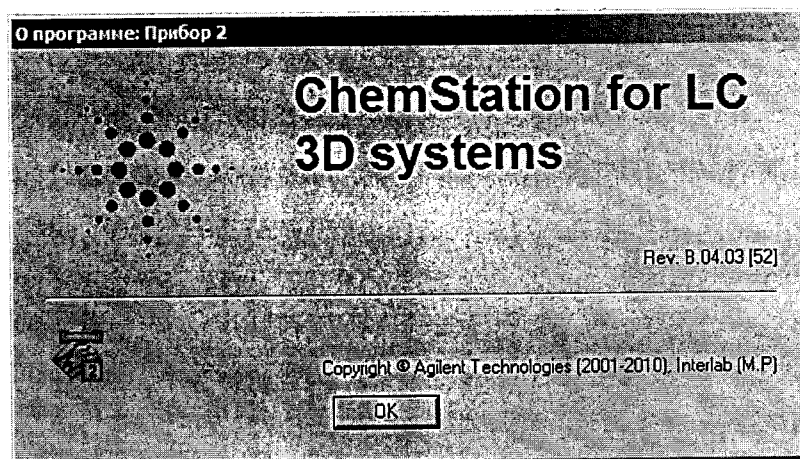


Рис.3 Окно с идентификационными данными Chemstation (32 разрядная версия)

Хроматограф считается выдержавшим поверку по п.6.2.3.1, если номер версии ПО не ниже номера, указанного в разделе «Программное обеспечение» описания типа (см. Таблицу 2) или выше. В названии ПО могут присутствовать значения VL, что указывает на бюджетный вариант данной версии.

Таблица 2

Наименование программного обеспечения	Идентификационное наименование программного обеспечения	Номер версии программного обеспечения
OpenLab CDS Chemstation Edition	OpenLab CDS Chemstation Edition	C.01.
OpenLab CDS EZChrom Edition	OpenLab CDS EZchrom Edition	A.04.
Chemstation	Chemstation	B.04.

6.3. Определение метрологических характеристик.

6.3.1. Установить параметры хроматографа (в зависимости от детектора), указанные в табл. 3, 4.

Таблица 3

Спектрофотометрический сканирующий детектор –1290 Infinity II Variable Wavelength Detector (1290 VWD), спектрофотометрические детекторы с диодной матрицей- 1290 Infinity II Diode Array Detector FS и 1290 Infinity II Diode Array Detector (1290 DAD)

Колонка ¹	ZORBAX SB-C18 (5 мкм, 4,6x150 мм)
Элюент (Mobile Phase)	80% ацетонитрил / 20% вода
Расход элюента (Flow rate)	1 мл/мин
Объем дозирования пробы (Injection volume)	20 мкл
Время отклика детектора	4 с
Температура колонки	комнатная при отсутствии термостата колонки и 40°C при наличии
Рабочая длина волны спектрофотометрических детекторов: - <i>определение уровня флуктуационных шумов нулевого сигнала детекторов</i> -- спектрофотометрический детектор с изменяемой длиной волны (1290 Infinity II Variable Wavelength Detector) -- спектрофотометрические детекторы с диодной матрицей (1290 Infinity II Diode Array Detector FS и 1290 Infinity II Diode Array Detector) - <i>определение дрейфа</i> --спектрофотометрический детектор с изменяемой длиной волны 1290 Infinity II Variable Wavelength Detector) -- спектрофотометрические детекторы с диодной матрицей (1290 Infinity II Diode Array Detector FS и 1290 Infinity II Diode Array Detector) - <i>определение предела детектирования</i> -- при использовании антрацена -- при использовании кофеина	230 нм 230 нм, контрольная длина волны $\lambda = 360$ нм, ширина полосы = 100 нм, ширина щели 4 нм. 230 нм 254 нм, контрольная длина волны $\lambda = 360$ нм, ширина полосы = 100 нм, ширина щели 4 нм. 250 нм 272 нм

Лампы и кюветы рекомендуется использовать стандартные (Standard, см. руководство пользователя)

¹ допускается использовать аналогичные колонки различных фирм-изготовителей, типоразмеров и маркировок, не ухудшающие их влияние на измеряемые величины по сравнению с приведенными колонками, при этом допускается изменение параметров проведения испытаний (подвижная фаза, расход элюента, температура колонки, время отклика детектора, ширина полосы). В испытаниях на уровень флуктуационных шумов и дрейфа рекомендуется, во избежание влияния фазы колонки, заменять их на рестрикторы (пустотелая колонка с диаметром 0,12 мм или просто отрезок капилляра определенной длины).

Таблица 4

Детектор по светорассеянию - 1290 Infinity II Evaporative Light Scattering Detector (1290 ELSD)

Колонка	ZORBAX SB-C18 (5 мкм, 4,6x150 мм) – анализ кофеина Hi-Plex Ca (8 мкм, 7,7 x 300 мм) – -анализ сахарозы или глюкозы
Элюенты (Mobile Phase)	80% ацетонитрил / 20% вода - анализ кофеина Вода – анализ сахарозы или глюкозы
Расход элюента (Flow rate)	1,0 мл/мин
Поток газа (Gas Flow)	1,6 л/мин
Сглаживание (Smoothing)	1 с
Частота сбора данных (Data Rate)	10 Гц
Объем дозирования пробы (Injection volume)	20 мкл
Температура колонки	Комнатная – для анализа кофеина 80 °С – для анализа сахарозы или глюкозы
Температура испарителя/ небулайзера	70 °С /70 °С – для анализа кофеина 90 °С /50 °С – для анализа сахарозы или глюкозы

6.3.2. Определение дрейфа и уровня флуктуационных шумов нулевого сигнала детекторов.

6.3.2.1 Перед проведением измерения система должна прокачивать поток элюента для стабилизации определяемых параметров не менее двух часов. Поток при этом допускается снизить до 0,3 – 0,6 мл/мин. Установить расход 1 мл/мин.

6.3.2.2. Определение дрейфа и уровня флуктуационных шумов нулевого сигнала детекторов проводится вручную или автоматически с помощью программного обеспечения хроматографа. Для этого следует снять базовую линию не менее 30 минут.

6.3.2.3. Автоматическое измерение уровня флуктуационных шумов проводится по алгоритму Peak-to-Peak и определяется за любой 1 минутный отрезок времени, начиная с 10 минуты испытаний. Дрейф, начиная с 10 минуты испытаний, определяется за 20 минутный отрезок времени и автоматически пересчитывается программой за один час.

6.3.2.4. Вручную уровень флуктуационных шумов определяется как максимальный размах повторяющихся колебаний нулевого сигнала с периодом не более 20 секунд. Дрейф за 20 минут умножается на три, чтобы оценить его уровень за один час.

6.3.2.5. Уровень флуктуационных шумов и дрейф нулевого сигнала не должен превышать значений, указанных в таблице 5.

Таблица 5

Наименование детектора	Уровень флуктуационных шумов, не более	Дрейф, не более
Спектрофотометрический детектор с изменяемой длиной волны (1290 Infinity II Variable Wavelength Detector)	$1,6 \cdot 10^{-5}$ Б	$4 \cdot 10^{-4}$ Б/ч
Спектрофотометрические детекторы с диодной матрицей (1290 Infinity II Diode Array Detector FS и 1290 Infinity II Diode Array Detector)	$2,5 \cdot 10^{-5}$ Б	$1,5 \cdot 10^{-3}$ Б/ч
Детектор по светорассеянию (1290 Infinity II Evaporative Light Scattering Detector)	2,0 мВ	5,0 мВ/ч

6.3.3. Определение предела детектирования детекторов

6.3.3.1 В инжектор хроматографа вводится 20 мкл поверочной смеси и проводится регистрация хроматограммы. Состав и концентрация поверочной смеси, соответствующей поверяемому детектору, указаны в таблице 1.

6.3.3.2. После записи хроматограммы, рассчитать предел детектирования по формуле :

$$C_{\min} = \frac{2 \cdot \Delta X \cdot G}{S \cdot V} \quad (1)$$

Где: $C_{\min}$ – предел детектирования, г/мл

ΔX - уровень флуктуационных шумов, Б, мВ (в зависимости от типа детектора), шум берется из рабочей хроматограммы на ровной части базовой линии в соответствии с требованиями п. 6.3.2.3. или 6.3.2.4.

G – масса контрольного вещества, г. (G = объем введенной пробы × концентрация введенного компонента).

S – площадь под пиком, Б, мВ (в зависимости от типа детектора) × с.

V – скорость потока (расход) элюента, мл/с.

6.3.3.3. Предел детектирования поверяемого детектора должен быть не более, чем указано в таблице 6.

Таблица 6

Наименование детектора	Предел детектирования, не более
Спектрофотометрический детектор с изменяемой длиной волны (1290 Infinity II Variable Wavelength Detector)	$1,5 \cdot 10^{-9}$ г/мл
Спектрофотометрические детекторы с диодной матрицей (1290 Infinity II Diode Array Detector FS и 1290 Infinity II Diode Array Detector)	$2,0 \cdot 10^{-9}$ г/мл
Детектор по светорассеянию (1290 Infinity II Evaporative Light Scattering Detector)	
- для раствора сахарозы или глюкозы	$1,0 \cdot 10^{-7}$ г/мл
- для кофеина	$5,0 \cdot 10^{-8}$ г/мл

6.4. Определение относительное СКО выходного сигнала хроматографа и относительного изменения выходного сигнала за 4 часа непрерывной работы

6.4.1. Последовательно ввести в инжектор хроматографа поверочную смесь 10 раз, каждый раз проводя регистрацию хроматограммы.

6.4.2. Используя данные, полученные в п. 6.4.1. вычислить относительное СКО результата измерения площадей и времен удерживания, используя формулу (2).

$$S = \frac{100}{X} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - X)^2}{n-1}} \quad (2),$$

где X_i – результат i -го измерения выходного сигнала (площадей пиков и времени удерживания);

X - среднее значение параметров выходного сигнала (площадей пиков и времени удерживания).

Вычисление можно производить с помощью электронных таблиц EXCEL или использовать автоматически определение с помощью программного обеспечения.

6.4.3. После выполнения пункта 6.4.1 хроматограф не выключать в течение 4-х часов. В спектрофотометрических детекторах на это время не допускается выключить источники излучения (лампы).

6.4.4. Через 4 часа непрерывной работы хроматографа провести повторную серию из двух измерений.

6.4.5. Относительное изменение выходного сигнала за 4 часа непрерывной работы, выраженное в процентах, вычисляют по формуле:

$$\delta = \frac{X_r - X}{X} \times 100, \% \quad (3)$$

где: X - среднее значение параметров выходного сигнала (площади пиков) в последних двух измерениях первой серии.

X_r - среднее значение параметров выходного сигнала (площади пиков) во второй серии.

Хроматограф считается выдержавшим поверку по п. 6.4, если значения относительного СКО и δ не более указанных в таблице 7.

Таблица 7

Наименование детектора	Относительное СКО выходного сигнала, %, не более		Относительное изменение выходного сигнала за 4 часа непрерывной работы (δ), %, не более
	по площади пика	по времени удерживания	по площади пика
Спектрофотометрический детектор с изменяемой длиной волны (1290 Infinity II Variable Wavelength Detector)	2	1	3
Спектрофотометрические детекторы с диодной матрицей (1290 Infinity II Diode Array Detector FS и 1290 Infinity II Diode Array Detector)	2	1	3
Детектор по светорассеянию (1290 Infinity II Evaporative Light Scattering Detector)	3	2	4

7. Оформление результатов поверки

7.1. Результаты поверки считаются положительными, если хроматограф удовлетворяет требованиям настоящей методики поверки. При поверке заполняется протокол, форма которого приведена в приложении Б.

7.2. Положительные результаты поверки оформляются путем выдачи свидетельства о поверке по установленной форме

7.3. Результаты поверки считаются отрицательными, если при проведении поверки установлено несоответствие прибора хотя бы одному требованию настоящей методики поверки.

7.4. Отрицательные результаты поверки оформляются путем выдачи извещения о непригодности.

МЕТОДИКА ПРИГОТОВЛЕНИЯ ПОВЕРОЧНЫХ РАСТВОРОВ

1. Для приготовления поверочных растворов применяют следующее оборудование и реактивы:

- 1 Колбы мерные 2-го класса точности с притёртой пробкой по ГОСТ 1770-74.
- 2 Пипетки мерные 2-го класса точности по ГОСТ 29228-91.
- 3 Межгосударственный стандартный образец состава раствора антрацена в ацетонитриле МСО 0043:1998, массовая концентрация 200 мкг/см³ или ГСО 8749-2006 состава раствора антрацена в ацетонитриле (200 мкг/см³).
- 4 Сахароза по ГОСТ 5833-75.
- 5 Стандартный образец состава раствора глюкозы МСО 0389:2002.
- 6 Вода 1-ой степени очистки по ГОСТ Р 52501-2005.
- 7 Ацетонитрил для жидкостной хроматографии ос.ч. по ТУ 6-09-5449-89.

2. Приготовление поверочных растворов с использованием жидких стандартных образцов

2.1. Используя формулу (1) производят расчет объема стандартного образца и объема растворителя, необходимых для получения раствора с массовой концентрацией контрольного вещества, требуемой для поверяемого детектора (см. таблицу 1 настоящей методики проверки).

2.2. При помощи градуированной пипетки переносят необходимый объем стандартного образца в мерную колбу с притертой пробкой вместимостью 100 см³ (или 1000 см³), разбавляют до метки растворителем и перемешивают.

2.3. Действительное значение массовой концентрации контрольного вещества в растворе (C_1 , мкг/см³) вычисляют по формуле:

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

где C_o - действительное (паспортное) значение массовой концентрации контрольного вещества в стандартном образце, мкг/см³;

V_o - объем стандартного образца, использованный для приготовления данного раствора.

V_k - общий объем приготовленного раствора (100 см³ или 1000 см³).

2.4. При необходимости проводят повторное разбавление полученного поверочного раствора

ПРОТОКОЛ
Хроматограф жидкостной модель _____

Зав. № _____

Принадлежит _____

ИНН владельца _____

Дата выпуска _____

Дата поверки _____

Условия поверки:

температура окружающего воздуха ____ °С;

атмосферное давление _____ кПа;

относительная влажность _____ %.

Документ, по которому проведена поверка _____

Средства поверки _____

Определение уровня флуктуационных шумов и дрейфа нулевого сигнала (графическое)

Допускаемое значение дрейфа нулевого сигнала, не более	Результат определения значения дрейфа нулевого сигнала	Допускаемое значение уровня флуктуационных шумов, не более	Результат определения уровня флуктуационных шумов

Определение чувствительности по поверочному раствору

Допускаемое значение предела детектирования, не менее	Результат определения предела детектирования

Расчетная часть:

Значение шума (размах шумовой полосы): _____

Среднее значение площади пика: _____

Масса контрольного вещества (G) , г. (G = объем введенной пробы × концентрация введенного компонента) _____

S – площадь под пиком, Б, мВ (в зависимости от типа детектора) × с

V – скорость потока (расход) элюента, мл/с _____

Определение относительного СКО выходного сигнала (S_r) и относительного изменения выходного сигнала (δ) за 4 часа непрерывной работы.

Серия измерений №1

№ измерения	Время удерживания (t)	Площадь пика (S)
1.		
2.		
3.		
4.		
5.		
6.		
7.		
8.		
9.		
10.		

Серия измерений №2

№ измерения	Время удерживания (t)	Площадь пика (S)
1.		
2.		

Результаты определения относительного СКО выходного сигнала (по площади пика)

Допускаемое значение (S_r), %, не более	Результат определения значения (S_r), %

Результаты определения относительного СКО выходного сигнала (по высоте пика)

Допускаемое значение (S_r), %, не более	Результат определения значения (S_r), %

Результаты определения относительного СКО выходного сигнала (по времени удерживания)

Допускаемое значение (S_r), %, не более	Результат определения значения (S_r), %

Результаты определения относительного изменения выходного сигнала (δ) по площади пика

Допускаемое значение (δ), %, не более	Результат определения значения (δ), %