

# Konfirmace HPLC systému

Mgr. Michal Douša, Ph.D.

## Obsah

<b>1. Měření modulové.....</b>	<b>2</b>
1.1 Těsnost pístů – tlakový test .....	2
1.2 Teplota autosampleru (správnost a přesnost) .....	2
1.3 Teplota kolonového termostatu .....	2
1.3.1 Absolutní hodnota.....	2
1.3.2 Linearita teploty (alternativní test).....	2
<b>2. Měření systému - pumpy .....</b>	<b>3</b>
2.1 Reprokovatelnost průtoku mobilní fáze a linearita průtoku .....	3
2.1.1 Reprokovatelnost průtoku.....	3
2.1.2 Linearita průtoku.....	3
2.2 Linearita gradientu, strmost gradientu a přesnost gradientu .....	3
2.2.1 Linearita gradientu.....	3
2.2.2 Přesnost gradientového ventilu.....	3
2.2.3 Přesnost nárůstu gradientu.....	4
<b>3. Měření systému - nástřik.....</b>	<b>4</b>
3.1 Linearita nástřiku .....	4
3.2 Reprokovatelnost nástřiku.....	4
3.3 Detekce pozice vialky v karuselu .....	4
3.4 Křížová kontaminace .....	4
<b>4. Měření systému - detektor.....</b>	<b>5</b>
4.1 Linearita UV detektoru.....	5
4.2 Správnost nastavení vlnové délky PDA detektoru .....	5
4.3 Linearita fluorescenčního detektoru.....	5
4.4 Správnost nastavení vlnové délky fluorescenčního detektoru .....	5

## 1. Měření modulové

### 1.1 Těsnost pístů – tlakový test

Měří se tlaková těsnost HPLC systému při tlaku 4 000 psi (27,5 MPa, 275 Bar).

***Kriterium:***

Tlakový rozdíl  $\Delta p$  po 1 minutě nesmí být menší než 15 % relat.

### 1.2 Teplota autosampleru (správnost a přesnost)

Měří se teplota kalibrovaným teploměrem při 10 °C, 20 a 40 °C.

***Kriterium:***

1. Rozdíl teplot  $T_1 - T_0$  nesmí být větší než 4 °C.
2. V uvedeném rozsahu teplot musí platit:  $0,90 \leq b \leq 1,10$  a koeficient korelace  $r \geq 0,90$ .

### 1.3 Teplota kolonového termostatu

#### 1.3.1 Absolutní hodnota

Měří se teplota kalibrovaným teploměrem od 15 °C do 45 °C v intervalu 15 °C.

***Kriterium:***

1. Rozdíl teplot  $T_1 - T_0$  nesmí být větší než 2 °C.
2. V uvedeném rozsahu teplot musí platit:  $0,95 \leq b \leq 1,05$  a koeficient korelace  $r \geq 0,95$ .

#### 1.3.2 Linearita teploty (alternativní test)

Změří se teplota kalibrovaným teploměrem při teplotě 30 °C. Měří se retenční čas standardního roztoku propylrabenu při teplotě od 15 °C do 45 °C v intervalu 15 °C.

***Kriterium:***

1. Rozdíl absolutních teplot  $T_1 - T_0$  nesmí být větší než 2 °C.
2. Linearita teploty je splněna když koeficient korelace  $r$  závislosti logaritmu retenčního času propylparabenu na reciproké hodnotě  $1/T$  je  $r > 0,98$ .

## 2. Měření systému - pumpy

### 2.1 Reprodukovatelnost průtoku mobilní fáze a linearita průtoku

#### 2.1.1 Reprodukovatelnost průtoku

Měření se retenčního času (8 opakování) standardního roztoku propylparabenu o koncentraci.

***Kriterium:***

Reprodukovatelnost průtoku mobilní fáze je splněna v případě, že RSD retenčního času propylparabenu z 8 nástřiků  $< 1 \%$ .

#### 2.1.2 Linearita průtoku

Linearita průtoku se vypočte z nepřímého měření času standardního roztoku propylparabenu o koncentraci při průtocích 0,5 – 0,75 – 1,0 – 1,5 a 2,0 ml/min.

***Kriterium:***

Linearita průtoku je splněna když koeficient korelace  $r$  závislosti  $1/t$  na průtoku je  $r > 0,98$ .

### 2.2 Linearita gradientu, strmost gradientu a přesnost gradientu

#### 2.2.1 Linearita gradientu

Měření standardního roztoku propylparabenu za různého složení mobilní fáze.

***Kriterium:***

Předpoklad linearity gradientu je platný v případě, že korelační koeficient závislosti objemového zlomku acetonitrilu v mobilní fázi ( $\varphi$ ) na reciproké hodnotě retenčního času propylparabenu ( $1/t$ ) je  $r \geq 0,98$ .

#### 2.2.2 Přesnost gradientového ventilu

Tři cesty (**B,C,D** nebo pumpy, záleží na tom, zda se používá vysokotlaký nebo nízkotlaký gradient) se naplní acetonitrem a poslední vodou (**A**). Provedou se 2 měření standardního roztoku propylparabenu za isokratických podmínek o stejném složení mobilní fáze, která se mísí gradientovým ventilem nebo pumpami.

***Kriterium:***

Předpoklad přesnosti gradientu je splněn, platí-li pro RSD retenčního času propylparabenu pro všechna složení mobilní fáze (6 nástřiků)  $\leq 1,0$  %.

### 2.2.3 Přesnost nárůstu gradientu

Provede se 6 měření standardního roztoku propylparabenu za gradientových podmínek.

***Kriterium:***

Předpoklad přesnosti gradientu je splněn, platí-li pro RSD retenčního času propylparabenu pro gradient (6 nástřiků)  $\leq 1,0$  %.

## 3. Měření systému - nástřik

### 3.1 Linearita nástřiku

Měří se plochy píků standardního roztoku propylparabenu pro objemový nástřik 5, 10, 25, 25, 50, 75 a 100  $\mu$ l.

***Kriterium:***

1. Předpoklad linearity nástřikového objemu je platný v případě, že korelační koeficient  $r \geq 0,99$ .
2. Přesnost nástřiku počítáno jako  $Acc=ABS(A/B)<1$ .

### 3.2 Reprodukovatelnost nástřiku

Měření se retenční čas (8 opakování) standardního roztoku propylparabenu.

***Kriterium:***

Reprodukovatelnost nástřiku je splněna v případě, že RSD plochy propylparabenu z 8 nástřiků  $< 1$  %.

### 3.3 Detekce pozice vialky v karuselu

Autosampler musí nalézt předem určenou pozici vialky v karuselu. Počet kontrol závisí na celkovém počtu míst karuselu a je roven druhé odmocnině z tohoto počtu.

***Kriterium:*** Všechny vialky musí být nalezeny.

### 3.4 Křížová kontaminace

Měří se plocha píku propylparabenu v blanku po předchozím nástřiku standardního roztoku propylparabenu.

**Kriterium:** V čase propylparabenu může být nalezen pík propylparabenu jehož plocha musí být nejvýše 0,005 % plochy standardního roztoku propylparabenu.

## 4. Měření systému - detektor

### 4.1 Linearita UV detektoru

Měří se plochy píků standardního roztoku propylparabenu o koncentraci 2,5, 5, 10, 20, 50, a 100 mg/l.

**Kriterium:**

1. Předpoklad linearity detektoru je splněn, když korelační koeficient závislosti plochy píku propylparabenu na koncentraci je  $r \geq 0,99$ .
2. Předpoklad citlivosti detektoru přes celý koncentrační rozsah je splněn v případě, že RSD všech citlivostí je  $\leq 4,5 \%$ .

### 4.2 Správnost nastavení vlnové délky PDA detektoru

Měří se spektrum naftalenu ( $\lambda_{\max} = 266; 276; 284 \text{ nm}$ ) a chloristanu erbičitého ( $\lambda_{\max} = 255; 379; 522,5$ ).

**Kriterium:** Přípustná odchylka od těchto maxim je  $\pm 2 \text{ nm}$ .

### 4.3 Linearita fluorescenčního detektoru

Měří se plochy píků standardního roztoku naftalenu o koncentraci 0,2, 0,4, 1,0, 2,0 a 4,0 mg/l.

**Kriterium:**

1. Předpoklad linearity detektoru je splněn, když korelační koeficient závislosti plochy píku naftalenu na koncentraci je  $r \geq 0,99$ .
2. Předpoklad citlivosti detektoru přes celý koncentrační rozsah je splněn v případě, že RSD všech citlivostí je  $\leq 4,5 \%$ .

### 4.4 Správnost nastavení vlnové délky fluorescenčního detektoru

Měří se emisní spektrum naftalenu s excitační vlnovou délkou 276 nm.

**Kriterium:** Emisní spektrum naftalenu s maximem mezi 320 – 324 nm.