

УТВЕРЖДАЮ

Руководитель ГЦИ СИ ФГУП «ВНИИМС»



В.Н.Яншин

Яншин
_____ 2008 г.

ИНСТРУКЦИЯ

ХРОМАТОГРАФЫ ЖИДКОСТНЫЕ WATERS HPLC

Методика поверки

к.р. 15311-08

Москва 2008 г.

Настоящая инструкция распространяется на хроматографы жидкостные Waters HPLC с детекторами: спектрофотометрическими (W490, W486), многоволновыми на диодной матрице (W996, W2996, W2998, W2487, W2489), масс-спектрометрическим (MCD), флуориметрическим (W474) многоволновым флуоресцентным (W2475), рефрактометрическими (W410, W2410, W2414), электрохимическими (W464, W2465), кондуктометрическим (W432) и устанавливает методику их первичной и периодических поверок.

Межповерочный интервал 1 год.

1. ОПЕРАЦИИ ПОВЕРКИ

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

Таблица 1.

Наименование операции	Номер пункта инструкции
Внешний осмотр	4.1
Опробование:	4.2
– определение уровня флуктуационных шумов нулевого сигнала и дрейфа нулевого сигнала	4.2.1–4.2.4
– определение предела детектирования	4.2.6
Определение метрологических характеристик:	4.3
– определение относительного среднего квадратического отклонения выходных сигналов	4.3.1–4.3.3
– определение относительного изменения выходных сигналов за 8 часов непрерывной работы	4.3.4–4.3.5

2. СРЕДСТВА ПОВЕРКИ

2.1. При проведении поверки применяют следующие средства поверки:

- ГСО 8749-2006 состава раствора антрацена в ацетонитриле;
- ГСО 7813-2000 состава хлорид-ионов, содержание хлорид-иона в воде 10 г/см³;
- аттестованы растворы: – кофеин–вода
- ГСО 7355–97 состава фенола.

Допускается применять другие средства поверки, метрологические характеристики которых соответствуют указанным выше.

2.2. При проведении поверки применяют следующие вспомогательные средства поверки:

- колонка "NovaPak C-18", 3,9x150 мм;
- ацетонитрил для жидкостной хроматографии по ТУ 6-09-14-2167-84.

3. УСЛОВИЯ ПОВЕРКИ И ПОДГОТОВКА К НЕЙ

3.1. При проведении поверки соблюдают следующие условия:

- температура окружающего воздуха, °С 20 ± 5
- атмосферное давление, кПА 84 ÷ 106,7

– относительная влажность воздуха, %	30 ÷ 90
– напряжение переменного тока, В	220 ⁺²² ₋₃₃
– частота сети, Гц	50 ± 1

3.2 Перед проведением поверки выполняют следующие подготовительные работы.

3.2.1 Хроматографы готовят к работе в соответствии с руководством по эксплуатации.

3.2.2 Перед проведением поверки готовят контрольные смеси, назначение и содержание анализируемых компонентов в которых приведены в таблице 2. Относительная погрешность аттестации не более 5 %.

3.2.3 Процедура приготовления контрольных растворов приведена в приложении 1.

Таблица 2.

Контрольный компонент	Массовая концентрация компонента, мг/дм ³ в контрольном растворе	Объем пробы, мкл	Элюент	Скорость потока, мл/мин	Детектор
Антрацен	1	20	ацетонитрил– вода 4:1	1	Абсорбционные W486, W490, W996 W2996 W2998 W2487 W2489
	0,10	10	–"–		Флуориметрические W474 W2475
Фенол	5	20	Ацетонитрил – вода + монохлор уксусная кислота	1	Электрохимические W464, W2465
Кофеин	1	10	ацетонитрил– вода 4:1	1	Рефрактометрические W410 W2410 W2414
Кофеин	10	1	метанол–вода	1	MCD
KCl	10	20	0,0025 М фталиевой кислоты + 0,0024 М Трис (рН 4,0)	1	Кондуктометрический W432

4. ПРОВЕДЕНИЕ ПОВЕРКИ

4.1. Внешний осмотр

При внешнем осмотре устанавливают:

- соответствие комплектности хроматографа паспортным данным;
- четкость маркировки;
- исправность механизмов и крепежных деталей.

4.2 Опробование

При опробовании проводят определение уровня флуктуационных шумов, дрейфа нулевого сигнала и предела детектирования.

Для проверки шума, дрейфа отключают колонку, водой промывают автосамплер (инжектор) и насос. Затем соединяют регулятор давления, инжектор и детектор при помощи капилляров и фитингов, входящих в комплект поставки

4.2.1 Уровень флуктуационных шумов и дрейф нулевого сигнала определяют при условиях, указанных в таблице 3, после выхода детектора на режим (п.3.2)..

Таблица 3.

Устанавливаемые параметры	Детектор					
	Абсорбционные W486, W490, W996 W2996, W2998 W2487, W2489	Кондукто- метрический W432	Рефракто- метриче- ские W410 W2410 W2414	Электро- химиче- ские W464 W2465	Масс- спектро- метриче- ский MCD	Флуори- метриче- ские W474 W2475
Элюент	Сухая ячейка	1мМ KCL	вода	Имитатор или сухая ячейка	метанол- вода	ацетонитрил- вода
Длина вол- ны, нм	254					251 (воз- бужд.) 405 (эмис- сии.)
Скорость потока, см ³ /мин	–	1	1	–	1	
Постоян- ная време- ни, с	1	"Fast"	1	1	–	1,5

4.2.2. Уровень флуктуационных шумов и дрейф нулевого сигнала измеряют в течение 30 мин на наиболее чувствительной шкале в координатах оптическая плотность (ток, напряжение) – время.

Уровень флуктуационных шумов нулевого сигнала (ΔX) принимают равным амплитуде (h) повторяющихся колебаний нулевого сигнала с периодом не более 20 секунд

Значения дрейфа нулевого сигнала принимают равным смещению нулевого сигнала в течение 1 часа.

4.2.3. Значения уровня флуктуационных шумов нулевого сигнала (peak to peak) не должны превышать значений, приведенных ниже:

W486	– $1 \cdot 10^{-5}$ е.о.п.
W490	– $1 \cdot 10^{-4}$ е.о.п.
W996, W2996, W2998	– $3 \cdot 10^{-5}$ е.о.п.
W2487, W2489	– $1,0 \cdot 10^{-5}$ е.о.п. (одноволновой режим)
W432	– 0,005 мкСм/см
W410, W2410	– $2,0 \cdot 10^{-8}$ ед.рефр.
W2414	– $3,0 \cdot 10^{-9}$ ед.рефр.
W464	– 10 пА
W2465	– 6 пА
W474, W2475	– 30 мкВ

4.2.4. Значения дрейфа нулевого сигнала не должны превышать значений, приведенных ниже:

W486	– $1 \cdot 10^{-4}$ е.о.п./ч
W490	– $2,5 \cdot 10^{-4}$ е.о.п./ч
W996, W2996, W2998	– $1 \cdot 10^{-3}$ е.о.п./ч
W2487, W2489	– $1 \cdot 10^{-4}$ е.о.п./ч
W410, W2410	– $2,5 \cdot 10^{-7}$ ед.рефр./ч
W2414	– $1,0 \cdot 10^{-7}$ ед.рефр./ч
W474	– 500 мкВ/ч
W2475	– 500 мкВ/ч
W432	– 0,05 мкСм/см·ч.

4.2.5. Отношение сигнал–шум ($h/\Delta x$) измеряют для масс–спектрометрического детектора при условиях, указанных в таблице 3.

В хроматограф вводят пробу контрольного вещества (таблица 2), измеряют высоту пика (h) в условных единицах или мм. Уровень флуктуационных шумов измеряют по п.4.2.2. в условных единицах или мм.

Значение ($h/\Delta x$) для MCD должно быть не менее – 10:1.

4.2.6. Предел детектирования определяют с использованием контрольных веществ и условий, указанных в таблице 2.

В хроматограф вводят пробу контрольного вещества, определяют высоту и ширину пика на половине его высоты ($\mu_{0,5}$)

Предел детектирования рассчитывают по формуле:

$$C_{мин.} = \frac{2 \cdot \Delta x \cdot G}{h \cdot \mu_{0,5} \cdot V} \text{ или } C_{мин.} = \frac{2 \cdot \Delta x \cdot G}{S \cdot V},$$

где G – масса вещества, г; $G=C \cdot V$ (C – массовая концентрация контрольного вещества, мг/дм³, V – объем дозы, дм³)

V – скорость элюента, см³/мин;

$\mu_{0,5}$ – ширина пика на половине высоты, мин;

Δx – уровень флуктуационных шумов нулевого сигнала, определенный до ввода контрольного вещества;

h – высота пика контрольного вещества;

Δx и h – измеряют в мм, условных единицах, мВ, либо в единицах, указанных в таблице 4

S – площадь пика, усл. ед. ·с; мВ·с, либо в единицах, указанных в таблице 4, умноженных на секунды.

Полученные результаты не должны превышать приведенных ниже значений порога детектирования:

W486	– $1,0 \cdot 10^{-9}$ г/см ³ антрацена;
W490	– $1,0 \cdot 10^{-8}$ г/см ³ антрацена;
W996, W2996, W2998	– $2 \cdot 10^{-9}$ г/см ³ антрацена;
W2487, W2489	– $1,0 \cdot 10^{-9}$ г/см ³ антрацена;
W474	– $2 \cdot 10^{-12}$ г/см ³ антрацена;
W2475	– $1 \cdot 10^{-12}$ г/см ³ антрацена;
W464, W2465	– $5 \cdot 10^{-11}$ г/см ³ фенола;
W410, 2410, 2414	– $1 \cdot 10^{-6}$ г/см ³ кофеина.
W432	– $5 \cdot 10^{-9}$ г/см ³ хлорид-иона.

4.3. Определение метрологических характеристик

4.3.1. Определение относительного среднего квадратического отклонения выходных сигналов.

Измерения проводят после выхода хроматографа на режим. Условия выполнения измерений должны соответствовать приведенным в разделе 3.

4.3.2. Контрольную смесь (табл.2.) вводят в хроматограф не менее 6 раз, измеряют значения выходных сигналов (времен удерживания и площадей пиков) вычисляют среднее арифметическое значение выходных сигналов (\bar{X}).

4.3.3. Относительное среднее квадратическое отклонение выходных сигналов рассчитывают по формуле:

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

где: \bar{X} – среднее арифметическое значение параметра выходного сигнала (площади пика, времени удерживания).

Значения относительного среднего квадратического отклонения выходных сигналов не должны превышать данных, приведенных в таблице 4.

4.3.4. Определение относительного изменения выходных сигналов за 8 часов непрерывной работы.

Условия измерения аналогичны описанным в разделе 3. Проводят операции по 4.3.2. Через 8 часов непрерывной работы повторяют измерения по 4.3.2.

Относительное изменение выходного сигнала за 8 часов непрерывной работы хроматографа рассчитывают по формуле:

$$\delta = \frac{|\bar{X}_t - \bar{X}|}{\bar{X}} \cdot 100$$

4.3.5. Значения относительного изменения выходных сигналов не должны превышать значений, приведенных в таблице 4.

Таблица 4.

Детектор	Относительное среднее квадратическое отклонение выходных сигналов (%)		Относительное изменение выходного сигнала за 8 часов непрерывной работы (%)	
	по времени удерживания	по площадям пиков	по времени удерживания	по площадям пиков
W486	0,3	1,0	± 2,0	± 2,0
W490	0,3	1,0	± 2,0	± 2,0
W996 W2996, W2998 W2487, W2489	0,3	1,0	± 2,0	± 2,0
W432	0,3	1,0	± 2,0	± 2,0
W410; W2410, W2414	0,3	1,0	± 2,0	± 2,0
W464, W2465	0,3	1,0	± 2,0	± 2,0
W474, W2475	0,3	1,0	± 2,0	± 2,0
MCD	2,0	10	± 10	± 10

5 ОФОРМЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ПОВЕРКИ

5.1 Результаты поверки хроматографа заносят в протокол.

5.2 Положительные результаты поверки хроматографа оформляют выдачей свидетельства в соответствии с ПР 50.2.006.

5.3 Хроматографы, не удовлетворяющие требованиям настоящих рекомендаций, к эксплуатации не допускаются. Хроматографы изымаются из обращения. свидетельство о поверке изымают и выдают извещение о непригодности с указанием причин в соответствии с ПР 50.2.006.

5.4 После ремонта хроматографы подвергают поверке.

Начальник сектора

Научный сотрудник

О.Л.Рутенберг

Е.В.Кулябина

МЕТОДИКА ПРИГОТОВЛЕНИЯ АТТЕСТОВАННЫХ РАСТВОРОВ

Методика предназначена для приготовления аттестованных водных растворов кофеина, в диапазоне массовой концентрации (1 – 10) мг/дм³, растворов антрацена в ацетонитриле в диапазоне массовой концентрации (1 – 0,1) мг/дм³

1 СРЕДСТВА ИЗМЕРЕНИЙ, ПОСУДА, РЕАКТИВЫ

ГСО 8749-2006 состава антрацена в ацетонитриле, массовая концентрация антрацена 0,200 мг/см³, относительная погрешность ±2%.

1.1

1.2 ГСО 7270–96 состава фенола в этаноле, массовая концентрация фенола 1 мг/см³, относительная погрешность ±1%.

1.3 Весы лабораторные по ГОСТ 24104-01, с верхним пределом взвешивания 200 г.

1.4 Мера массы (гири), 2–01 класс точности, ГОСТ 7328.

1.5 Колбы мерные наливные 2–100–2, 2–200–2, 2–500–2, 2–1000–2 по ГОСТ 1770-74.

1.6 Пипетки градуированные 1–2–2–0,5 по ГОСТ 29227 (I).

1.7 Стаканы В–1–50ТС по ГОСТ 25336.

1.8 Кофеин фармакопейный (содержание основного вещества не менее 98%).

1.9 Дистиллированная вода по ГОСТ 6709-72.

2 ПРОЦЕДУРА ПРИГОТОВЛЕНИЯ

2.1 Приготовление аттестованных растворов кофеина

2.1.1 Приготовление исходного раствора кофеина

Взвешивают в стакане около 100 мг кофеина, добавляют в стакан 25 мл дистиллированной воды, перемешивают. Полученный раствор переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³. Ополаскивают стакан дистиллированной водой, переносят ее в мерную колбу, доводят до метки дистиллированной водой, перемешивают.

Содержание кофеина в исходном растворе (C_0 , мг/дм³) рассчитывают по формуле

$$C_0 = \frac{m}{V_{100} \cdot 10^{-3}} = \frac{m}{0,1},$$

где m – масса кофеина, мг

V_{100} – вместимость мерной колбы, $V = 100$ см³.

2.1.2 Приготовление аттестованного раствора кофеина с массовой концентрацией 10 мг/дм³.

1 см³ исходного раствора кофеина переносят пипеткой вместимостью 1 см³ в мерную колбу вместимостью 100 см³. Доводят дистиллированной водой до метки, перемешивают.

Массовую концентрацию в мг/дм³ кофеина в аттестованном растворе (C_1) находят следующим образом:

$$C_1 = \frac{C_0 \cdot V_n}{V}, \quad (1)$$

где V_n – вместимость пипетки, $V_n = 1$ см³;

V – вместимость мерной колбы, см³.

2.1.3 Приготовление аттестованного раствора кофеина с массовой концентрацией 1 мг/дм³.

10 см³ раствора кофеина массовой концентрацией 10 мг/дм³. переносят пипеткой вместимостью 10 см³ в мерную колбу вместимостью 100 см³. Доводят дистиллированной водой до метки, перемешивают.

Массовую концентрацию в мг/дм³ кофеина в аттестованном растворе(C₂) находят следующим образом:

$$C_2 = \frac{C_1 \cdot V_n}{V}, \quad (2)$$

где V_n – вместимость пипетки, $V_n = 10 \text{ см}^3$;

V – вместимость мерной колбы. см³.

2.2.. Приготовление аттестованных растворов антрацена в ацетонитриле

2.2.1. Приготовление раствора антрацена в ацетонитриле с массовой концентрацией 1 мг/дм³

1 см³ ГСО состава антрацена в ацетонитриле с массовой концентрацией 200 мкг/см³ помещают в мерную колбу вместимостью 200 см³.

Рассчитанная по формуле (1) массовая концентрация – 1 мг/дм³.

2.2.1. Приготовление раствора антрацена в ацетонитриле с массовой концентрацией 0,1 мг/дм³

10 см³ раствора антрацена в ацетонитриле с массовой концентрацией 1 мг/дм³ переносят пипеткой вместимостью 10 см³ в мерную колбу вместимостью 100 см³. Доводят дистиллированной водой до метки, перемешивают.

Массовую концентрацию в мг/дм³ антрацена в контрольном растворе(C₂) находят по формуле (2)

2.3 Приготовление раствора с массовой концентрацией фенола 5 мг/дм³

2.3.1. 1 см³ ГСО фенола в этаноле пипеткой вместимостью 1 см³ переносят в мерную колбу вместимостью 200 см³ и доводят содержимое колбы до метки ацетонитрилом.

2.3.2. Приготовление элюента для проверки хроматографа с электрохимическим детектором при использовании раствора фенола.

На аналитических весах взвешивают (600 ± 10) мг кристаллической монохлоруксусной кислоты и количественно переносят в мерную колбу емкостью 200 см³. В ту же колбу мерным цилиндром вместимостью 50 см³ помещают 35 см³ ацетонитрила и тщательно перемешивают содержимое до полного растворения монохлоруксусной кислоты. Доводят объем до метки деионизованной водой и вновь тщательно перемешивают.