

MV_RR_CNJ_0050 高效液相色谱仪检定规程

1. 高效液相色谱仪检定规程的说明

编号	JJG(教委)024-1996
名称	(中文) 高效液相色谱仪检定规程 (英文) Verification regulation for high performance liquid chromatography
归口单位	国家教育委员会
起草单位	国家教育委员会
主要起草人	陈培榕
批准日期	1997年1月22日
实施日期	1997年4月1日
替代规程号	无
适用范围	适用于新安装、使用中和修理后的具有紫外—可见光、荧光和示差折光率检测器的高效液相色谱仪(以下简称仪器)的检定。
主要技术要求	1.外观要求 2.安装条件 3.检定环境 4.检定设备 5.检定项目和检定方法
是否分级	无
检定周期(年)	2
附录数目	2
出版单位	科学技术文献出版社
检定用标准物质	
相关技术文件	
备注	

2. 高效液相色谱仪检定规程的摘要

2 范围

适用于新安装、使用中和修理后的具有紫外—可见光、荧光和示差折光率检测器的高效液相色谱仪(以下简称仪器)的检定。

2.1 原理

本仪器用于分离和测定有机混合物中的化学成分。样品以溶液状态进入色谱柱后,在流动相的推动下,逐步被分离成单个的组分。然后依次通过色谱检测器进行检测。根据各组分的保留时间和响应峰值而进行组分的定性或定量分析。

2.2 构成

其主要组成应包括方框图1的部分

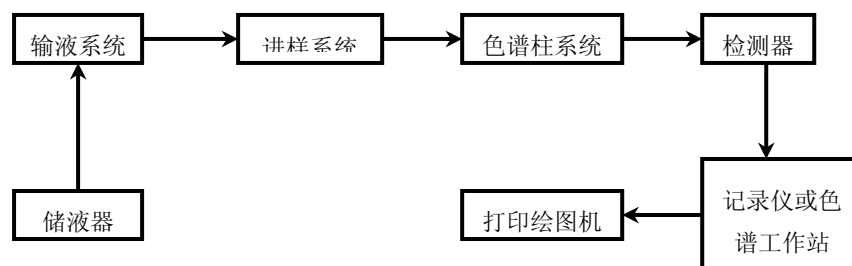


图1 高效液相色谱仪组成方框图

3 计量单位

参见GB3100—93国际单位制及其应用中的有关条文。

4 计量要求

其计量特性和指标应符合表1中的规定。

5 技术要求

5.1 外观要求

5.1.1 仪器应有下列标志：仪器名称、型号、制造厂名、出厂仪器系列编号、产品合格证书及操作使用说明书。仪器外表完好，面板字迹清晰。

5.1.2 仪器整机部件：调节旋钮、按键、开关及指示灯能正常工作，电缆线插接件应接触良好。

5.2 安装条件

5.2.1 仪器应平稳地安装在牢固的操作台上，电缆接插件应紧密配合，接地良好。

5.2.2 高压气瓶与仪器的连接应使用专用管道和接头。

表 1 高效液相色谱仪计量特性和指标

项目 编号	检测器			
	特性指标 特性项目	紫外—可见光 检测器	荧 光 检测器	折射率 检测器
1	泵流量设定值误差	$S_S \leq \pm (2 \sim 5) \%$		
2	* 泵流量稳定性误差	$S_R \leq \pm (1 \sim 2) \%$		
3	柱恒温箱温度	$\Delta T < \pm 2^\circ\text{C}; T_C \leq 1^\circ\text{C}$		
4	* 基线噪声	$\leq \pm 5 \times 10^{-4} \text{AU}$	$\leq \pm 5 \times 10^{-4} \text{AU}$	$\leq \pm 5 \times 10^{-7} \text{RIU}$
5	* 基线漂移	$\leq \pm 5 \times 10^{-3} \text{AU/h}$	$\leq \pm 5 \times 10^{-3} \text{AU/h}$	$\leq \pm 5 \times 10^{-6} \text{RIU/h}$
6	灵敏度		$\leq 10^{-8} \text{g/ml}$	$\leq 10^{-4} \text{g/ml}$
7	* 最小检测量	$\leq 5 \times 10^{-8} \text{g/ml}$	$\leq 5 \times 10^{-10} \text{g/ml}$	$\leq 5 \times 10^{-6} \text{g/ml}$
8	线性范围	$\geq 10^3$		
9	* 定性重复性	$RSD \leq 1.5\%$		
10	* 定量重复性	$RSD \leq 3\%$		

* 带星号的项目为必须检定的项目。

5.3 检定环境

5.3.1 室内环境：应清洁无尘，无易燃、易爆和腐蚀性气体，室内排风良好，且不应放置与测定无关的其它杂物。

5.3.2 室内温度： $10^\circ\text{C} \sim 30^\circ\text{C}$ (温度波动应不大于 $\pm 3^\circ\text{C}$ /操作期间；使用折射率检测器时应不大于 2°C)。

5.3.3 室内相对湿度： $\leq 85\%$ 。

5.3.4 电源：电压 $(220 \pm 22) \text{V}$ ；频率： $(50 \pm 0.5) \text{Hz}$ 。

5.4 检定设备和试剂

5.4.1 分析天平：最大称量 100g，最小分刻度0.01mg，或其它微量自动电子天平。经检

定合格。

5.4.2 秒表：分度值应小于0.1s，经检定合格。

5.4.3 容量瓶：50ml 10个，经检定合格。

5.4.4 玻璃水银温度计：0℃~150℃，分刻度0.1℃，1支，经检定合格。

5.4.5 注射器：10 μ l，50 μ l各两支，经校准合格，10ml 两支。

5.4.6 标准物质和试剂：萘、硫酸奎宁为标准物质；丙三醇、异丙醇、丙酮试剂的等级和溶液的配制方法见附录B。

5.4.7 甲醇(HPLC 纯)、水(石英亚沸重蒸去离子水)，及其它分析纯的无机试剂，在使用前需过滤，脱气。

5.5 检定项目和检定方法

5.5.1 泵流量的检定：连接好色谱柱和检测器，以甲醇为流动相，流量为1.0ml/min，待流速(或压力)稳定后，在流动相排出口用已称量过的容量瓶按表 2 的设定流量分别准确收集流动相，再称量。按式(1)和式(2)分别计算泵流量设定值误差 S_S 和泵流量稳定性误差 S_R 。

$$S_S = (F_m - F_S) / F_S \quad (1)$$

$$S_R = (F_{\max} - F_{\min}) / \bar{F} \quad (2)$$

式中 S_S ——流量设定值误差

F_m —— $(m_2 - m_1) \times \rho_i \times t$ ，流量实测值

m_2 ——容量瓶+流动相的质量

m_1 ——容量瓶的质量

F_S ——流量设定值

ρ_i ——实验温度下流动相的密度

t ——流动相的收集时间

S_R ——流量稳定性误差

F_{\max} ——测量列中的流量最大值

F_{\min} ——测量列中的流量最小值

\bar{F} ——测量列的算术平均值

表 2 S_S 及 S_R 的检定

流量设定值 F_S /(ml/min)	0.5	1.0	2.0	
测量次数	3	3	3	
流动相收集时间(t/min)	25	15	10	
允许误差	S_S	5%	3%	2%
	S_R	3%	2%	2%

注：可以根据实际要求设定泵的检定流量。每当变换流量设定值后，应等待流量稳定后方可收集测量流量。测定顺序可随意选择，但对同一流量的测定应分3次设定和测量，取其平均值。

5.5.2 柱恒温箱温度的检定

按仪器说明书选择最低和最高可控温度点，将水银温度计插入柱箱内，待温度指示稳定后，记录仪器温度指示值及水银温度计指示值，每隔 10min 记录 1 次，共计 7 次，取其算术平均值，计算设定值与平均值之差 Δt 及测量最大值与最小值之差 t_c 。

5.5.3 定性和定量重复性的检定

在仪器处于稳定的运行状态下，用微量注射器或定体积进样管注入适量的标准溶液(紫

外-可见光检测器用萘；荧光检测器用硫酸奎宁；折光检测器用丙三醇等），记录峰保留时间和峰面积，连续测量8次，分别以峰保留时间和峰面积按式(3)计算定性和定量重复性(相对标准偏差*RSD*)。

$$RSD = \sqrt{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2 / (n-1)} \times \frac{1}{\bar{X}} \quad (3)$$

式中 X_i ——第*i*次测得的保留时间或峰面积

\bar{X} ——*n*次测量结果的算术平均值

i——测量序号

n——测量次数

5.5.4 紫外-可见光检测器性能的检定

基线噪声和基线漂移：按仪器说明书联接好仪器各组件。用甲醇为流动相，流量1.0ml/min；吸收波长254nm，范围最灵敏档；记录纸速度5mm/min~10mm/min。待基线稳定后，运行基线30min~40min，测量并计算基线噪声和基线漂移。

最小检测浓度：经基线检测后，拆除色谱柱。在静态条件下，用注射器直接注入2ml~5ml、 4×10^{-8} g/ml 萘的甲醇溶液于样品池中，其响应峰高应大于或等于两倍基线噪声峰峰高。按式(4)计算其最小检测浓度。

$$\rho_1 = 2 \times H_N \times \rho / H \quad (4)$$

式中 ρ_1 ——最小检测浓度

H_N ——噪声峰高(记录仪格数或实测高度)

ρ ——样品浓度

H ——样品峰高(记录仪格数或实测高度)

线性范围：经最小检测浓度检测后，以2%异丙醇的水溶液为甲溶液；系列丙酮-2%异丙醇的水溶液为乙溶液；用甲溶液冲洗样品池若干次，待基线稳定后，将其调至零点位置，然后依次注入0.1%、0.2%……1.0%的乙溶液于样品池中，记录各溶液的响应峰值。各重复测定3次，取其算术平均值。对丙酮含量与峰值作图，找出曲线拐点(比理论值低5%处)，此为线性范围的上限值 ρ_h ，并按式(4)计算其最小检测浓度值 ρ_1 ，再求出 ρ_h / ρ_1 比值，即为检测器(丙酮)的线性范围。

5.5.5 荧光检测器性能的检定

基线噪声和基线漂移：连接好检测器与记录仪，吸收范围最灵敏档，激发波长345nm，发射波长455nm，记录纸速10mm/min。待检测器温度稳定后，在静态条件下，用注射器向样品池注入丙酮水溶液冲洗数次。然后，再注入5ml的丙酮，堵住样品池的出口，5min后，再注入5ml 0.05mol/L的 H_2SO_4 水溶液(不应有气泡)，然后运行基线30min~40min，测量并计算基线噪声和基线漂移值。

最小检测浓度和灵敏度：经基线检测后，用注射器慢慢注入约3ml 0.05mol/L的 H_2SO_4 水溶液于样品池中，待基线稳定后，将其调至零点位置。然后用注射器将 10^{-8} g/ml硫酸奎宁的硫酸(0.05mol/L)水溶液注入样品池中，其响应峰值应达到满量程的70%以上，重复测定3次，测量峰值，取其算术平均值，按式(4)计算最小检测浓度，并计算灵敏度。

线性范围：经最小检测浓度检测后，吸收范围改为中间位置，用注射器向样品池注入5ml 0.05mol/L的 H_2SO_4 水溶液以冲洗样品池。然后用注射器依次将 1×10^{-5} g/ml、 2×10^{-5} g/ml、 3×10^{-5} g/ml…… 1×10^{-4} g/ml的硫酸奎宁硫酸(0.05mol/L)水溶液注入样品池中，分别记录其响应峰值，各重复测定3次，取其算术平均值。然后对硫酸奎宁浓度与响应峰值作图，找出曲线拐点(比理论值低5%处)，此为线性上限值 ρ_h 。并按式(4)计算其最小检测浓度值 c_1 ，再求出 ρ_h / ρ_1 比值，即为其线性范围。

5.5.6 折光率检测器性能的检定

基线噪声和漂移：连接好色谱柱、检测器及仪器的其它部分，以纯水为流动相，流量1ml/min，参比池亦为纯水，范围选择最灵敏档。待仪器稳定后，运行基线30min~40min，测量并计算基线噪声和基线漂移值。

最小检测浓度和零敏度：拆除色谱柱，用蒸馏水冲洗样品池，范围选择最灵敏档，待基线稳定后，将其调至零点位置。用注射器将 10^{-4} g/ml的丙三醇水溶液注入样品池中，其响应峰值应达到满量程的70%以上，重复测定3次，测量峰值，取其算术平均值，按式(4)计算最小检测浓度，并计算灵敏度。

线性范围：用蒸馏水反复冲洗样品池和参比池，然后依次向样品池注入 10^{-6} g/ml, 10^{-5} g/ml, 10^{-4} g/ml, 2×10^{-3} g/ml, 3×10^{-3} g/ml, 4×10^{-3} g/ml, 5×10^{-3} g/ml的丙三醇水溶液，分别记录响应峰值，对丙三醇浓度与峰值作图，求出曲线拐点(比理论值低5%处)，此点为线性上限 ρ_h 。用式(4)计算其最小检测浓度值 ρ_1 ，再算出 ρ_h/ρ_1 比值，即为其线性范围。

说明：上述检定中使用的色谱柱均为 C_{18} 反相色谱柱。

6 计量管理

6.1 检定结果处理

经检定后的仪器，发给检定证书。在检定结论中需明确说明被检定的仪器应属于何种级别、是否合格、存在的问题和建议等。

6.2 检定周期

本仪器在正常运行的条件下，检定周期为两年，若更换部件或对仪器性能有怀疑时，应随时检定。

注：需要查阅全文，请与出版发行单位联系。