

达元公司

液相色谱仪测试建议方案

(上海伍丰仪器有限公司提供)

液相色谱系统分析系统性能测试方法

本液相色谱系统分析系统性能测试方法以国家质监局液相色谱仪国标 JJG-705-2002 检定规程为基础,由上海伍丰科学仪器有限公司编写。对液相色谱系统的系统指标包括:基线噪音、基线漂移、最小检测限、定性重复性、定量重复性等分析性能进行检定。系统测试优先于部件的测试。



注意:

进行系统测试之前,按照所要测试的配置,需要将紫外检测器、输液单元、进样单元、色谱柱,如果配有柱温箱,需要将柱温箱等单元的流路部分,通讯部件连接电脑工作站软件或数据处理装置,通讯后方可进行。

测试必备的条件:

检定规程:国家质监局 JJG-705-2002 检定规程。

流动相:甲醇(色谱纯级) 500mL,

流量: 1.000mL/min,

标准样品: 萘/甲醇 溶液, $C_{\text{萘}}=1\times 10^{-4}\text{g/mL}$, $C_{\text{萘}}=1\times 10^{-7}\text{g/mL}$,

色谱柱: 150mm C18 色谱柱,

温度: 18~25°C, 温度变化不可超过 $\pm 1^\circ\text{C}$,

电源电压: $\sim 220\pm 22\text{V}$,

检定波长: 254nm,

检定项目: 基线噪音、基线漂移、最小检测限、定性重复性、定量重复性,

鉴定项目和要求(参考:伍丰公司企业测试标准):

基线噪音 $\leq 2\times 10^{-5}\text{AU}$,

基线漂移 $\leq 2\times 10^{-4}\text{AU/h}$,

最小检测浓度 $\leq 1\times 10^{-8}\text{g/mL}$,

定性重复性误差 $\text{RSD}_{6\text{Rt}}\leq 0.5\%$,

定量重复性误差 $\text{RSD}_{6\text{A}}\leq 1\%$,

输液单元流量设定值误差 $S_S\leq 1.0\%$

输液单元流量稳定性误差 $S_R\leq 1.0\%$

测试具体内容和步骤:

(等度系统)

1 系统基线噪声检定

系统按正常工作连接,以 100%色谱级甲醇为流动相,流量为 1.0mL/min,连接 C18 色

谱柱，紫外检测器波长设定 254nm，响应时间设定 1s，关闭波长扫描，关闭外部事件，开机预热，待仪器稳定后，记录基线 4min，停止采样后，设定峰宽 5，斜率 70，重分析谱图，查看谱图基线峰-峰高对应的吸光度值，计算系统的基线噪音。

2 系统基线漂移检定

系统按正常工作连接，以 100%色谱级甲醇为流动相，流量为 1.0mL/min，连接 C18 色谱柱，紫外检测器波长设定 254nm，响应时间设定 1s，关闭波长扫描，关闭外部事件，开机预热，待仪器稳定后，记录基线 70min，停止采样后，设定峰宽 10，斜率 70，重分析谱图，查看谱图 1h 内，偏离指定零点的值。

3 最小检测浓度的检定

在 8.5.2.1 的条件下，用微量注射器从进样口注入 20 μ l 浓度为 1×10^{-7} g/mL 的萘/甲醇溶液，记录色谱图，由色谱峰高和基线噪音，按下式计算最小检测浓度。

$$\text{最小检测浓度: } c_L = \frac{2N_d c V}{H \cdot 20}$$

式中： c_L ——最小检测浓度，g/mL；

N_d ——基线噪音，mAU；

c ——标准溶液浓度，g/mL；

H ——标准溶液的色谱峰峰高，mAU；

V ——进样体积， μ l；

*4 定性重复性和定量重复性检定

***重要指标：**此指标考核了输液单元的稳定性，以及检测单元的灵敏度。

在 8.5.2.1 的条件下，用微量注射器从进样口注入 20 μ l 浓度为 1×10^{-4} g/mL 的萘/甲醇溶液，记录色谱图，设定峰宽 5，斜率 70，重分析谱图，计算当前条件下主色谱峰的峰面积。连续进样 6-7 次，计算连续 6 次进样下的定性重复性和定量重复性。

RSD 计算：

$$RSD_6 = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^6 (x_i - \bar{x})^2}{6-1}} \times \frac{1}{\bar{x}} \times 100\%$$

$RSD_{6_{Rt}}$ ——定性重复性相对标准偏差

RSD_{6_A} ——定量重复性相对标准偏差

x_i ——第 i 次测量的保留时间或峰面积的值

\bar{x} ——6 次测量的保留时间或峰面积值的算术平均值

i ——测量序号



注意：

上述认证方式既用于等度系统，也可适用于二元高压梯度洗脱系统。对于二元高压梯度洗脱系统，亦采用甲醇作为流动相，单独使用 A 泵或 A 相输出，流量为 1.000mL/min，其他泵或其他相设定为 0。

梯度系统附加测试项目：

1. 二元高压梯度系统测试

测试必备的条件：

输液单元：高压恒流泵 A，高压恒流泵 B，

高压梯度混合器，一只，

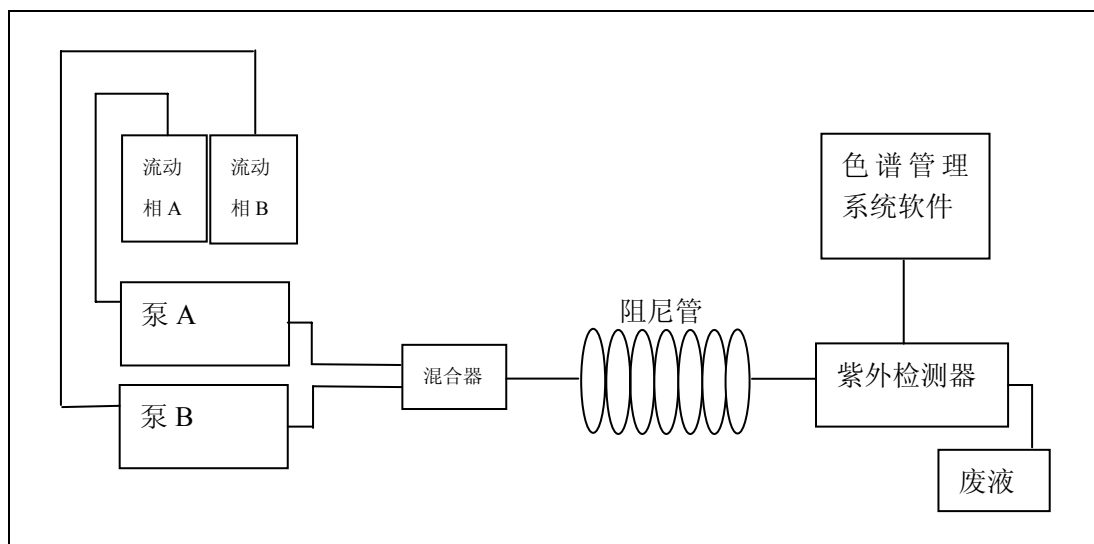
紫外检测器，一台，

阻尼管，一根，1/16"OD，0.004"ID，1m，黑色 PEEK 管，两端带有手紧接头，

流动相：A 泵：纯水；B 泵：0.1%丙酮的水溶液，

检定要求：梯度误差 $\leq 2\%$

系统连接方式：



色谱管理系统软件中的参数设定：

二元高压梯度系统：

初始流量：

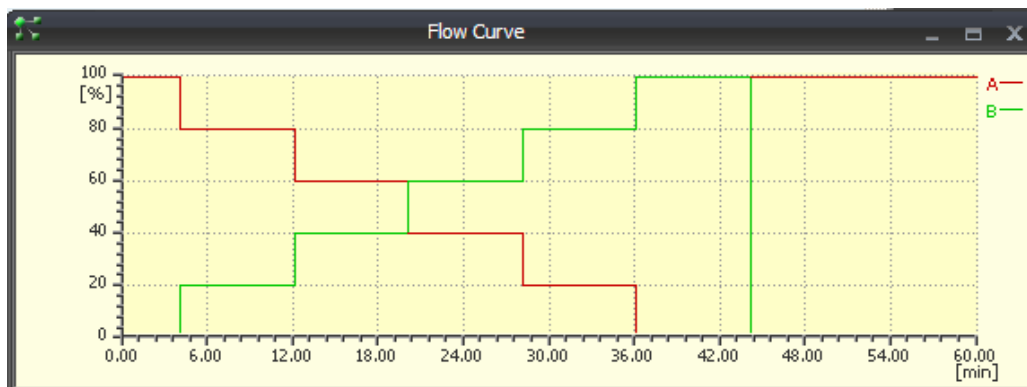
初始流量大小：1.000mL/min，初始比例：A：B=100：0

检测波长：254nm，响应时间 1s；

时间程序：

时间 (min)	A%	B%	流 量 (mL/min)
0.000	100	0	1.000
4.000	100	0	1.000
4.001	80	20	1.000
12.000	80	20	1.000
12.001	60	40	1.000
20.000	60	40	1.000
20.001	40	60	1.000
28.000	40	60	1.000
28.001	20	80	1.000
36.000	20	80	1.000
36.001	0	100	1.000
44.000	0	100	1.000
44.001	100	0	1.000

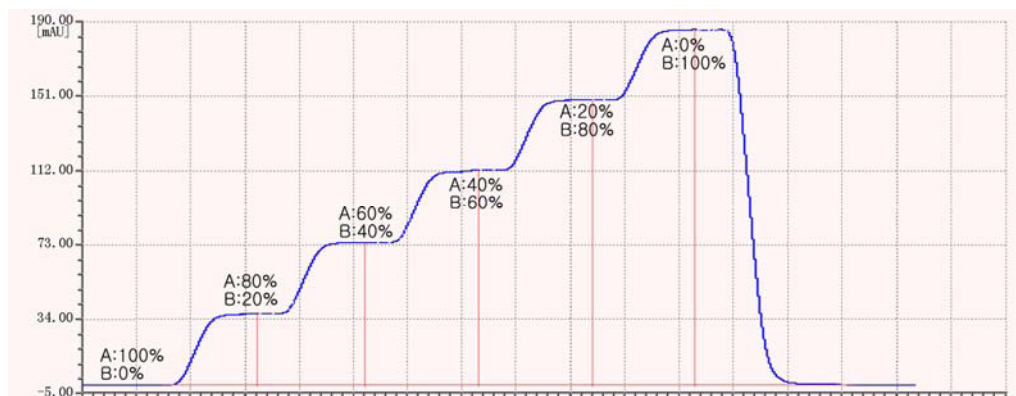
流量曲线：



等待系统稳定，基线平直之后，可开始采集数据。

采集时间：60min。

梯度曲线:



序号	保留时间(分钟)	峰高(微伏)	半峰宽(秒)
1	11.3247	3733	36.38
2	19.6497	7483	36.49
3	27.9346	11319	39.17
4	35.9263	14937	36.64
5	43.7781	18623	33.53

梯度误差:

$$G_{ci} = (\overline{Li} - \overline{Lm}) / \overline{Lm} \times 100\%$$

G_{ci} ——第 i 段梯度误差 (%)，

\overline{Li} ——第 i 段吸光度的平均值

\overline{Lm} ——各段吸光度平均值的平均值



梯度误差的测试检定采用纯水和纯水溶液作为流动相，由于水的粘度和表面张力比较大，溶解到水中的空气比较难以消除，系统的稳定需要一定的时间，因此，梯度系统的测试需要在系统压力稳定下方可进行。

系统性能测试结果数据比较:

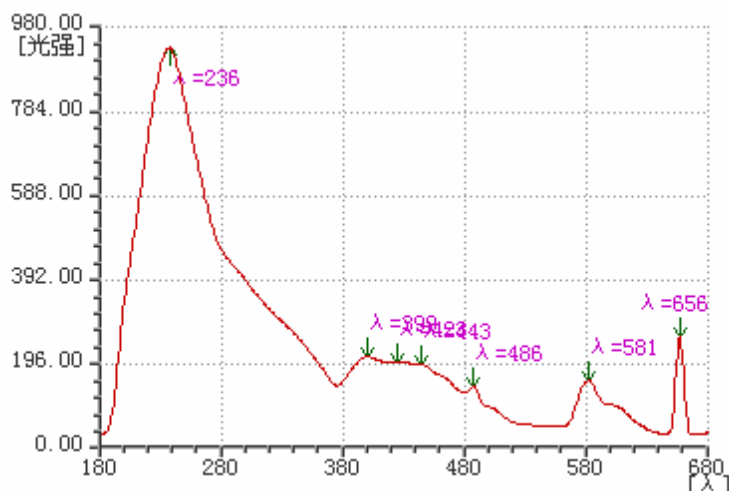
1. 基线噪音: 同等测试条件下, 噪音越小越好。
2. 基线漂移: 同等测试条件下, 漂移越小越好。
3. 最小检测浓度: 同等测试条件下, 浓度越小越好。
4. 定性重复性误差: 同等测试条件下, 误差越小越好。
5. 定量重复性误差: 同等测试条件下, 误差越小越好。

*参考测试项目

单元测试:

1. 紫外检测器波长准确性和波长重复性测试:

仪器加电后的首次开氙灯，系统会执行一次电路系统和光路系统的自检过程，大概持续4min左右。自检若顺利通过，仪器自动退回到上次关闭仪器前设置的波长的初始界面。打开LC100UV紫外检测器，等待氙灯稳定后，启动LC100WS色谱管理系统，选择【操作】选项中的【光谱扫描】，启动光谱扫描，得到如下谱图：



要求光谱峰在 $486\pm 1\text{nm}$ 和 $656\pm 1\text{nm}$ 纳米处有特征峰出现。

该操作连续测定3次，以 $486\text{nm}\pm 1\text{nm}$ 和 $656\text{nm}\pm 1\text{nm}$ 为标准判断3次波长重复性。

以重复性一致为佳。

*备注：LC-100采用数字通讯技术，可以简单地采用此测试方法。如果其他仪器无此功能，请按照国家质监局JJG-705-2002检定规程中手工测试方法步骤测试。

2 输液单元流量精度测试

2.1 检定参数:

参量:

设定流量:	1.000 mL/min;
测量次数:	3次;
流动相收集时间:	5min;

检定项目:

	流量设定值误差 S_S
	流量稳定性误差 S_R

2.2 检定过程:

1. 将输液单元的流动相输出口用防尘帽拧上。打开放空阀，手动排除泵腔、管路内部的气泡。四元低压梯度输液单元排除气泡的操作相对复杂一点，详情请参见《LC100 输液单元使用说明书》有关章节。
2. 卸下输出口上的防尘帽，将阻尼管连接到输液单元流动相输出口，而无需连接 HPLC 色谱柱
3. 使用蒸馏水作为输液单元的流动相。



如果没有可供使用的合乎规格的阻尼管，亦可使用 HPLC 色谱柱，但条件有所变化。

- ◆ 手动排除泵腔管路中的气泡后，将色谱柱的输入端连接到输液单元的流动相输出口。色谱柱的输出端连接一根短的 PEEK 管。
- ◆ 使用甲醇作为输液单元的流动相。

待仪器稳定 20min 左右后，在输液单元用阻尼管输出流动相的位置，用事先已干燥至恒重并已称重的容量瓶收集约 5min 时间内流出的所有流动相，同时用秒表计时。收集好规定时间流出的流动相，置于分析天平上，称出该段时间内流出的所有流动相的总质量，根据当时温度的密度，换算到流动相的体积，根据以下公式，可以求出流量设定值误差 S_S 和流量稳定性误差 S_R 。

流量设定值误差 S_S 计算公式:

$$S_S = (\overline{F_m} - F_s) / F_s \times 100\%$$

流量稳定性误差 S_R 计算公式:

$$S_R = (F_{\max} - F_{\min}) / \overline{F_m} \times 100\%$$

式中:

$$F_m \text{ —— } F_m = \frac{W_2 - W_1}{\rho_i \cdot t}, \text{ 实际测量值, mL/min;}$$

W_2 —— 容量瓶和流动相的质量之和, g;

W_1 —— 容量瓶的质量, g;

t ——收集流动相的时间, min;

\overline{F}_m ——同一组测量值的算术平均值, mL/min;

F_s ——流量设定值, mL/min;

F_{\max} ——同一组测量值中, 流量最大的值, mL/min;

F_{\min} ——同一组测量值中, 流量最小的值, mL/min;



检定之前请检查管路有无泄漏, 在一定时间之内, 压力是否稳定。

LC100 每套仪器在出厂之前已经做过严密的部件认证, 新装仪器时, 可跳过此过程。

输液单元流量精度的检定, 可以在整套系统中进行测试, 亦可单独完成测试。