



Федеральное государственное
бюджетное учреждение
**«Всероссийский научно-исследовательский
институт метрологической службы»**

119361, г. Москва, вн. тер. г. муниципальный
округ Очаково-Матвеевское, ул. Озерная, д. 46

Тел.: (495) 437 55 77
E-mail: Office@vniims.ru

Факс: (495) 437 56 66
www.vniims.ru



СОГЛАСОВАНО

Заместитель директора ФГБУ «ВНИИМС»

Ф.В. Булыгин

2023 г.

ГСИ. Системы капиллярного электрофореза P/ACE MDQ Plus.
Методика поверки»

МП 009-34-22

г. Москва
2023 г.

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Настоящая методика распространяется на Системы капиллярного электрофореза P/ACE MDQ Plus (далее – системы) «AB Sciex Pte. Ltd», Сингапур, и устанавливает методику их первичной и периодической поверки.

Первичная поверка проводится после ввода СИ в эксплуатацию.

Периодическая поверка проводится по истечению межповерочного интервала, а также средств измерений, повторно вводимых в эксплуатацию после их длительного хранения (более одного межповерочного интервала) и после ремонта.

Используемые средства поверки обеспечивают прослеживаемость систем к ГПЭ единицы массы (килограмма) ГЭТ 3-2020, что обеспечивается посредством использования поверенных средств измерений: весов и мерных колб через неразрывную цепь поверок в соответствии с ГПС для СИ массы, утвержденной приказом Росстандарта № 1622 от 04.07.2022 г. и ГПС для СИ массы и объема жидкости в потоке, объема жидкости и вместимости при статических измерениях, массового и объемного расхода жидкости, утвержденной приказом Росстандарта № 2356 от 26.09.2022г. Применяемый ГСО 5504-90 удельной энергии сгорания (бензойная кислота К-3) прослеживается также к ГПЭ единиц массовой (молярной) доли и массовой (молярной) концентрации компонента в жидких и твердых веществах и материалах ГЭТ 176-2013.

Применяемый ГСО 11708-2021 состава водного раствора флуоресцина прослеживается к единицам величин «молярная концентрация» и «массовая концентрация», воспроизводимых Государственным первичным эталоном единиц массовой (молярной) доли и массовой (молярной) концентрации компонентов в жидких и твердых веществах и материалах на основе спектральных методов ГЭТ 196-2015.

Применяемый ГСО 6687-93/6689-93 состава водных растворов хлорид-ионов прослеживается по аттестованной методике измерений ЦСО 01.04.02-2018 к единицам СИ: массы (кг), объема (м³), УЭП жидкостей (См/м) и температуры (К) в соответствии с утвержденными поверочными схемами.

В результате поверки должны быть подтверждены следующие метрологические требования, приведенные в таблице 1.

Таблица 1

Наименование характеристики	Значение
Предел детектирования бензойной кислоты (при положительной полярности высоковольтного блока) для фотометрических детекторов при отношении сигнал/шум 3:1, мкг/см ³ , не более	0,5
Предел детектирования хлорид-ионов (при отрицательной полярности высоковольтного блока) для фотометрических детекторов при отношении сигнал/шум 3:1, мкг/см ³ , не более	1,0
Предел допускаемого относительного среднего квадратического отклонения (СКО) выходного сигнала по времени миграции (по 6 последовательным измерениям), %	2
Предел допускаемого относительного среднего квадратического отклонения (СКО) выходного сигнала по площади пика (по 6 последовательным измерениям), %	3
Отношение сигнал/шум (s/n) флуоресцентного детектора с лазерным возбуждением, при вводе флуоресцина концентрации $3,6 \cdot 10^{-8}$ г/см ³ , не менее	10000:1
Предел допускаемого относительного изменения выходного сигнала по площади пика за 4 часа работы для всех детекторов, %	10

1 ПЕРЕЧЕНЬ ОПЕРАЦИЙ ПОВЕРКИ

1.1 При проведении поверки выполняют операции, указанные в таблице 2.

Таблица 2

Наименование операции	Номер пункта методики	Проведение операции при	
		первойной поверке	периодической поверке
1. Внешний осмотр	6	да	да
2. Подготовка к поверке и опробование	7	да	да
3. Проверка программного обеспечения средства измерений	8	да	да
4. Определение метрологических характеристик и подтверждение соответствия метрологическим требованиям:	9	да	да
5. Определение предела детектирования для фотометрических детекторов	9.1-9.5	да	да
6. Определение отношения сигнал/шум (s/n) флуоресцентного детектора с лазерным возбуждением	9.6	да	да
7. Определение относительного среднего квадратического отклонения выходного сигнала (по площади пика и времени миграции)	9.7	да	да
8. Определение относительного изменения выходного сигнала (по площади пика) за 4 часа работы	9.8	да	да

1.2. Первая поверка проводится для всех детекторов, которыми укомплектована система.

1.3. При эксплуатации меньшего количества детекторов, чем входит в комплектацию, эксплуатации в одной полярности, допускается проведение периодической поверки в сокращённом объеме на меньшем числе детекторов и (или) только при положительной или отрицательной полярности. В соответствии с приказом Минпромторга РФ № 2510 от 31.07.2020 г., поверка в сокращенном объеме проводится на основании письменного заявления владельца средства измерений или лица, представившего средство измерений на поверку, оформленного в произвольной форме, а информация об объеме проведенной поверки передается в Федеральный информационный фонд по обеспечению единства измерений.

2 ТРЕБОВАНИЯ К УСЛОВИЯМ ПРОВЕДЕНИЯ ПОВЕРКИ

При проведении поверки в лаборатории должны соблюдаться следующие нормальные условия измерений:

- температура окружающей среды, °C от 15 до 25
- относительная влажность воздуха, %, не более 80
- напряжение переменного тока, В 198 до 142
- содержание вредных веществ в воздухе в месте проведения поверки не должно превышать предельно допустимых концентраций по ГОСТ 12.1.005-88.

3. ТРЕБОВАНИЯ К СПЕЦИАЛИСТАМ, ОСУЩЕСТВЛЯЮЩИМ ПОВЕРКУ

К проведению поверки систем капиллярного электрофореза допускаются лица, изучившие эксплуатационные документы на них, имеющие достаточные знания и опыт работы с ними и аттестованные в качестве поверителя.

4. МЕТРОЛОГИЧЕСКИЕ И ТЕХНИЧЕСКИЕ ТРЕБОВАНИЯ К СРЕДСТВАМ ПОВЕРКИ

4.1 При проведении поверки применяют основные и вспомогательные средства поверки, указанные в таблице 3.

Таблица 3

Операции поверки, требующие применение средств поверки	Метрологические и технические требования к средствам поверки, необходимые для поверки	Перечень рекомендуемых средств поверки
п. 7.3 Проверка условия проведения поверки	Средства измерений температуры окружающего воздуха. Диапазон измерений температуры от 0 до + 50 °C, пределы допускаемой абсолютной погрешности измерений ± 0,5 °C Средства измерений относительной влажности окружающего воздуха в диапазоне от 5% до 95% пределы допускаемой абсолютной погрешности ±2%, средства измерений атмосферного давления в диапазоне от 600 до 1100 мбар, пределы допускаемой абсолютной погрешности ±3 мбар	Измеритель комбинированный Testo 176-P1, рег. №48550-11
	Средства измерений напряжения переменного тока, диапазон измерений напряжения от $1 \cdot 10^{-7}$ В до 1000 В, относительная ПГ от ±0,0035% до ±0,0055 %	Мультиметр цифровой Fluke 8454A рег. № 36395-07
7.2 Подготовка контрольных растворов – Приложение А	Средство измерений массы по ГОСТ OIML R 76-1-2011 с верхним пределом взвешивания 200 г класса точности 1 - специальный	Весы CPA225D-0CE, рег. №54391-13
	Средство измерений pH с диапазоном pH от 1,00 до 12,00, абсолютная погрешность ± 0,05 pH	Анализатор много-параметрический настольный Edge рег. № 57240-14
	Средства измерений объема вместимостью 10, 25, 50, 100 мл, 2-го класса точности с притертой пробкой по ГОСТ 1770-74	Колбы мерные вместимостью 10, 25, 50, 100 мл
	Средства измерений объема вместимостью 50 мл со шкалой по ГОСТ 25336-82	Стаканы В-1-50ТС
	Средства измерений переменного объема от 100 мкл до 1000 мкл и от 1 мл до 10 мл, предел допускаемого относительного среднего квадратического отклонения фактического объема дозы 1,0 %	Дозаторы пипеточные Eppendorf Research Plus одноканальные с переменным объемом дозирования от 100 мкл до 1000 мкл и

Операции поверки, требующие применение средств поверки	Метрологические и технические требования к средствам поверки, необходимые для поверки	Перечень рекомендуемых средств поверки
		от 1 мл до 10 мл Рег. №55543-13
	Стандартный образец состава раствора бензойной кислоты с аттестованным значением массовой концентрации бензойной кислоты 1,00 мг/см ³ , границы относительной погрешности аттестованного значения 1,0 % при Р=0,95 %	ГСО № 5504-90 удельной энергии сгорания (бензойная кислота К-3)
	Стандартный образец состава водных растворов хлорид-ионов с аттестованными значениями массовой концентрации хлорид-ионов 1,006; 0,503; 0,1007 г/дм ³ и границами относительной погрешности аттестованного значения СО при доверительной вероятности 0,95, ±0,5%, ±0,6%; ±0,6 %.	ГСО №6687-93/6689-93
	Стандартный образец состава водного раствора флуоресцина натрия с аттестованными значениями массовой концентрации флуоресцина натрия, 1,0 мг/дм ³ , молярной концентрации флуоресцина натрия 0,0028 ммоль/дм ³ с относительной расширенной неопределенностью аттестованного значения 2,2% при k=2 и Р=0,95	ГСО 11708-2021 состава водного раствора флуоресцина натрия
	Вспомогательное оборудование: вода дистиллированная деионизированная по ГОСТ Р 58144-2018 Термостат (водяная баня) от +3°C до +80°C Ультразвуковая ванна Пробирки полипропиленовые с крышкой объемом 1,5 мл типа "Эппendorф" Гидроксид натрия, х.ч. по ГОСТ 4328-77 Соляная кислота х.ч. по ГОСТ 3118-77 Натрий тетраборнокислый, стандарт-титр по ТУ 6-09-2540-87 или тетраборат натрия десятиводный, х.ч. по ГОСТ 4199-76 Борная кислота по ГОСТ 9656-75 Натрий хромовокислый, ч.д.а. по ТУ 6-09-91-84 Цетилtrimетиламмоний бромид (ЦТАБ) по ТУ 6-09-13-452	
п. 9 определение МХ СИ и подтверждение соответствия метрологическим требованиям	Светофильтры с длиной волны 200 и 254 нм для UV детектора; апертура для LIF детектора	
Допускается использовать при поверке другие утвержденные и аттестованные эталоны единиц величин, средства измерений утвержденного типа и поверенные, утвержденного типа стандартные образцы, удовлетворяющие метрологическим требованиям, указанным в таблице.		

5 ТРЕБОВАНИЯ (УСЛОВИЯ) ПО ОБЕСПЕЧЕНИЮ БЕЗОПАСНОСТИ ПРОВЕДЕНИЯ ПОВЕРКИ

5.1 Требования безопасности должны соответствовать рекомендациям, изложенным в руководстве по эксплуатации на прибор.

5.2. При выполнении поверки соблюдают правила техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007-76, требования электробезопасности по ГОСТ 12.1.019-79 и пожаробезопасности по ГОСТ 12.1.004-91.

6 ВНЕШНИЙ ОСМОТР СРЕДСТВА ИЗМЕРЕНИЙ

При внешнем осмотре устанавливают:

- соответствие комплектности системы требованиям технической документации;
- четкость маркировки;
- исправность механизмов и крепежных деталей.

Не допускаются дефекты, которые могут повлиять на работоспособность прибора.

7 ПОДГОТОВКА К ПОВЕРКЕ И ОПРОБОВАНИЕ СРЕДСТВА ИЗМЕРЕНИЙ

7.1 Подготавливают прибор к работе в соответствии с требованиями руководства по эксплуатации.

7.2 Готовят контрольные растворы бензойной кислоты и тетраборатного буферного раствора для систем с положительной полярностью источника высокого напряжения; хлорид-ионов и хроматного буферного раствора для систем с отрицательной полярностью источника высокого напряжения в соответствии с Приложением А.

7.3 Проверяют условия проведения поверки.

7.4 Опробование -проверка общего функционирования. Включают систему, дожидаются окончания инициализации и цикла самопроверки и выдерживают её во включённом состоянии до начала поверки в течение 45 минут. Результаты опробования считаются положительными, если после выхода системы на режим не появляются информационные сообщения программного обеспечения, указывающие на возникновение fatalных ошибок.

8. ПРОВЕРКА ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ СРЕДСТВА ИЗМЕРЕНИЙ

Проверка идентификационных данных ПО

8.1. Номер версии ПО определяют следующим образом: в главном окне программы в командной строке выбрать **Help**.

В открывшемся окне щелкнуть мышью по строке **About 32 Karat Software**, в результате откроется окно, в котором приведены наименование ПО и номер версии. Копия экрана с окном приведена на рисунке 1.

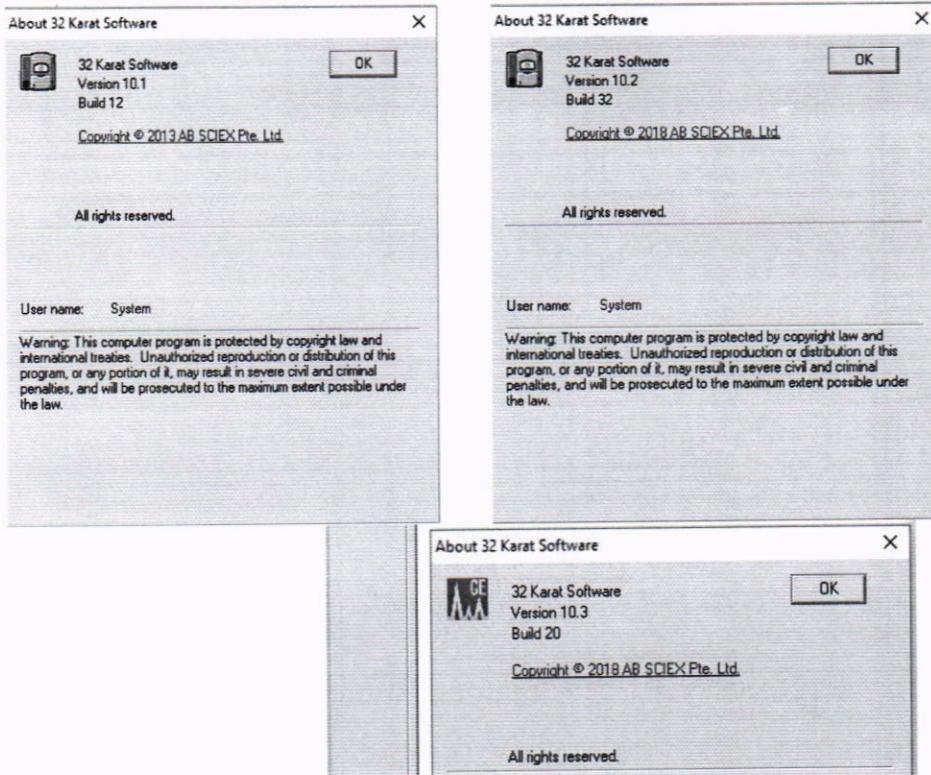


Рисунок 1 - Окна с названием и номером версии ПО

8.2. Проверка контрольной суммы файла **CSMain.exe** осуществляется по алгоритму MD5.

Вычисление контрольной суммы можно выполнить с помощью встроенных программ CMD (Командная строка) или Windows Power Shell.

Для вычисления контрольной суммы с помощью CMD:

- находят приложение Command Prompt через строку поиска или в меню Пуск и запускают его.
- В появившемся окне задают команду **certutil -hashfile "C:\32Karat\CSMain.exe" MD5**
- Считывают выданное командой значение цифрового идентификатора ПО.

Образец окон с командой и результатом приведён на Рисунке 2.

```
C:\Users\user>certutil -hashfile "c:\32Karat\csmain.exe" MD5
MD5 hash of c:\32Karat\csmain.exe:
17743ff80361bfd1f037d14df66058b9
CertUtil: -hashfile command completed successfully.
```

```
C:\Users\user>certutil -hashfile "c:\32Karat\csmain.exe" MD5
MD5 hash of c:\32Karat\csmain.exe:
1e3c9e0fcfbfd7a8e25457d76bad9d094
CertUtil: -hashfile command completed successfully.
```

Рисунок 2 – Получение цифрового идентификатора ПО с помощью командной строки

Для вычисления контрольной суммы с помощью Windows Power Shell:

- находят приложение Windows Power Shell через строку поиска или в меню Пуск и запускают его.
- В появившемся окне задают команду **Get-Filehash -Path C:\32Karat\CSMain.exe -Algorithm MD5**

- Считывают выданное командой значение цифрового идентификатора ПО.
Образец окна с командой и результатом приведён на Рисунке 3.

PS C:\Users\Administrator> Get-FileHash -Path C:\32Karat\csmain.exe -Algorithm MD5		
Algorithm	Hash	Path
MD5	DE991E5895B7BB582E9E5645815C0342	C:\32Karat\csmain.exe

Рисунок 3 – Получение цифрового идентификатора ПО с помощью Windows Power Shell

Совпадение идентификационных данных запущенного ПО с данными, приведёнными в таблице 4, является положительным результатом проверки идентификационных данных ПО.

Таблица 4 – Идентификационные данные программного обеспечения.

Идентификационные данные (признаки)	Значение		
Идентификационное наименование ПО	32 Karat		
Номер версии (идентификационный номер) ПО	10.1	10.2	Не ниже 10.3
Цифровой идентификатор ПО	17743ff80361 bfd1f0 37d14df6605 8b9	1e3c9e0fcffd7a 8e25457d76bad 9d094	de991e5895b7b b582e9e564581 5c0342
Алгоритм вычисления цифрового идентификатора	MD5	MD5	MD5

9. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕТРОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК СРЕДСТВА ИЗМЕРЕНИЙ И ПОДТВЕРЖДЕНИЕ СООТВЕТСТВИЯ МЕТРОЛОГИЧЕСКИМ ТРЕБОВАНИЯМ

9.1 Определение предела детектирования для фотометрических детекторов

В зависимости от полярности источника напряжения системы измерения проводят с использованием:

- бензойной кислоты и боратного буферного раствора для систем с положительной полярностью источника высокого напряжения;
- хлорид-ионов и хроматного буферного раствора для систем с отрицательной полярностью источника высокого напряжения.

Для измерений используют картридж с кварцевым непокрытым капилляром, внутренним диаметром 75 мкм, общей длиной 60 см, эффективной длиной 50 см и оптической апертурой 100 x 800 мкм.

При мечани: Настоятельно рекомендовано использовать два разных картриджа для измерений в положительной и отрицательной полярности.

Перед измерением все растворы перемешивают и дегазируют в ультразвуковой ванне (15 минут) и/или дегазуют центрифугированием (скорость вращения - 5000 об/мин, время 10 мин).

Перед началом проведения измерений промывают капилляр согласно Приложению Б.

Рекомендуется перед началом проведения поверки получить пробную электрофорограмму, по которой можно определить время миграции пика рабочего вещества. Время миграции ($T_{миг}$, мин) пика бензойной кислоты не должно превышать 10 мин, пика хлорид-ионов - 6 мин. При невыполнении этих условий промывку капилляра продолжают.

После регистрации пробной электрофорограммы переходят к п. 9.2 в случае положительной полярности источника напряжения системы капиллярного электрофореза или к п. 9.3 в случае отрицательной полярности источника напряжения системы.

9.2 Выполнение измерений при положительной полярности источника высокого

напряжения.

В соответствии с Руководством по эксплуатации системы регистрируют 6 электрофорограмм поверочного раствора бензойной кислоты, приготовленного по п.А.3.7 в условиях, указанных в таблице 5.

Рекомендуемая программа метода при положительной полярности (рис.4):

- 2 минуты промывки раствором гидроксида натрия по п.А.2.1 при 20 psi;
- 2 минуты промывки боратным буферным раствором по п.А.3.4 при 20 psi;
- 10 сек. гидродинамический вкол раствора бензойной кислоты по п.А.3.6 при 0,5 psi;

• 6 минут электрофоретическая миграция в буферном растворе по п.А.3.4 под напряжением 30 кВ

• на 2 минуте применить обнуление сигнала детектора

Если пик не успевает появиться на электрофорограмме, то допускается увеличить время выдержки напряжением с 6 до 10 минут.

После регистрации капилляр промывают по п. Б.3.

Затем переходят к обработке результатов.

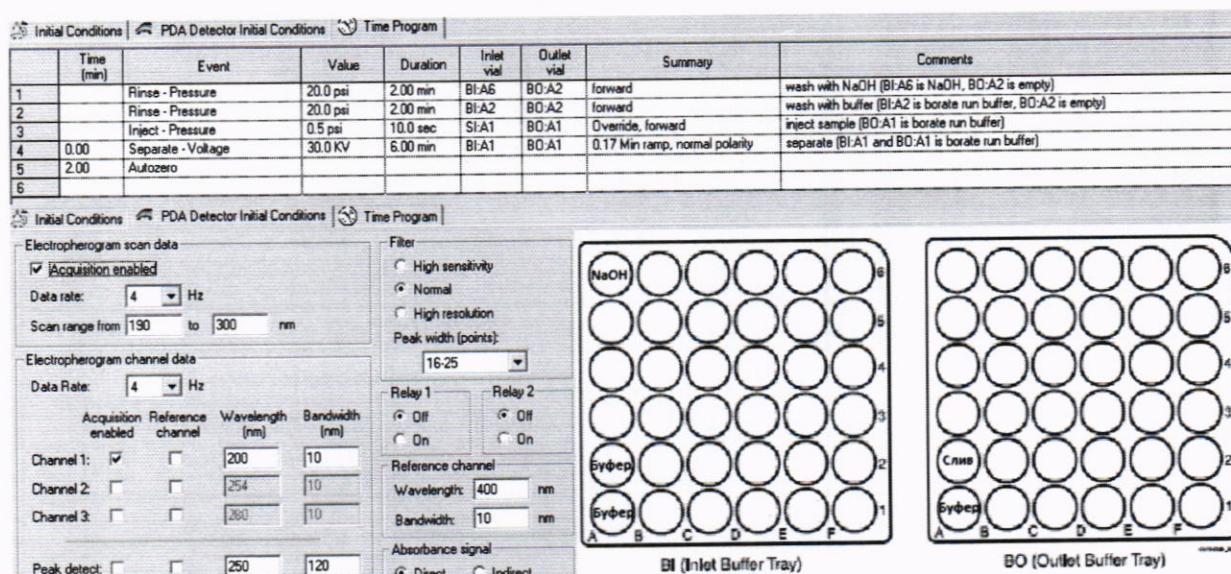


Рис. 4 - Рекомендуемый метод и схема расстановки реагентов при положительной полярности в программе 32 Karat

Таблица 5. Условия проведения измерений при положительной полярности источника высокого напряжения

Наименование параметра	Значение
Рабочее вещество	Бензойная кислота п.А.3.7
Капилляр	Кварцевый, непокрытый, внутренний диаметр 75 мкм, общая длина 60 см, эффективная длина 50 см
Оптическая апертура, мкм	100 x 800
Длина волны, нм	200 или 214
Сигнал абсорбции	Прямой(direct)
Частота дискретизации, Гц	4
Температура капилляра, °C	25
Ввод пробы	Гидродинамический, давление 35,5 мбар (0,5psi), время 10 с
Напряжение, кВ	30 (интервал выхода на заданное напряжение 0,17 мин).
Ведущий электролит	Боратный буферный раствор по п.А.3.4
Время анализа, мин	T _{миг} + 1

9.3 Выполнение измерений при отрицательной полярности источника высокого напряжения.

В соответствии с Руководством по эксплуатации системы регистрируют 6 электрофорограмм поверочного раствора хлорид-ионов, приготовленного по п.А.4.5 в условиях, указанных в таблице 6.

Приемлемо: ввиду низкой стабильности фонового электролита и его контаминации образцом при повторных вколов, необходима замена фонового электролита каждые 4-6 вколов

Рекомендуемая программа метода при отрицательной полярности (рис.5):

- 1 минута промывки раствором гидроксида натрия по п.А.2.1 при 20 psi;
- 3 минуты промывки буферным раствором по п.А.4.3 при 20 psi;
- 12 сек. гидродинамический вкол раствора хлорид-ионов при 0,8 psi;
- 5 минут электрофоретическая миграция в буферном растворе по п.А.4.3 под напряжением 20 кВ (обратная полярность), интервал выхода на заданное напряжение 1 мин
- после сбора данных 1,5 минуты промыть дистиллированной водой при 20 psi;
- на 1,5 минуте применить обнуление сигнала детектора

Если пик не успевает появиться на электрофорограмме, то допускается увеличить время выдержки напряжением с 5 до 6 минут.

После регистрации капилляр промывают по п.Б.3.

Затем переходят к обработке результатов.

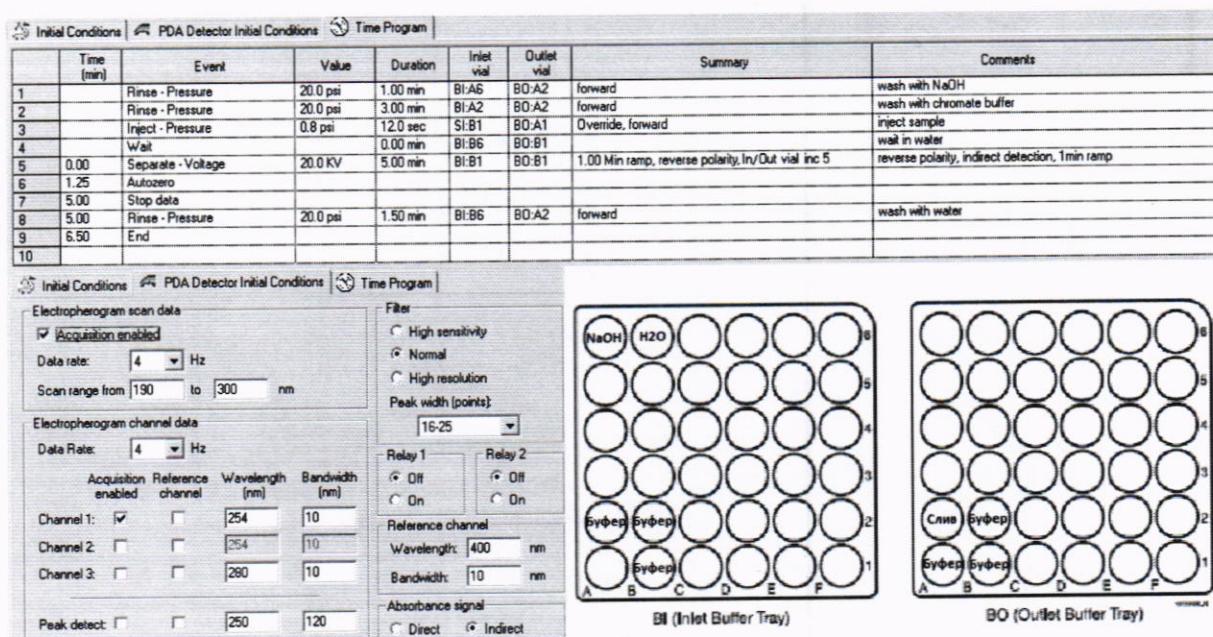


Рис. 5 - Рекомендуемый метод при отрицательной полярности в программе 32 Karat

Таблица 6. Условия проведения измерений при отрицательной полярности источника высокого напряжения

Наименование параметра	Значение
Рабочее вещество	Хлорид-ионы
капилляр	Кварцевый, непокрытый, внутренний диаметр 75 мкм, общая длина 60 см, эффективная длина 50 см
Оптическая апертура, мкм	100 x 800
Длина волны, нм	254
Сигнал абсорбции	Обратный(indirect)
Температура, °C	25
Ввод пробы	Гидродинамический, давление 55,5 мбар (0,8psi), время 12 с
Напряжение, кВ	20 (интервал выхода на заданное напряжение – 1 мин)
Ведущий электролит	Буферный раствор по п.А.4.3
Время анализа, мин	T _{миг} + 1

9.4. Обработка результатов

На полученных электрофорограммах проверяют правильность автоматической разметки пиков рабочих веществ и, если необходимо, корректируют её.

Примечание: Параметры разметки подбираются таким образом, чтобы кратковременные изменения выходного сигнала, имеющие характер одиночных импульсов, распознавались программным обеспечением как неименованные пики и при оценке уровня флюктуационных шумов нулевого сигнала не учитывались.

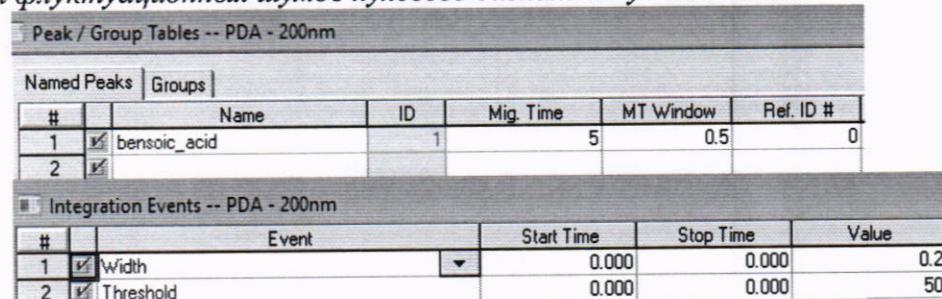


Рис. 6. Примерные настройки автоматической разметки для положительной полярности

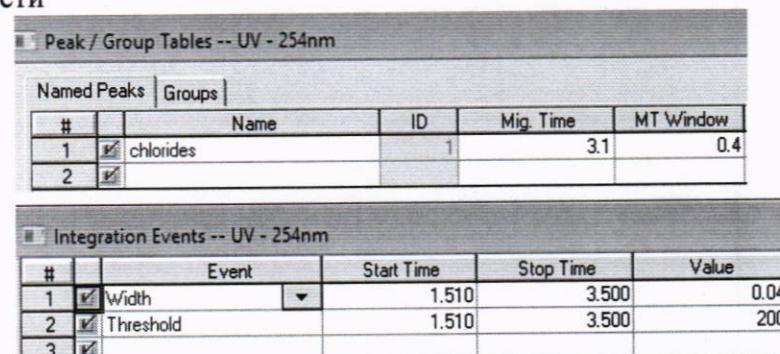


Рис. 7 - Примерные настройки автоматической разметки для отрицательной полярности

Используя программное обеспечение, с помощью встроенной функции S/N (ASTM) находят соотношение сигнал-шум (S/N_i) для каждой электрофорограммы. Согласно алгоритму ASTM, уровень флюктуационных шумов нулевого сигнала (N_i) принимается равным амплитуде колебаний сигнала относительно базовой линии, вычисленной методом наименьших квадратов, на 30-секундном участке электрофорограммы, предшествующем выходу пика рабочего вещества. За значение уровня сигнала S_i принимается высота пика рабочего вещества.

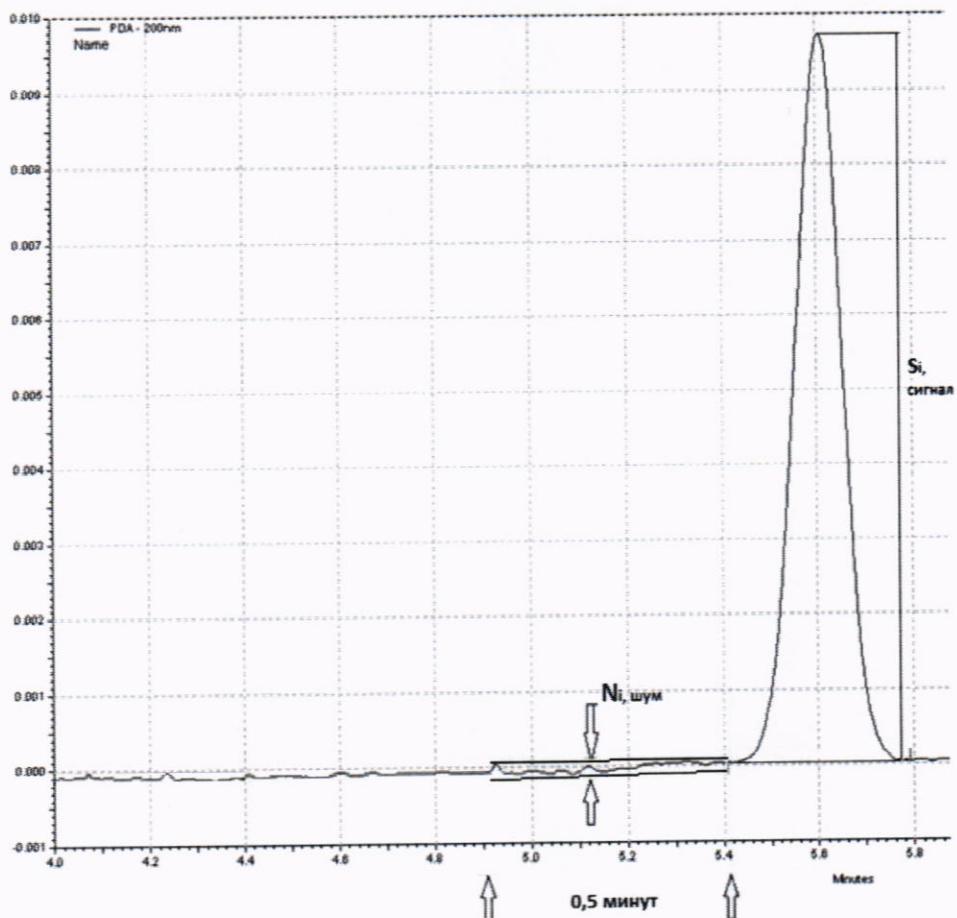


Рис. 8 – Принцип определения высоты пика Si и уровня флюктуации шума Ni

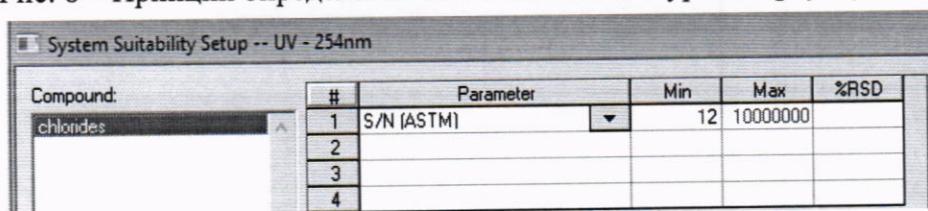


Рис. 9 – Меню программирования вычисления соотношения сигнал/шум

9.5 Для каждой электрофорограммы вычисляют предел детектирования при отношении сигнал/шум 3:1 ($C_{det,i}$, мкг/см³) по формуле:

$$C_{det,i} = \frac{3 \cdot C}{(S/N)_i} \quad (1)$$

где $(S/N)_i$ – соотношение сигнал/шум на i -ой электрофорограмме ($i = 1, \dots, 6$);

C - массовая концентрация поверочного раствора бензойной кислоты (или хлорид-ионов), мкг/см³.

За предел детектирования бензойной кислоты (или хлорид-ионов) (C_{det} , мкг/см³) принимают наибольшее из значений.

Результаты проверки считаются положительными при получении значений пределов детектирования:

- бензойной кислоты (при положительной полярности высоковольтного блока) при отношении сигнал/шум 3:1, не более 0,5 мкг/см³,
- хлорид-ионов (при отрицательной полярности высоковольтного блока) при от-

ношении сигнал/шум 3:1, не более 1,0 мкг/см³.

9.6 Определение отношения сигнала/шум флуоресцентного детектора с лазерным возбуждением

В соответствии с Руководством по эксплуатации системы регистрируют 6 электрофорограмм поверочного раствора флуоресцеина натрия, приготовленного по п.А.5.3 в условиях, указанных в таблице 7.

Рекомендуемая программа метода (рис.10):

- 2 минуты промывки боратным буферным раствором по п.А.3.4 при 30 psi;
- 5 сек. гидродинамический вкол раствора флуоресцеина по п.А.5.3 при 0,5 psi;
- 5 минут электрофоретическая миграция в буферном растворе по п.А.3.4 под напряжением 10 кВ

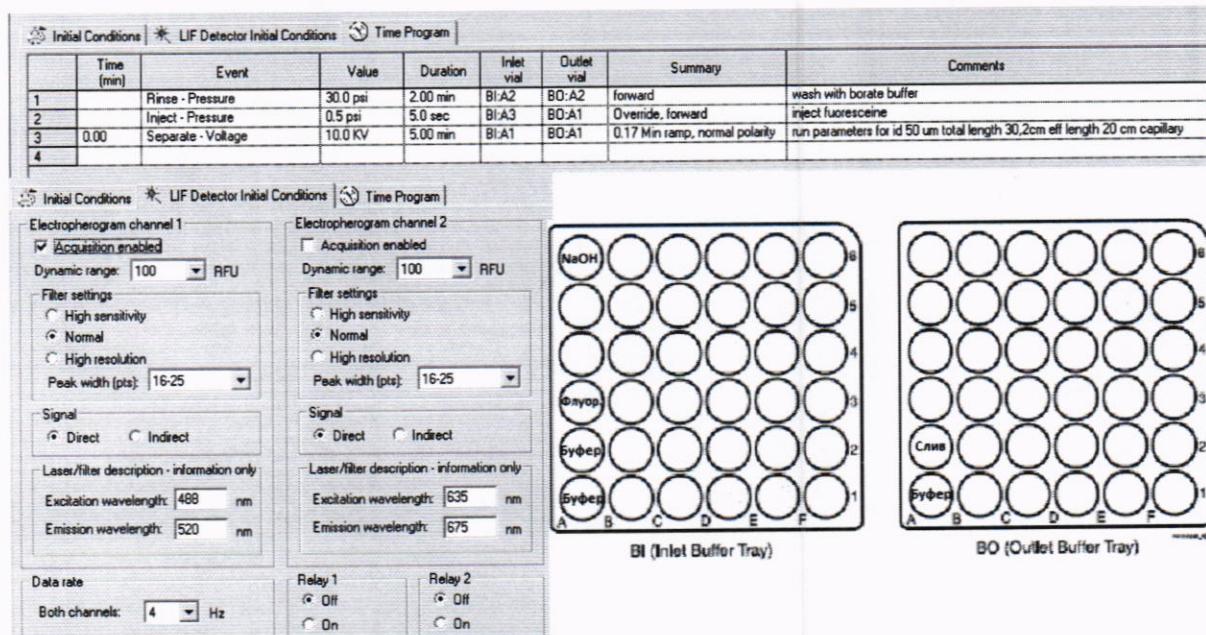


Рис. 10 - Рекомендуемый метод для флуоресцеина в программе 32 Karat

Таблица 7. Условия проведения измерений для флуоресцентного детектора с лазерным возбуждением

Наименование параметра	Значение
Рабочее вещество	Флуоресцеин натрия
Капилляр	Кварцевый, непокрытый, внутренний диаметр 50 мкм, общая длина 30,2 см, эффективная длина 20 см
Оптическая апертура, мкм	LIF-апертура
Длина волны/фильтры, нм	488 - возбуждения, 520 - излучения
Сигнал абсорбции	Прямой(direct)
Динамический диапазон	100RFU
Температура, °C	25
Ввод пробы	Давление 35,5 мбар (0,5psi), время 5 с
Напряжение, кВ	10
Ведущий электролит	Буферный раствор по п.А.3.4
Время анализа, мин	5

После регистрации капилляр промывают по п.Б.3.

На полученных электрофорограммах проверяют правильность автоматической разметки пиков рабочих веществ и, если необходимо, корректируют её.

Примечание: Параметры разметки подбираются таким образом, чтобы кратковременные изменения выходного сигнала, имеющие характер одиночных импульсов, распознавались программным обеспечением как неименованные пики и при оценке уровня флуктуационных шумов нулевого сигнала не учитывались.

Named Peaks		Groups				
#	Name	ID	Mig. Time	MT Window	Ref. ID #	ISTD. ID #
1	Fluoresceine	1	3	0.5	0	0
2						

#	Event	Start Time	Stop Time	Value
1	Width	0.000	0.000	0.2
2	Threshold	0.000	0.000	250
3				

Рис. 11 - Примерные настройки автоматической разметки для LIF-детектора

Для каждой электрофорограммы определяют соотношение сигнал-шум (S/N)_i с помощью встроенного алгоритма S/N (ASTM) аналогично п. 9.4.

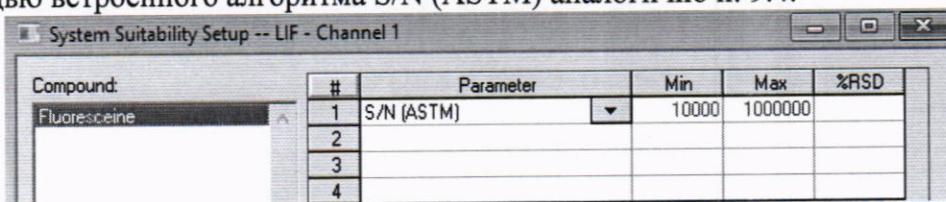


Рис. 12 – Меню программирования вычисления соотношения сигнал/шум для LIF-детектора

За соотношение сигнал-шум детектора принимается наименьшее из полученных значений.

Результаты проверки считаются положительными, если полученное соотношение S/N составляет не менее 10000:1.

9.7 Определение относительного среднего квадратического отклонения выходных сигналов (по площади пика и времени миграции)

Для проверки относительного среднего квадратического отклонения выходного сигнала используют электрофорограммы, зарегистрированные по 9.2, 9.3 и 9.6.

При помощи программного обеспечения определяют значения выходных сигналов x_i (времени миграции или площади пика) на всех электрофорограммах поверочного раствора контрольного вещества.

Вычисляют среднее арифметическое выходных сигналов (\bar{X}) и относительное СКО:

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

где σ – относительное среднее квадратическое отклонение выходного сигнала, %;

X_i – i-ое значение выходного сигнала (времени миграции или площади пика);

\bar{X} – среднее значение выходного сигнала;

n – число измерений.

9.8 Определение относительного изменения выходного сигнала (по площади пика) за 4 часа работы

Условия измерения аналогичны описанным в п. 9.2 -9.3 и 9.6. Проводят измерения по 9.2 -9.3 и 9.6. Через 4 часа непрерывной работы повторяют измерения по 9.2 -9.3 и 9.6.

П р и м е ч а н и е : В связи с низкой стабильностью фонового электролита по п.А.4.3 , перед повтором измерений в отрицательной полярности необходимо заново приготовить раствор по п.А.4.3

В связи с низкой стабильностью рабочего раствора по п. А.5.2, перед повтором измерений на LIF-детекторе необходимо заново приготовить раствор по п. А.5.2

Относительное изменение выходного сигнала за 4 часа непрерывной работы рассчитывают по формуле (3):

$$\delta = \frac{|\bar{X}_t - \bar{X}|}{\bar{X}} \cdot 100 \quad (3)$$

где δ – относительное изменение выходного сигнала, %;

\bar{X} – среднее значение выходного сигнала в исходной серии измерений;

\bar{X}_t – среднее значение выходного сигнала в серии измерений через 4 часа;

9.9 Система считается прошедшей поверку, если выполняются условия, изложенные в пунктах 9.9.1-9.9.5.

9.9.1 Условия поверки должны соответствовать п. 5.

9.9.2 Пределы детектирования фотометрических детекторов должны составлять:

- для бензойной кислоты (при положительной полярности высоковольтного блока) при отношении сигнал/шум 3:1, не более 0,5 мкг/см³,

- для хлорид-ионов (при отрицательной полярности высоковольтного блока) при отношении сигнал/шум 3:1, не более 1,0 мкг/см³.

9.9.3 Отношение сигнал/шум (S/N) флуоресцентного детектора с лазерным возбуждением должно составлять не менее 10000:1.

9.9.4 Значения относительного среднего квадратического отклонения выходных сигналов по детекторам не должны превышать:

- по времени миграции 2 %,

- по площади пика 3 %.

9.9.5 Значения относительного изменения выходных сигналов за 4 часа непрерывной работы не должны превышать 10 %.

10 ОФОРМЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ПОВЕРКИ

10.1 Результаты поверки заносят в протокол (Приложение В).

10.2 Положительные результаты поверки системы оформляют в соответствии с приказом Минпромторга РФ № 2510 от 31.07.2020 г.

10.3 При отрицательных результатах системы признаются непригодными к применению в сфере государственного регулирования обеспечения единства измерений и оформляют результаты поверки в соответствии с приказом Минпромторга РФ № 2510 от 31.07.2020 г.

10.4 Сведения о результатах поверки передаются в Федеральный информационный фонд по обеспечению единства измерений.

10.5 При наличии письменного заявления владельца или лица предоставляющего систему на поверку, свидетельство о поверке СИ или извещение о непригодности к применению СИ оформляются на бумажном носителе или в виде электронного документа (при наличии технической возможности).

Начальник лаборатории 009 ФГБУ «ВНИИМС»

Е.В. Кул'ябина

Приложение А
(обязательное)

Приготовление контрольных растворов

А.1 Для приготовления контрольных растворов используют следующие средства измерений, реактивы и вспомогательные устройства:

Весы лабораторные по ГОСТ ОИМЛ R 76-1-2011, класс точности – I
рН-метр, диапазон рН от 1,00 до 12,00, погрешность $\pm 0,05$;
Термостат (водяная баня);
Ультразвуковая ванна;
Пробирки полипропиленовые с крышкой типа "Эппendorф" объемом 1,5 мл;
Стакан вместимостью 50 см³ по ГОСТ 25336-82;
Колбы мерные вместимостью 10, 25, 50, 100 по ГОСТ 1770-74;
Автоматические пипеточные дозаторы переменного объема 100-1000 мкл, 1-10
мл;
Вода дистиллированная деионизированная по ГОСТ Р 58144-2018;
Гидроксид натрия, х.ч. по ГОСТ 4328-77;
Соляная кислота х.ч. по ГОСТ 3118-77;
Натрий тетраборнокислый, стандарт-титр по ТУ 6-09-2540-87 или тетраборат
натрия десятиводный, х.ч. по ГОСТ 4199-76;
Борная кислота по ГОСТ 9656-75;
Натрий хромовокислый, ч.д.а. по ТУ 6-09-91-84;
Цетилtrimетиламмоний бромид (ЦТАБ) по ТУ 6-09-13-452;
ГСО 5504-90 удельной энергии сгорания (бензойная кислота К-3), молярная доля
99,990 %;
ГСО 6687-93/6689-93 состава водных растворов хлорид-ионов 1 г/дм³;
ГСО 11708-2021 состава водного раствора флуоресцеина натрия;

А.2 Приготовление растворов для промывки капилляра

Все растворы готовят с использованием дистиллированной деионизированной во-
ды, ГОСТ 6709-72.

A.2.1 Раствор гидроксида натрия для промывки капилляра

В мерную колбу вместимостью 50 см³ помещают 1 г гидроксида натрия доводят
до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают. Молярная концентрация
раствора 0,5 моль/дм³.

Срок хранения в посуде из полиэтилена 6 месяцев.

A.2.2 Раствор соляной кислоты для промывки капилляра

В стакан из термостойкого стекла вместимостью 50 см³ помещают 23 см³ дистил-
лированной воды, затем приливают 2 см³ соляной кислоты и перемешивают. Молярная
концентрация раствора приблизительно 1 моль/дм³.

Срок хранения не ограничен.

А.3 Приготовление растворов для проведения испытаний при ПОЛОЖИТЕЛЬ-
НОЙ полярности источника высокого напряжения

A.3.1 Раствор натрия тетраборнокислого, молярная концентрация 0,05 моль/дм³

Раствор готовят из стандарт-титра по прилагаемой к нему инструкции. Раствор
хранят в полиэтиленовой посуде в условиях, исключающих поглощение диоксида угле-
рода. Срок хранения 6 месяцев.

П р и м е ч а н и е: Допускается приготовление раствора из 10-ти водного тетра-

бората натрия $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, навеску которого составляет 0,995 г. Навеску добавляют в мерную колбу 50 мл, растворяют водой и доводят до риски.

A.3.2 Раствор борной кислоты №1, 100 мМ борной кислоты

В мерную колбу вместимостью 50 см³ помещают 0,309 г борной кислоты, доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

Молярная концентрация раствора приблизительно 0,1 моль/дм³.

Срок хранения 1 месяц.

A.3.3 Раствор борной кислоты №2, 50 мМ борной кислоты

В мерную колбу вместимостью 50 см³ добавляют 25 см³ раствора борной кислоты №1 (п.А.3.2), доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

Молярная концентрация раствора приблизительно 0,05 моль/дм³.

Срок хранения 1 месяц.

A.3.4 Боратный буферный раствор, pH 8,5

В чистый сухой стакан вместимостью 50 см³ добавляют 3 см³ раствора натрия тетраборнокислого, приготовленного по п.А.3.1 и 19 см³ раствора борной кислоты №2, приготовленного по п.А.3.3, тщательно перемешивают. Измеряют значение pH раствора.

Буферный раствор используется для проведения поверки при положительной полярности источника высокого напряжения.

Срок хранения 1 месяц.

A.3.5 Приготовление запасного раствора бензойной кислоты №1 (массовая концентрация 1000 мкг/см³)

Навеску бензойной кислоты массой 100 мг растворяют в дистиллированной воде при нагревании на водяной бане, переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³ охлаждают до комнатной температуры, доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

Срок хранения раствора в холодильнике 1 месяц.

Примечание: Допускается приготовление раствора № 1 из бензойной кислоты ч.д.а. по ГОСТ 10521-78

A.3.6 Приготовление запасного раствора бензойной кислоты №2 (массовая концентрация 100 мкг/см³) В мерную колбу вместимостью 50 см³ помещают 5 см³ запасного раствора №1 (п.А.3.4), доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

Срок хранения раствора в холодильнике 1 месяц.

A.3.7 Приготовление поверочного раствора бензойной кислоты (массовая концентрация 4 мкг/см³) В мерную колбу вместимостью 25 см³ добавляют 1 см³ запасного раствора №2 (п.А.3.5), доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

Раствор используют в день приготовления.

A.4 Приготовление растворов для проведения поверки при ОТРИЦАТЕЛЬНОЙ полярности источника высокого напряжения

A.4.1 Раствор хромовокислого натрия, молярная концентрация 0,1 моль/дм³

В мерную колбу вместимостью 10 см³ помещают навеску 0,162 г хромовокислого натрия, растворяют в 5 - 6 см³ дистиллированной воды, затем доводят до метки дистиллированной водой.

Срок хранения раствора в плотно закрытом полиэтиленовом сосуде не ограничен.

A. 4.2 Раствор цетилtrimетиламмония бромида (ЦТАБ), молярная концентрация 0,01 моль/дм³

В мерную колбу вместимостью 100 см³ помещают 0,364 г ЦТАБ, добавляют примерно 50 см³ дистиллированной воды, выдерживают на водяной бане при 40°C до полного растворения, доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают.

Срок хранения раствора в пластиковой посуде в условиях, исключающих поглощение углекислого газа из воздуха, в холодильнике - 6 месяцев.

При последующем использовании нужно прогреть раствор перед применением, чтобы растворить образующиеся кристаллы.

A. 4.3 Хроматный буферный раствор

В мерную колбу вместимостью 25 см³ помещают 1,25 см³ раствора хромовокислого натрия, приготовленного по п.А.4.1, 1,25 см³ раствора ЦТАБ, приготовленного по п.А.4.2, и доводят до метки дистиллированной водой. Тщательно перемешивают и центрифугируют 10 минут. Приготовленный раствор содержит 5 мМ/дм³ хромовокислого натрия и 0,5 мМ/дм³ ЦТАБ.

Буферный раствор используется для проведения поверки при отрицательной полярности источника высокого напряжения.

Срок хранения 4 часа.

A.4.4 Приготовление запасного раствора хлорид-ионов №1 (массовая концентрация 100 мкг/см³)

В мерную колбу вместимостью 50 см³ добавляют 5,0 см³ ГСО состава раствора хлорид-ионов, доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают.

Срок хранения раствора в холодильнике 1 месяц.

Примечание: Допускается приготовление раствора № 1 из хлорида натрия (NaCl), навеска которого составляет 165 мг в мерной колбе вместимостью 1000 см³

A.4.5 Приготовление поверочного раствора хлорид-ионов (массовая концентрация 4 мкг/см³) В мерную колбу вместимостью 25 см³ помещают добавляют 1 см³ запасного раствора №1 (п.А.4.4), доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

Растворы используют в день приготовления.

A.5 Приготовление растворов для проведения испытаний флуоресцентного детектора с лазерным возбуждением (LIF детектора).

A.5.1 Приготовление запасного раствора флуоресцина натрия №1 (массовая концентрация 1x10⁻⁷ г/см³)

В мерную колбу вместимостью 1 см³ добавляют 1,0 см³ ГСО состава водного раствора флуоресцина натрия концентрацией 1 мг/дм³, доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

Раствор используют в день приготовления.

Примечание: Допускается приготовление раствора флуоресцина из флуоресцеин натриевой соли по ТУ 2463-289-00204197-2003), навеска которого составляет 1 мг в мерной колбе вместимостью 1000 см³

A.5.2 Приготовление поверочного раствора флуоресцина натрия (массовая концентрация 3,6·10⁻⁸ г/см³)

В мерную колбу вместимостью 10 см³ добавляют 3,6 см³ запасного раствора №1 (п.А.5.1), доливают до метки боратным буфером по А.3.4 и тщательно перемешивают.

Срок хранения раствора – 1 час.

Приложение Б
(обязательное)

Подготовка капилляра

Б.1 Подготовка нового капилляра к работе (рис. Б1.1 и Б1.2)

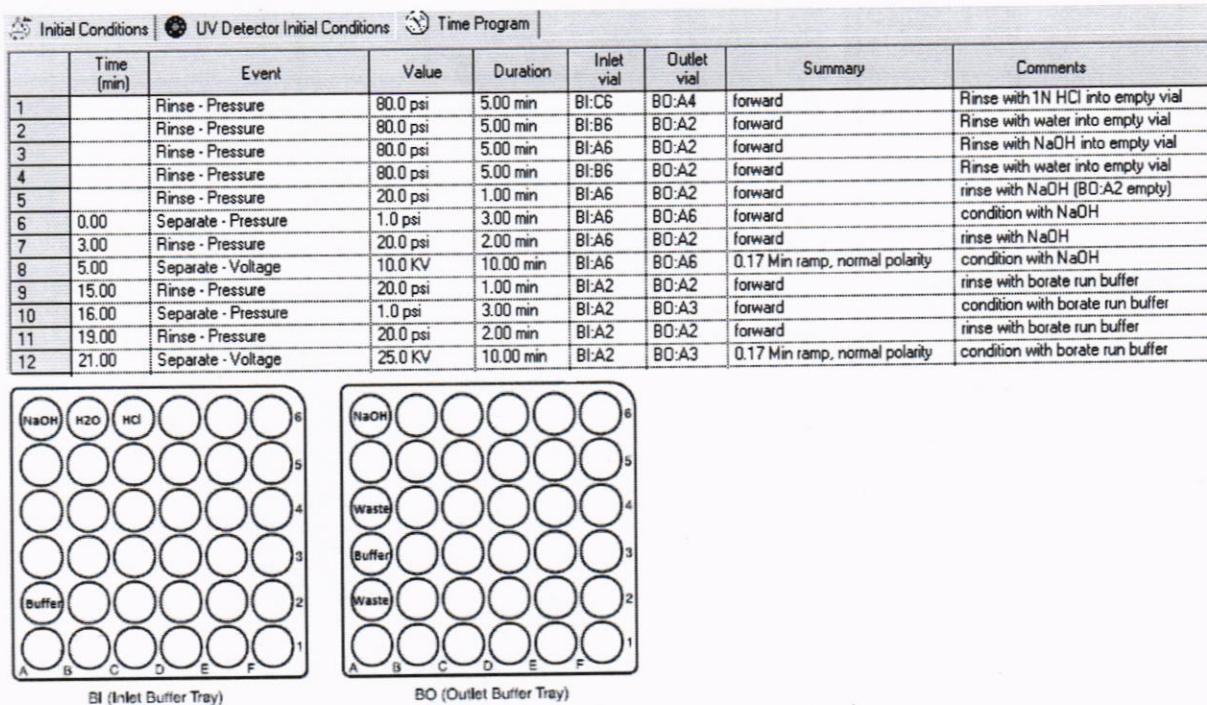


Рис. Б.1.1 Рекомендуемый метод подготовки нового капилляра к работе в положительной полярности в программе 32 Karat

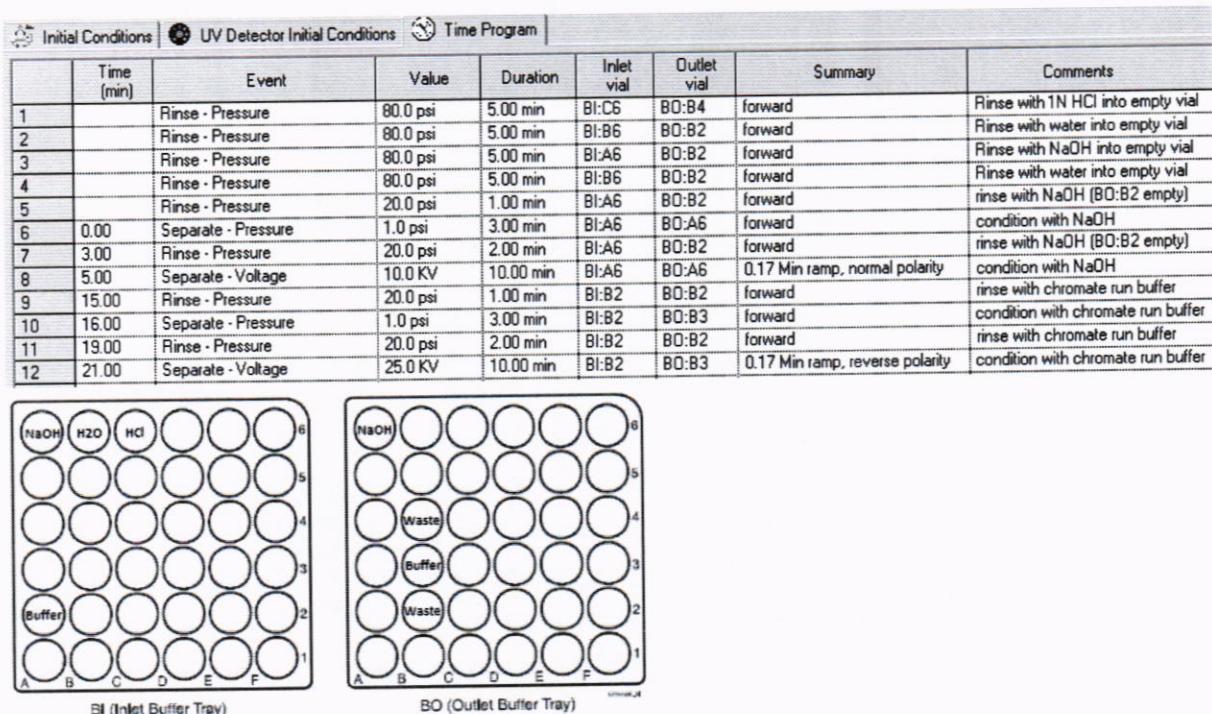


Рис. Б.1.2 Рекомендуемый метод подготовки нового капилляра к работе в отрицательной полярности в программе 32 Karat

Новый капилляр последовательно промывают:

- 5 минут раствором соляной кислоты по п.А.2.2 при 80 psi;

- 5 минут дистиллированной водой при 80 psi;
- 5 минут раствором гидроксида натрия по п.А.2.1 при 80 psi;
- 5 минут дистиллированной водой при 80 psi;
- 1 минута раствором гидроксида натрия по п.А.2.1 при 20 psi;
- 3 минуты кондиционирование под давлением с раствором гидроксида натрия по п.А.2.1 при 1 psi;
- 2 минуты промывка раствором гидроксида натрия по п.А.2.1 при 20 psi;
- 10 минут кондиционирование напряжением с раствором гидроксида натрия по п.А.2.1, выдержать напряжение 10 кВ;
- 1 минута буферным раствором по п.А.3.4 или А.4.3 при 20 psi;
- 3 минуты кондиционирование давлением с буферным раствором по п.А.3.4 или А.4.3 при 1 psi;
- 2 минуты промывка буферным раствором по п.А.3.4 или А.4.3 при 20 psi;
- 10 минут кондиционирование под напряжением с буферным раствором по п.А.3.4 или А.4.3, выдержать напряжение 25 кВ (положительная полярность для боратного буфера и отрицательная полярность для хроматного буфера);

Примечание: Рекомендовано использовать два разных картриджа для положительной и отрицательной полярности.

Б.2 Промывка ранее использованного капилляра (Рис. Б.2.1, Б.2.2 и Б.2.3)

	Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary	Comments
1		Rinse - Pressure	20.0 psi	5.00 min	Bl:B6	Bl:A2	forward	Rinse with water into empty vial
2		Rinse - Pressure	20.0 psi	5.00 min	Bl:C6	Bl:A4	forward	Rinse with 1N HCl into empty vial
3		Rinse - Pressure	20.0 psi	5.00 min	Bl:B6	Bl:A2	forward	Rinse with water into empty vial
4		Rinse - Pressure	20.0 psi	5.00 min	Bl:A6	Bl:A2	forward	Rinse with NaOH into empty vial
5	0.00	Separate - Pressure	20.0 psi	5.00 min	Bl:A2	Bl:A2	forward	Rinse with buffer
6		Separate - Voltage	25.0 KV	10.00 min	Bl:A2	Bl:A3	0.17 Min ramp, normal polarity	condition with borate run buffer

Рис. Б.2.1 Рекомендуемый метод промывки ранее использованного капилляра перед работой в положительной полярности

	Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary	Comments
1		Rinse - Pressure	20.0 psi	5.00 min	Bl:B6	Bl:B2	forward	Rinse with water into empty vial
2		Rinse - Pressure	20.0 psi	5.00 min	Bl:C6	Bl:B4	forward	Rinse with 1N HCl into empty vial
3		Rinse - Pressure	20.0 psi	5.00 min	Bl:B6	Bl:B2	forward	Rinse with water into empty vial
4		Rinse - Pressure	20.0 psi	5.00 min	Bl:A6	Bl:B2	forward	Rinse with NaOH into empty vial
5	0.00	Separate - Pressure	20.0 psi	5.00 min	Bl:B2	Bl:B2	forward	Rinse with buffer
6		Separate - Voltage	25.0 KV	10.00 min	Bl:B2	Bl:B3	0.17 Min ramp, reverse polarity	condition with chromate run buffer

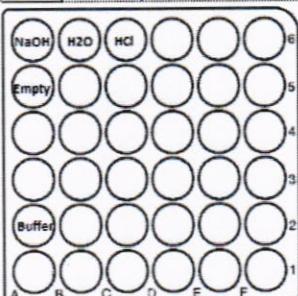
Рис. Б.2.2 Рекомендуемый метод промывки ранее использованного капилляра перед работой в отрицательной полярности

Все операции промывки проводят при 1,38 бар (20 psi) при температуре 25°C.

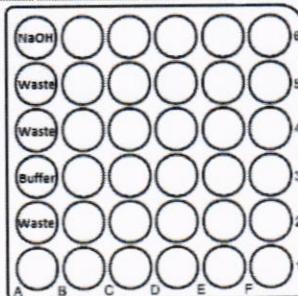
Для установления равновесия на внутренней поверхности капилляра выдержать напряжение 25 кВ между буферными растворами в течение 10 минут (положительная полярность для боратного буфера и отрицательная полярность для хроматного буфера);

Б.3 Промывка капилляра по окончании серии измерений

Initial Conditions		UV Detector Initial Conditions		Time Program				
	Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary	Comments
1		Rinse - Pressure	20.0 psi	5.00 min	BI:B6	BO:A2	forward	Rinse with water into empty vial
2		Rinse - Pressure	20.0 psi	5.00 min	BI:C6	BO:A4	forward	Rinse with 1N HCl into empty vial
3		Rinse - Pressure	20.0 psi	5.00 min	BI:B6	BO:A2	forward	Rinse with water into empty vial
4		Rinse - Pressure	20.0 psi	5.00 min	BI:A6	BO:A2	forward	Rinse with NaOH into empty vial
5		Rinse - Pressure	20.0 psi	5.00 min	BI:B6	BO:A2	forward	Rinse with water into empty vial



BI (Inlet Buffer Tray)



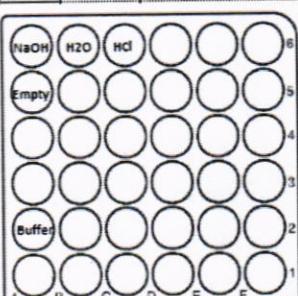
BO (Outlet Buffer Tray)

По окончании серии измерений капилляр промывают по схеме:

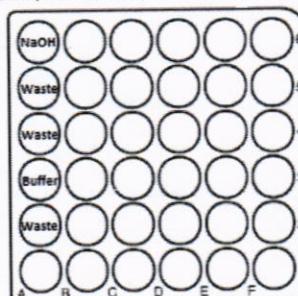
- 5 минут дистиллированной водой при 20 psi;
 - 5 минут раствором соляной кислоты по п.А.2.2 при 20 psi;
 - 5 минут дистиллированной водой при 20 psi;
 - 5 минуты раствором гидроксида натрия по п.А.2.1 при 20 psi;
 - 5 минут дистиллированной водой при 20 psi;

Б.4 Промывка капилляра по окончании поверки

Initial Conditions		UV Detector Initial Conditions		Time Program				
	Time (min)	Event	Value	Duration	Inlet vial	Outlet vial	Summary	Comments
1		Rinse - Pressure	20.0 psi	5.00 min	BI:B6	BO:A2	forward	Rinse with water into empty vial
2		Rinse - Pressure	20.0 psi	5.00 min	BI:C6	BO:A4	forward	Rinse with 1N HCl into empty vial
3		Rinse - Pressure	20.0 psi	5.00 min	BI:B6	BO:A2	forward	Rinse with water into empty vial
4		Rinse - Pressure	20.0 psi	5.00 min	BI:A6	BO:A2	forward	Rinse with NaOH into empty vial
5		Rinse - Pressure	20.0 psi	5.00 min	BI:B6	BO:A2	forward	Rinse with water into empty vial
6	0.00	Separate - Pressure	20.0 psi	5.00 min	BI:A5	BO:A5	forward	Air dry



BI / Inlet Buffer Tray



BO (Outlet Buffer Tray)

По окончании поверки, для хранения капилляр промывают аналогично окончанию серии измерений с дополнительным шагом:

- 5 минут продувка воздухом(пустые виалы) при 20 psi.

ПРИЛОЖЕНИЕ В
(рекомендуемое)

ПРОТОКОЛ ПОВЕРКИ

Система капиллярного электрофореза P/ACE MDQ Plus _____

Зав. номер _____

Дата выпуска _____

Дата поверки _____

Условия поверки:

температура окружающего воздуха _____ °C

относительная влажность _____ %

РЕЗУЛЬТАТЫ ПОВЕРКИ

1. Результаты внешнего осмотра _____
2. Результаты опробования _____
3. Результаты проверки программного обеспечения _____
4. Результаты определения предела детектирования для фотометрических детекторов
5. Результаты определения отношения сигнал/шум (s/n) флуоресцентного детектора с лазерным возбуждением
6. Результаты определения относительного среднего квадратического отклонения выходного сигнала (по площади пика и времени миграции)
7. Результаты определения относительного изменения выходного сигнала (по площади пика) за 4 часа работы
8. Заключение

Поверитель _____