

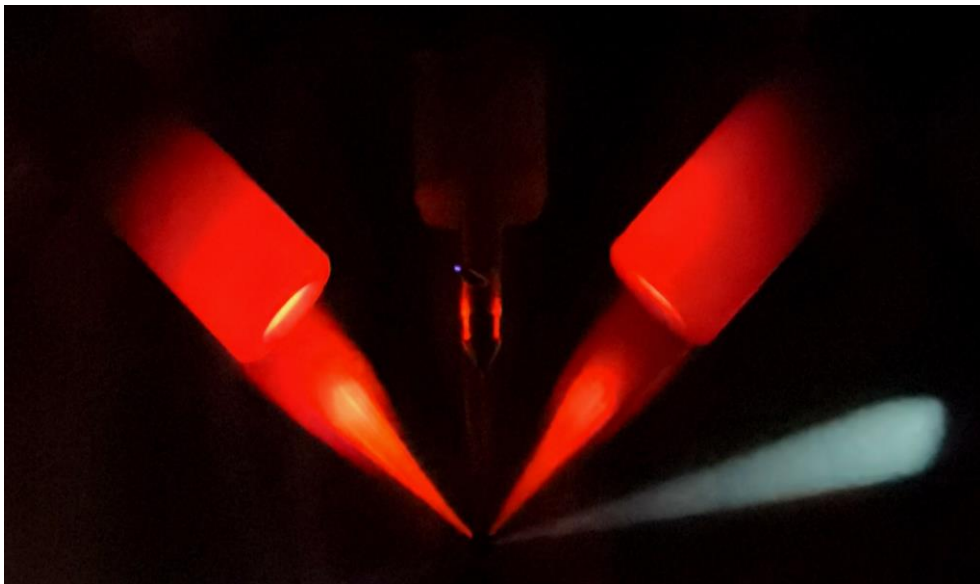


# 如何排查与解决残留和污染问题

李立军 SCIEX中国首席应用专家

逻辑分析，先查再解决，分为几种类型。

- 1, 残留和污染定义。
- 2, 残留还是污染? 判断来源类型, 原因排查流程。
- 3, 残留和污染实例。
- 4, 如何解决残留和污染并预防。



# 什么是残留和污染

## 这里讨论的是LC-MS/MS可以检测到的

- 残留，是指曾经分析过高浓度样品后，在空白样品中仍然有分析物色谱峰信号出现，如果直接进低浓度样品时浓度偏高，残留一般会逐渐降低，原因可能是：
  - (1) 在自动进样器中，各部位均可能残留，如LOOP环未在流路中，没有洗针，或吸附严重，未洗干净；
  - (2) 在色谱柱及管路中未完全洗脱。
- 污染，是指在整个实验各环节中任何来源的因素，能干扰检测的现象，造成结果不准（假阳性等错误）或本底噪声提高，任何形式的残留都可以视为污染，但污染更广泛，更随机和来源不明。
- 污染可分为如下分为几种类型：
  - (1) 样品本身被分析物污染，含有不明浓度的分析物；
  - (2) 分析仪器及实验材料被分析物污染，例如质谱离子源，LC流动相，反应气等；
  - (3) 未知化合物污染，这些污染物可能导致LC-MS/MS结果误判，假阳性等。

# 判断是样品还是系统残留

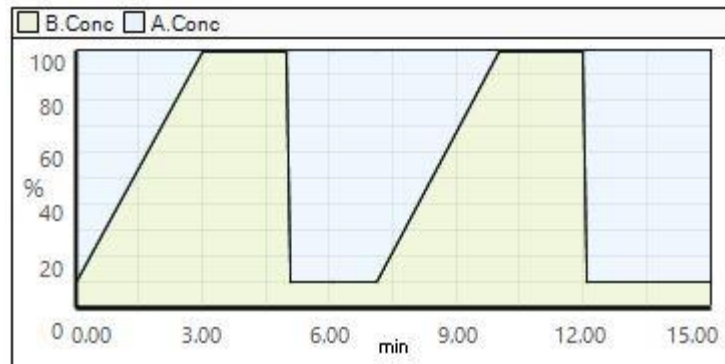
这里采用的排查均是比较容易实现的，一般操作者就可以判断，不需要维修工程师帮助，例如拆卸自动进样器，改变流路等，首先逻辑分析，找出具体原因

- 记住，不要怕麻烦，所有实验开始时都应该首先进空白，如果开始的基质空白没有分析物的峰，则不需要再进溶剂空白等，如果基质空白有峰，这时再进一针溶剂空白，如果无峰，很显然，问题出在前面，可能是基质也可能是样品制备过程中，那么对实验前处理中使用的容器，移液器，溶剂试剂耗材等仔细排查，甚至有可能是操作人员带来。
- 若看到溶剂空白也有残留峰，可以进样1ul空气，空气无峰，则溶剂也被污染了，更换不同品牌批次排查，若进样空气针中有分析物峰，则残留与样品无关，需要排查LC仪器管路，进样针及针座，色谱柱等。
- 如果进过浓样品后，进空白溶液出峰，但重复进样信号逐渐下降，则残留在系统中；如果不下降，则需要更换新的空白再次进样，若新空白下降，则说明原来的空白已经被污染，那么针的可能性最大，因为未洗净带入空白小瓶中，所以空白需要多准备几瓶；若新换的空白也不下降，则可能样品已经被整体污染。
- 如果同时检测多种化合物，若残留，则大部分都会有信号，如果仅有一两个化合物有峰，则是样品污染，除非这一两个化合物与其他化合物性质差异比较大，容易粘连。混合物中某一种化合物有，其他无，排除进样器。

# 判断是自动进样器还是色谱柱残留

## 前面已经排除了样品本身问题

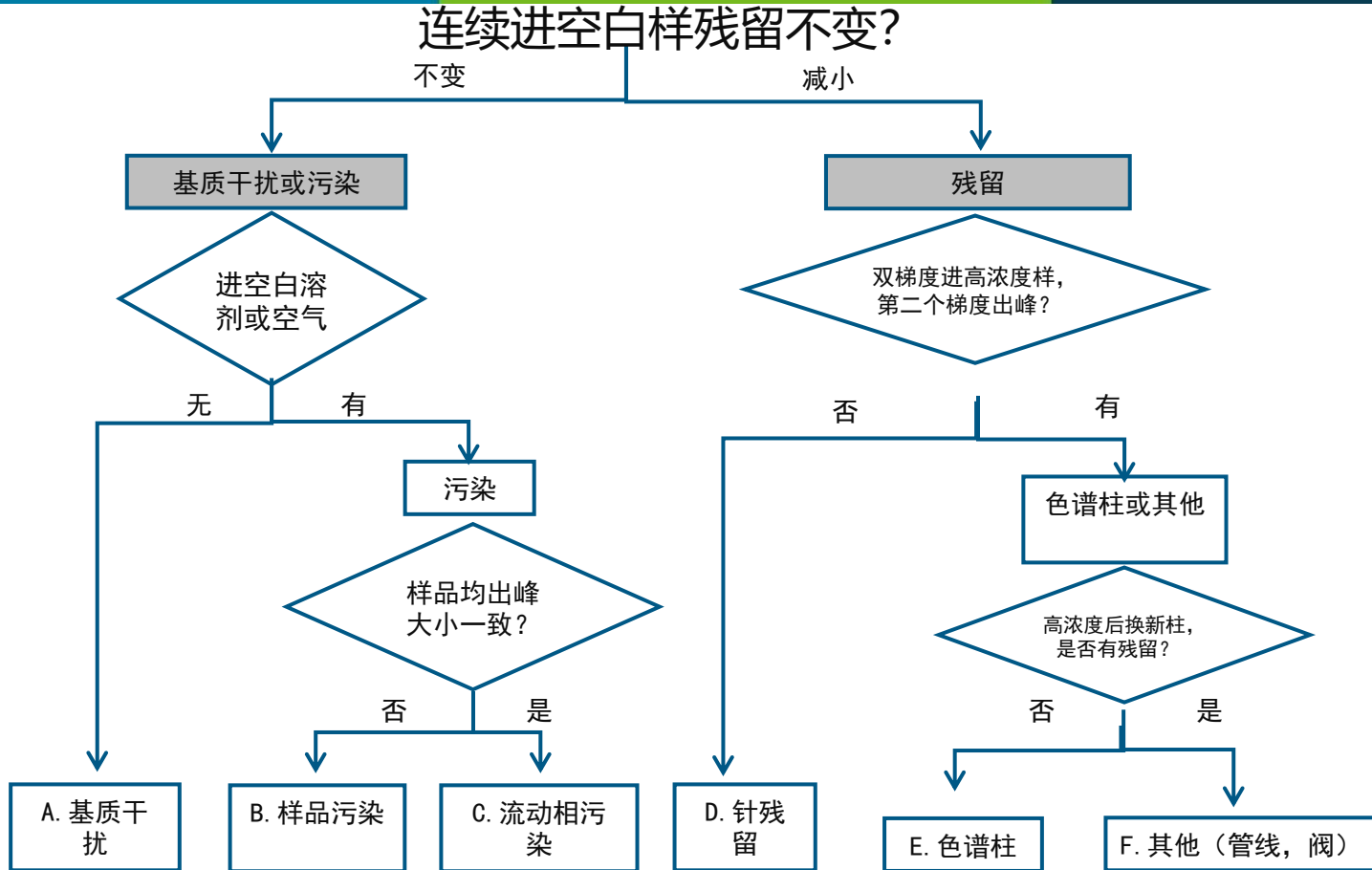
- 保留时间是否稳定？如稳定，通常是自动进样器残留，如果来回飘，或隔几针才出一次峰，则问题出在色谱柱及管路中，还可能是样品小瓶。
- 是否色谱柱呢？拆掉色谱柱，换上两通，FIA进样，此时等度洗脱，时间很短，方便，如果两通无峰，就与自动进样器无关，如果两通照常出峰，则与自动进样器有关。
- 还可以将LC梯度改为相对高比例有机相的等度，如果出峰，则也是自动进样器问题，注意再进一针低浓度的标准品，确定保留时间一致。
- 如果是柱子引起残留，可以运行一个双梯度，如果是色谱柱前端或预柱引起的，则会出现两个峰，而自动进样器不会。
- 有条件的话，改用手动进样，观察是否仍有残留，如果仍然有，则样品看来比较粘。



## 出峰还是基线噪音越来越高？

- 对于MICRO或NANO系统，许多正常的HPLC察觉不到的微小死体积，均可能影响很大。
- 新的小瓶，空白溶剂需要多准备几瓶，防止针外壁带入到空白小瓶中，同样一瓶，第一次进样没有，进过样品后出现，那么几乎可以断定是针带来的残留。
- 另外，进过标品后，空白样品出峰信号更强，则绝对是样品污染。
- 如果两对MRM，仅一对出峰，或两对MRM比率不符，则是其他化合物污染干扰。
- 洗针液是否被污染，可以取出一点到进样瓶中进样看，一试便知。
- 而对于质谱仪的组件，如离子源喷雾针，腔体等，只能使基线变高，不应该出峰的。
- 基线高-可能与整个体系相关，需要花大力气。





# 残留问题的解决的实例1

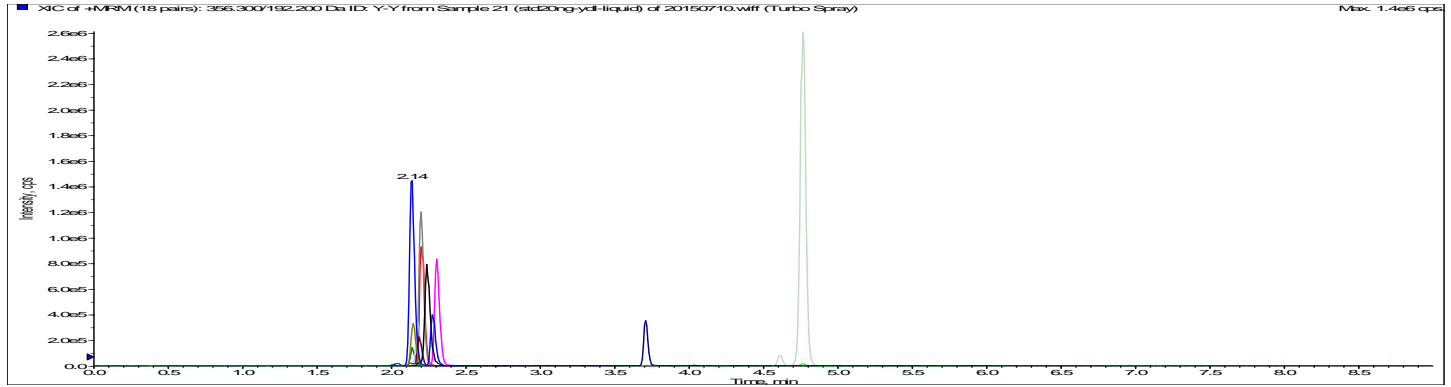
## 残留还是污染？

- 某客户新购的QTRAP5500，配30A。
- 同时测定中药内多种成分，客户反映残留严重，无法进行实验。
- 期间按照安装工程师的建议，换过新的流动相，新的色谱柱，都不管用。
- LC公司的工程师清洗过自动进样器针座，甚至更换过客户实验室的另一台LC，结果依旧。
- 客户强烈要求退换质谱仪。
- 经过与客户沟通，最终客户答应我们最后一次查找原因。
- 从北京带着流动相，甲酸，色谱柱，为防万一，就近从其他客户处借来一台100XL色谱仪。

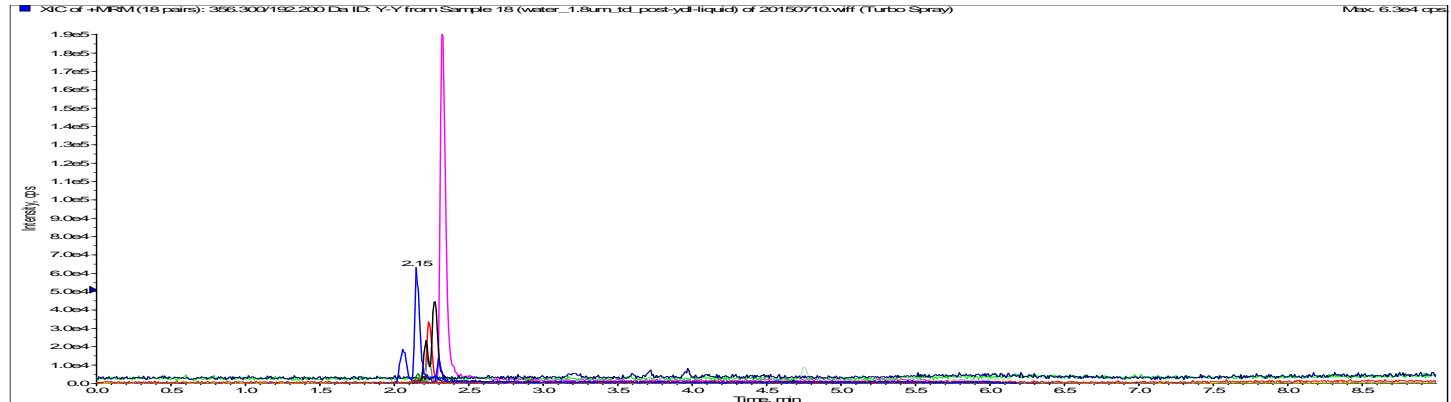


# 残留问题的解决的实例1

混和标准品溶液  
20ng/ml STD

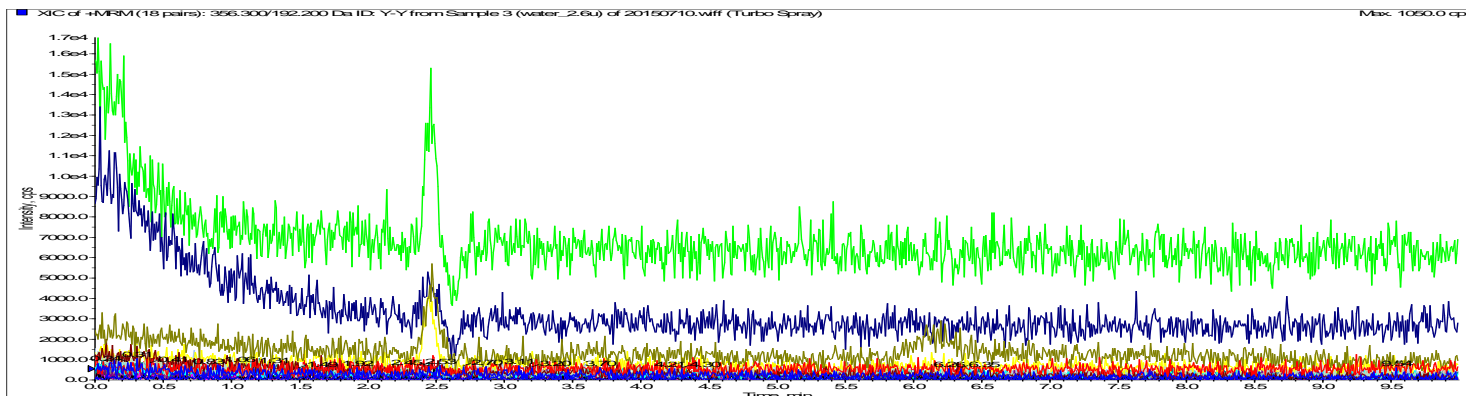


客户的空白水

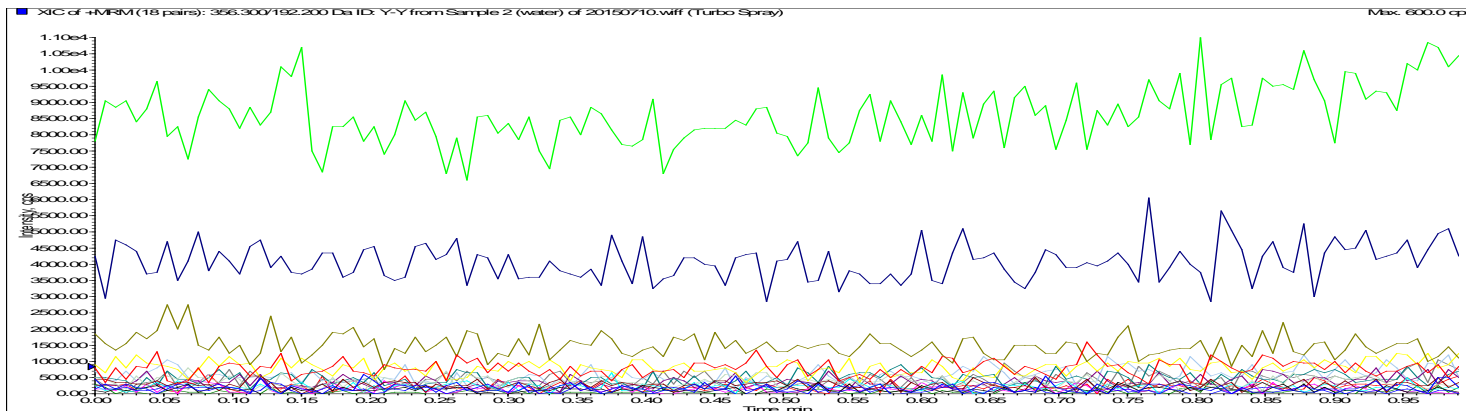


# 残留问题的解决的实例1

首先改为等  
度洗脱，客  
户的空白水

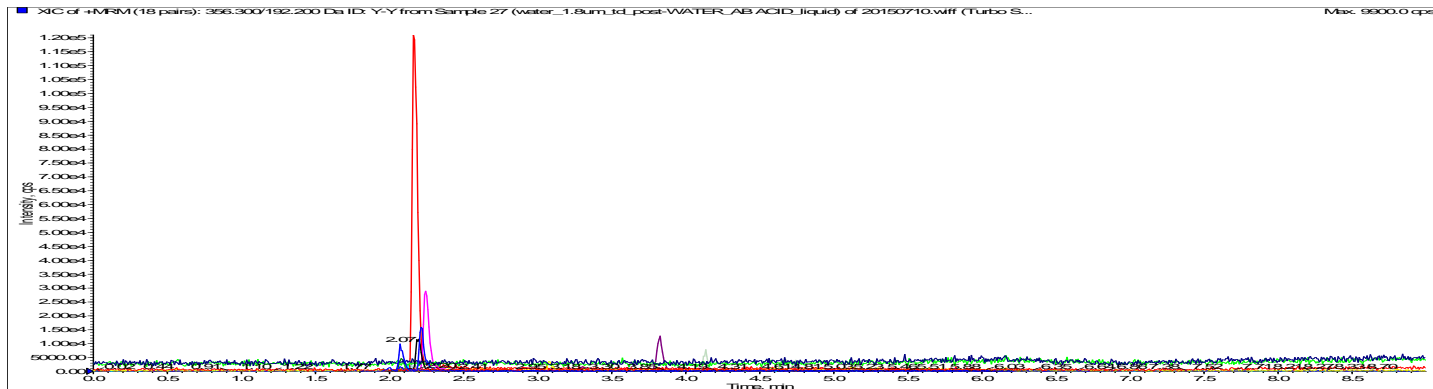


其次换下  
色谱柱，  
换上两通

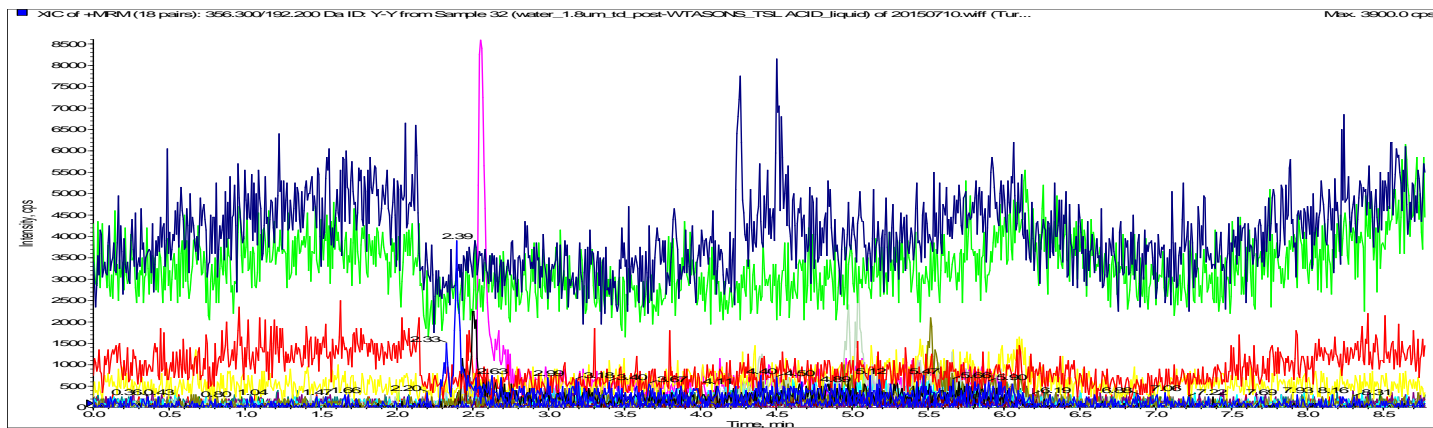


# 残留问题的解决的实例1

客户的水相，加入从SCIEX带去的甲酸

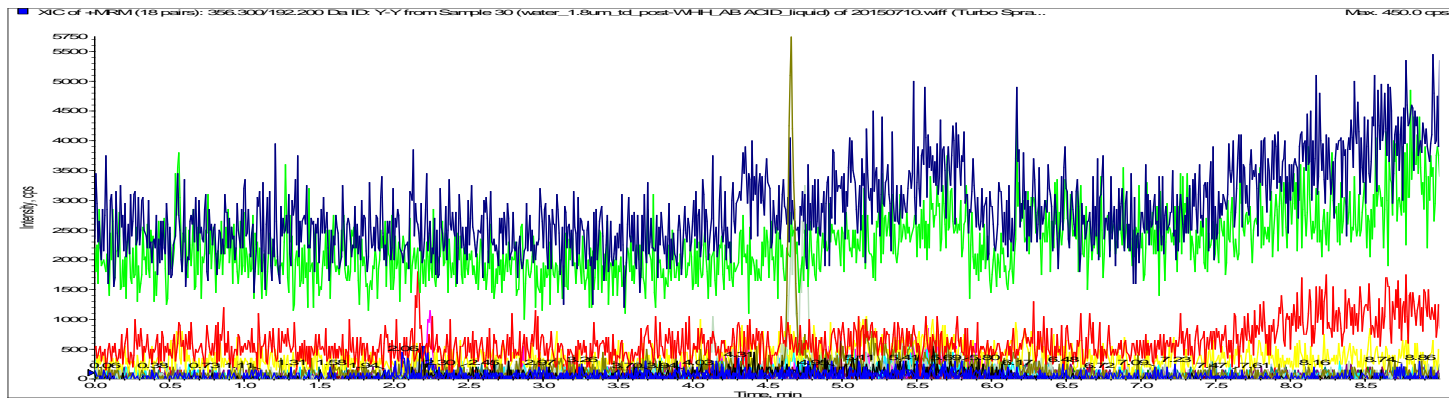


流动相换为市售纯净水1，添加客户的酸

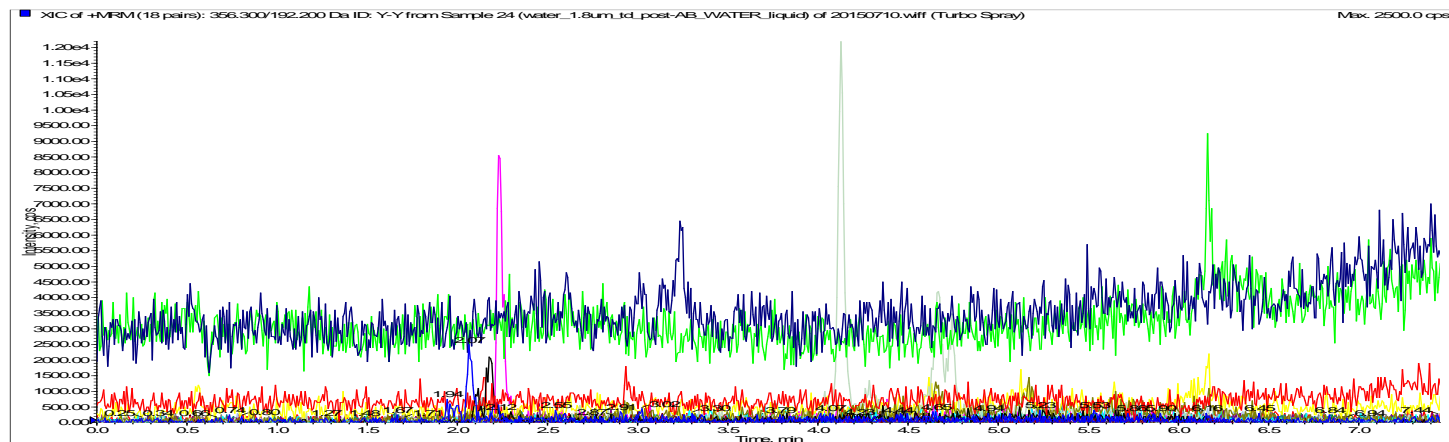


# 残留问题的解决的实例1

流动相换为市售纯净水2，  
添加SCIEX的酸

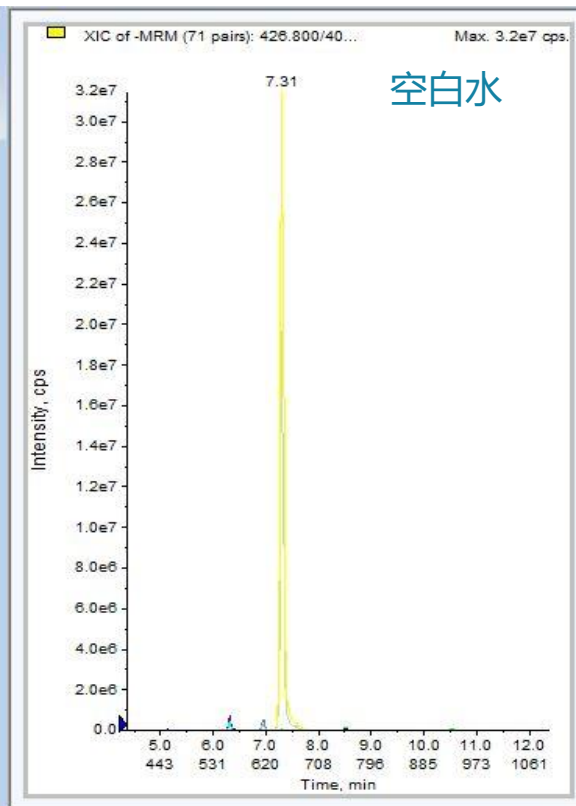
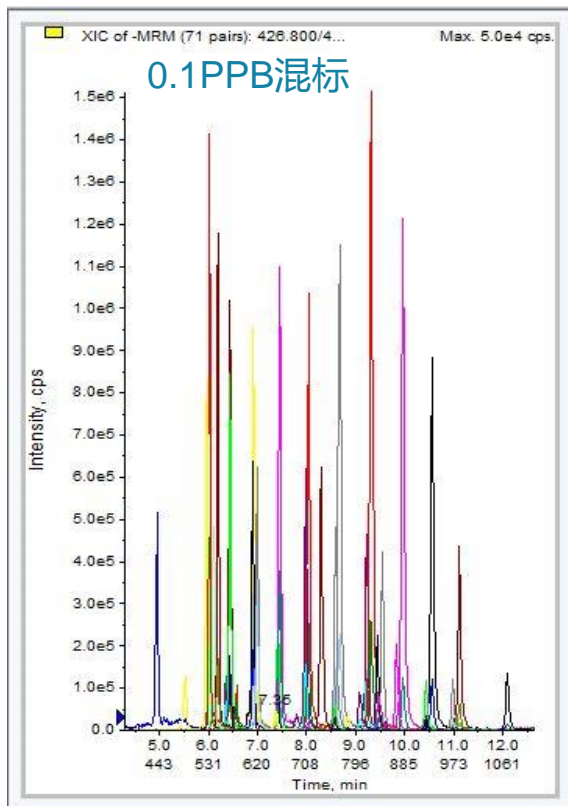


更换客户的水相后，客户的  
色谱柱



# 残留问题的解决的实例2

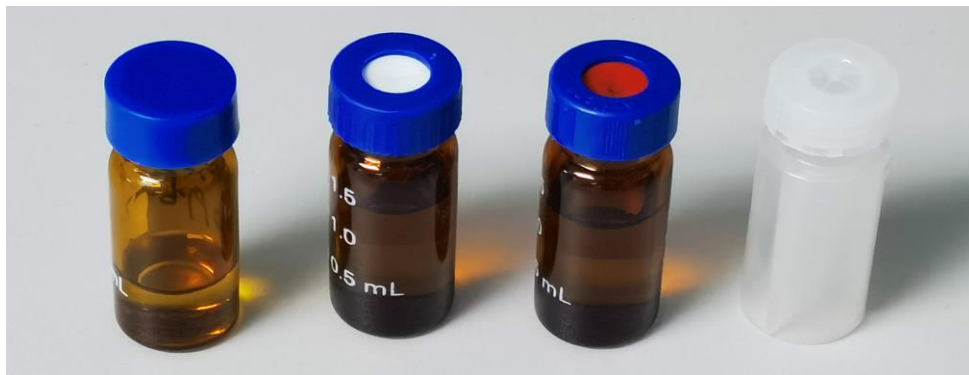
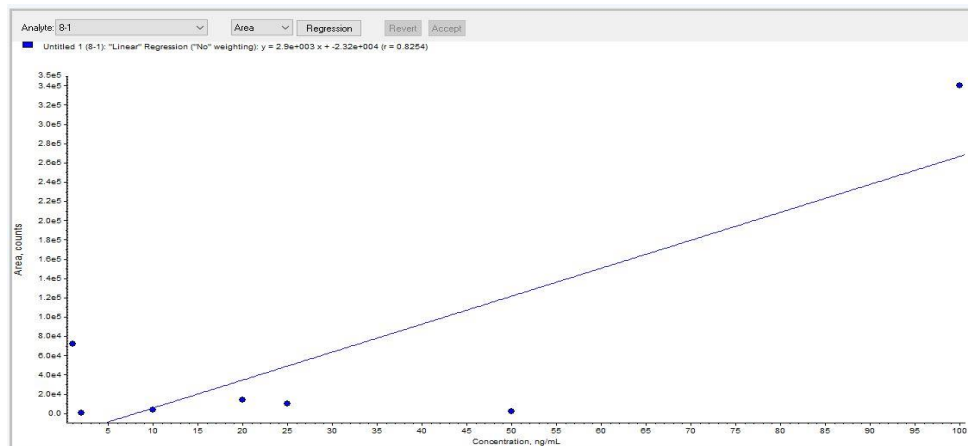
## 残留还是污染？ 配样的玻璃溶剂瓶盖很关键



# 残留问题的解决的实例3

## 进样小瓶污染造成标曲不成线性

- 标曲不直，因素很多，其中之一就是污染。
- 早期，进样小瓶重复使用，LC-UV看不到残留，似乎标曲也没问题，进样小瓶用水冲洗，洗液泡，烤箱烘干等。
- 但实际上没用，因为浓度差很多，LC-MS/MS灵敏度高了两个数量级 LC-MS /MS很明显，曲线就是乱的，更换全新的小瓶后正常。



# 残留问题的解决的实例4

## 样品过滤膜问题，所有样品均出峰

- 某客户，来北京实验室用高精度质谱做未知物筛查，首批样品均有同样的一组奇怪的峰，包括空白，无法解释。滤膜，所有样品均带来峰。
- 看到样品已经比较干净，建议离心后直接进样看看，发现这组峰不见了，原来问题出在过滤膜上，本来是净化样品的，结果反而带来污染。

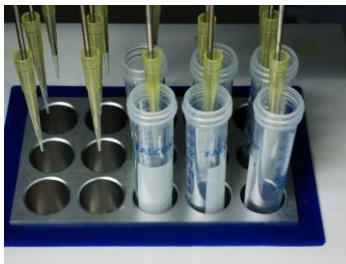




# 造成残留及污染的一些实例

## 永远有你不知道、没注意的地方会引入污染

- 手套沾过样品，换流动相捏住管下部，浸泡在溶剂中。
- 配缓冲液，称量 $\text{NH}_4\text{AC}$ ，药勺挖过样品。
- 关了冷阱，夏天发霉，类似汽车空调，空压机出来的都是臭气。
- 捡漏引起的污染，顺着缝隙，肥皂泡进入管路，表面活性剂等。
- 摇床震荡样品不盖盖飞溅，氮吹时气流过大等。





## 残留不应影响方法的准确度和精密度，国际上有通用标准，不超过LLOQ的20%

- 自动进样器针管-加大混合洗针液量，清洗次数和时间，强洗针液甲醇，乙腈，异丙醇，丙酮等混合。
- 洗针液污染-对于抓瓶式进样器，要有多个洗针瓶。
- 自动进样器针座-拆下清洗。
- 管路污染-用不同溶剂彻底清洗，必要时更换。
- 实在不行，换一台其他型号的LC。
- 柱温升高会降低流动相的粘度，增加分析物的溶解度。因此，较高温度可减少与色谱柱上的污染。
- 化合物粘度大，很难洗净-在两针样品中间插入大进样量溶剂。

**残留不可能绝对避免，很多时候不可能完全消除残留，所以需要通过合理的安排样品顺序**

- 样品避免第一针进样，特别是含复杂基质的，尤其是高浓度样品，包括基质空白，建议的进样顺序是：
- 第一针，与流动相起始相同比例溶剂，第二针，基质空白，不应出峰，且基线正常。
- 然后，标准曲线—先稀后浓。
- 再次进与流动相起始相同比例溶剂，观察是否有残留，可以多准备几个小瓶进样。
- 最后实际样品—如果某一针出现超高信号，检查它的下一针，必要时重复进样。

## 残留及污染，有时二者兼而有之

- 更换清洗溶剂后，自动进样器必须经过足够时间的Purge。
- 对某些分析物有干扰，对其他的没有影响，所以之前的项目没问题，不代表新的项目没问题，都必须先空白验证。
- LC梯度一定要高比例有机相冲洗，95-100%，不能偷懒。
- 比较粘的样品，找到合适的洗脱液。
- 对LC-MS/MS，建议项目单独色谱柱，不能混用纯LC的，还要至少准备同型号规格的两根以上。
- 实验材料不论是否重复使用还是一次性的，均应先做测试，遇到质量不合格的产品，溶出太多的不知道。
- 定时更换流动相尤其是水相，还要脱气。
- 对重要的实验，溶剂、耗材等不能吝啬，建议全部使用新开封的，不要重复使用进样小瓶及盖。
- 溶剂瓶上的气体隔离装置-选配。

### 流动相安全过滤器和瓶盖

- **增进健康和员工安全**  
将溶剂及其挥发气体禁锢于容器内
- **保护 HPLC/UHPLC 结果**  
去除灰尘及其他空气污染物对实验结果的影响
- **增强质量和安全审计的信心**  
不再使用铝箔和封口膜来盖住溶剂瓶



SecurityCAP 流动相安全过滤器具有集成式单向阀和滤膜，可捕获灰尘、微粒和其他空气污染物。这有助于防止不必要的物质进入溶剂容器，它们可能导致不重现的 HPLC/UHPLC 结果、溶剂污染、细菌生长和鬼峰，所有这些都对色谱和 HPLC/UHPLC 系统造成不利影响。

## 污染也可分为出峰和单纯基线升高

**环境污染：**整个仪器所在室内出现浓度过高的样品或纯品固体粉末，预处理室内样品要严格避免污染，高浓度标准品盖子未盖好，溶液有挥发和滴洒，固体粉末也有可能挥发。此外环境污染还可能导致比如移液枪、枪头、管子等的污染。氮气发生器进气口没有新鲜空气，气源引入噪音。

**流动相污染：**前面所述各环节均可造成，配制流动相和处理高浓度样品在同一地方。

**色谱柱污染：**进超高浓度的样品，各个项目乱用，还没有使用记录。

**样品变质，降解等**对其他同时检测的物质造成污染。

**样品瓶污染-**未采用一次性小瓶包括密封垫或内衬管。

**前处理过程污染：**各种材料，仪器，容器，试剂等。



# 污染造成基线噪音高的原因和解决方案

## 如果以前做的基线低的物质基线突然高了或者基线整体提高：冲，洗，烤，换，改

流动相污染：水相长期不更换容易生霉，最容易使基线提高，换新水仍不行则可维护纯水机再测或瓶装水试试；也可将水相和有机相互换。

需要现用现配，现场开封，建议甲醇、乙腈试剂现用现开，开过的（特别是放在预处理室的）不要再使用。甲酸和醋酸铵等添加试剂也要注意。

流动相瓶子污染：多次洗，不行就换新的。

质谱仪器脏了，需要擦锥孔和清洗离子源，还可以设700度以上高温，不要忘了GAS2，烘烤几个小时。

液相管路系统：换上干净的流动相一直冲洗仪器，反复进针空白溶剂，可以使仪器噪音降低明显。

不同品牌氮气发生器的原理不同，尝试比较，增加过滤器，某些实验用液氮代替发生器。

对于某些无法完全排除的溶剂污染，可以采用在LC管路内安装TRAP柱，如全氟化合物壬基酚等，或更换LC管路。

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅 <https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。

本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2022 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-11-14838-ZH-A



[Lijun.li@sciex.com](mailto:Lijun.li@sciex.com)

