

Agilent 1100 LC

现场培训教材

安捷伦科技有限公司
化学分析仪器部

1、 培训目的:

- 基本了解1100LC硬件操作。
- 掌握化学工作站的开机, 关机, 参数设定, 学会数据采集, 数据分析的基本操作。

二、 培训准备:

1、仪器设备： Agilent 1100LC

G1310A (单元泵); G1312A(二元泵); G1311A(四元泵)。

G1313A (自动进样器)。

G1316A (柱温箱)。

G1314A (VWD检测器)。

G1362A (示差检测器)。

G1315A/B (DAD检测器)。

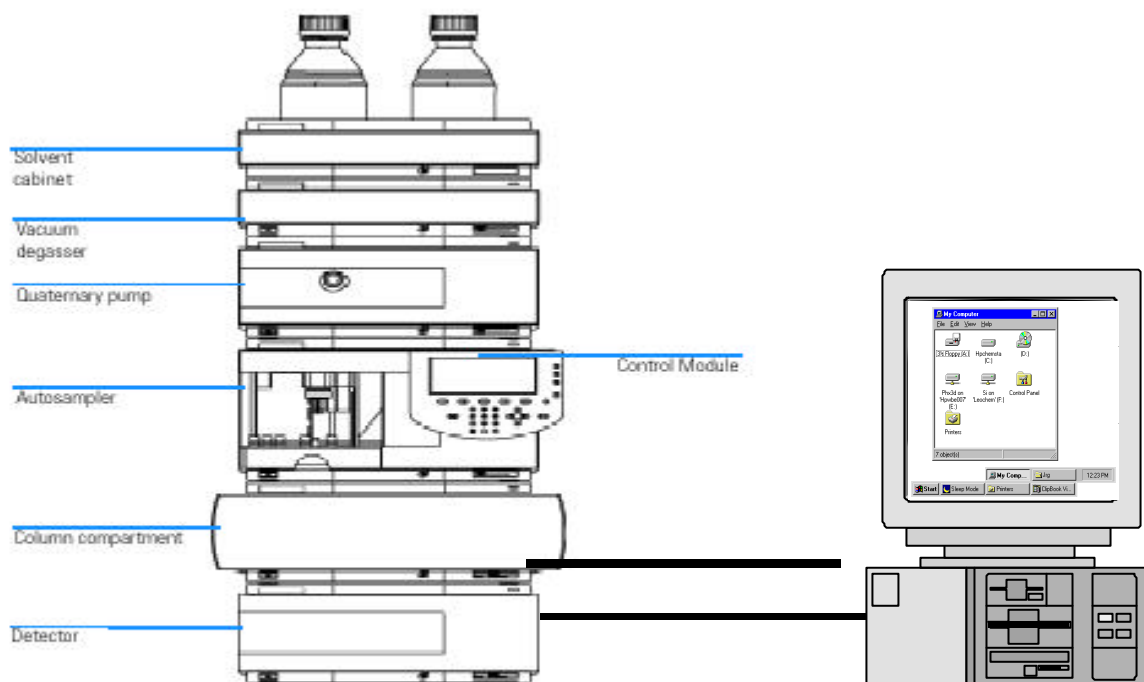
G1321A (FLD检测器)。

色谱柱: Zorbax eclipse XDB C8, 150mm × 4.6mm i.d.

2、溶剂准备:

色谱级纯或优级纯乙腈 (ACN) 或甲醇。

二次蒸馏水

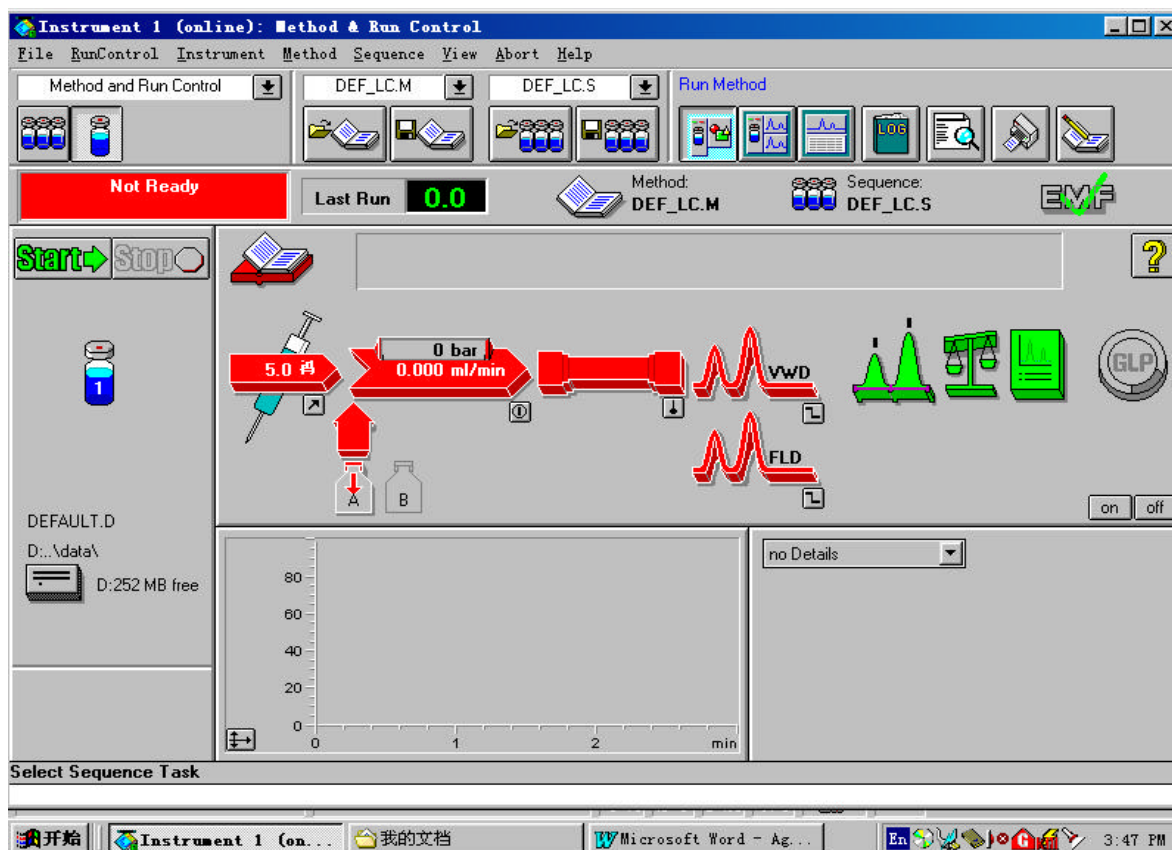


基本操作步骤:

(一)、开机:

- 1、打开计算机,进入Windows NT (或Windows 2000)画面,并运行Bootp Server程序。
- 2、打开 1100 LC 各模块电源。
- 3、待各模块自检完成后,双击Instrument 1 Online图标,化学工作站自动与1100LC

通讯，进入的工作站画面如下所示。



4、从“View”菜单中选择“Method and Run control”画面，单击“View”菜单中的“Show Top Toolbar”，“Show status toolbar”，“System diagram”，“Sampling diagram”，使其命令前有“√”标志，来调用所需的界面。

5、把流动相放入溶剂瓶中。

6、打开Purge阀。

7、单击Pump图标，出现参数设定菜单，单击Setup pump选项，进入泵编辑画面。

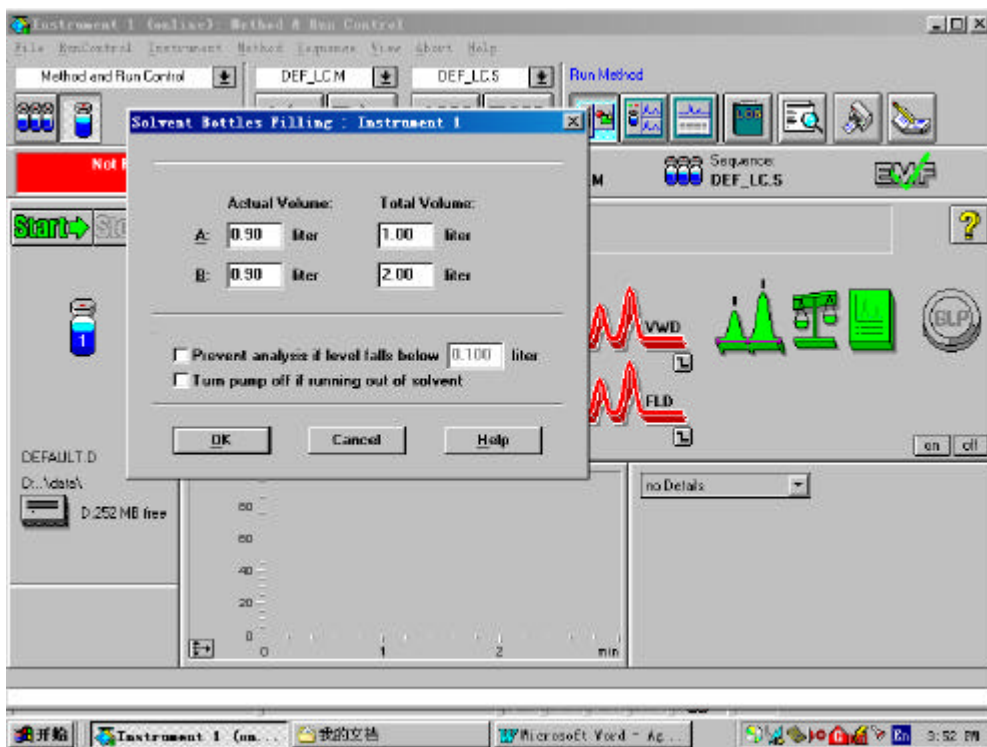
8、设Flow: 5ml/min，单击OK。

9、单击Pump图标，出现参数设定菜单，单击Pump control选项，选中On，单击OK，则系统开始Purge，直到管线内（由溶剂瓶到泵入口）无气泡为止，切换通道继续Purge，直到所有要用通道无气泡为止。

10、单击Pump图标，出现参数设定菜单，单击Pump Control选项，选中Off，单击Ok关系，关闭Purge valve。

11、单击Pump图标，出现参数设定菜单，单击Setup pump选项，进入Pump编辑画面，设Flow: 1.0ml/min。

12、单击泵下面的瓶图标，如图所示（以二元泵为例），输入溶剂的实际体积和瓶体积。也可输入停泵的体积。单击Ok。

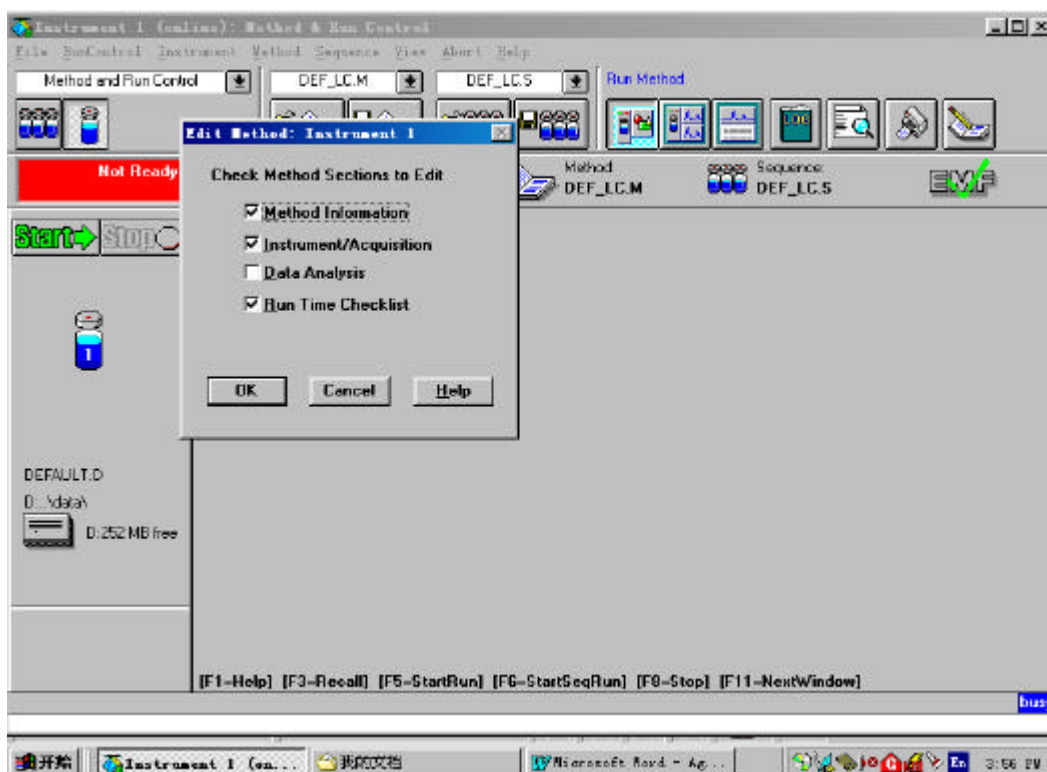


(二) 数据采集方法编辑:

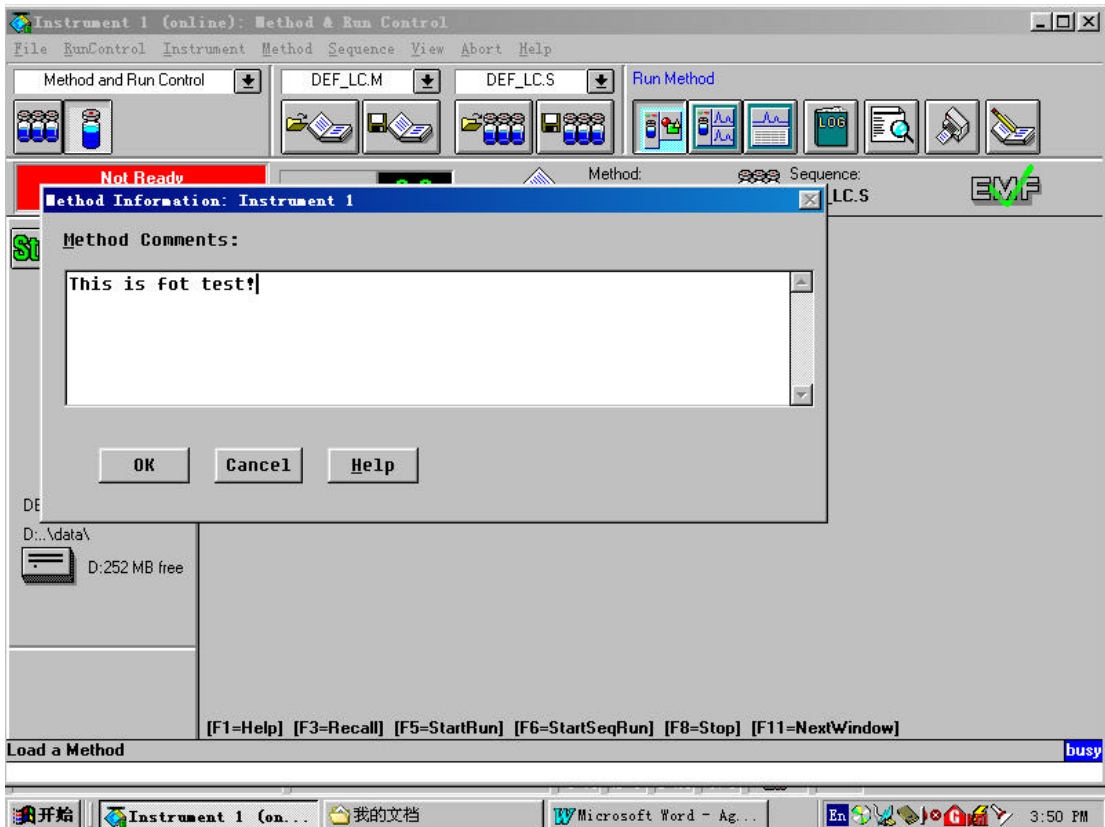
1、开始编辑完整方法:

● 从“Method”菜单中选择“Edit entire method”项，如上图所示选中除“Data analysis”外的三项，单击Ok，进入下一画面。

2、方法信息:

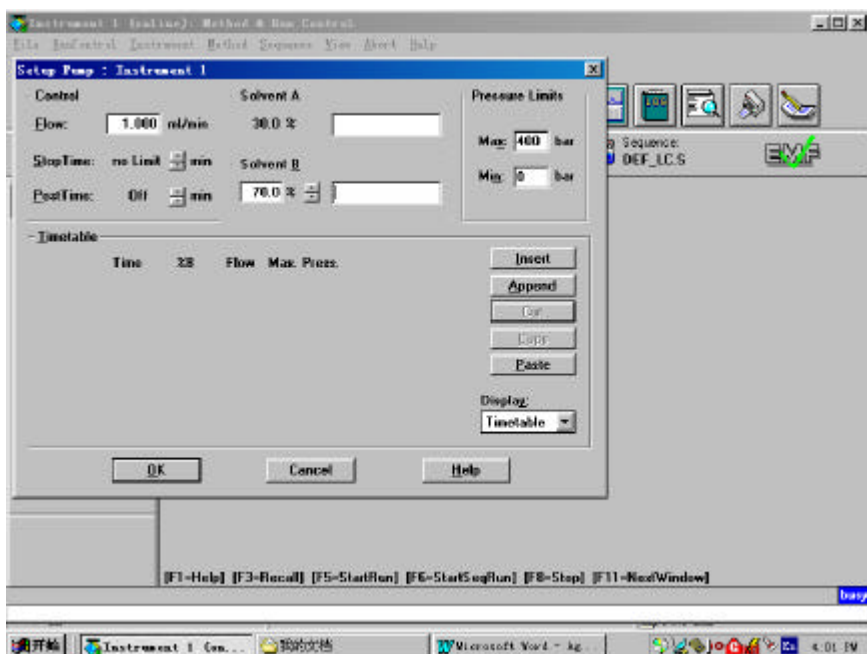


在“Method Comments”中加入方法的信息（如：方法的用途等）。单击Ok 进入下一画面。



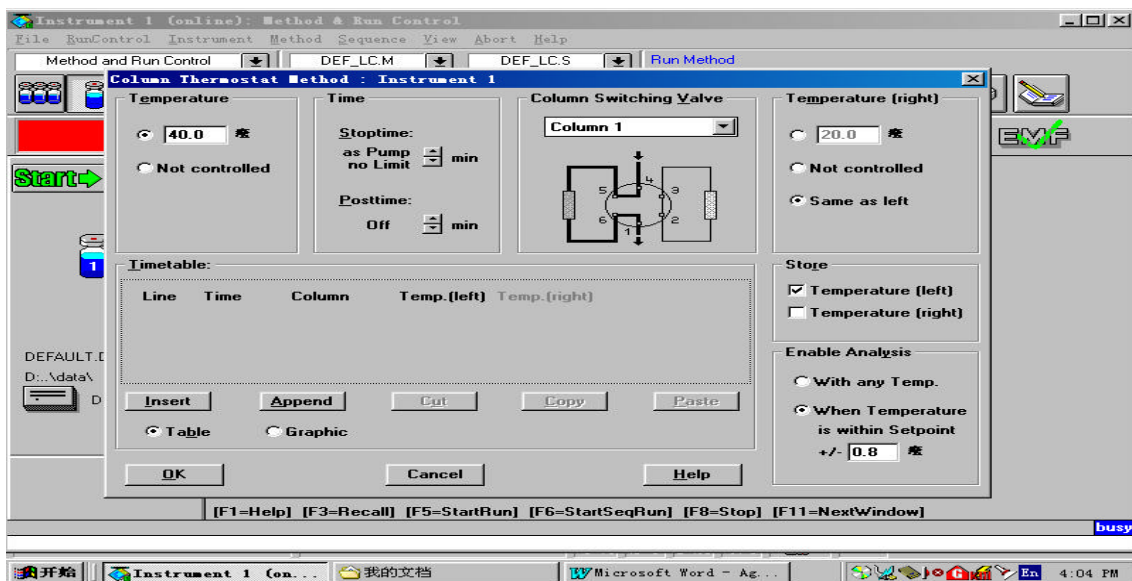
3、泵参数设定：（以二元泵为例）

- 在“Flow”处输入流量,如1ml/min, 在“Solvent B”处输入70.0,(A=100-B) ,也可Insert一行“Timetable”,编辑梯度。在“Pressure Limits Max”处输入柱子的最大耐高压,以保护柱子。
- 单击Ok进入下一画面。



4、自动进样器参数设定：

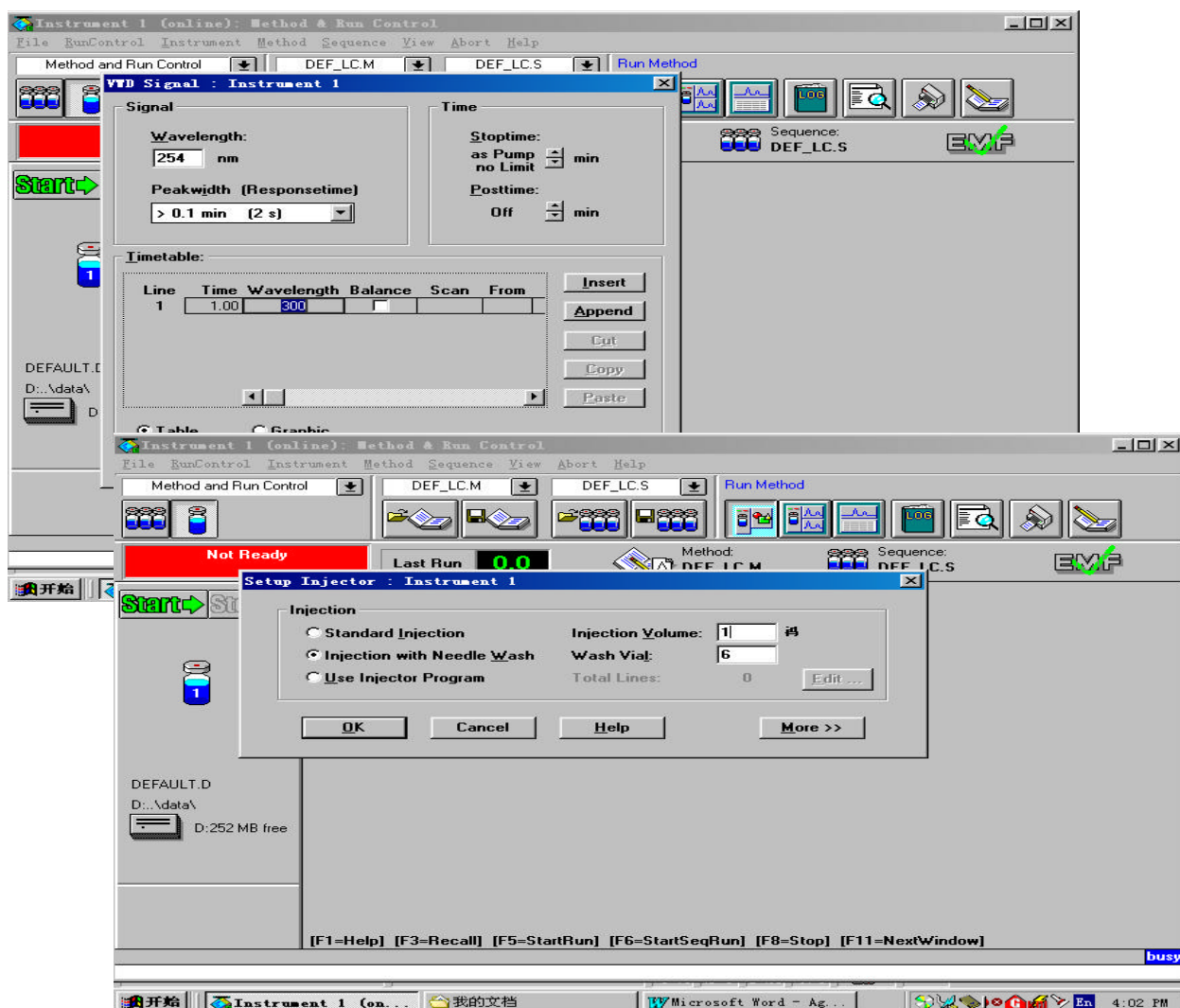
● 选择合适的进样方式， 如图所示，进样体积 1.0ul ,洗瓶位置为6号。“Standard Injection”----只能输入进样体积，此方式无洗针功能。“Injection with Needle Wash” ----可以输入进样体积和洗瓶位置，此方式针从样品瓶抽完样品后，会在洗瓶中洗针。“Use injector program” ---可以点击Edit 键进行进样程序编辑。
点击Ok进入下一画面。



5、柱温箱参数设定：

- 在"Temperature"下面的方框内输入所需温度,并选中它,点击"more>>"键,如图所示,选中"Same as left"---使柱温箱的温度左右一致。

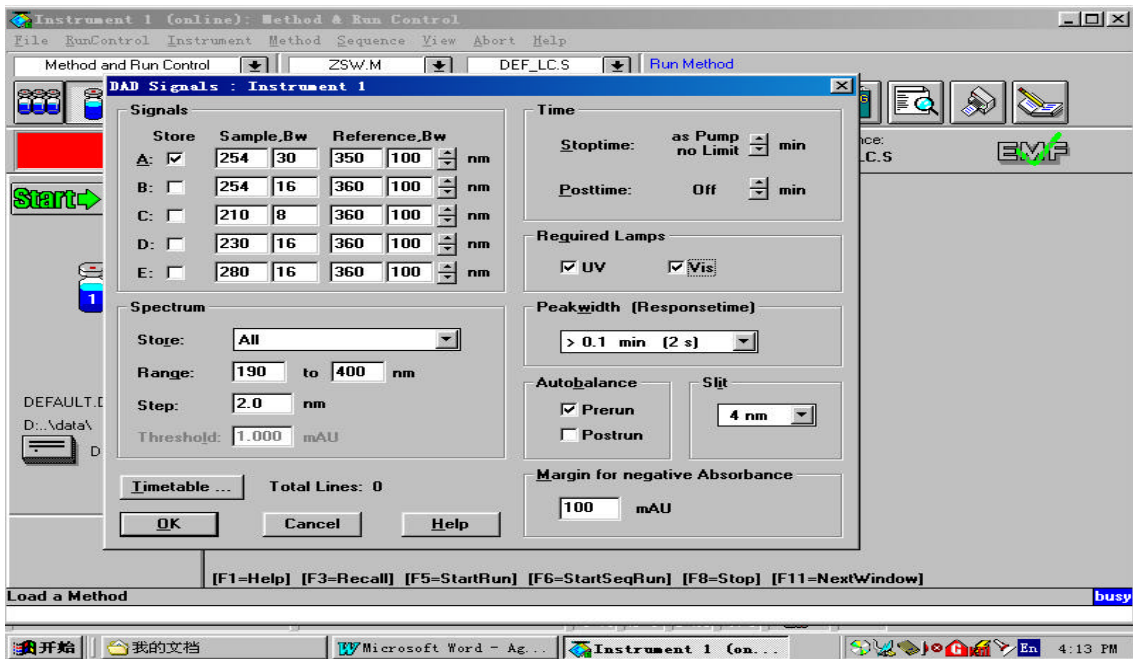
- 点击ok进入下一画面。



6、VWD检测器参数设定：

- 在"Wave length"下方的空白处输入所需的检测波长,如254nm, 在"Peak width (Response time)"下方点击下拉式三角框,选择合适的响应时间, 如>0.1min (2s)。

- 在Timetable 中可以 "Insert" 一行, 输入随时间切换的波长, 如1min , 波长=300nm。点击ok进入下一画面。

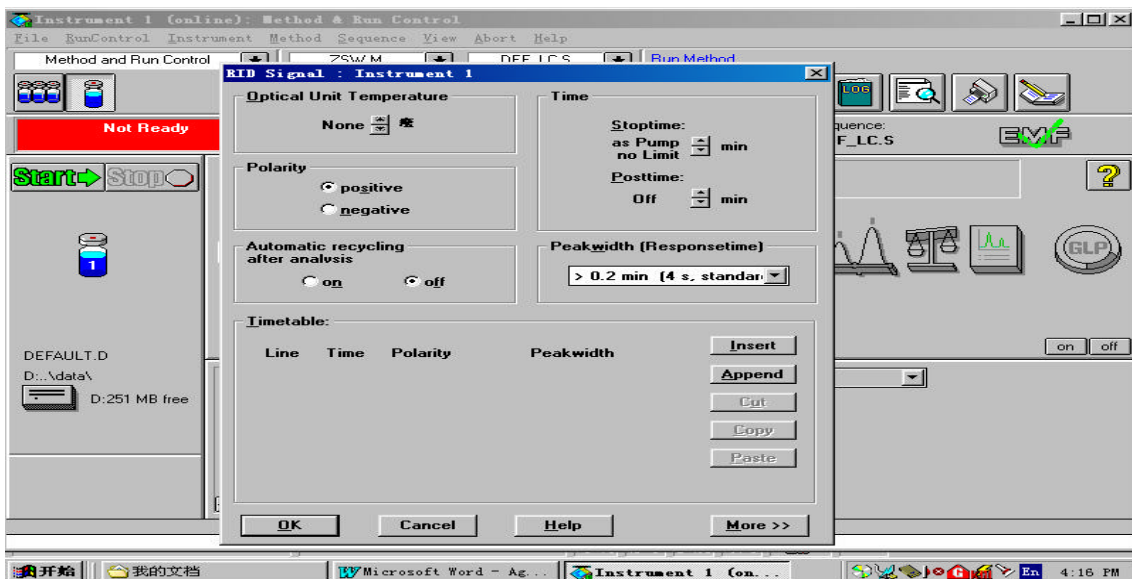


7、DAD检测器参数设定：

- 色谱条件：

流动相：75%ACN,25%水； 进样量：5ul； 检测波长：254nm, BW=30nm, 参比波长=350nm, BW=100nm； 柱温：30℃； 流量：1ml/min； 停止时间：出峰完毕。

- 样品波长 -- 一般选择最大吸收处的波长。 样品带宽BW — 一般选择最大吸收值一半处的整个宽度，BW↑，Noise↑。 参比波长 — 一般选择在靠近样品信号的无吸收或低吸收区域。 参比带宽BW — 至少要与样品信号的带宽相等，许多情况下用100nm作为缺省值。 Peak width (Response time)：其值尽可能接近要测的窄峰峰宽。 Slit — 狭缝窄，光谱分辨率高；宽时，噪音低。同时可以输入采集光谱方式，步长，范围，阈值。选中所用的灯。 ● 点击Ok进入下一画面。



8、RID检测器参数设定：

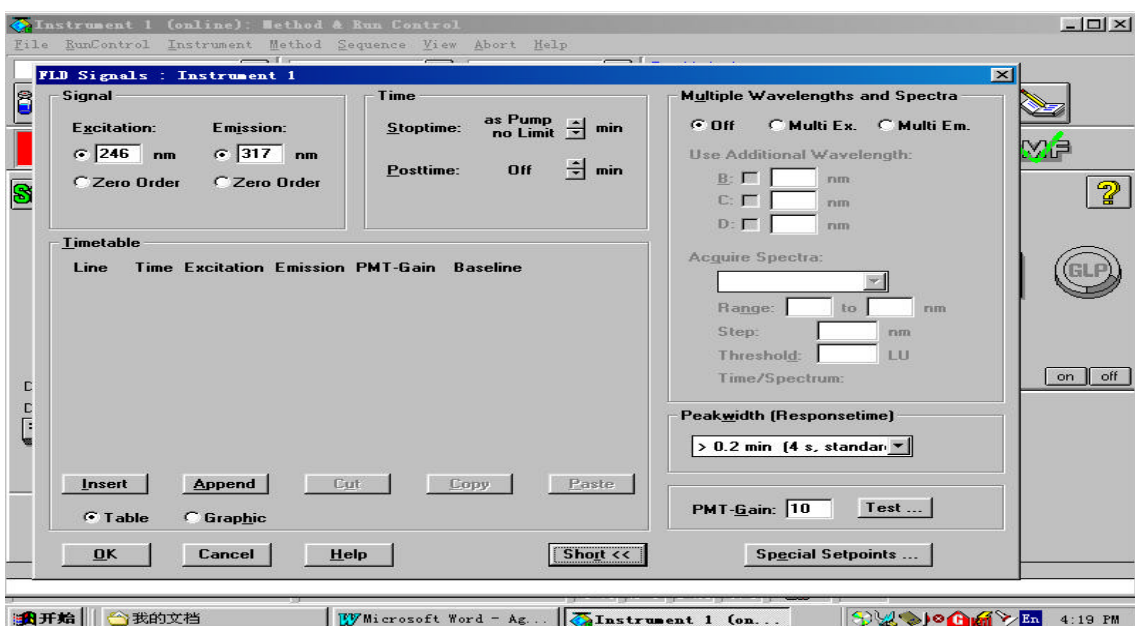
● 色谱条件：

进样体积：20ul 。 光学单元温度： Off 。

极性：正 。 峰宽(响应时间)： 4s 。

● 如图所示：“Optical Unit Temperature”---若环境温度控制在±2℃,设定为Off,若环境温度不稳定,则设定光学单元温度为高于环境温度5度,以防样品在池中沉淀。“Peak width” ---大多数分析设为4S,只有在高速分析下设为更短。“Automatic recycling after analysis” ---在不进行分析时可以让流动相循环,节省流动相,检测器连续运行,可随时投入使用。

● ***** 点击RID图标,选择RID Control : Heater 设为On,若要循环流动相,必须将“Recycling Valve”设为ON。手动purge

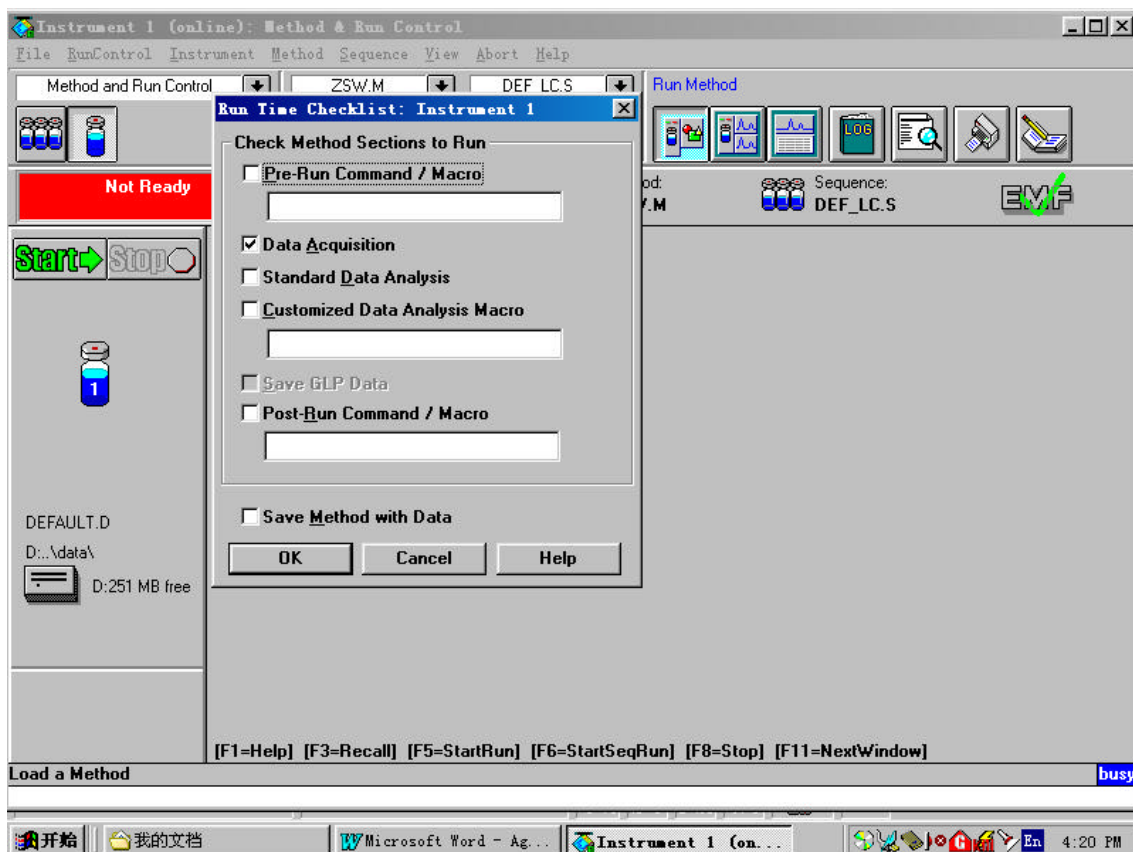


参比池,将其设为On,并输入Purge 时间。 点击Ok,进入下一FLD画面。

9、 FLD检测器参数设定：

色谱条件：

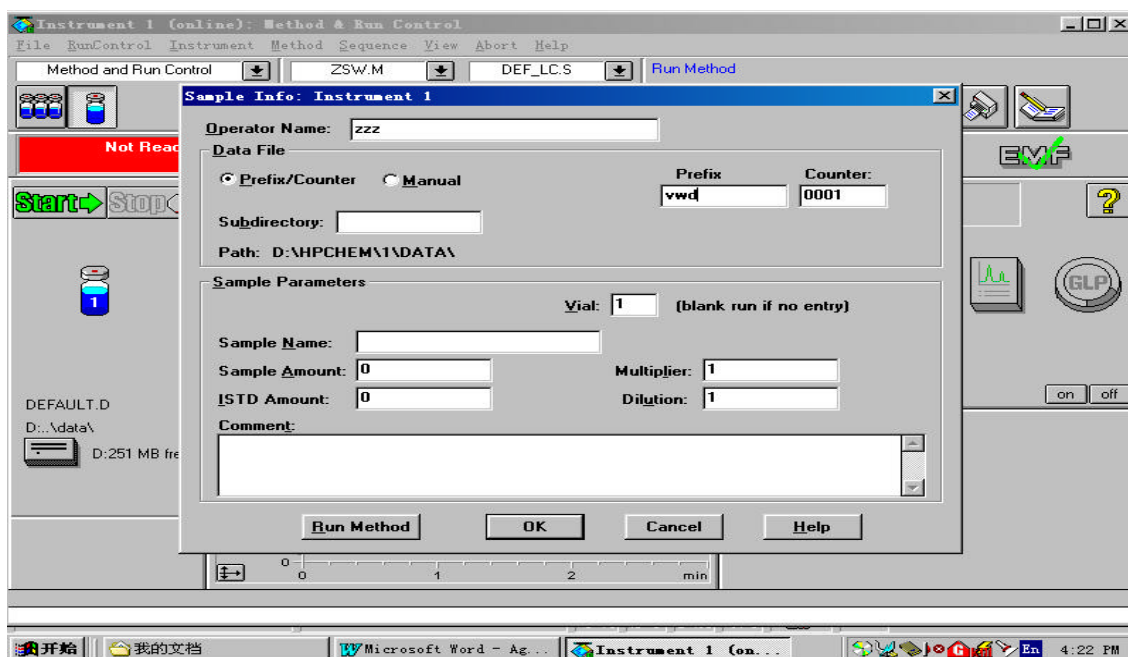
- 样品： P/N 01018-68704 用甲醇稀释为1:10。
- 进样体积： 5ul。
- 柱温箱： 30℃ 。 EX=246nm, EM=317nm ,PMT=10。
- 响应时间=4s。 停止时间： 出峰完毕。
- Excitation A: 激发波长:200-700nm,步长为1nm,或Zero Order。
- Emission: 发射波长: 280-900nm, 步长为1nm,或Zero Order。
- PMT: 大多数应用适当的设定值为10,若高浓度样品峰被切平头,则减少 PMT 值。
- “Peak width”: 大多数应用设为4s,只有快速分析采用小的设定值。
- Multi Ex : 多波长及光谱(激发)。
- Multi Em: 多波长及光谱(发射)。
- 同时可以输入范围Range、步长step、采集光谱。



10、在“Run time checklist”中选中“Data acquisition”，单击Ok。

11、单击“Method”菜单，选中“Save method as”，输入一方法名，如“test”，单击Ok。

12、从菜单“View”中选中“Online signal”，选中Windows 1,然后单击Change按钮,将所要绘图的信号移到右边的框中,点击Ok。(如同时检测二个信号,则重复12,选中Windows 2)。



13、从“Run

control

”菜单中选择“Sample

info”选项，如上图所示，输入操作者名称，在“Data file”中选择“Manual”或“Prefix”。
区别： Manual--每次做样之前必须给出新名字，否则仪器会将上次的数据覆盖掉。 Prefix—
在Prefix 框中输入前缀，在Counter 框中输入计数器的起始位，仪器会自动命名，如vwd0001，vwd0002.....。

14、从Instrument 菜单选择System on。

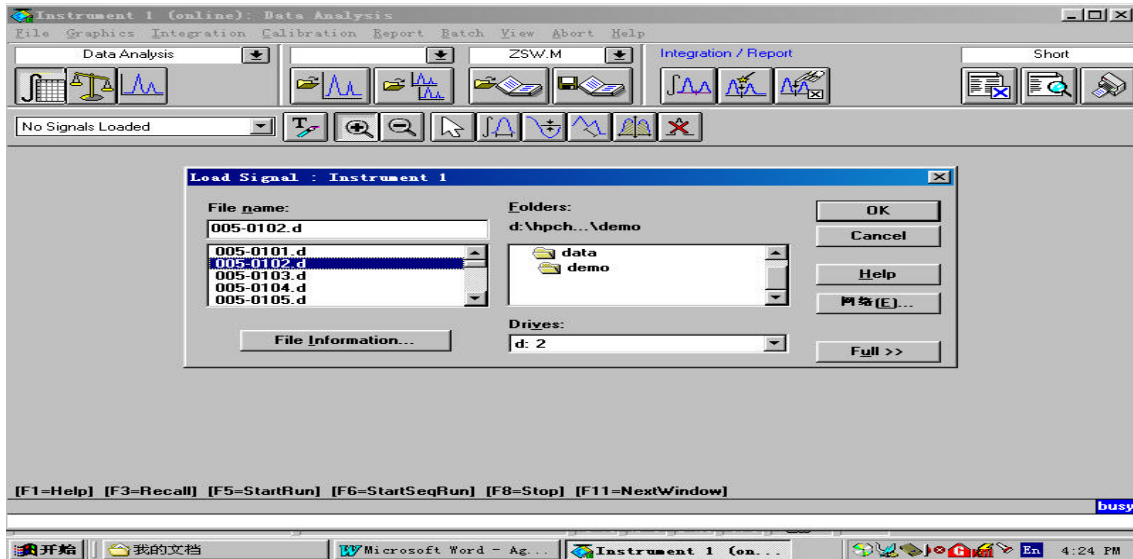
15、等仪器Ready，基线平稳，从Method菜单中选择“Run method”，进样。

(三)、数据分析方法编辑：

1、从“View”菜单中，单击“Data analysis”进入数据分析画面。

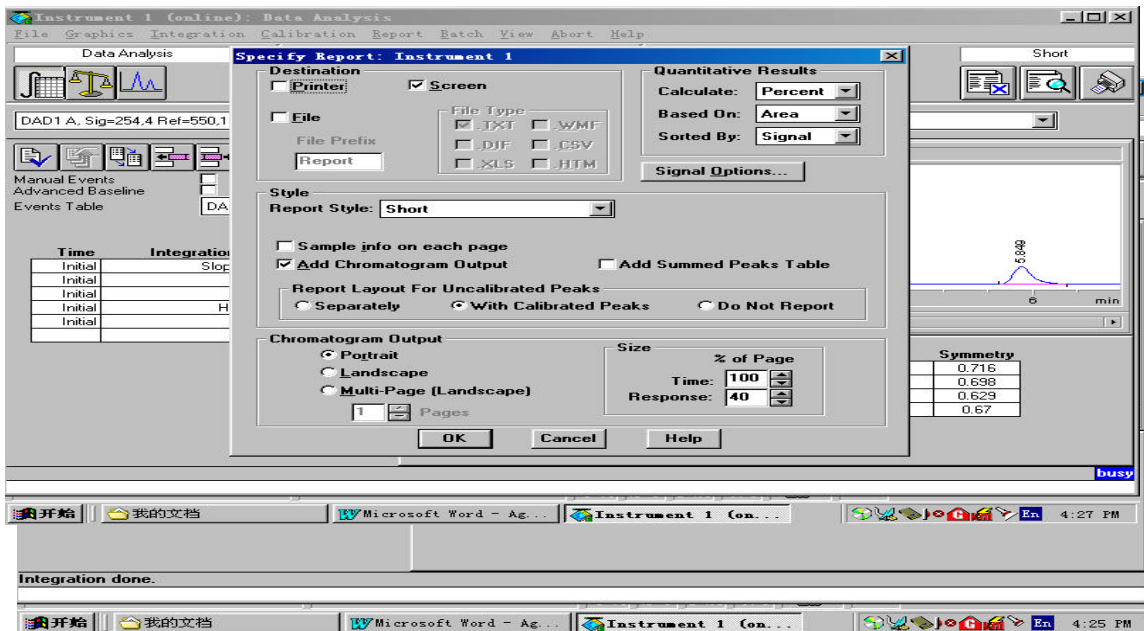
2、从“File”菜单选择“Load signal”，选中您的数据文件名，如下图所示。单击Ok。

- 做谱图优化,从“Graphics”菜单中选择“Signal options”选项,从Ranges中选择Auto scale及合适的显示时间,单击ok,或选择“Use Ranges”调整。反复进行,直到图的比例合适为止。



4、积分:

- 从“Integration”中选择“Auto integrate”,如积分结果不理想,再从菜单中选择“Integration Events”选项,选择合适的Slope sensitivity, Peak width, Area reject, Height reject.
- 从“Integration”菜单中选择“Integrate”选项,则数据被积分。
- 如积分结果不理想,则修改相应的积分参数,直到满意为止。



- 单击左边“√”图标,将积分参数存入方法。

5、打印报告:

- 从“Report”菜单中选择“Specify report”选项,进入如上画面。
- 单击“Quantitative Results”框中Calculate右侧的黑三角,选中Percent(面积百分比),其它选项不变。
- 单击Ok。
- 从“Report”菜单中选择“Print”

report”，则报告结果将打印到屏幕上，如想输出到打印机上，则单击Report底部的“Print”钮。

(四)、关机：

- 关机前，用100%的水冲洗系统20分钟，然后用有机溶剂冲洗系统10分钟（如ACN），然后关泵，（适于反相色谱柱）。[正相色谱柱用适当的溶剂冲洗]
- 退出化学工作站，及其它窗口，关闭计算机（用shut down关）。
- 关掉Agilent 1100电源开关。

(五)、Agilent 1100 LC维护保养：

- 1、色谱柱长时间不用，存放时，柱内应充满溶剂，两端封死（如ACN适于反相色谱柱，正相色谱柱用相应的有机相）
- 2、对于手动进样器，当使用缓冲溶液时，要用水冲洗进样口，同时搬动进样阀数次，每次数毫升。
 - *3、流动相使用前必须过滤，不要使用多日存放的蒸馏水（易长菌）。
 - *4、带seal-wash的1100，要配制90%水+10%异丙醇，以每分2—3滴的速度虹吸排出，溶剂不能干涸。
- 5、其它主意事项见说明书，或由现场工程师介绍。

维护知识

1、为什么溶剂和样品要过滤？

溶剂和样品过滤非常重要，它会对色谱柱、仪器起到保护作用，消除由于污染对分析结果的影响。

色谱柱：由于填料颗粒很细，色谱柱内腔很小，溶剂和样品中的细小颗粒会使色谱柱和毛细管容易堵塞。

仪器：溶剂和样品中的细小颗粒会增加进样阀的堵塞和磨损，同时也会增加泵头内的蓝宝石活塞杆和活塞的磨损。

样品过滤头的类型：

30mm内径：适用于大进样量的过滤，由0.2 μ m和0.45 μ m两种规格，材料有纤维素，醋酸纤维，聚四氟乙烯。处理样品体积少于50 μ l。

13mm内径：适用于范围广的过滤，由0.2 μ m和0.45 μ m两种规格，材料为纤维素。

3mm内径：适用于小进样量的过滤，由0.2 μ m和0.45 μ m两种规格。处理样品体积为7 μ l。

滤膜类型：

聚四氟乙烯滤膜：适用于所有溶剂，酸和盐，并无任何可溶物。

醋酸纤维滤膜：不适用于有机溶剂，特别适用于水基溶液，推荐用于蛋白质和其相关样品。

尼龙66滤膜：适用于绝大多数有机溶剂和水溶液，可用于强酸，

70%乙醇、二氯甲烷、不适用于二甲基甲酰胺。

再生纤维素滤膜：具有蛋白吸收低，同样适用水溶性样品和有机溶剂。

2、为什么HPLC用缓冲盐时要加在线Seal-wash选项？

HPLC用缓冲盐时，由于泵头内的缓冲盐溶液存在高压析盐现象，析出的细小盐粒非常坚硬，它附着在蓝宝石活塞杆上，随着蓝宝石活塞杆的往复运动，容易产生划痕，并磨损密封垫，造成漏液等故障现象。在线Seal-wash选项能有效的带走可能存在的缓冲盐结晶。缓冲盐的浓度在0.1mol或大于0.1mol时，必须使用该在线冲洗选项。

清洗液配制：

90%水+10%异丙醇。该混合液可抑制菌类生长和减小水的表面张力。以2-3滴/min的速度虹吸流下，不能干涸。

3、为什么Agilent 1100LC的流动相管路非常细？

在使用HPLC时，应特别注意“柱外效应”对分析结果的影响，由于样品分子在液体流动相中的扩散系数比在气体中小4~5个数量级，液体流动相的流速也比气相慢1-

2个数量级。因此，样品进入色谱柱后，在柱子以外的任何死体积（进样器、柱接头、连接管、检测器）中，样品分子的扩散和滞留，都会引起色谱峰的展宽，而使柱效降低

。为使柱外效应减之最小，获得理想的分析结果，Agilent 1100LC使用加工工艺难度高的毛细管线作为流动相管路。

毛细管线分类：0.17mm内径 -----绿色；0.12mm内径-----红色。

PEEK 管线：内径 -----0.13mm；0.18mm；0.25mm；0.5mm。

毛细管线优点：柔韧性好。

***Agilent 公司同时备有1/16in

的粗外径毛细管线，适用于不同习惯的用户

，优点是刚性好，但柔韧性差一些。

4、流动相使用前为什么要脱气？

流动相使用前必须进行脱气处理

，以除去其中溶解的气体（如O₂），以防止在洗脱过程中当流动相由色谱柱流至检测器时，因压力降低而产生气泡。气泡会增加基线的噪音，造成灵敏度下降，甚至无法分析。溶解的氧气还会导致样品中某些组份被氧化，柱中固定相发生降解而改变柱的分离性能。若用FLD，可能会造成荧光猝灭。

常用的脱气方法比较:

氦气脱气法: 利用液体中氦气的溶解度比空气低, 连续吹氦脱气, 效果较好, 但成本高。

加热回流法: 效果较好, 但操作复杂, 且有挥发性污染。

抽真空脱气法: 易抽走有机相。

超声脱气法: 流动相放在超声波容器中, 用超声波振荡10-15min, 此法效果最差。

在线真空脱气法: Agilent 1100LC真空脱机利用膜渗透技术,

在线脱气, 智能控制, 无需额外操作, 成本低, 脱气效果明显优于以上几种方法, 并适用于多元溶剂体系。

5、如何防止溶剂瓶内溶剂过滤器的堵塞, 以及堵塞后的处理?

溶剂的质量或污染以及藻类的生长会堵塞溶剂过滤器, 从而影响泵的运行, 尤其水溶液或磷酸盐缓冲液 (PH=4—7)。以下几种方法可以有效防止溶剂瓶内溶剂过滤器的堵塞。

A: 请严格执行溶剂过滤。

B: 请勿使用多日存放的蒸馏水及磷酸盐缓冲液

C: 如果应用许可, 可在溶剂中加入0.0001---0.001M的叠氮化钠。

D: 在溶剂瓶内溶剂的上方小流量连续吹氦气, 以隔绝空气。

E: 避免使溶剂瓶暴露在直射阳光下, 尽量使用琥珀色的溶剂瓶盛放水溶液或磷酸盐缓冲液。

堵塞后的处理方法:

将过滤头从组件中取下, 在浓硝酸 (35%) 中浸泡1h, 然后用二次蒸馏水冲洗干净并超声处理。

6、 Agilent 1100LC泵如何维护?

Agilent

1100LC泵给色谱柱提供稳定、无脉动、流量准确的流动相, 及时合理的维护非常重要。

A: 流动相使用前请务必脱气、过滤。

B: 使用缓冲盐时, 要加在线Seal-wash选项。

C: 关机前, 用

100%的水冲洗系统20分钟, 然后用有机溶剂冲洗系统10分钟 (如甲醇), 然后关泵, (适于反相色谱柱)。[正相色谱柱用适当的溶剂冲洗]

D: 及时更换Purge Valve内的过滤芯。(当打开Purge Valve时, 压力高于10bar, 表明过滤芯已堵)。E: 使用合适的密封圈。

7、 如何选择合适的泵头活塞密封圈?

泵头活塞的标准密封圈能适合于大多数应用, 但使用正相溶剂 (如正己烷), 不适合使用标准活塞密封圈, 特别是长时间使用时, 需更换另一种不同的密封圈, 我们建议使用聚四氟乙烯密封圈。(p/n0905-1420 2/pk)

***注意: 聚四氟乙烯密封圈的的压力范围为: 0—

200bar; 建议在泵的压力限制中, 将最大压力设为200bar。

8、 使用梯度比例发时要注意那些事项?

当盐溶液与有机溶剂溶液混合时，盐溶液能与有机溶剂溶液完全混溶，而不会出现沉淀。但是在比例阀的混合点，重力作用使盐颗粒沉淀下来，通常，阀A接水相/盐溶液，D接有机溶剂，此法连接可有效使盐回落到盐溶液中，并被溶解。若颠倒过来，盐可能落在有机溶剂中，出现问题。

强烈建议：当使用缓冲盐溶液和有机溶剂时，推荐将缓冲盐通道接在A通道上，有机溶剂通道直接接在A通道的上方D通道上；定期用水冲洗所有的通道，以除去阀口上可能出现的盐沉淀。

9、在线真空脱气机使用要注意那些事项？

一般来说，Agilent

1100LC

的真空脱气机无需过多维护，只需注意几个注意事项就可以了。

A: 第一次使用，要用随仪器附带的注射器抽满脱气机腔体；更换不同类型的溶剂时，要先抽空，再抽满。

B: 不用的通道要充满溶剂或密闭起来。

10、更换色谱柱时要注意什么事项？

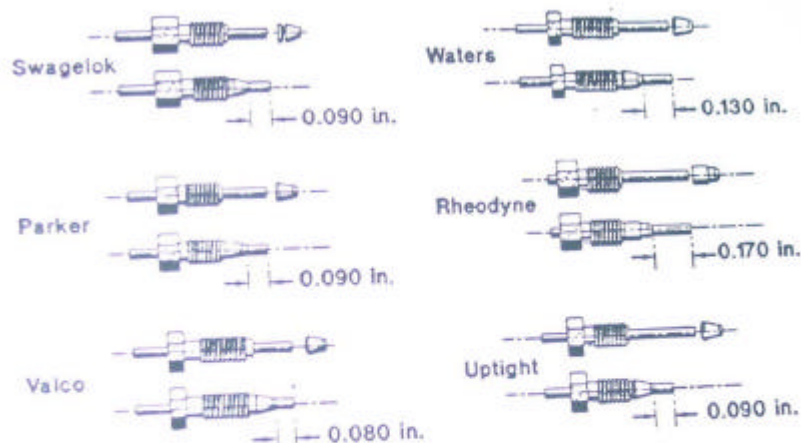
在使用HPLC时，应特别注意“柱外效应”对分析结果的影响，由于样品分子在液体流动相中的扩散系数比在气体中小4~5个数量级，液体流动相的流速也比气相慢1-

2个数量级。因此，样品进入色谱柱后，在柱子以外的任何死体积（进样器、柱接头、连接管、检测器）中，样品分子的扩散和滞留，都会引起色谱峰的展宽，而使柱效降低

。为使柱外效应减之最小，获得理想的分析结果，仪器的流动相管路连接非常重要，一般Agilent 1100LC

在第一次安装时，均有受过专业培训的安装工程师负责安装，各种接头会处理的非常完美。客户只需在更换色谱柱时注意接头处理就可以了，一般柱子入口接头为不锈钢卡套接头，柱子出口为不锈钢卡套接头或PEEK管线手拧街头，当完成第一次安张后，不锈钢卡套已固定死，当接不同的柱子时，要注意柱子接头处的形状和长度，否则会产生一个非常大的死体积。

下面是不同厂家柱子接头的形状和长度，请参考：



11、手动进样阀需做那些维护，使用时要注意什么？

对于手动进样器，当使用缓冲溶液后，或者进浓度差异比较大的样品时要用专用工具而不是用带针头的注射器冲洗进样口，同时搬动进样阀数次，每次数毫升。

注意事项：

A: 安装时六通阀的5, 6出口要与注射器在同一水平线上，以防止虹吸现象的发生，导致进样量的重复性变异。

B: 进样量的多少要根据定量管的LOOP体积决定。

当样品量少时：进样体积由注射器的进样体积决定，但最大进样体积要小于1/2loop体积。

当样品量较多时：进样体积由定量管的体积决定，为保证样品完全把定量管的流动相置换干净，需注射5—6倍的LOOP体积。

C: 要使用专用的液相注射器进样，绝对不可以用气相的注射器。