Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

使用沃特世中性质量控制标准品排除仪器系统的常见问题

Kenneth D. Berthelette、Mia Summers、Kenneth J. Fountain
沃特世公司（美国马萨诸塞州米尔福德市枫树街34号）

应用优势

- 可提早发现HPLC/UPLC系统存在的问题，从而尽可能避免收集质量差的数据
- 通过使用一种高质量标准品，可更迅速地进行故障排除，从而缩短系统停机时间
- 可快速确认刚修好的仪器是否已恢复到正常运行状态

沃特世解决方案

沃特世中性质量控制标准品

ACQUITY UPLC® H-Class系统

ACQUITY UPLC色谱柱

Empower® 3色谱数据管理系统

经LCGC认证的Qsert透明样品瓶

关键词

分析标准品与试剂、中性质量控制标准品、ACQUITY UPLC色谱柱、HPLC、故障排除

引言

液相色谱是一种功能强大的分析方法；然而，当一台HPLC或UPLC®系统出现故障时，意味着需要大量的时间和资源进行维修。色谱系统的有些问题（如：泵渗漏）可被经验丰富的色谱分析师发现，而另一些问题（如：柱出口端管路连接不当）则比较隐秘并且很难排除。通过使用一种合格的系统适应性标准品，色谱分析师能更容易地发现色谱系统内存在的问题，从而尽可能缩短系统停机时间。

沃特世中性质量控制标准品（QCRM）由丙酮、萘和苊这三种中性化合物混合而成。这些化合物均在严格的监控下生产，具有优异的批间重现性并能确保结果稳定性不随时间的推移而变化。此标准品是一种用来排除系统故障和进行仪器维护的理想解决方案，因为这些化合物可在有机溶剂含量充足的常用流动相条件下实现分离。此项应用对6种常见色谱分析问题进行了研究，以证实中性QCRM在快速诊断HPLC或UPLC系统所存在问题方面的效用。维修完成后，中性QCRM可用来快速确认系统是否已恢复到最佳运行状态。通过使用中性QCRM检查系统功能，可确保数据质量，从而可以放心使用仪器系统。

实验

ACQUITY UPLC H-Class系统条件

流动相：	50:50
乙腈：	水
分离模式：	等度洗脱
检测（PDA）：	UV 254 nm
色谱柱：	ACQUITY UPLC BEH C_{18}，2.1 x 50 mm，1.7 µm（部件编号：186002350）
柱温：	30 °C
进样针冲洗：	50:50 = 乙腈:水
样本净化：	50:50 = 乙腈:水
密封垫冲洗：	50:50 = 甲醇:水
流速：	0.6 mL/min
进样量：	1 µL
数据管理：	Empower 3色谱数据管理系统

样本制备

打开一瓶ASR中性质量控制标准品（部件编号：186006360）并将其转移至经LCGC认证的Qsert透明样品瓶（部件编号：186001126C）内，以备进样使用。

结果与讨论

当一台HPLC或UPLC系统出现问题时，故障排除是既耗时又成本昂贵的一个过程。通过使用一种质量控制标准品（QCRM），色谱分析师能更容易地确定仪器系统的问题所在并进行相应的维修，从而缩短系统停机时间。沃特世中性QCRM是一种由丙酮、萘和苊组成的混合物，它在严格监控的环境中生产并具有良好的批间重现性，从而能确保获得可靠结果。该标准品既可用于系统性能的基准评估，也适用于排除仪器系统所存在的问题。此外，这种标准品可在仪器维修后使用，以确保系统已恢复到最佳运行状态。

对仪器系统的性能进行基准评估有益于监测系统性能并确保生成高质量的数据[1]。之后如果仪器系统内出现任何问题，操作员都能将进行任何维修后的系统性能与故障存在时的性能进行比较。在此项应用中，我们通过使用中性QCRM快速诊断故障，对6种常见色谱分析问题进行了研究，如表1所示。在试验期间，我们对保留时间、USP拖尾因子和USP塔板数进行了监测。虽然也可对其他多种参数进行监测，但我们选择上述参数是因为许多方法（特别是药典方法）对这些参数都有规定。此外，所有这些参数均能预示仪器系统是否存在故障。

问题#	问题描述
1	柱性能差
2	泵渗漏
3	单向阀的性能差
4	柱配件连接不当
5	系统内有气泡
6	流动相配制错误

表1. 举例说明一些人为引起并能被沃特世中性QCRM诊断出来的常见LC系统问题。

如表2所示，在出现任何系统故障或用户错误前，将这种中性QCRM在五天时间内向一台最近经过校准的配有ACQUITY UPLC PDA检测器的ACQUITY UPLC H-Class系统进样45次。作为系统基准评估过程的一部分，操作员应根据实验室规程设定合适的规范值：只有这种中性QCRM符合这些规范值，才能认定仪器系统处于最佳工作状态[2]。通过设定这些规范值，可对系统性能进行监测，从而有可能及时捕捉到各种隐患。

		丙酮	萘	苊
基准评估数据（n=45）	平均保留时间（分钟）	0.323	1.633	2.893
	保留时间%RSD	0.690	0.440	0.440
	USP拖尾因子	1.180	1.130	1.080
	USP塔板数	3144	11009	10436

表2. 系统基准评估期间收集的数据，这些数据证实系统运行良好并且保留时间的%RSD低（n=45）。

为了展现中性QCRM的故障排除能力，我们证实的第一种系统问题是性能降低的色谱柱对化合物分离的影响。随着时间的推移，所有液相色谱柱在重复进样过程中都将丧失分离某种混合物中各组分的高效性和能力。如图1所示，将中性QCRM在一根过度使用的ACQUITY UPLC BEH C_{18}色谱柱（2.1 x 50 mm，1.7 µm）中的分离情况与在一根性能达标的色谱柱中所获得的分离效果进行比较。

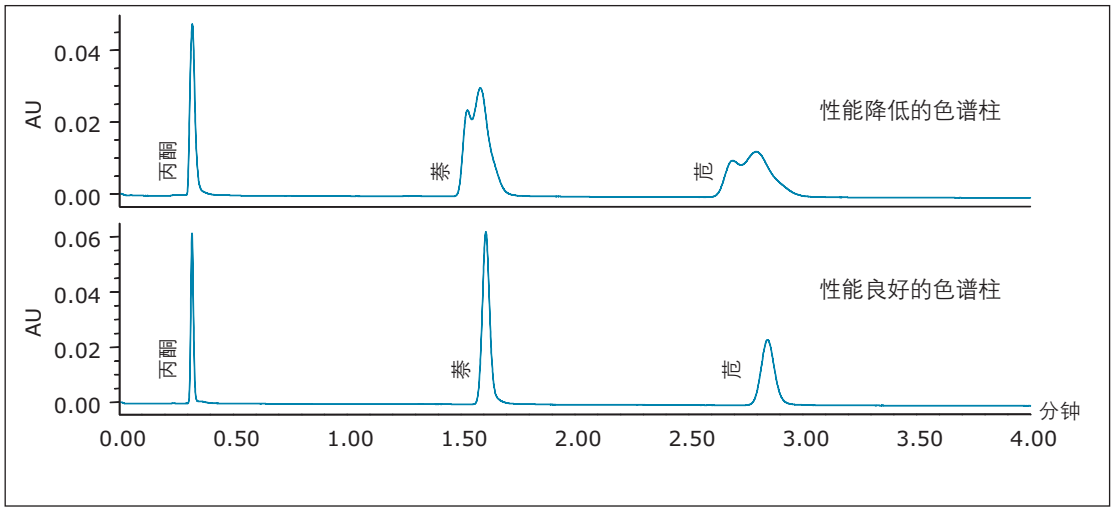

图1. 中性QCRM在性能降低的色谱柱和性能良好的色谱柱中的分离情况。

如图1所示，使用这根性能降低的色谱柱会使萘和苊色谱峰同时出现分裂。通过监测苊峰的USP塔板数发现，该数值在使用性能降低的色谱柱时下降至1000左右，如表3所示。在将性能降低的色谱柱更换为一根新的色谱柱后，又对这种中性QCRM进样9次。如表3所示，这9次进样所得到的数据与基准数据相当，表明系统已恢复到出现柱故障之前的最佳运行状态。更换色谱柱后，总体保留时间的%RSD较低并且塔板数和拖尾因子又恢复到比较接近的稳定水平，这证明系统已恢复到正常性能水平。

		丙酮	萘	苊
性能降低的色谱柱（在出现问题期间的检测数据）	保留时间（分钟）	0.319	1.574	2.770
	USP拖尾因子	1.290	1.040	1.010
	USP塔板数	1043	1458	1433
性能降低的色谱柱（维修后）	平均保留时间（分钟）	0.323	1.631	2.893
	保留时间%RSD	0.670	0.460	0.440
	USP拖尾因子	1.170	1.130	1.090
	USP塔板数	3152	11001	10531

表3. 在使用一根性能降低的色谱柱期间以及更换色谱柱后所收集的数据（n=9）。

我们证实的第二种系统问题是渗漏引起的泵故障。当发生渗漏时，使用这种中性QCRM进行分析，如图2所示。

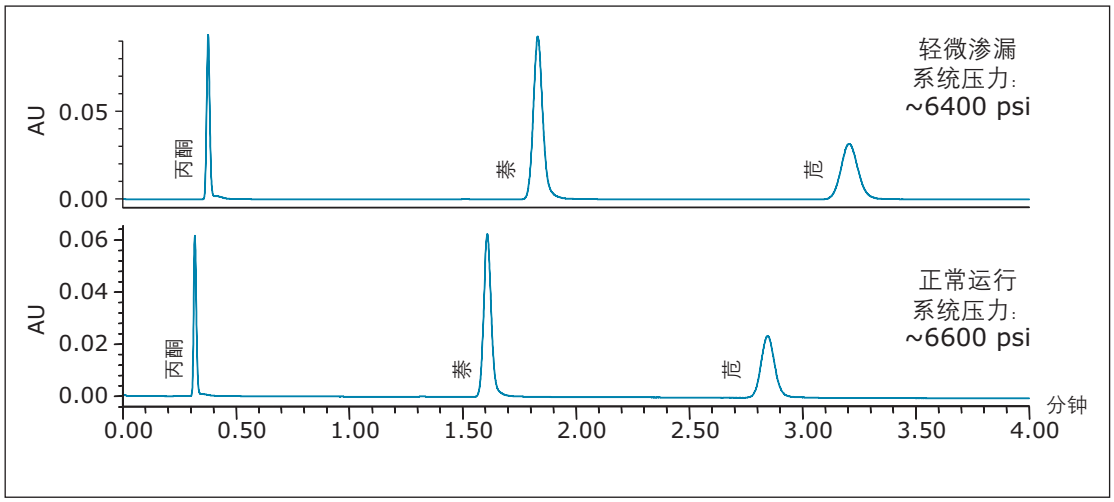

图2. 比较一台存在轻微渗漏故障的色谱泵与一台运行正常的色谱泵对这种中性QCRM的分离情况。

当泵内存在轻微渗漏时，所有色谱峰仍在样品运行时间内进行洗脱；然而，保留时间会出现变化并且系统压力也会略微改变。根据实验室设定的严格规范值，表4所示的10%左右的保留时间偏差可能会落在规范值以外，从而提醒分析师仪器系统可能存在问题。通过将其与压力变化综合考虑，这会提示分析师色谱泵可能存在故障。维修色谱泵后，再使用中性QCRM对系统性能进行重新检查。将该标准品进样9次并对所得出的数据进行汇总，如表4所示。在针对渗漏问题维修色谱泵后，所有峰的总体保留时间%RSD均小于0.7，这证明系统已恢复到正常运行状态。

		丙酮	萘	苊
泵出口处的配件渗漏（在出现问题期间的检测数据）	保留时间（分钟）	0.376	1.832	3.206
	USP拖尾因子	1.160	1.140	1.080
	USP塔板数	3438	9348	8516
泵出口处的配件渗漏（维修后）	平均保留时间（分钟）	0.323	1.631	2.893
	保留时间%RSD	0.680	0.450	0.440
	USP拖尾因子	1.180	1.120	1.070
	USP塔板数	3148	11020	10421

表4. 对一台存在轻微渗漏故障的色谱泵以及该泵维修后所收集的数据（n=9）。

第三种常见系统问题是单向阀性能差。单向阀有助于调节HPLC/UPLC系统的流速和压力。随着时间的推移，这些阀门可能会根据所用流动相的类型而出现粘滞和堵塞。当它们的性能开始减退时，可观察到仪器系统存在明显的色谱分析问题和压力问题。图3将这种中性QCRM在单向阀性能不良的色谱系统与单向阀性能良好的色谱系统中的分离情况进行了比较。

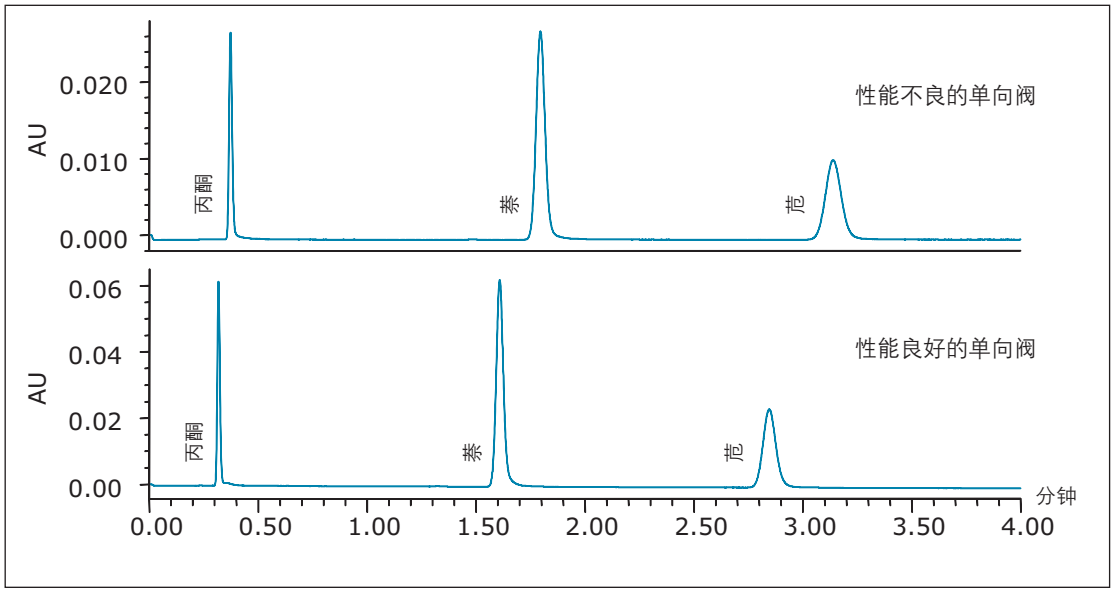

图3. 中性QCRM在一台配有性能不良与性能良好的单向阀的系统中的分离情况。

与使用性能良好的单向阀相比，使用性能不良的单向阀所得出的全部三个峰的保留时间均出现了改变。保留时间的这种微小改变因单向阀未能对流动相流速进行有效调节而引起。在这种情况下，不仅化合物的保留会增加，而且对萘来说塔板数也下降26%，如表5所示。保留时间的这种改变以及塔板数的降低可能会导致标准品的分析结果偏离规范值。更换单向阀后，立即通过再对中性QCRM进样9次来再次检查系统性能，如表5所示。在这种情况下，9次进样的塔板数和保留时间与基准数据相当，表明仪器系统在对单向阀进行维修后已恢复到正常运行状态。

		丙酮	萘	苊
单向阀性能不良（在出现问题期间的检测数据）	保留时间（分钟）	0.374	1.805	3.156
	USP拖尾因子	1.170	1.070	1.020
	USP塔板数	3103	8768	8783
单向阀性能不良（维修后）	平均保留时间（分钟）	0.323	1.631	2.893
	保留时间%RSD	0.680	0.470	0.440
	USP拖尾因子	1.160	1.140	1.070
	USP塔板数	3157	11025	10511

表5. 使用配有一个性能不良与性能良好的单向阀的仪器系统所收集的数据（n=9）。

液相色谱系统中的第四种常见故障模式是柱连接不当。更换色谱柱时可能会出现管件与色谱柱连接不当的问题并由此导致管件与柱末端配件之间存在空隙。这种空隙会影响峰形并可能使色谱峰加宽，从而产生过多的拖尾峰或肩峰。图4比较了中性QCRM在一根连接不当的色谱柱与连接得当的色谱柱中的分离情况。

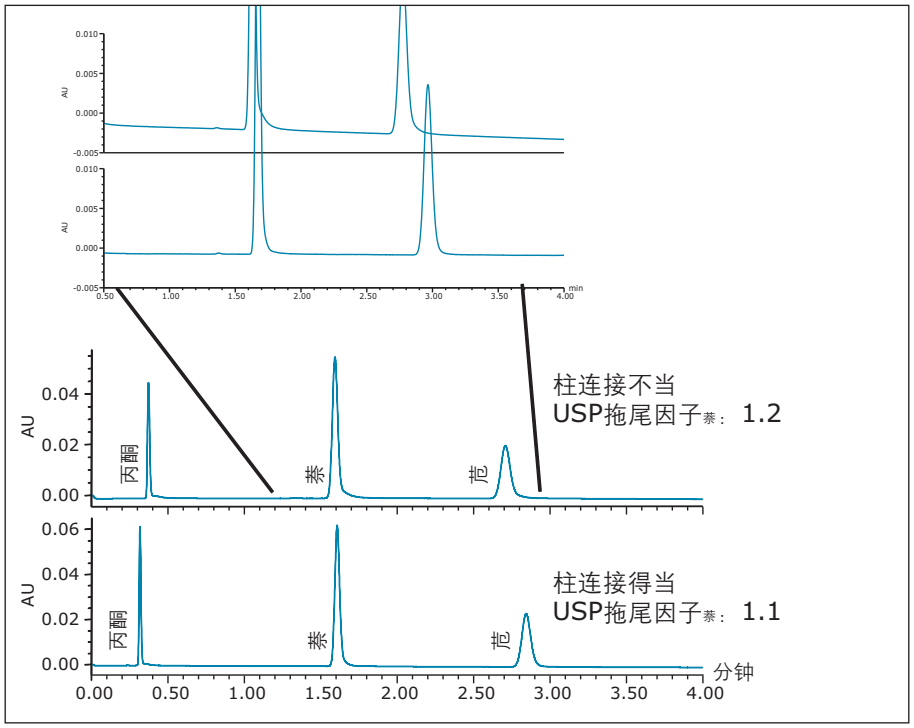

图4. 中性QCRM在连接得当和连接不当的色谱柱中的分离情况。

在本例中，与使用连接得当的色谱柱相比，中性QCRM在使用连接不当的色谱柱进行分离时仅会出现一些微小改变。色谱柱连接不当所带来的影响根据已形成空隙的大小而变化。在这种情况下，萘峰的拖尾程度在管件连接不当时会略微增加，同时苊峰的保留降低。这些改变可能会预示出仪器系统存在的许多问题。每个色谱峰均会受到不同的影响，由于这类差异比较微小，因此可能不会引起注意。除了萘峰的拖尾程度较高之外，也观察到塔板数出现下降，如表6所示。根据测定结果和规范值，这类塔板数下降可能会引起系统性能检查结果不合格。通过正确连接色谱柱并再对标准品进样9次来重新检查系统性能，如表6所示。萘峰的拖尾因子恢复到1.1左右，塔板数增加并恢复到与基准数据相同的性能水平，这表明系统已恢复到最佳运行状态。

		丙酮	萘	苊
柱出口端管路连接不当（在出现问题期间的检测数据）	保留时间（分钟）	0.385	1.669	2.815
	USP拖尾因子	1.140	1.200	1.170
	USP塔板数	3159	8685	8659
柱出口端管路连接得当（维修后）	平均保留时间（分钟）	0.323	1.631	2.893
	保留时间%RSD	0.670	0.450	0.440
	USP拖尾因子	1.160	1.080	1.070
	USP塔板数	3220	10980	10438

表6. 使用连接不当和连接得当的色谱柱所收集的数据（n=9）。

液相色谱系统中的第五种常见问题是溶剂管路内存在气泡，这将引起系统灌注不足或溶剂瓶内的溶剂耗尽。一旦气泡形成，它就会影响系统压力和流动相输送。图5显示出气泡对中性QCRM分离情况的影响。

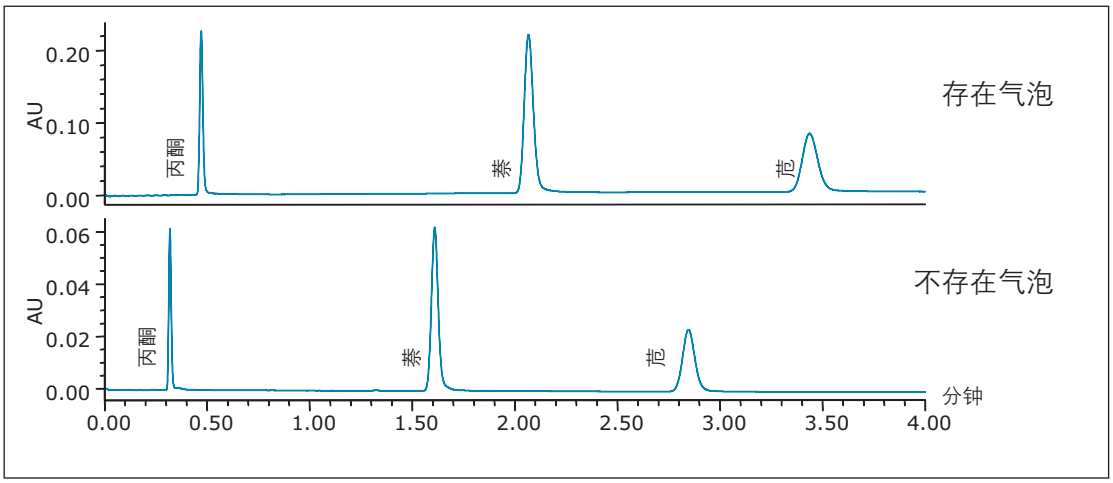

图5. 中性QCRM在仪器系统存在和不存在气泡时的分离情况。

仪器系统内有气泡时，所有色谱峰的保留时间均会改变。溶剂管路或泵内的气泡会引起流动相输送不当，从而改变保留时间。在这种情况下观察到萘峰的保留增加25%，如表7所示。通过使用流动相重新灌注仪器系统，可将气泡排出系统。从表7所示的将气泡排出仪器系统后对中性QCRM进样9次所得出的数据来看，保留时间又恢复到对系统进行基准评估时所得出的数值，表明这时系统已不再存在气泡。

		丙酮	萘	苊
仪器系统内存在气泡（在出现问题期间的检测数据）	保留时间（分钟）	0.471	2.066	3.436
	USP拖尾因子	1.120	1.160	1.110
	USP塔板数	4408	10116	9616
仪器系统内存在气泡（维修后）	平均保留时间（分钟）	0.323	1.631	2.893
	保留时间%RSD	0.690	0.460	0.440
	USP拖尾因子	1.15	1.06	1.09
	USP塔板数	3189	11202	10449

表7. 在液相色谱系统存在和不存在气泡时所收集的数据。该气泡通过灌注流动相泵而除去。

此项应用所研究的最后一个液相色谱系统中的常见问题是流动相内的有机溶剂构成发生变化，这可能是分析师在配制流动相时出错。流动相构成的微小改变也会对色谱分析结果造成影响，其中包括延长或缩短保留时间并有可能引起色谱峰共洗脱。在此项应用中，乙腈百分比在分析中性QCRM时的变化幅度为± 2%。图6显示出使用乙腈比例为48%、52%和50%（建议配比）的流动相时的分离情况。

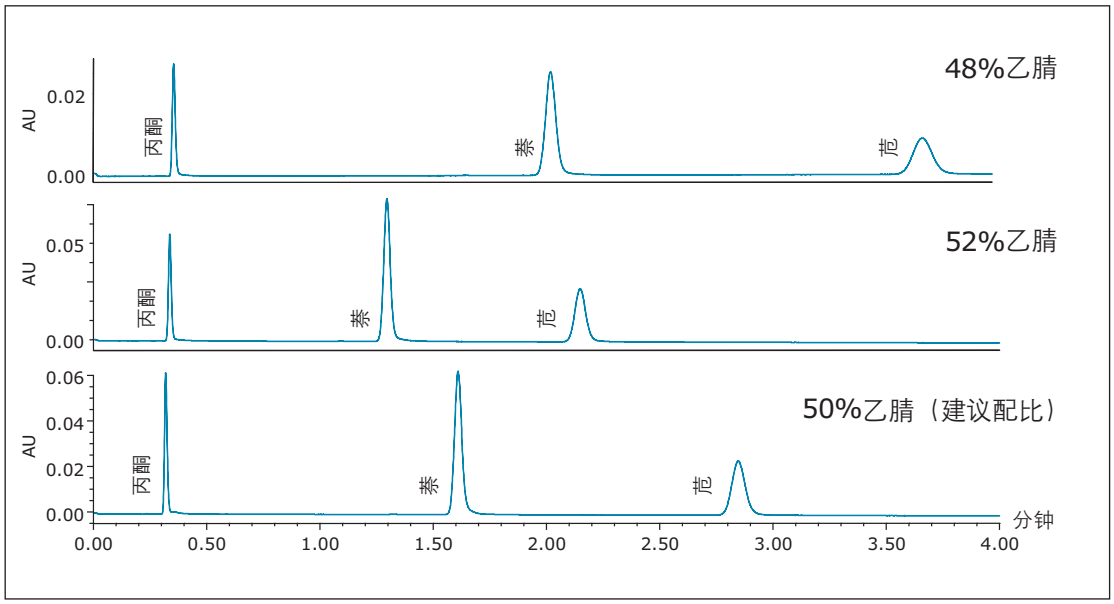

图6. 流动相强度对中性QCRM分离情况的影响。

可以预计，不同的有机溶剂构成会对该标准品的等度分离产生明显影响。当流动相中包含48%的乙腈时，观察到萘峰的保留时间出现了25%的改变；而当流动相中存在52%的乙腈时，保留时间缩短21%，如表8所示。一旦仪器系统恢复到原始流动相构成（50%乙腈）后，立即对中性QCRM进样9次以重新检查系统性能（如表8所示）并证明系统运行正常。所有色谱峰的保留时间均与基准数据相当，这表明流动相配比准确并且系统正常运行。这种中性QCRM可与许多流动相相容；如果样本分析所用的流动相同时用于对系统进行基准评估和故障排除，那么就可以显示出中性QCRM在排除流动相配比错误方面的优势。虽然此项应用主要讨论使用50%乙腈的情况，但这也适用于其他有机溶剂含量充足的流动相。在不使用某种标准品检查系统性能的情况下，流动相配制错误可能会导致色谱分析不可重现或者真实样本的多个目标峰出现共洗脱，从而迫使进行昂贵且不必要的方法开发或对样本进行重复分析。相反，通过给这种中性QCRM设定适当的规范值，可在样本分析开始前发现有机溶剂配比错误。

		丙酮	萘	苊
使用52%乙腈进行分离	保留时间（分钟）	0.336	1.295	2.148
	USP拖尾因子	1.130	1.070	1.080
	USP塔板数	3290	9323	9144
使用48%乙腈进行分离	保留时间（分钟）	0.358	2.035	3.690
	USP拖尾因子	1.150	1.080	1.080
	USP塔板数	3124	8818	8974
使用50%乙腈（建议条件）进行分离	平均保留时间（分钟）	0.323	1.632	2.893
	保留时间%RSD	0.680	0.430	0.440
	USP拖尾因子	1.140	1.050	1.060
	USP塔板数	3297	11402	10520

表8. 使用不同流动相构成进样中性QCRM时所收集的数据。

结论

沃特世中性质量控制标准品（QCRM）由三种可采用有机溶剂含量充足的常用流动相分离的中性化合物混合而成，且与大多数色谱柱化学品相容，从而使其成为一种用来排除HPLC和UPLC系统所存在问题的理想标准品。在将该标准品用作一种故障排除工具之前，建议先使用该标准品对系统性能进行基准评估并设定一组用来确定将来得出的标准品分析数据合乎规定的规范值[1]。在常规分析期间，该标准品可用来对仪器系统进行监测，如果出现问题，可运行这种中性QCRM以确定系统是否存在问题并帮助鉴定问题所在。一旦问题解决，立即再次运行该标准品以确认系统已恢复到正常运行状态。

使用这种中性QCRM的好处很多。首先是可缩短系统停机时间。这样可使资源得到更好的利用，同时能分析更多的样本并减少分析师为尝试确定系统问题所在而花费的时间。其次，由于这种标准品采用严格的生产工艺制得，因此可减少在适应性标准品配制方面的错误，从而便于将仪器系统的问题隔离开来，并允许色谱分析师更快速地找出问题。最后，这种中性QCRM可用来确保刚修好的仪器系统已恢复到最佳运行状态。这可增加维修后所得出数据的可信度并确保生成高质量的数据。

参考文献

1. Berthelette KD, Summers M, Fountain KJ. Benchmarking System Performance using Waters Neutrals QC Reference Material. Waters Application Note Literature code: 720004622EN

2. Quality Control Reference Material and Benchmarking Instrument Performance. Waters White Paper Literature code: 720004535EN.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

Waters、Empower、UPLC和ACQUITY UPLC是沃特世公司的注册商标。The Science of What's Possible是沃特世公司的商标。其他所有商标均归各自的拥有者所有。

©2013年 沃特世公司。印制于中国。

2013年3月 720004635ZH AG-PDF

沃特斯中国有限公司
沃特世科技（上海）有限公司

北京：010 - 5209 3866
上海：021 - 6156 2666
广州：020 - 2829 6555
成都：028 - 6554 5999
香港：852 - 2964 1800

免费售后服务热线：800 (400) 820 2676
www.waters.com