

戴安 HPLC 标准操作规程(SOP)

一、准备工作:

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 150ml, 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的清洗液。

***: 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, 再下次使用时放回原位置, 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, 流动相会重新溶剂环境中的气体, 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(按泵面板上的相应字母并保持约 3 秒钟), 打开 PURGE 阀后, 按面板上的 PURGE 键进行流动相自动脱气(可选择再次按键关闭, 或等待 5 分钟后仪器自动停止), 完成后先关闭 PURGE 阀, 再启动泵流速。

②、流动相快速替换: 由于流动相通道有限, 当在同一个通道中更换流动相时, 应首先打开 PURGE 阀, 再按泵面板上的 PURGE 键进行快速溶剂替换(流动为 6ml/min, 持续 5 分钟), 完成后再关闭 PURGE 阀, 按要求进行系统的过渡或平衡。

2、自动进样器:

A、进样针排气: 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)先进行进样针排气。打开 Chromeleon 主程序后, 点出 Files, 选择 Browser, 打开后, 点击 Dionex Temp., 选择 Panle 中的 Dionex_LC, 在右边的窗口中双击 ASI100.pan 文件打开后, 点菜单 Control 拉至最低下点击, 在 Connect 变绿后, 选手 Wash, settings 更改 Wash Value 为 250、Dispense 为 50 后, 在 R、B 盘中放置甲醇, G 盘中放置异丙醇, 按 Prime 进行针排气, 完成后即可。(对于面板中有设置的用户直接在自动进样器设置窗口中按针排气(Syringe Prime)即可。

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清洗。在 Program 编辑查看时, 在结束时间命令前加 WASH 命令; 如选择单瓶进样, 则在进样完成后, 按自动进样器选项中的 Wash 键进行清洗。

3、柱温箱: 柱温箱应在打开电源且柱连接好后, 及时设置为方法要求的温度。

4、检测器: 为减少灯能量浪费, 检测器应在样品准备完成后或基本完成时, 且仪器系统按要求流动相及流速平衡至少 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分析。

二、仪器平衡:

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

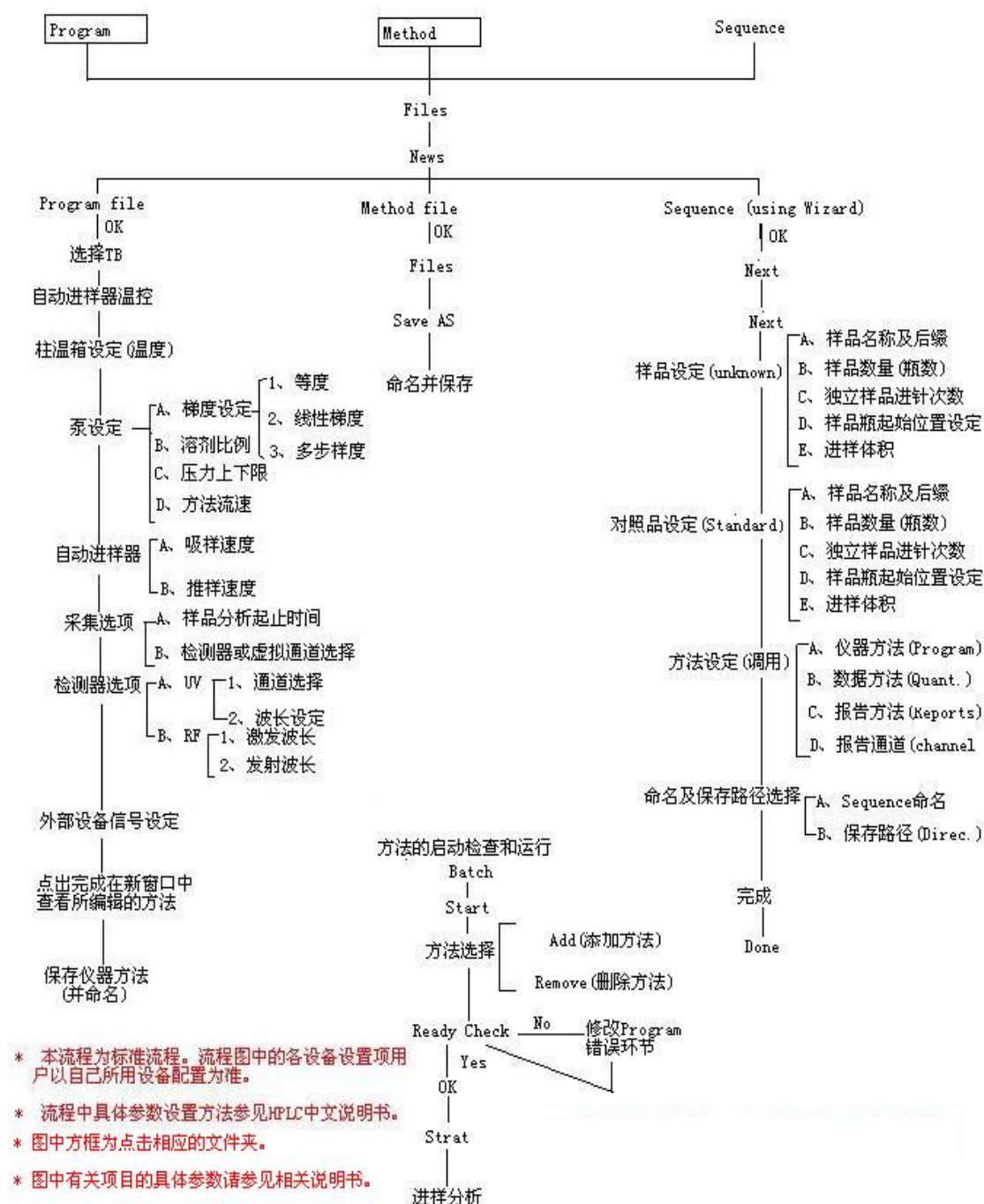
2、**检测器**：常规情况，设定方法要求的波长并调整检测器显示范围为-5~100mV，查看基线 20 分钟以上，基线基本平直即可开始样品分析。

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。

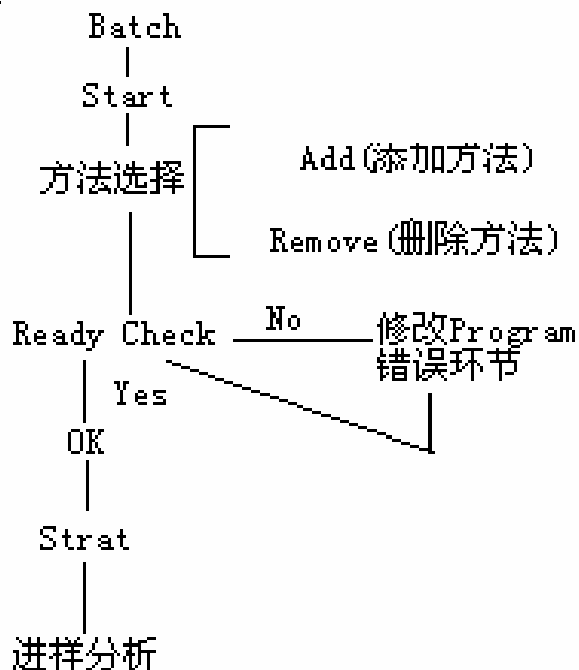
三、样品方法的编辑与运行：

1、新方法编辑及运行：



2、已有方法的运行：

方法的启动检查和运行



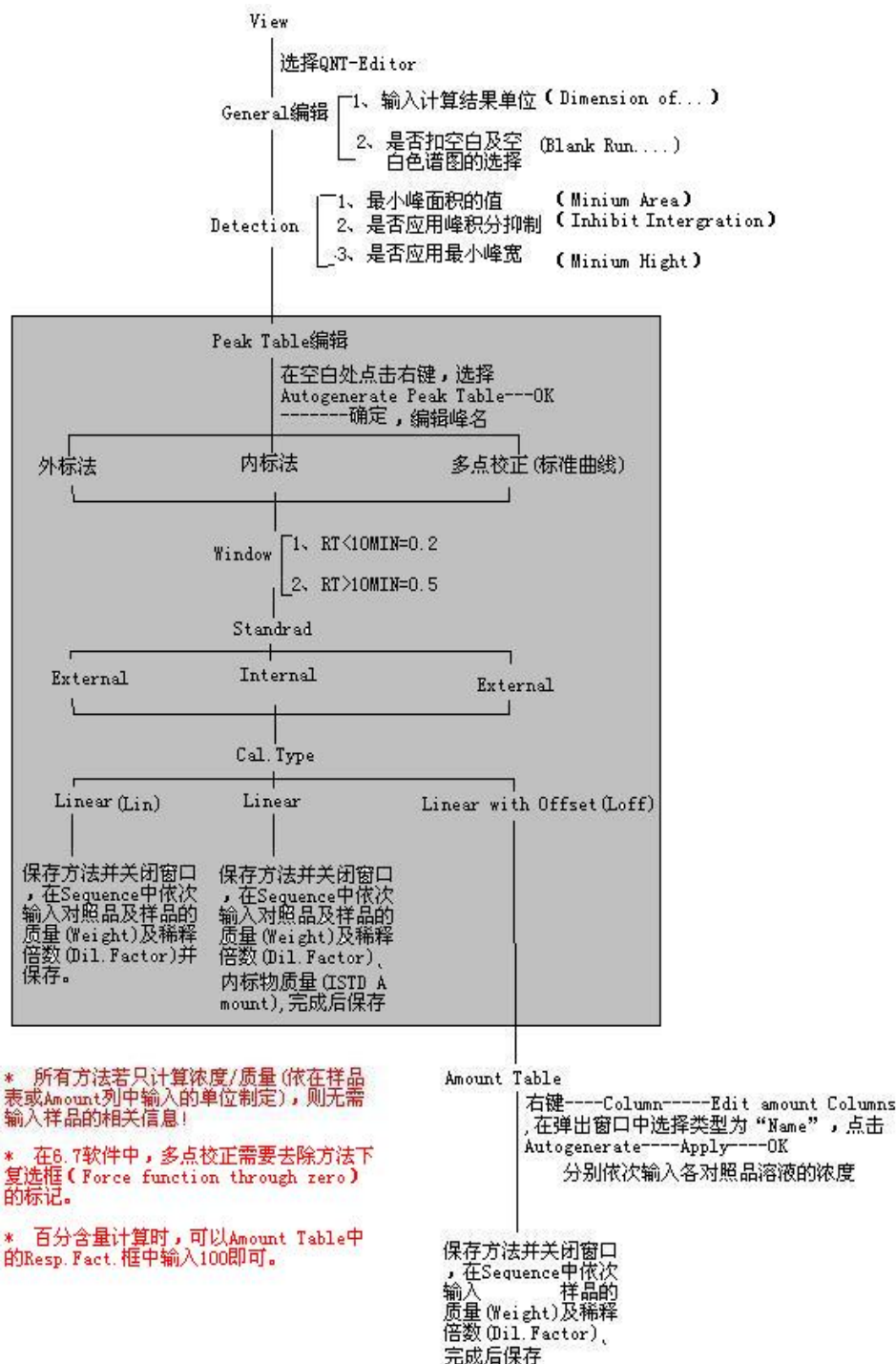
四、数据分析方法：

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，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)：



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, 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”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。

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”标识，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，根据流动相的组成选择纯甲醇或在 5%甲醇水溶液除盐后以纯甲醇进行清洗（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，具体以相关的样品为参考；含盐流动相至少以 5%甲醇水溶液清洗 45 分钟以上后，逐步改换到纯甲醇清洗）；再者，选择自动进样器清洗或以先纯水后甲醇的方式用专用接头对手动进样阀在 Load 位进行清洗，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。

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；

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；

C、仪器运行过程中尽是避免再仪器上使用 USB 设备；

D、对于电子追踪记录中的错误信息一定要及时分析原因并排除；

E、软件运行过程中不可将加密狗拔下；

F、注意计算机的防毒；

G、单独 Sequence 中的样品尽量不超过 200，过多会相起系统内存紧张；

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；

I、不要对同一样品打开多个窗口，否则会引起数据读写错误；

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。