

Alliance HPLC实验的一般流程

- HPLC系统的启动(顺序很重要)
 - 打开计算机,待Windows完成自检后,打开2695电源和检测器,待设备通过自检后,启动色谱管理软件(例如: Empower3)
- 准备流动相
 - 过滤,脱气
- 色谱泵排气
 - 用新配制的流动相灌注泵
- 用准备好的流动相平衡色谱柱及色谱系统
 - 可在2695的控制面板上设定流速参数
 - 系统大约需平衡0.5--1小时方能稳定工作
- 准备样品
 - 用流动相溶样或重组样品,过滤
 - 制备空白样品
- 编辑仪器方法,开始实验

概览

- Alliance 系统简介
 - 溶剂管理系统
 - 样品管理系统
- Alliance 系统操作
 - 一般流程
 - 准备流动相
 - 面板操作(prime seal wash; prime needle wash; dry prime; wet prime; purge injector)
 - 平衡
 - 使用溶剂管理系统注意事项
 - 使用样品管理系统注意事项
 - 检测器操作和注意事项(2489; 2998; 2414; 2475; 2424)

准备流动相

- 液相色谱仪器对流动相的要求
 - 与检测器匹配
 - 脱气,过滤除去微粒
 - 避免用含卤素离子的缓冲盐(不锈钢系统)
 - 防止细菌的生长
- 色谱柱对流动相的要求
 - 纯度的要求
 - 超纯水,或用KMnO₄处理过的双蒸水
 - 有机溶剂:色谱纯,并与填料相匹配
 - 缓冲液的pH值,在填料的允许范围(一般在pH2-8)内
 - 缓冲液(盐)的浓度不要太高(≤100mM)
 - 流动相对样品的溶解度
 - 调整有机溶剂和水的比例
 - 最好用流动相溶样

流动相的脱气

- 流动相脱气的目的
 - 使色谱泵的输液准确
 - 输液量均匀准确,并且脉动减小
 - 保留时间及色谱峰面积的重现性提高
 - 提高检测的性能
 - 防止气泡引起的尖峰
 - 基线稳定,信噪比增加
 - 溶剂的紫外吸收本底降低
 - 保护色谱柱
 - 减少死体积
 - 防止填料的氧化

流动相脱气的方法

- 加热
 - 简单，如同抽真空一起使用，其效果很好。但容易造成流动相组成的变化
- 抽真空
 - 同上，一般在溶剂抽滤的同时，也有脱气的效果
- 超声波振荡
 - 简单，但效果不够理想；超声时间不要太长(1分钟左右即可)
- 通惰性气体（一般用氦气）
 - 可保持在线连续脱气，多用于低压梯度
- 真空在线脱气机（in-line degasser）
 - 可保持连续脱气，是2695首选的脱气方法

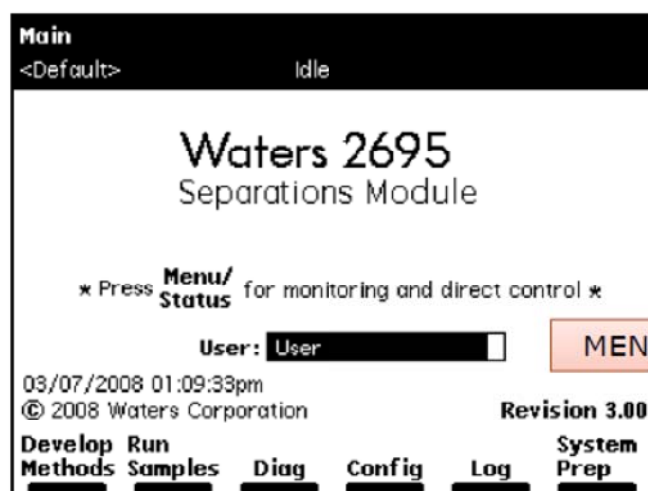
流动相的保存

- 有机溶剂流动相
 - 室温下密封，避光保存
- 缓冲盐流动相
 - 当日现配现用
 - 低温下密封保存,一般不超过3天
 - 防止微生物生长
- 有机溶剂与水（缓冲盐）混配的流动相
 - 低温密封保存
 - 防止有机相的挥发
- 选用适宜的容器
 - 不要使用塑料瓶

概览

- Alliance 系统简介
 - 溶剂管理系统
 - 样品管理系统
- Alliance 系统操作
 - 一般流程
 - 准备流动相
 - 面板操作(prime seal wash; prime needle wash; dry prime; wet prime; purge injector)
 - 平衡
 - 使用溶剂管理系统注意事项
 - 使用样品管理系统注意事项
 - 检测器操作和注意事项(2489; 2998; 2414; 2475; 2424)

2695的开机画面-Main



MENU / STATUS

2695的开机操作

- 从主菜单(main menu), 可以选择下述操作指令:
 - Choose a user (necessary for locked methods)
 - Develop methods
 - Run Samples
 - Go to Diagnostics
 - Configure the instrument
 - Views the Error Log

Diagnostics

Diagnostics

AL BAPTISTE

Idle

Serial Number: 1111111111

Transducers

System: 1150 psi
Primary: 1149 psi
Sample: 1114 psi

Lifetime Counters:

Eluent delivered = 17.4 L
Injection count = 451

点击 "Prime SealWsh"

Prime SealWsh

Comp Check

Prime NdlWsh

Adjust Seals

Service Utilities

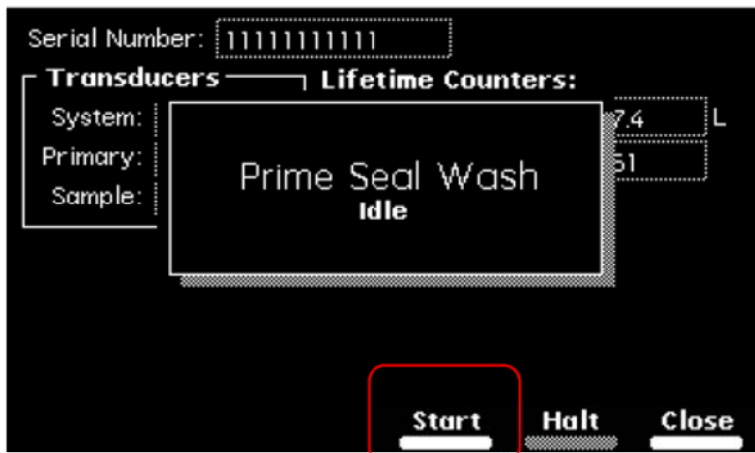
Other Tests

Prime Seal wash

Diagnostics

AL BAPTISTE

Idle



点击 “ Start ”

Prime Seal wash

■ 密封垫清洗剂

- 起润滑柱塞杆作用，并冲洗掉由柱塞腔高压侧带过来的流动相或缓冲盐沉淀
- 这一循环清洗步骤将延长密封垫的寿命
- 对于反相HPLC 应用来说，采用水作为密封垫清洗液，加入一定量的有机溶剂以抑制细菌生长。例如，用 80:20 水:甲醇 或 80:20 水:乙腈, 取决于应用
- 将密封垫清洗溶液瓶放在可见的位置，需要时可随时补充清洗液

Prime Seal wash

■ 灌注柱塞杆密封垫清洗泵

- 将注射器接头 (Startup Kit) 固定在注射器 (Startup Kit) 上
- 摘下密封垫清洗管路入口处的过滤头
- 注射器吸满清洗液，然后将其插入密封垫清洗管路的入口
- 按 Start 键，启动密封垫清洗程序，推注射器杆将清洗液注入系统
- 当清洗液从密封垫清洗管路的出口流出时，按 Halt 键
- 重新插上入口管路的过滤头，将其放入密封垫清洗液中
- 按 Close 键 返回到 Diagnostics 屏幕

Diagnostics

Diagnostics

AL BAPTISTE

Idle

Serial Number: 1111111111

Transducers

System: 1150 psi
Primary: 1149 psi
Sample: 1114 psi

Lifetime Counters:

Eluent delivered = 17.4 L
Injection count = 451

点击 "Prime NdWsh"

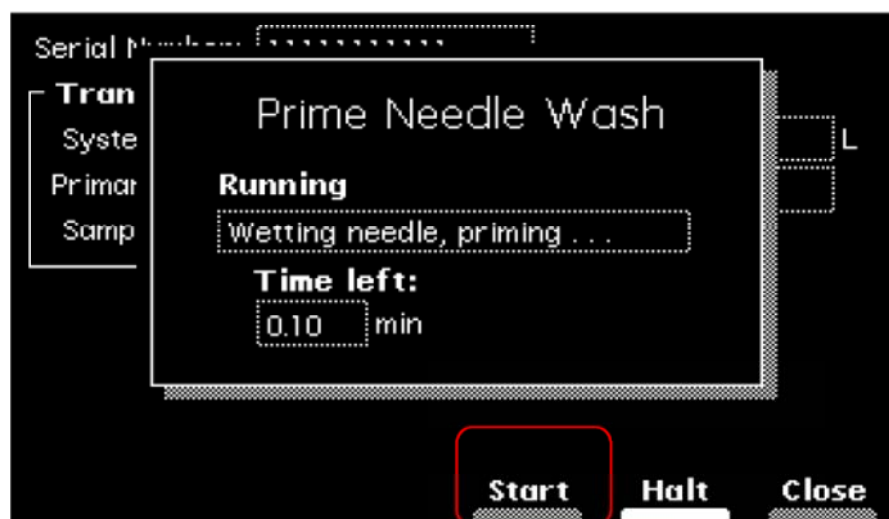
Prime SealWsh Comp Check **Prime NdWsh** Adjust Seals Service Utilities Other Tests

Prime NdlWsh

Diagnostics

AL BAPTISTE

Idle



点击Start开始prime洗针液

Prime NdlWsh

- 洗针泵将进样针放在样品管理系统的清洗位置，防止带出样品。洗针可除去进样针上沾污的缓冲盐流动相和样品，从而延长进样器密封垫的寿命。一些推荐使用的洗针溶剂开列如下。高浓度的样品可能需要另外的针洗剂，将洗针溶液瓶放在可见的位置，需要时可随时补充清洗液。

色谱条件	洗针液
水溶性缓冲盐, 反相	90:10水:甲醇
非水反相	100% 甲醇
正相	流动相

- 灌注洗针泵，按 Start 键。启动 30秒洗针程序。若30秒内没有溶液从废液管中流出，再按 Start 键。

2695的状态画面- Status

📌 Status (1)

<Default>

Idle

Method: <direct>	Flow: 0 0.000 mL/min	System: 1 psi			
Composition		Sample			
A 100.0 %	B 0.0 %	C 0.0 %	D 0.0 %	Set OFF °C	Current 24.7 °C
Column		S1 OFF	S2 OFF	S3 OFF	S4 OFF
Set OFF °C	Current 24.6 °C				
Degasser		Vac pump IDLE	Pressure 0.0 psig		
Disable 0					
Sample Queue		Next Page		Direct Function	

MENU / STATUS

Direct Function-Dry prime

📌 Status (1)

<Default>

Idle

Method: <direct>	Direct Functions		Sample	
Composit	1 Dry Prime		Set OFF °C	Current 24.7 °C
A 100.0 %	2 Wet Prime			
Column	3 Purge Injector			
Set OFF °C	4 Equilibrate			
2	5 Condition Column			
Degasser	6 Inject Samples			
Disable				
	OK ✓	Cancel		

Dry prime 干灌注操作

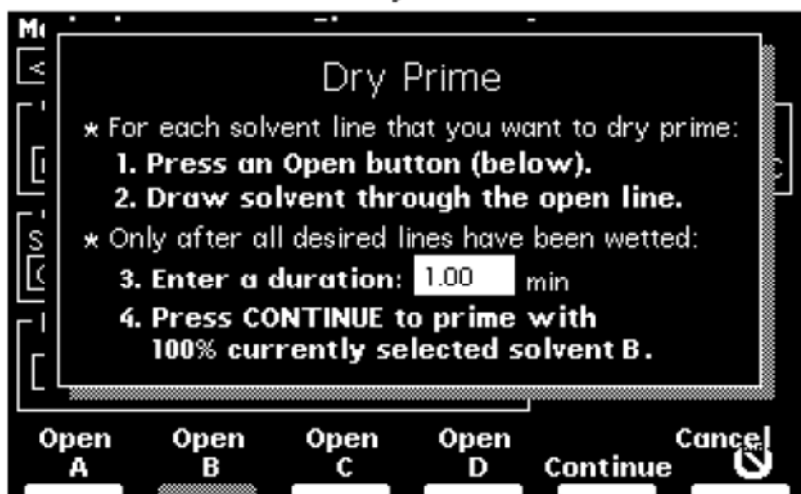
- 当某一路管路中流动相走干时，需做此操作
- 进行dry prime的操作步骤如下：
 - 轻轻振摇溶剂瓶中的过滤头以除去可能留存的气泡
 - 在灌注排液阀出口插上一支注射器，然后打开排液阀（反时针旋转半圈）。不要将注射器固定在排液阀上，而要用手将其贴紧阀的出口
 - 选择 Dry Prime，然后按 OK
 - 按屏幕上你想灌注的相应的流路（A,B,C,或D）键
 - 用一只手握住注射器，同时用另一只手抽注射器的杆，使针筒中产生一段让流路中空气逸出所必需的真空
 - 重复此操作直至排液口有溶剂流出。这可能需要几分钟时间，特别是当在线脱气机也同时在灌注时，时间会更长
 - 重复上述操作将4个溶剂通道全都充满溶剂，然后关闭排液阀

Dry prime 干灌注操作

Status (1)

<Default>

DryPrime:Solvent B selected



Dry Prime

* For each solvent line that you want to dry prime:

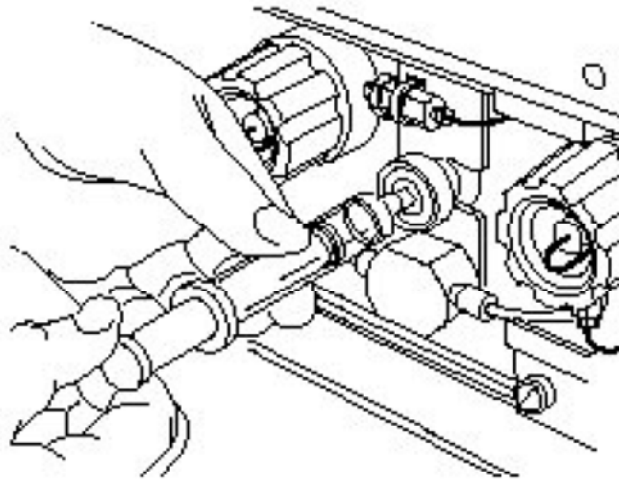
- 1. Press an Open button (below).**
- 2. Draw solvent through the open line.**

* Only after all desired lines have been wetted:

- 3. Enter a duration: 1.00 min**
- 4. Press CONTINUE to prime with 100% currently selected solvent B.**

Open A Open B Open C Open D Continue Cancel

Dry prime 操作示意图



TP01355A

Wet prime 湿灌注

i Status (1)

<Default>

Idle

Method:
<direct>

Composit
A
0.0 %

Column
Set
OFF °C 2

Degasser
Disable

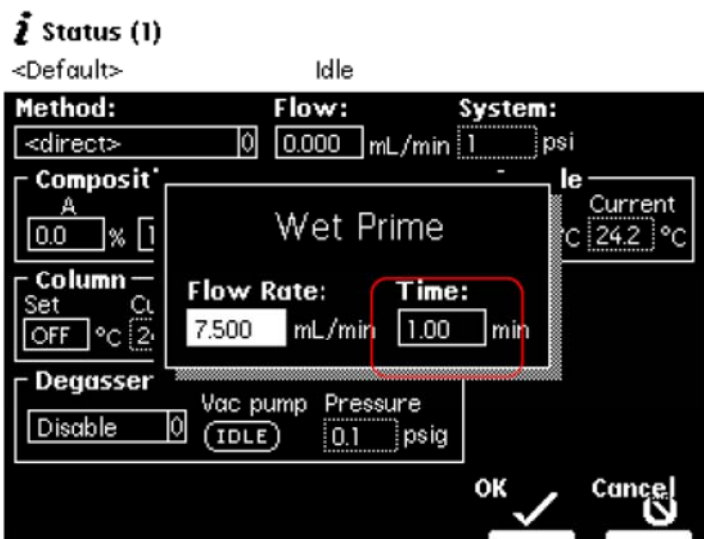
Direct Functions

- 1 Dry Prime
- 2 Wet Prime
- 3 Purge Injector
- 4 Equilibrate
- 5 Condition Column
- 6 Inject Samples

Current
24.2 °C

OK ✓ Cancel

Wet prime



湿灌注时间需要调整!推荐6min

Wet prime 操作

- 进行 Wet prime操作的步骤如下

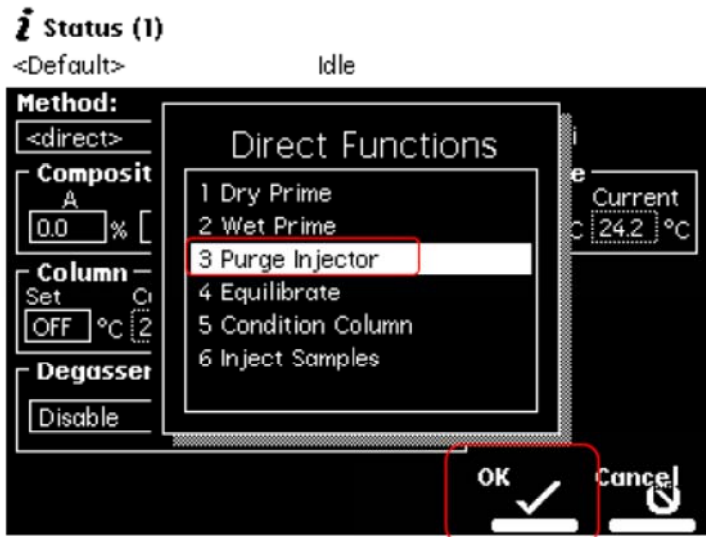
—轻轻振摇溶剂瓶中的过滤头以除去可能留存的气泡。

—输入用于 prime的流速和持续时间（所用的溶剂组成是在 Status 屏幕中输入的），然后按 OK。溶剂管理系统开始运行。Prime的持续时间取决于安装在 2695上的选件

选件	流速 (mL/min)	持续时间 (min)
真空脱气机	7.5	6
氮气脱气	7.5	2

- 到达指定时间后流速停止，2695回到 Idle 状态

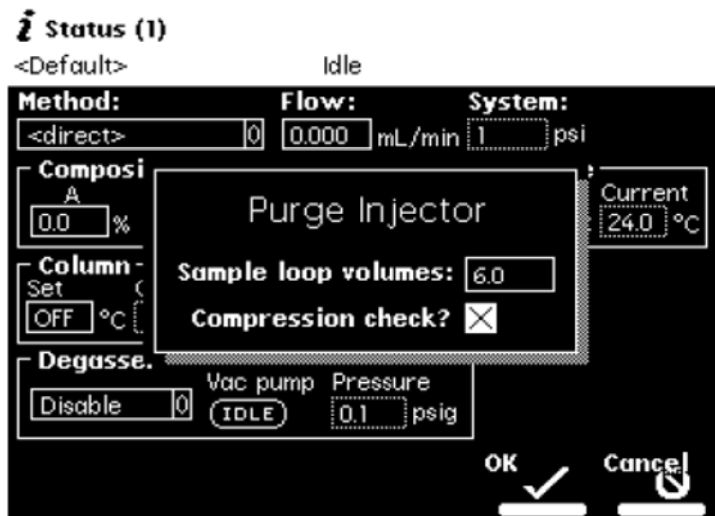
Purge Injector 冲洗进样器



Purge Injector 冲洗进样器

- Purge(冲洗) 进样器是为了
 - 除去前一次运行残留的流动相
 - 清除来自流路或注射器的气泡
 - 在做完wet prime 后，改变到一个新的可混溶的溶剂
- 选择 Purge Injector，然后按 OK

Purge Injector 冲洗进样器



Purge Injector 冲洗进样器

- 进行 purge injector的操作步骤如下
 - 输入需要冲洗的样品环体积的数值(从6起),按 OK
- purge 过程可能包括一个Compression check选项(压缩检验)。其目的是检测样品环和注射器中是否有气泡和渗漏以及核查密封件的完整性。若选中Compression check 选项,就将进行压缩试验。一般不推荐做此操作

概览

- Alliance 系统简介
 - 溶剂管理系统
 - 样品管理系统
- Alliance 系统操作
 - 一般流程
 - 准备流动相
 - 面板操作(prime seal wash; prime needle wash; dry prime; wet prime; purge injector)
 - 平衡
 - 使用溶剂管理系统注意事项
 - 使用样品管理系统注意事项
 - 检测器操作和注意事项(2489; 2998; 2414; 2475; 2424)

色谱柱及色谱系统的平衡

- 在做完泵排气之后进行
- 注意平衡和平衡色谱柱的区别(Empower软件功能)
- 如何记录平衡和平衡色谱柱的谱图(Empower软件功能)
- 梯度方法一般需要做三次梯度平衡
 - 注意观察和确认梯度峰(流动相空白峰)
- 等度方法一般需要平衡30-60分钟(根据柱体积来定)
 - 经验判定方法:基线走平,压力波动平稳

概览

- Alliance 系统简介
 - 溶剂管理系统
 - 样品管理系统
- Alliance 系统操作
 - 一般流程
 - 准备流动相
 - 面板操作(prime seal wash; prime needle wash; dry prime; wet prime; purge injector)
 - 平衡
 - 使用溶剂管理系统注意事项
 - 使用样品管理系统注意事项
 - 检测器操作和注意事项(2489; 2998; 2414; 2475; 2424)

2695溶剂管理系统的使用注意事项

- 缓冲盐流动相要用0.45um的水相过滤膜过滤
- 使用过缓冲液时，停泵前要用水清洗泵头，并开启Seal Wash冲洗柱塞杆密封垫1分钟
- 使用纯水相流动相的管路滤头要放在1:1=有机相:水的溶剂瓶中Wet Prime后放置
- 抽液后关闭排液阀时，不要太用力拧紧，以不渗液为准
- 更换流动相时,要保证两种溶剂的互溶性,如不互溶,要用一种中间溶剂过渡
- 色谱泵在停用时,应先用水洗去缓冲盐,然后用纯甲醇充满泵头及管路,并保存在纯甲醇中

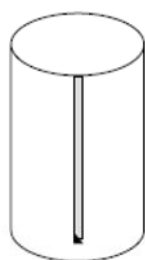
概览

- Alliance 系统简介
 - 溶剂管理系统
 - 样品管理系统
- Alliance 系统操作
 - 一般流程
 - 准备流动相
 - 面板操作(prime seal wash; prime needle wash; dry prime; wet prime; purge injector)
 - 平衡
 - 使用溶剂管理系统注意事项
 - 使用样品管理系统注意事项
 - 检测器操作和注意事项(2489; 2998; 2414; 2475; 2424)

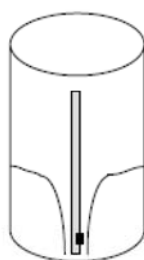
2695样品管理器的使用注意事项 样品瓶

- 2695样品瓶位置和进样量由软件设定
- 注意
 - 样品瓶中应有超过1/3瓶高度的样品量
 - 样品瓶中的样品也不要装得太满,应留有一定的空气
 - 使用内衬管(Insert)时应设定针高度为2mm
 - 使用仪器生产商推荐的样品瓶

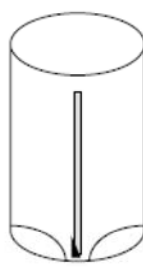
选用合适的进样瓶及密封垫



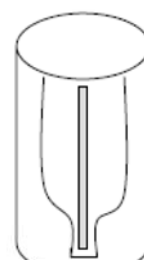
Bottom Draw
Standard



Side Draw
Total Recovery



Bottom Draw
Max Recovery



Qsert



2695样品管理器的使用注意事项 针清洗

■ 2695进样器的清洗

- 进样针是流路的组成部分,运行中一直由流动相清洗
- 进样针外部由软件控制在每次进样前用洗针液清洗
- 若注射器内出现气泡,用面板操作的Purge Injector功能清除之
- 运行样品组的最后一行应做一个空白进样

(Why?)

2695样品管理器的使用注意事项-清洗针

- 洗针溶剂根据流动相的不同应有不同

流动相	洗针溶剂
缓冲溶液, 反相	50% 水 : 50% 甲醇
纯缓冲溶液	100% 水
非水溶液, 反相	100% 甲醇
正相	流动相
GPC	流动相
离子交换	对离子试剂的水溶液

- 注意

- 洗针溶剂瓶(内放绿色塑料管)不要放在仪器的上部, 应放于与仪器同一水平面的实验台上
- 使用正相试剂时需考查仪器系统的兼容性

概览

- Alliance 系统简介

- 溶剂管理系统
- 样品管理系统

- Alliance 系统操作

- 一般流程
- 准备流动相
- 面板操作(prime seal wash; prime needle wash; dry prime; wet prime; purge injector)
- 平衡
- 使用溶剂管理系统注意事项
- 使用样品管理系统注意事项
- 检测器操作和注意事项(2489; 2998; 2414; 2475; 2424)

检测器的启动操作

- 连通流路：
 - 色谱柱出口接检测器入口
 - 注意接头不要留有空隙
 - 检测器出口用适当的管路(内径,长度)通向废液瓶
- 连通数据线路:
 - 2487等通过IEEE 电缆与软件busLAC/E卡连接
 - 2489等通过网线与Empower连接
- 开启电源开关后,需待检测器通过自检后,才能被软件控制(约需5-10分钟)
- 建议先通流动相再开灯,避免干池开灯
- 通流动相平衡至少30分钟后才能正常工作

Waters 2998 PDA 检测器

- PDA(Photo Diode Array):光电二极管矩阵



由软件设定检测器参数

- 只需设定如下参数即可采集数据
 - 波长范围
 - 分辨率
 - 每秒采集的光谱数
- 操作极为简便
- 不需费神选择参比波长及其带宽

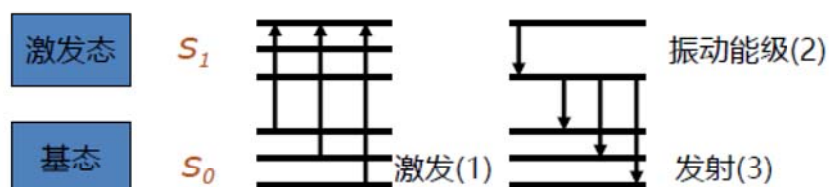


Waters 2475 荧光检测器



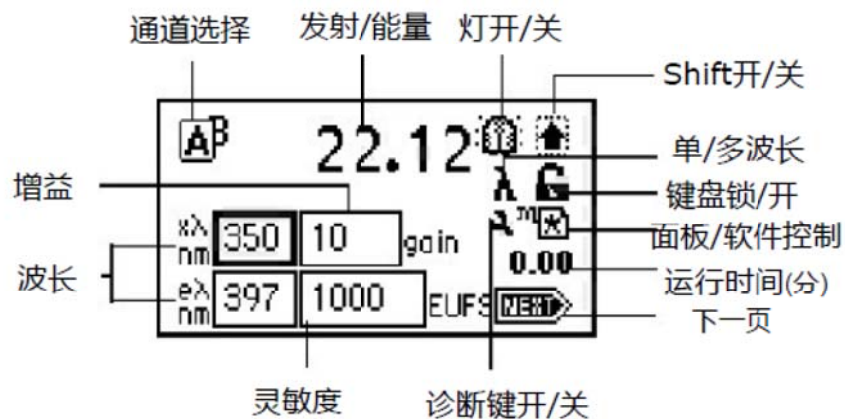
荧光检测的基本原理

- 发荧光的化合物吸收光(UV或Vis),其分子达到激发态,其返回到基态时发射光的现象即荧光

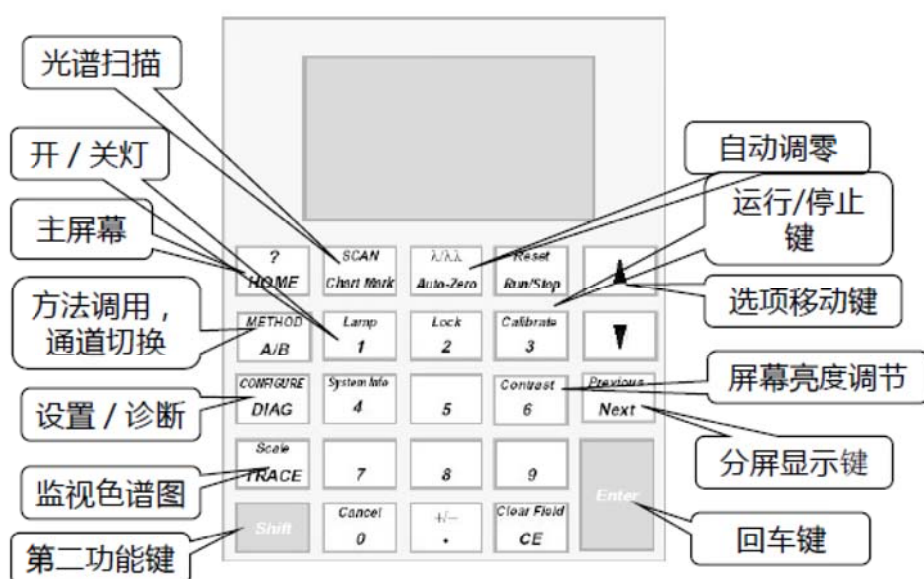


- 分子在吸收UV或可见光后进入激发态,分子达到不稳定的高能量状态
- 电子失去过剩的能量成为振动能,并达到最低的激发单重态
- 电子失去能量达到基态时发出荧光
- 共轭及芳香族化合物最容易有荧光现象

2475的主显示屏



2475的面板及操作



荧光检测器使用注意事项

- 不是所有化合物都有荧光, 有时需要衍生
- 检测器对溶解气体及其它“淬灭”物质敏感, 流动相最好能在线脱气
- 对 E_x 及 E_m 的最佳 λ , 易受温度、溶剂极性和粘度、pH及样品浓度影响
- 检测池的耐压较低, 注意出口管路要畅通
- 设置的发射波长至少要比激发波长高10nm

2475 荧光检测器的扫描功能

- 扫描功能
- 由面板功能执行
- 亦能由Empower3软件执行

