



ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ПРИКЛАДНОЙ МЕТРОЛОГИИ – РОСТЕСТ»
(ФБУ «НИЦ ПМ – РОСТЕСТ»)

СОГЛАСОВАНО

Заместитель генерального директора

С.А. Денисенко

М.п.

«24»

июня

2025 г.



Государственная система обеспечения единства измерений

Хроматографы жидкостные HPLC
Методика поверки

РТ-МП-17-205-2025

г. Москва
2025 г.

1 ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1.1 Настоящая методика распространяется на хроматографы жидкостные HPLC (далее по тексту - хроматографы) и устанавливает методы и средства их первичной и периодической поверки.

1.2 Прослеживаемость поверяемого СИ реализуется посредством применения ГСО:

- к единице массовой доли компонентов в соответствии с поверочной схемой «Государственная поверочная схема для средств измерений содержания неорганических компонентов в жидких и твердых веществах и материалах», утвержденной Приказом Росстандарта от 19.02.2021 г. № 148, ГЭТ 176-2019;

- к единице массовой доли (%) компонентов в соответствии с поверочной схемой «Государственная поверочная схема для средств измерений содержания органических компонентов в жидких и твердых веществах и материалах», утвержденной Приказом Росстандарта от 28.12.2024 г. № 3158, ГЭТ 208-2024;

- к единице массы (кг), воспроизводимой государственным первичным эталоном в соответствии с поверочной схемой «Государственная поверочная схема для средств измерений массы», утвержденной Приказом Росстандарта от 04.07.2022 № 1622, ГЭТ 3-2020;

- к единице объема (м³) в соответствии с поверочной схемой «Государственная поверочная схема для средств измерений массы и объема жидкости в потоке, объема жидкости и вместимости при статических измерениях, массового и объемного расходов жидкости», утвержденной Приказом Росстандарта от 26.09.2022 г. № 2356, ГЭТ 216-2018.

1.3 Методы, обеспечивающие реализацию методики поверки – косвенные.

2 ПЕРЕЧЕНЬ ОПЕРАЦИЙ ПОВЕРКИ

2.1 При проведении поверки выполняют операции, приведенные в таблице 1.

Таблица 1 - Операции поверки

Наименование операции поверки	Обязательность выполнения операций поверки при		Номер раздела (пункта) методики поверки, в соответствии с которым выполняется операция поверки
	первичной поверке	периодической поверке	
1. Внешний осмотр средства измерений	Да	Да	7
2. Подготовка к поверке средства измерений	Да	Да	8
3. Проверка программного обеспечения средства измерений	Да	Да	9
4 Опробование средства измерений			10
- определение уровня флуктуационных шумов и дрейфа нулевого сигнала	Да	Да ¹⁾	10.1
- определение предела детектирования	Да	Да ¹⁾	10.2
- определение отношения сигнал/шум (флуориметрический детектор)	Да	Да ¹⁾	10.3
5. Определение метрологических характеристик и подтверждение соответствия средства измерений метрологическим требованиям:	Да	Да ¹⁾	11
- определение относительного среднего квадратического отклонения (СКО) выходного сигнала	Да	Да ¹⁾	11.1

Наименование операции поверки	Обязательность выполнения операций поверки при		Номер раздела (пункта) методики поверки, в соответствии с которым выполняется операция поверки
	первичной поверке	периодической поверке	
- определение относительного изменения выходного сигнала за 8 часов непрерывной работы хроматографа	Да	Да ¹⁾	11.2
- определение показателей точности результатов измерений	Нет	Да ²⁾	11.3
6. Оформление результатов поверки	Да	Да	12
Примечания: ¹⁾ При отсутствии НД на методику измерений, утвержденного в установленном порядке по ГОСТ Р 8.563-09. ²⁾ При наличии НД на методику измерений, утвержденного в установленном порядке по ГОСТ Р 8.563-09.			

2.2 Если при проведении той или иной операции поверки получен отрицательный результат, дальнейшее выполнение поверки прекращают.

2.3 Поверка по отдельному измерительному каналу (детектору) в соответствии с порядком проведения поверки средств измерений, утвержденным Приказом Министерства промышленности и торговли РФ № 2510 от 31.07.2020 г. «Об утверждении порядка проведения поверки средств измерений, требований к знаку поверки и содержанию свидетельства о поверке», проводится на основании письменного заявления владельца средства измерений или лица, предоставившего его на поверку.

Информация об объеме проведенной поверки передается в Федеральный информационный фонд по обеспечению единства измерений (ФИФОЕИ).

3 ТРЕБОВАНИЯ К УСЛОВИЯМ ПРОВЕДЕНИЯ ПОВЕРКИ

3.1 При проведении поверки соблюдают следующие условия:

- температура окружающего воздуха, °С	от 15 до 25
- относительная влажность воздуха, %	от 20 до 80
- атмосферное давление, кПа	от 84,0 до 106,7

4 ТРЕБОВАНИЯ К СПЕЦИАЛИСТАМ, ОСУЩЕСТВЛЯЮЩИМ ПОВЕРКУ

К проведению поверки допускаются поверители средств измерений в соответствии с областью аккредитации организации, аккредитованной в национальной системе аккредитации на проведение поверки средств измерений согласно законодательству Российской Федерации об аккредитации, прошедшие инструктаж по технике безопасности и ознакомленные с эксплуатационными документами.

5 МЕТРОЛОГИЧЕСКИЕ И ТЕХНИЧЕСКИЕ ТРЕБОВАНИЯ К СРЕДСТВАМ ПОВЕРКИ

5.1 При проведении поверки применяют средства, приведенные в таблице 2.

Таблица 2 - Средства поверки

Операции поверки, требующие применения средств поверки	Метрологические и технические требования к средствам поверки, необходимые для проведения поверки	Перечень рекомендуемых средств поверки
10	Средства измерений температуры окружающей среды в диапазоне измерений от 15 °С до 25 °С с абсолютной погрешностью не более ± 1 °С Средства измерений относительной влажности воздуха в диапазоне от 20 % до 80 % с абсолютной погрешностью не более ± 3 % Средства измерений атмосферного давления в диапазоне измерений от 84,0 до 106,7 кПа с абсолютной погрешностью не более ± 3 кПа	Прибор комбинированный TESTO мод. 608-H1, рег. № 53505-13 Барометр-анероид метеорологический БАММ-1, рег. № 5738-76
10.1	Средства измерений времени в диапазоне измерений от 0 до 60 мин с абсолютной погрешностью не более ± 5 с	Секундомер механический СОСпр-36-2-000, рег. № 83109-21
10.2, 11.1, 11.2	Контрольные растворы с массовой концентрацией - кофеина в воде 10 мг/дм ³ - глюкозы в воде 90 мг/дм ³ - антрацена в ацетонитриле 0,25 мкг/дм ³	Контрольные растворы, приготовленные по методике, приведенной в приложении А, на основе ГСО 11872-2022 ГСО 11683-2021 (комплект РГ) ГСО 8749-2006

5.2 Допускается применение других средств поверки, обеспечивающих определение метрологических характеристик поверяемых СИ с требуемой точностью.

5.3 Все средства измерений, применяемые для поверки, должны быть утвержденного типа, поверены и соответствовать требованиям методики поверки. Стандартные образцы, используемые при поверке, должны быть утвержденного типа, соответствовать требованиям методики поверки и иметь действующие паспорта.

6 ТРЕБОВАНИЯ (УСЛОВИЯ) ПО ОБЕСПЕЧЕНИЮ БЕЗОПАСНОСТИ ПРОВЕДЕНИЯ ПОВЕРКИ

6.1 При проведении поверки выполняют требования безопасности, изложенные в руководстве по эксплуатации (далее – РЭ) хроматографа и детекторов.

7 ВНЕШНИЙ ОСМОТР СРЕДСТВА ИЗМЕРЕНИЙ

При внешнем осмотре устанавливают

- соответствие комплектности поверяемого хроматографа требованиям эксплуатационной документации;
- четкость маркировки;
- исправность механизмов и крепежных деталей;
- отсутствие видимых механических повреждений, влияющих на работоспособность хроматографа.

8 ПОДГОТОВКА К ПОВЕРКЕ СРЕДСТВА ИЗМЕРЕНИЙ

8.1 Перед проведением поверки выполняют следующие подготовительные работы.

8.1.1 Перед проведением поверки готовят контрольные растворы, назначение и содержание анализируемых компонентов в которых приведены в таблице 3. Методика приготовления контрольных растворов приведена в приложении А.

8.1.2 Перед проведением поверки хроматограф готовят к работе в соответствии с РЭ.

Хроматограф выдерживают не менее 30 минут после включения прибора для установления динамического равновесия в системе (выхода на режим).

Перед включением детекторов хроматографическую систему промывают подвижной фазой не менее 10 минут.

8.1.3 Для определения предела детектирования, относительного среднего квадратического отклонения (СКО) выходного сигнала, относительного изменения выходного сигнала за 8 часов непрерывной работы используют аналитическую колонку С18 размером 250×4,6 мм или 150×4,6 мм, заполненную сферическим силикагелем с эффективным диаметром частиц 5 мкм, эффективным диаметром пор от 80 до 120 Å и химически модифицированной поверхностью октадецильными группами (С18) (колонка может быть с другими характеристиками).

Таблица 3 - Контрольные растворы для определения предела детектирования и метрологических характеристик и условия измерений

Детектор	Состав раствора	Содержание контрольного компонента в растворе	Объем вводимой пробы	Условия
на диодной матрице DA	кофеин в воде	10 мг/дм ³	0,02 см ³	одноволновой режим с длиной волны детектирования 272 нм
рефрактометрический RI	глюкоза в воде	90 мг/дм ³	0,02 см ³	температура ячейки 35 °С, постоянная времени 1,5 с,
флуориметрический FL	антрацен в элюенте ацетонитрил/вода 80:20	0,25 мкг/мм ³	0,02 см ³	длина волны возбуждения Ex 360 нм, эмиссии Em 450 нм

9 ПРОВЕРКА ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ СРЕДСТВА ИЗМЕРЕНИЙ

Запускают программное обеспечение (далее – ПО) хроматографа, на экране в верхнем правом углу нажимают символ «i».

На экране высвечивается наименование ПО и номер версии.

Результаты операции поверки считают положительными, если идентификационные данные ПО соответствуют приведенным в таблице 4.

Таблица 4 - Идентификационные данные ПО

Идентификационные данные (признаки)	Значение
Идентификационное наименование ПО	Sainer Chromatographic Workstation
Номер версии (идентификационный номер) ПО, не ниже	V 3.6.4.0
Цифровой идентификатор ПО	-

10 ОПРОБОВАНИЕ СРЕДСТВА ИЗМЕРЕНИЙ

При опробовании определяют уровень флуктуационных шумов и дрейф нулевого сигнала, предел детектирования для всех детекторов кроме флуориметрического, для флуориметрического детектора определяют отношение сигнал/шум по Рамановскому спектру дистиллированной воды.

10.1 Определение уровня флуктуационных шумов и дрейфа нулевого сигнала

Определение уровня флуктуационных шумов и дрейфа нулевого сигнала детектора хроматографа можно проводить с установленной аналитической колонкой, указанной в 8.1.3, или без аналитической колонки с использованием капилляра с внутренним диаметром 0,127 мм (0,005 дюймов) длиной около 1 м между насосом и инжектором.

Уровень флуктуационных шумов, дрейф нулевого сигнала определяют при условиях, указанных в таблице 5, после выхода детектора на режим в соответствии с РЭ.

Таблица 5

Детектор	Элюент	Постоянная времени, с	Скорость потока, см ³ /мин	Параметры
на диодной матрице DA	метанол	1	1	одноволновой режим с длиной волны детектирования 250 нм
рефрактометрический RI	бидистиллированная или деионизованная вода	1,5	1	температура ячейки 35 °С
флуориметрический FL	дистиллированная вода	1,5	1	длина волны возбуждения λ_{ex} 360 нм, эмиссии λ_{em} 450 нм

После выхода хроматографа на режим фиксируют в течение одного часа нулевой сигнал детектора на шкале с максимальной чувствительностью в координатах сигнал (оптическая плотность или напряжение) – время.

Уровень флуктуационных шумов нулевого сигнала (Δx) определяется как максимальная высота пика (h) повторяющихся колебаний нулевого сигнала с периодом не более 20 секунд.

Автоматическое измерение уровня флуктуационных шумов проводят по алгоритму «Пик к Пик» и определяют за любой одноминутный отрезок времени, начиная с 10-ой минуты измерений.

Значение дрейфа нулевого сигнала принимают равным смещению нулевого сигнала в течение одного часа при регистрации хроматограммы без ввода пробы. Допускается регистрировать нулевой сигнал в течение 30 мин с последующей экстраполяцией.

Результаты операции поверки считают положительными, если значения уровня флуктуационных шумов нулевого сигнала и дрейфа нулевого сигнала не превышают значений, приведенных в таблице 6.

10.2 Определение предела детектирования

Определение предела детектирования выполняют на хроматографе с установленной аналитической колонкой, указанной в 8.1.3, с применением контрольных растворов, приведенных в таблице 3.

В хроматограф вводят пробу контрольного раствора, измеряют площадь пика (S). Предел детектирования $C_{\min}$ рассчитывают по формуле

$$C_{\min} = \frac{2 \cdot \Delta x \cdot G \cdot 60}{S \cdot V}, \quad (1)$$

где G – масса вещества, г; $G = C \cdot v$ (C – массовая концентрация контрольного вещества мг/см³, v – объем пробы, см³);

V – скорость потока элюента, см³/мин;

S – площадь пика, е.о.п.с, ед.рефр. с, мВ·с;

Δx – уровень флуктуационных шумов нулевого сигнала, е.о.п., ед.рефр., мВ.

Результаты считают положительными, если значения предела детектирования не превышают значений, приведенных в таблице 6.

10.3 Определение отношения сигнал/шум для хроматографов с флуориметрическим детектором по Рамановскому спектру дистиллированной воды

Отношение сигнал/шум определяют при условиях, указанных в таблице 5.

Прогревают лампу в течение 1 часа. Заполняют ячейку дегазированной дистиллированной водой.

С помощью кнопки [VP] на лицевой панели детектора выбирают режим <VALIDATION> (индикация на дисплее детектора).

Кнопкой [func] выбирают режим <S/N CHECK> (индикация на дисплее детектора).

Кнопкой [Enter] запускают автоматическую проверку соотношения сигнал/шум.

После измерения значения интенсивности пика спектра комбинационного рассеяния воды (около 397 нм) на экране появляется его значение <F=> и предлагается запустить измерения шума и расчет значения сигнал/шум.

Для продолжения нажимают [Enter].

После этого начнется измерение шума в течение 15 минут и начинается обратный отсчет времени.

По окончании на экране высвечивается автоматически рассчитанное значение отношения сигнал/шум <S/N=>.

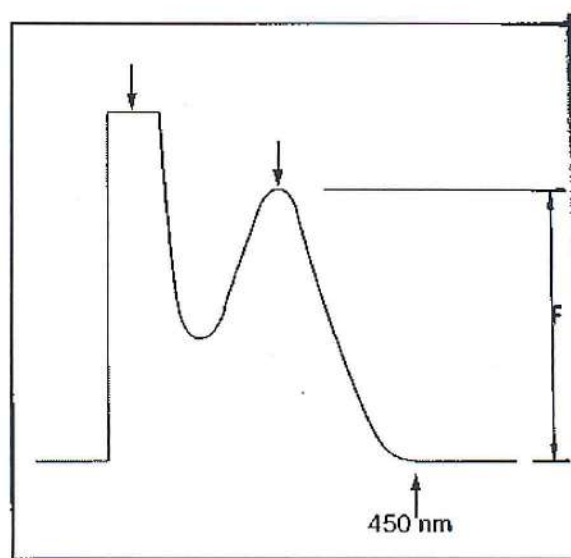


Рисунок 1 - Рассеянный свет в составе света возбуждения
Пик спектра рамановского рассеяния (около 397 нм)

Результаты операции поверки считают положительными, если значения отношения сигнал/шум соответствуют значениям, приведенным в таблице 6.

Таблица 6

Наименование характеристики	Значение для детекторов		
	на диодной матрице DA	флуориметрический FL	рефрактометрический RI
Уровень флуктуационных шумов нулевого сигнала, не более	$5 \cdot 10^{-5}$ е.о.п.	не нормируется	$5 \cdot 10^{-8}$ ед. рефр.
Дрейф нулевого сигнала, не более	$5 \cdot 10^{-4}$ е.о.п./ч	не нормируется	$5 \cdot 10^{-7}$ ед. рефр./ч
Предел детектирования, не более по кофеину	$5 \cdot 10^{-10}$ г/см ³	-	-
по глюкозе	-	-	$1 \cdot 10^{-6}$ г/см ³
Отношение сигнал/шум для Рамановского спектра дистиллированной воды, не менее	-	1200:1	-
Предел допускаемого относительного среднего квадратического отклонения выходного сигнала, %:			
- времени удерживания	1	1	1
- площади пика	2	3	4
Пределы допускаемого относительного изменения выходного сигнала (площади пика) за 8 часов непрерывной работы хроматографа, %	±3	±4	±6

11 ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕТРОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК И ПОДТВЕРЖДЕНИЕ СООТВЕТСТВИЯ СРЕДСТВА ИЗМЕРЕНИЙ МЕТРОЛОГИЧЕСКИМ ТРЕБОВАНИЯМ

11.1 Определение относительного среднего квадратического отклонения (ОСКО) выходного сигнала

11.1.1 Определение относительного среднего квадратического отклонения (ОСКО) выходного сигнала проводят на хроматографе с соответствующим детектором и аналитической колонкой, указанной в 8.1.3.

Метрологические характеристики определяют с использованием контрольных растворов, приведенных в таблице 3, при условиях хроматографирования, указанных в таблице 5.

11.1.2 Контрольную смесь вводят в хроматограф не менее 6 раз, измеряют значения выходных сигналов (площади пика и времени удерживания).

Относительное среднее квадратическое отклонение выходного сигнала рассчитывают по формуле

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

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

X_i – i -ое значение параметра выходного сигнала (площади пика, времени удерживания);

n – количество измерений.

Результаты операции поверки считают положительными, если значения относительного среднего квадратического отклонения (СКО) выходного сигнала не превышают значений, приведенных в таблице 6.

11.2 Определение относительного изменения выходного сигнала за 8 часов непрерывной работы

После выполнения измерений по 11.1.2 через 8 часов непрерывной работы хроматографа повторяют операции по 11.1.2 при условиях хроматографирования, указанных в таблице 5.

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

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

где $\bar{X}$ – среднее арифметическое значение параметра выходного сигнала (площади пика);
 $\bar{X}_t$ – среднее арифметическое значение параметра выходного сигнала (площади пика), полученное через 8 часов непрерывной работы.

Результаты операции поверки считают положительными, если значения относительного изменения выходного сигнала (площади пика) за 8 часов непрерывной работы хроматографа не превышают значений, приведенных в таблице 6.

11.3 Определение показателей точности результатов измерений

При проведении периодической поверки хроматографов, эксплуатируемых по НД на методики, отвечающим требованиям ГОСТ Р 8.563-2009, проверяют показатели точности результатов измерений в соответствии с процедурами и нормативами контроля, регламентированными в методике измерений.

12 ОФОРМЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ПОВЕРКИ

12.1 Результаты поверки хроматографа заносят в протокол произвольной формы.

12.2 Результаты поверки передаются в Федеральный информационный фонд по обеспечению единства измерений. При положительных результатах поверки оформляют свидетельство о поверке в соответствии с действующим законодательством в области обеспечения единства измерений по письменному заявлению владельца или лица, представившего средство измерений на поверку.

12.3 На хроматограф, не удовлетворяющий требованиям настоящей методики поверки, в соответствии с действующим законодательством в области обеспечения единства измерений оформляется извещение о непригодности с указанием причин.

12.4 Знак поверки наносится на свидетельство о поверке (при его оформлении).

Начальник отдела ФБУ «НИЦ ПМ - РОСТЕСТ»



С.В. Вихрова

Начальник сектора ФБУ «НИЦ ПМ - РОСТЕСТ», к.х.н.



О.Л. Рутенберг

ПРИЛОЖЕНИЕ А
(обязательное)**МЕТОДИКА ПРИГОТОВЛЕНИЯ КОНТРОЛЬНЫХ РАСТВОРОВ****А.1 СРЕДСТВА ИЗМЕРЕНИЙ, ПОСУДА, РЕАКТИВЫ**

А.1.1 ГСО 11872-2022 стандартный образец состава кофеина с массовой долей кофеина от 97,00 до 99,99, % границы допускаемых значений абсолютной погрешности аттестованного значения при $P=0,95 \pm 1,0$ %.

А.1.2 ГСО 11683-2021 стандартный образец молярной концентрации глюкозы в растворе (комплект РГ), с молярной концентрацией глюкозы $5,00 \text{ ммоль/дм}^3$, границы допускаемых значений относительной погрешности аттестованного значения при $P=0,95 \pm 3$ %.

А.1.3 ГСО 8749-2006 состава раствора антрацена в ацетонитриле (СО-Антр) с массовой концентрацией антрацена от 0,19 до $0,21 \text{ мг/см}^3$, границы допускаемых значений относительной погрешности аттестованного значения $\text{СО} \pm 2$ % (при $P=0,95$).

А.1.4 Весы лабораторные по ГОСТ OIML R 76-1-2011 с пределом взвешивания 20 или 200 г.

А.1.5 Колбы мерные 2-10-2, 2-100-2 по ГОСТ 1770-74.

А.1.6 Пипетки градуированные 1-1-2-1, 1-1-2-5 по ГОСТ 29227-91.

А.1.7 Ацетонитрил для жидкостной хроматографии, ТУ 6-09-14-2167-84 или с аналогичными характеристиками чистоты и оптического поглощения.

А.1.8 Метанол, ТУ 20.14.22-003-62112778-2020, CAS 67-56-1.

А.1.9 Вода дистиллированная по ГОСТ Р 58144-2018.

А.2 ПРОЦЕДУРА ПРИГОТОВЛЕНИЯ

А.2.1 Приготовление контрольных растворов кофеина

А.2.1.1 Приготовление исходного раствора кофеина с массовой концентрацией 1000 мг/дм^3

Взвешивают в стакане 100 мг ГСО 11872-2022 состава кофеина, добавляют в стакан 25 мл дистиллированной воды, перемешивают. Полученный раствор переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3 . Ополаскивают стакан дистиллированной водой, количественно переносят воду в мерную колбу, доводят до метки дистиллированной водой, перемешивают.

А.2.1.2 Приготовление контрольного раствора кофеина с массовой концентрацией 10 мг/дм^3 .

1 см^3 исходного раствора кофеина переносят пипеткой вместимостью 1 см^3 в мерную колбу вместимостью 100 см^3 . Доводят дистиллированной водой до метки, перемешивают.

Контрольный раствор с массовой концентрацией кофеина 10 мг/дм^3 используют для определения предела детектирования и метрологических характеристик хроматографов с детектором на диодной матрице DA.

А.2.2. Приготовление контрольного раствора глюкозы с массовой концентрацией 90 мг/дм^3

1 см^3 ГСО 11683-2021 раствора глюкозы пипеткой вместимостью 1 см^3 переносят в мерную колбу вместимостью 10 см^3 и доводят содержимое колбы до метки дистиллированной водой.

Контрольный раствор глюкозы используют для определения предела детектирования и метрологических характеристик хроматографа с детектором рефрактометрическим RI.

А.2.3 Приготовление контрольного раствора антрацена

А.2.3.1 Приготовление контрольного раствора с массовой концентрацией антрацена 1 мкг/см^3 ($1 \cdot 10^{-6} \text{ г/см}^3$).

$0,5 \text{ см}^3$ ГСО 8749-2006 состава раствора антрацена в ацетонитриле с массовой концентрацией 200 мкг/см^3 градуированной пипеткой помещают в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и доводят объем до метки раствором подвижной фазы (ацетонитрил : вода с объемным отношением 80:20).

А.2.3.2 Приготовление контрольного раствора с массовой концентрацией антрацена $0,25 \text{ мкг/см}^3$ ($0,25 \cdot 10^{-6} \text{ г/см}^3$).

$2,5 \text{ см}^3$ контрольного раствора с массовой концентрацией антрацена 1 мкг/см^3 градуированной пипеткой вместимостью 5 см^3 помещают в мерную колбу вместимостью 10 см^3 и доводят объем до метки раствором подвижной фазы (ацетонитрил : вода с объемным отношением 80:20).

Контрольный раствор антрацена используют для определения метрологических характеристик хроматографов с детектором флуориметрическим FL.