

戴安 Ultimate 3000 系列 HPLC 标准操作规程

一、准备工作:

1、面板操作指南:

1.1、如何进入菜单: 使用仪器中配置的感应笔在仪器前面板显示屏下的白色定位点前约 0.5cm 处悬停约 1 秒或轻触, 四个定位点的上方将显示相应的菜单功能, 按需要进行相应的选择即可, 常规参数的选择 (或进入) 使用 “**SELECT 或 OK**”, 返回上一层按 “**BACK**”, “<、^、<、V” 分别为光标移动键。感应笔触任一定位点将直接显示出 “常用功能菜单”, 对于未显示的功能, 则需要先选择 “**MENU**” 进入主菜单, 再进一步进行选择。

1.2、各设备的主要功能:

1.2.1、泵:

A、泵开关: 使用感应笔调出常用功能菜单后, 直接选择 “**FLOW ON**” 功能, 即开启泵马达; 在启动后, 再次调出菜单后显示的 “**FLOW OFF**” 为关闭泵选项。

B、溶剂选择: 使用感应笔调出常用功能菜单后, 选择 “**MENU**”, 进入后再选择 “**CONTROL**” 功能, 进入子菜单后, 移动选项到相应的溶剂 “**A%、B%、C%、D%**” 进入后再调节相应的值即可。在当前设置流动相比比例不足 100%, 系统会自动与前一项进行分配, 总和为 100%。

C、流速的调节: 使用感应笔调出常用功能菜单后, 直接选择 “**SET FLOW**” 然后通过移动选项进行流速的设置。注, 数值不能自动进位, 故设置时应确认显示的值最终的值为最终的值。

D、PURGE: 使用感应笔调出常用功能菜单后, 直接选择 “**PURGE**” 即执行, 再次选择时即为关闭, 当未做选择时系统会在执行 5 分钟后自动停止。

1.2.2、紫外检测器:

A、灯开关: 在使用感应笔调出常用功能菜单后, 选择 “**MENU**” 进入子菜单后, 再选择 “**GENERAL SETTING**”, 进入后, 再进入下一级子菜单, 通过感应笔移动选择 “**UV LAMP**”, 进入后再选择 “**TOGGLE**” 则打开氙灯; 再选择 “**Vis LAMP**” 时, 相应的操作打开钨灯。

B、波长选择: 在调出常用功能菜单后, 选择 “**WAVELENGTH**” 选择, 再选择 “**WAVELENGTH 1**” 进入, 通过感应笔移动光标选择修改检测波长。

C、自动调零: 在调出常用功能菜单后, 选择 “**AUTOZERO**” 即执行自动调零。

D、启动/停止采集: 在调出常用功能菜单后, 选择 “**RUN/STOP**” 启动或停止数据信号的采集 (仅用于国产工作站, 波长改变后必须重新执行一次启动)。

1.2.3、柱温箱:

A、温度控制: 在调出常用功能菜单后, 选择 “**TEMP.**” 即进入温度设置子菜单, 其中可通过 “**ON/OFF**” 控制柱温箱的启动和停止, 同时通过移动选择进行温度的值设置。

B、阀切换控制: 在调出常用功能菜单后, 选择 “**VALVE**” 进入阀控制子菜单, 设置流路连接及阀位置的切换。

1.2.4、自动进样器:

A、进样针清洗: 在调出常用功能菜单后, 选择 “**WASH**” 即执行针的清洗。

B、进样针排气泡: 在调出常用功能菜单后, 选择 “**PRIME**” 即自动执行针的排气泡。

2、各部件的准备操作:

2.1、泵:

A、流动相:

①、流动相是否充足: (主要是有机相或者是单一通道的缓冲盐体系), 一般应在所预计的消耗量之上加 150-200ml, 以保证仪器运行过程中不会出现流动相短缺;

②、流动相是否新鲜: (主要是高纯水及缓冲盐流动相), 一般情况下一次制得的纯水或缓冲盐流动相应应在连续的 24 小时内使用完, 如未使用完也应弃去不用, 并重新配制新鲜的流动相。**特殊情况至少应重新过滤并脱气。**

B、柱塞清洗液: 清洗液是否新鲜及匹配: 对于常规的流动相(一般指不含盐或离子对等添加剂的流动相), 配制 50%甲醇作为清洗液, 在连续不超过 4 天工作的情况下可以两周一换; 若超过 4 天, 则一周换一次。对于含盐或其它添加剂的流动相, 配制 5%甲醇(或高纯水)作为清洗液, 在连续使用时, 应每日更换; 中间如有较长时间不用, 则应将清洗液瓶清空(或改为 50%甲醇作为保存液, 并在下次使用时, 根据所使用的流动相配制适宜清洗液)。

***:** 若泵超过半个月以上不用, 应将柱塞清洗溶剂管(蠕动泵下压部分)抽出, 清空清洗液瓶, 再次使用时, 将溶剂管放回原位并添加新的清洗液, 以保证清洗管道的正常使用。

C、溶剂管道:

①、管道中的气泡: 在泵长期不用时, 由于脱气机停止工作, 流动相会重新溶解环境中的气体, 而产生的气泡会对柱、泵及检测器产生不同程度的影响, 因此要求在停泵后重新使用时应先观察 A、B、C、D 四溶剂管道进比例阀部分是否存在气泡, 如无, 在泵启动后等待 5 分钟后(脱气机自动脱气), 再启动泵流速; **若有**, 则选择相应的通道(软件中将相关通道比例设为 100%), 打开 PURGE 阀后, 在软件中, 点击泵面板上的“Purge On”命令执行流动相自动脱气(点击“Purge Off”键命令关闭, 或等待 5 分钟后仪器命令运行完成后自动停止); 完成脱气后, **先关闭 PURGE 阀**, 再启动泵并逐步升高流速。

②、流动相快速替换: 由于流动相通道数量有限, 当需要对通道中流动相进行更换时, 应首先打开 PURGE 阀, 选择相应通道比例为 100%, 执行“Purge”命令, 等待命令自动运行完成后, 关闭 PURGE 阀, 按要求进行系统的过渡或平衡。

2.2、自动进样器:

A、进样针排气及清洗: 当自动进样器非连续使用时(间隔一天或以上), 应在仪器启动前(**尤其是泵**)先对进样针执行排气。打开 Chromeleon 主程序后, 选择自动进样器选项(相关图标下的“Settings”), 在弹出菜单中进行相关的操作的设置(**Prime Syringe**: 设置排气操作的循环次数, 通常设置为 3—5 次; **Wash buffer loop**: 清洗定量环, 按 Start 开始; **Wash Needle Externally**: 进样针外壁冲洗, 通常在当天(或批次)样品分析完成后执行)。若使用针清洗液瓶中清洗液冲洗, 则应确保此溶剂与流动相基本一致(**一般与流动相一致; 如果流动相使用到盐等添加剂, 清洗液中盐溶剂使用水代替盐即可**)且有效脱气。

B、进样针清洗: 当连续使用中需要更换样品类型或流动相粘度较大时, 应在每次进样完成后进行针(Buffer loop 和 Needle)清洗。

2.3、柱温箱: 柱温箱应在打开电源且柱连接好后, 及时启动(ON)并设置方法要求的温度及平衡温度偏差(**在温度到达设置温度的正负平衡温度偏差点时, 系统会自动检测温度是否平衡, 在达到稳定的平衡后, 继续以 0.1 度的步进速度升温**)。

2.4、检测器: 为减少灯能量浪费, 通常检测器在样品准备工作完成后(或基本完成时, 即样品准备工作能在 30 分钟以内完成); 同时仪器**按方法要求流动相比例及流速**平衡至少 30 分钟以上后打开, 在完成自检 20 分钟以后方可开始样品的进样分析。

二、仪器平衡:

1、泵: 应在完成准备工作后, 以 0.2ml/min 的步进速度(每个平衡点保持 0.5 分钟以上时间)进行流速的升降, 在达到 0.6ml/min 以上的流速时进行等度流动相比例或梯度流动相初始平

衡比例调整；根据准备样品的准备情况，及时将流速调整到方法要求的值，并等待压力稳定后平衡 30 分钟以上时间方可进样样品的分析。当比例调整幅度大于 40% 的变化时，应进行过渡(选择两步或两步以上调整后达到需要的比例)，通常，先调节待加入流动比例为 5—10%，平衡约 5 分钟以上，后再调节比例到要求的浓度。梯度泵开机时通常选择有机相调节平衡流速，再进逐步加入水相；含盐流动相系统应以调节有机相比比例 5—10% 平衡约 30 分钟以上，再逐步转换到盐通道。

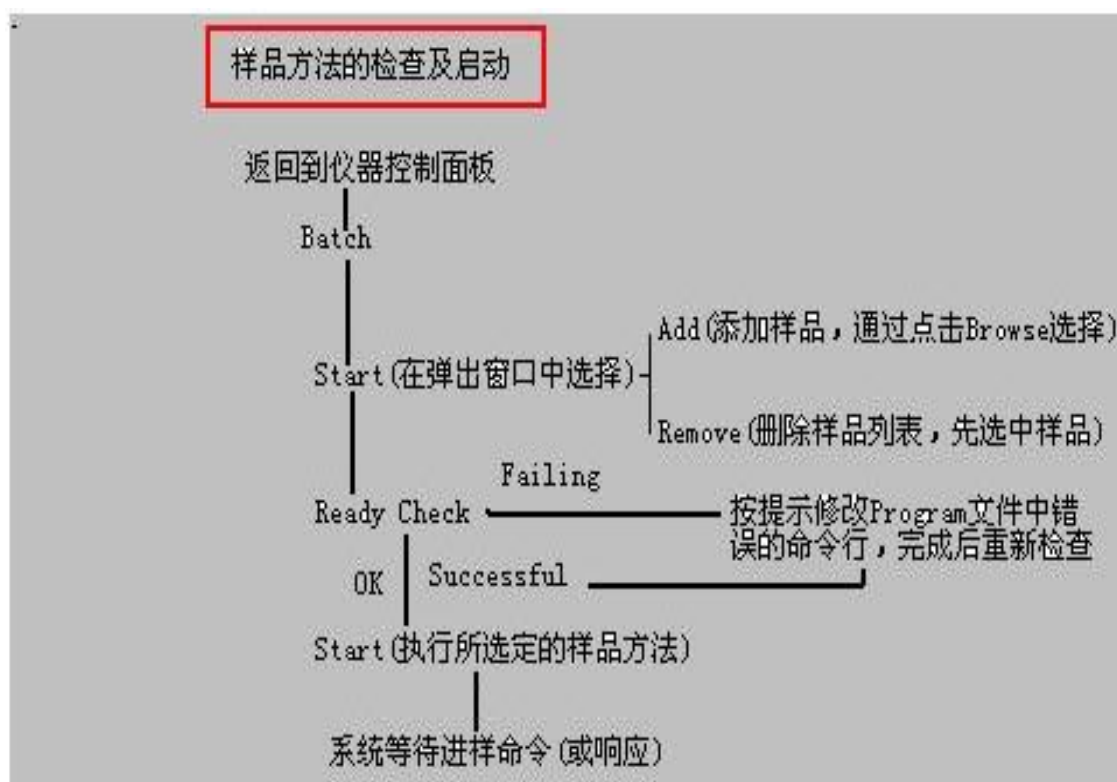
2、检测器：常规情况，设定方法要求的波长（UV/PDA）或激发及参比波长（RF）并调整检测器显示范围为-5~100mV（/mAU），查看基线，考虑到在连续的 20 分钟，基线在设置的显示范围内基本平直即可开始样品进样分析。

3、柱温箱：在方法要求使用柱温箱时，应在仪器电源打开后，及时将柱温箱温度设置到预定值并启动。

4、进样器：手动进样在系统平衡过程中应扳至 Inject 位置，以保证系统充分平衡。

三、样品方法的编辑与运行：

1、已有方法的运行：

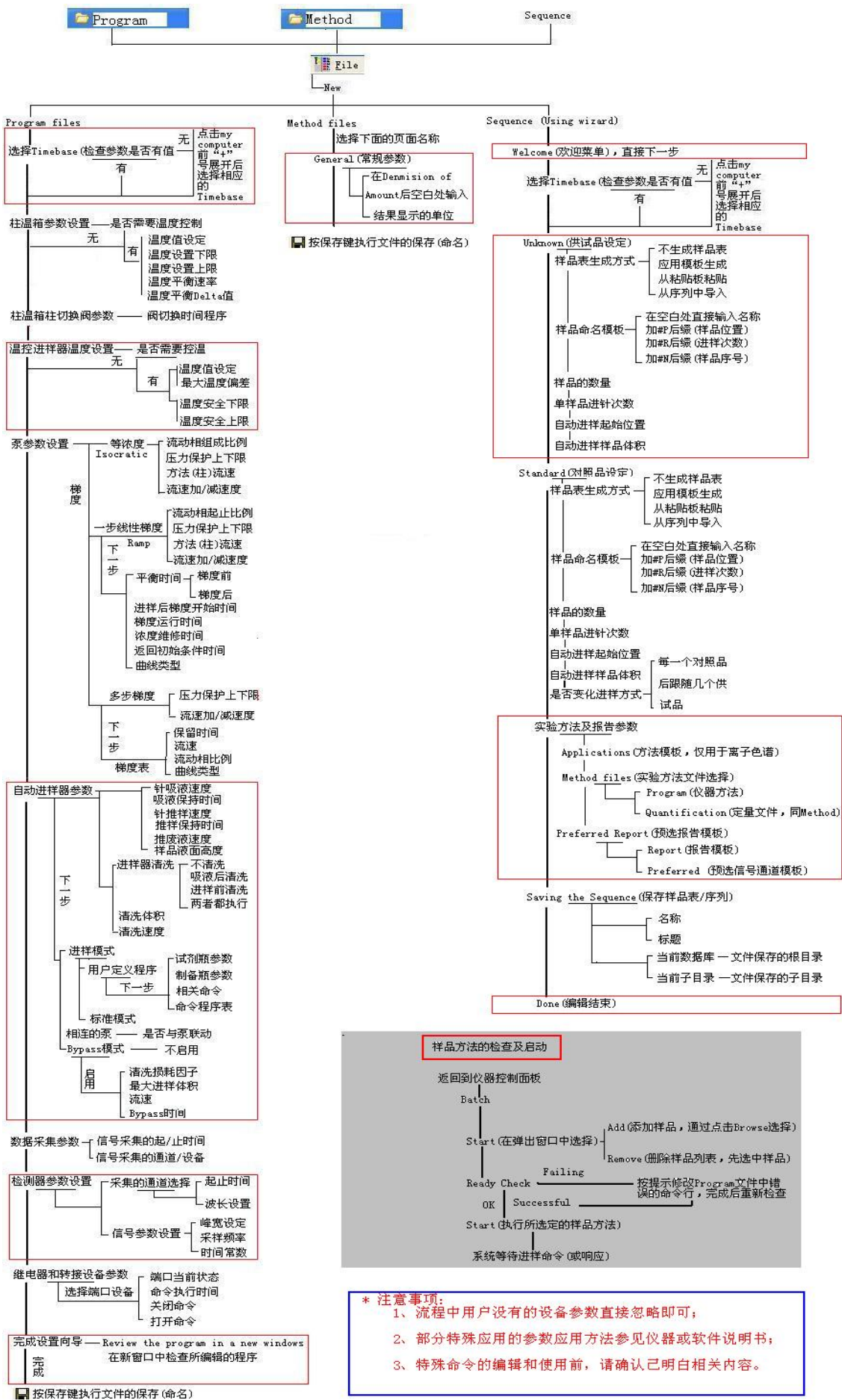


注：通常在“**Start**”窗口添加样品时注意保持所做的样品“**Sequence**”是唯一的；

如果有关机程序，则将关机程序置于样品序列下面（通过“**Move Down/Move Up**”功能键来调整）；

对于有自动进样和柱切换功能的用户，可以添加多个序列，但需注意各序列之间需添加平衡样品/序列。

2、新建样品方法及方法的检查执行：



四、数据分析方法：

1、数据的选择：在资源管理中(点击 Browser 图标进入，如下图；或在仪器控制面板中选择 Files---Browser 进入)



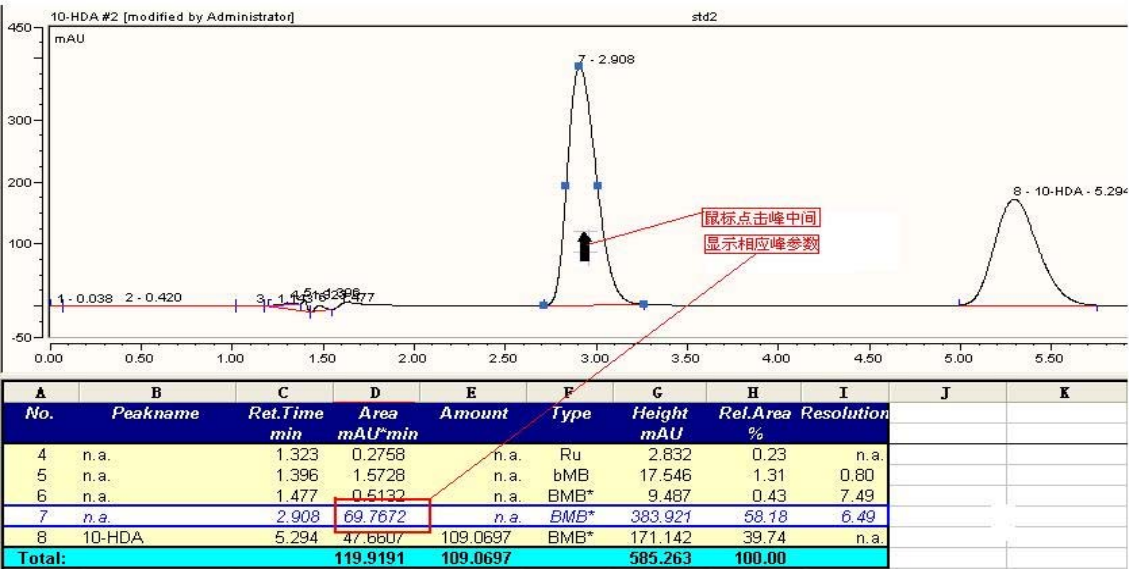
找到数据保存（所要查看数据的 Sequence）的位置，

No.	Name	Type	Pos	Inj. Vo	Program	Method	Status	Inj. Date/Time	Weight	Dil. Fa	ISTD Am	Sample ID	R
1	STD1	Standard	RA1	5.0	test1	test1	Finished	2005-2-23 11:49:	1				R
2	BI&NIA01	Standard	RA1	5.0	test1	test1	Finished	2005-2-23 12:05:	1				Ru
3	BI&NIA02	Standard	RA1	5.0	test1	test1	Finished	2005-2-23 12:21:	1				Ru
4	BI&NIA03	Standard	RA1	5.0	test1	test1	Fin						Ru
5	BI&NIA04	Standard	RA1	5.0	test1	test1	Fin						Ru
6	BI&NIA05	Standard	RA1	5.0	test1	test1	Fin						Ru

How to...
What's this?
Program
Audit Trail
Quantification Method
All Channels
3DFIELD
UV_VIS_1
UV_VIS_2

Open
Query
Sync
Copy
Paste
Clear

双击打开第一个对照品数据，即进入数据查看窗口，

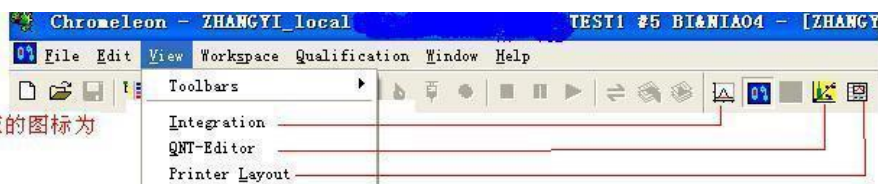


点击参比峰（一般为比主成分峰小但大于其它杂质峰做为参比峰，或主成分峰）查看并记录“Area”值，做为最小峰面积的设定参考。

2、数据分析(流程图)：

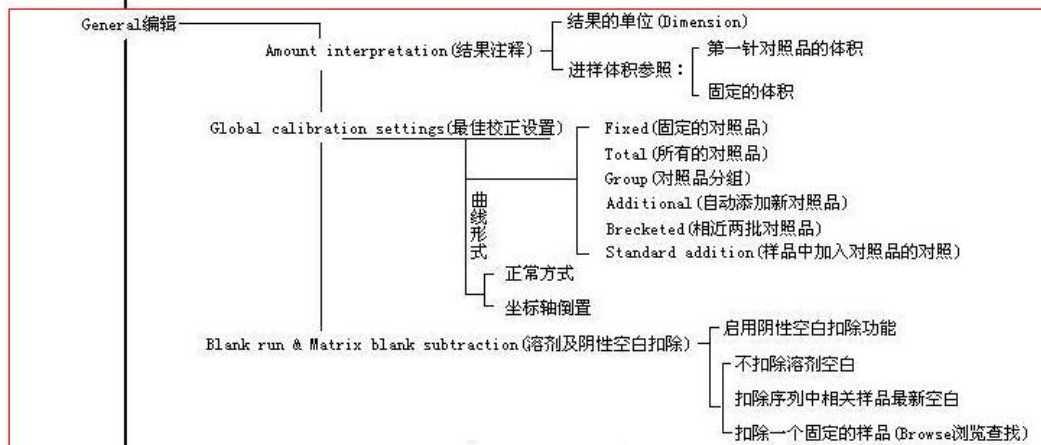
* 注：双击打开的样品视图即Integration

注：红线部分命令对应的图标为相应的快捷方式



View (点击菜单栏上的相应命令)

选择QNT-Editor

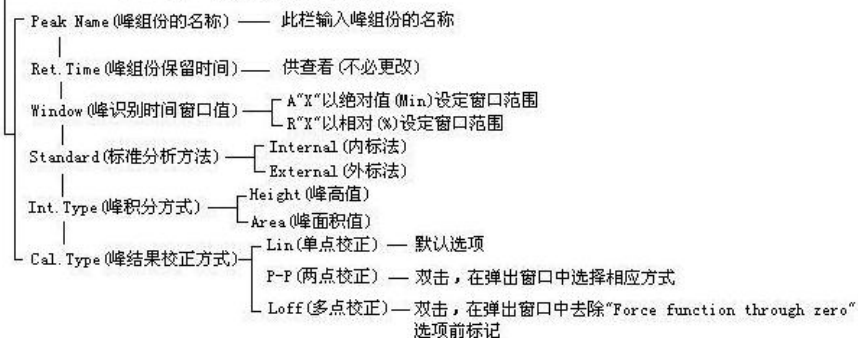


Detection (积分参数设置--峰修饰)

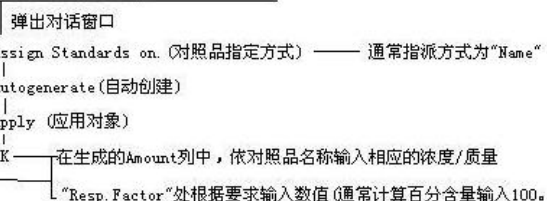


Peak Table (峰/组份表编辑) — 鼠标在空白区域右键，选择“Autogenerate Peak Table”

----OK----确定，生成新的峰表。



Amount Table (浓度表编辑) — 鼠标在空白区域右键，选择“Column”---Amount Column---Edit amount Column---OK



按保存键执行文件的保存

返回资源管理器界面

根据含量计算结果，选择在样品的“Weight及Dil. Factor以及ISTD Amount”列，分别依次输入质量、稀释倍数及内标物的质量。
若计算样品的浓度，则在完成后直接打开样品数据，相应的“Amount”列位置显示的即为质量或浓度。

五、数据报告的编辑与数据备份：

1、选择报告模板：

在数据查看窗口中，打开“**View**”菜单，选择“**Printer Layout**”即进入报告界面，根据结果需要，选择合适的报告模板，常用模板如下：

“ Intergration ”	单一样品的标准报告
“ Calibration(Curr.P) ”	单标准校正曲线报告
“ Peak Analysis ”	峰分析报告
“ Calibration(Batch) ”	混标的校正曲线报告
“ Summary ”	数据统计分析报告

2、报告模板的编辑：

在报告界面下，打开“**Edit**”菜单，选择“**Layout Mode**”打开报告布局编辑功能：

A、标题及方法信息：双击报告标题或方法信息部分对内容进行更改或替换（双击后会出现可更换内容的对话框，根据对话框中信息选择需要替换或更改的信息）。

B、报告结果内容：双击结果部分标题对相关信息进行更改或替换；如果需要增加则在表下部的空白区右键，根据需要选择“**Insert**”插入表格或信息；在双击出现的窗口第一行中可能进行数学组合（+、-、×、÷）。

C、谱图：双击谱图，在弹出的窗口中对相关信息及内容项进行修改和编辑；“**Overlay**”为谱图的叠加，当选择后点 **Add** 进行谱图的增加，**选择过程注意检测通道的选择**；“**Comprasion**”为谱图的对比效果，**Offset** 部分为谱图间距。”

3、数据的备份与输出：

A、数据的备份：在资源管理器中选择需要备份的文件源（**根目录、文件夹、Sequence、或相应的样品数据**），打开“**File**”菜单，选择“**Export/Backup**”中的 **Backup**”，在弹出窗口中选择数据保存的目标位置，点“**Start**”开始数据备份，最后点“**Finish**”完成。

B、数据的输出：变色龙软件提供数据文件以“PDF、ASCII、EXECL、TXT、CMB”等文件形式输出，以满足不同的需要。选择相就的数据文件（Sequence），打开“File”菜单，选择“**Batch Report**”项，在弹出窗口中选择报告方法，去除“**Print out**”标记，点击“**Export**”，在弹出窗口中选择文件所需的文件类型及所需输出的报告类型后下一步，确定输出文件保存位置后“**OK**”，完成。

C、数据的恢复：在备份文件的文件夹中双击备份文件在弹出窗口中选择恢复文件的目录后按“**Start**”进行恢复。或在主程序中打开“**File**”菜单，选择“**Restore/Import**”中的 **Restore**”，在弹出窗口中同法操作即可。

六、关机及注意事项：

1、关机：

样品分析**最终**完成后，应首先关闭检测器的灯，以减少灯能量的损失；

其次，根据流动相的组成是否含有缓冲盐或离子对等添加剂，选择以纯甲醇（**不含添加剂流动相**）或 5% 甲醇水溶液（**含添加剂流动相**）除盐（**或酸/碱**）后以纯甲醇进行柱及系统的清洗（连续使用情况下每日至少清洗 30 分钟以上时间，非连续使用应增长清洗时间，具体以相关的样品性质作为参考；含盐流动相至少以 5% 甲醇水溶液清洗 60 分钟以上，再逐步改换到纯甲醇清洗）；

再者，选择自动进样器相关的清洗（**Buffer loop** 和 **Needle**）；如果样器溶剂含有添加剂，则应先用纯水冲洗去除添加剂后，再用甲醇清洗保存；如果是手动进样器，需使用随机配置的专用接头对手动进样阀在 **Load** 位进行清洗按上述选择相应的溶剂进行清洗，完成后扳至 **Inject** 位用清洗液充填管道；

上述工作完成后再将柱温箱关闭或降至室温。如果所用的温度较高，在关闭电源后，最好是先将柱温箱盖打开，确认柱温箱内温度已降到室温后，再关闭。

2、注意事项：

A、新柱子活化时最好断开检测器管道直接排除清洗液。活化对于普通 C18 (ODS) 柱，建议使用纯甲醇以 0.2ml/min 的流速，冲洗柱子 12 个小时以上（**过夜**），再逐步将流速提升到 0.5、1.0、1.2ml/min，并在每个条件下保持约 20 分钟，执行完成后降下流速，换上实验要求的流动相平衡系统；

B、一次开灯相当于 30 小时灯寿命，因此建议尽可能将样品集中分析；遇有样品分散的情况，且间隔时间不超过 8 小时，建议不要关灯，只需将泵流速降低至 0.05-0.2ml/min 之间，以减少流动相的损耗；

C、仪器运行过程中尽量避免通过仪器后部的 USB HUB 使用 USB 设备，不当的操作会造成仪器的通讯中断，影响正常的样品分析方法运行；

D、对于电子追踪（**Audit Trail**）记录（文件位置为：资源管理器，点击与仪器安装时所配置的“**TimeBase**”同名文件夹前的“+”号，展开后，选择“**Audit**”文件夹，在右边的窗口中会以日期的形式显示相应日期的日志；仪器控制面板上的“**Audit trail**”仅显示最新的 100 条记录。当发现记录中出现错误信息后，应及时参照“**TroubleShooting**”中相关设备的内容进行诊断和矫正，对于不清楚或无法判断的信息请及时联系戴安公司进行排除；

E、软件运行过程中不可将加密狗拔下，**为保证加密狗性能，请勿频繁拔插；**

F、注意计算机的防毒，如果要使用移动媒体，请在插入工作站计算机前先在有防（杀）毒软件的计算机进行扫描，确认无毒后再使用；

G、单独 **Sequence** 中的样品尽量不超过 200。在编辑样品时系统会自动将该 **Sequence** 中所有样品调入内存，数量过多时会引起系统内存紧张；

H、对样品的仪器方法（**Program**）更新后，应及时对“**Program**”文件夹中储存的方法进行同步更新。否则下次 **Sequence** 编辑所生成的文件仍为“**Program**”文件夹中旧程序文件；

I、不要将同一样品在多个窗口进行编辑，否则会引起数据读写错误。在正常编辑完样品方法后，及时关闭当前的窗口；

J、样品数据应定期进行备份，以减少系统问题造成的数据安全影响。**备份后，先检查备份的数据是否完整（双击备份的文件，在弹出窗口中点击相应文件夹前“+”号，确认显示的文件与备份要求是否一致），确认无误后，再从软件中删除原始位置的数据。**