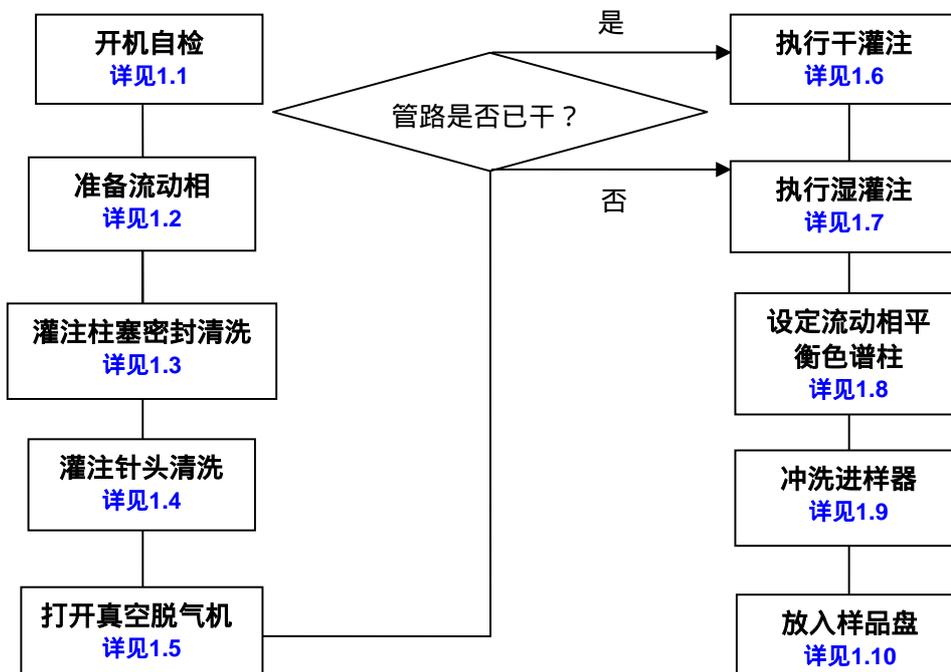


Waters 2695-2489 HPLC系统 操作规程



2695-2489系统的标准化操作规程

一、 开机及准备系统



二、 实验

打开计算机，运行Empower软件，选择存放数据文件的Project，运行Run Samples；按件中的Develop Methods按钮，建立仪器方法,并保存至方法组；按Monitor按钮，观察基线，待基线平稳，可准备进样。

三、 关机

实验结束后，退出Run Samples界面，退出Empower2软件，关闭检测器电源；然后依次进行以下操作：

1. 清洗色谱柱约60分钟（详见附录一）
2. 灌注柱塞密封，清洗1分钟（详见1.3）
3. 灌注针头清洗2次（详见1.4）
4. 冲洗进样器（详见1.9，对于缓冲盐或离子对试验，建议用50%乙腈：50%水冲洗进样器）
5. 降低流速至0，待系统压力回零后，关闭2695电源。关闭计算机及显示器电源。

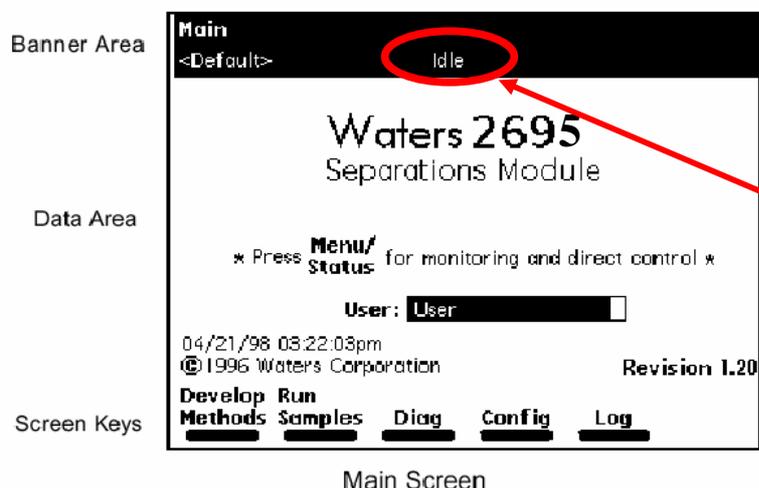
2695 系统速查表

WET PRIME 参数	溶剂	WET PRIME 时系统压力/ system psi				WET PRIME 时压力波动/Delta psi		
		典型值	允许范围	低于 10	超出该范围	典型值	允许范围	超出该范围
7.5mL/min	乙腈	80	500	清洗单向阀阀芯 ^a 和吸滤头 ^b ；或排气不充分，继续湿灌注	清洗在线过滤器筛板 ^b	9	40	清洗单向阀阀芯 ^a 和吸滤头 ^b ；或排气不充分，继续湿灌注
	甲醇	110				10		
	水	198				12		
	缓冲盐	210				13		

注：
^a清洗单向阀：单向阀（共两个）先放在超纯水中超声10分钟，再放在甲醇中超声10分钟。
^b清洗在线过滤器或吸滤头：将在线过滤器拆下，取出筛板，用30% H₃PO₄水溶液超声清洗20分钟，纯水反复超声清洗至清洗后的水pH值呈中性，然后用甲醇超声清洗10分钟。

1.1 开机 (Powering On)

1. 打开Alliance 2695和2489 的电源开关至 ON (1) 的位置，仪器开始进行自检。
2. 仪器将进行大约5分钟的自检过程，待仪器自我测试完毕后，出现以下画面，画面上方的状态显示区会出现“Idle” 状态，表示开机测试正常。



当此处显示“Idle”即“空闲”时，表明仪器处于待命状态，可以用仪器面板上的按键来控制仪器。

当此处显示“Remote”即“远程控制”时，表明仪器处于 Empower 软件控制，则仪器面板上的按键无效。

操作画面说明:

Banner Area：当前仪器状态显示区。

Data Area：操作画面显示区，可分为两大功能画面，可利用面板的Menu / Status键进行切换。

Screen Keys（屏幕功能键）

菜单 (Menu) 画面下：

Screen Keys（屏幕功能键）如下：

- Develop Method：编辑、修改、删除仪器方法。
- Run Sample：执行样品注射、仪器分析条件。
- Diag：诊断维护仪器。
- Config：设置仪器系统装置。
- Log：查询仪器使用记录。

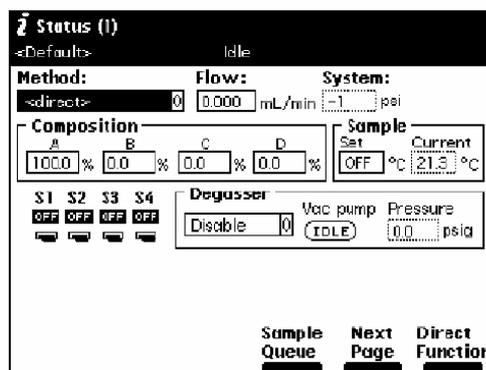


Log：又称“日志”，是仪器的使用记录。这是一个非常有用的工具，在这里可以查到仪器的开关机时间、错误的使用记录等有用的信息！

Status / Control 画面下：

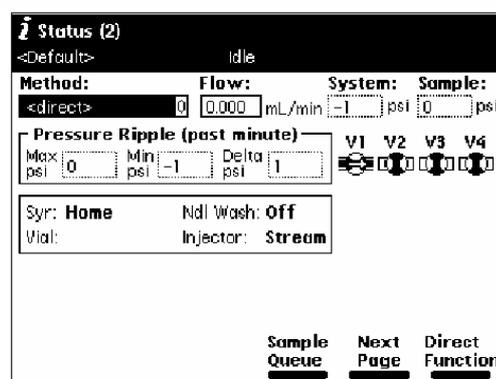
(1) Status(1)画面

- 脱气装置(Degasser)的开启
- 仪器流速(Flow Rate)的设定
- 溶剂比例(Solvent Composition)的设定



(2) Status (2)画面

- 显示仪器内部工作状态，如系统与注射器压力、压力变化(Delta psi)、阀门运转状态



说明：按“Next Page”键，可进行Status (1)与Status (2)画面切换。

1.2 准备溶剂瓶(Preparing Solvent Reservoirs)

- 必须用色谱纯有机溶剂(最好选择进口品牌)，水或缓冲盐溶液要用超纯水(18.2MΩ)；
- 水相流动相需要每隔48小时重新配制，特别是100% 含水流动相的使用时间不得超过两天；
- 首先要检查6根管子是否在液面下，**必须确保6根管子全部插到溶剂瓶的底部**；
- 溶剂瓶液面必须高于溶剂混合阀(Gradient Proportioning Valve)的位置；而洗针液的溶剂瓶应放于试验台面上，与2695仪器底部位于同一水平面上；
- 清洗柱塞密封垫(Seal Wash)的溶液配制：含5%-10%甲醇的超纯水
- 洗针液 (Needle Wash) 的配制：50%甲醇：50%水（该比例仅适用于反相实验）

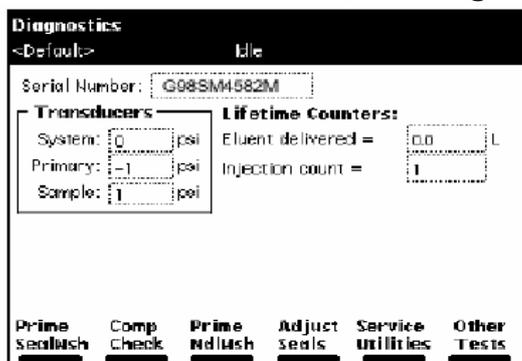
* 特别提示:

- 玻璃容器必须使用超纯水清洗；
- 所有溶剂和溶液在使用前必须用0.45μ m的滤膜过滤，并超声脱气1分钟；
- 用洁净的玻璃容器盛放溶液和流动相，避免污染

1.3 灌注柱塞密封清洗泵 (Priming the Plunger Seal Wash Pump)

操作步骤：

1. 回到Menu 画面，选择Diag。



2. 确定Seal Wash的管路放在正确的位置。
3. 按**Prime Seal Wash**，再按**Start**，直到清洗溶剂流出泵杆密封圈冲洗废液管，按**Halt**。
4. 按Close。

注意：

密封圈清洗(Seal wash)的溶液，在反相液相色谱中可使用90%水/10%甲醇或者使用95%水/5%乙腈(体积比，根据实际需要进行选择)。

1.4 灌注针头清洗泵 (Prime the Needle Wash Pump)

操作目的：

- 防止执行样品进样时的交叉污染。
- 当流动相为缓冲液或样品在注射针头内，延长进样器密封圈(Injector Seal)使用寿命。

溶剂的选择：

- 根据样品及流动相的化学特性来作选择。
- 若为浓度较高的样品需要较强的溶剂来清洗。
- 不同的色谱实验，所建议使用的清洗溶剂如下表：

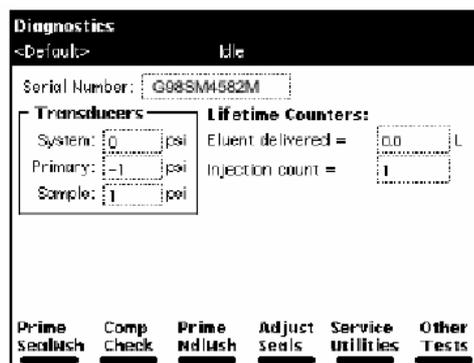
色谱条件	洗针液
反相缓冲溶液	50% 水，50% 甲醇
反相非缓冲溶液	100% 甲醇

注意：

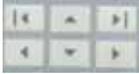
若上述清洗溶剂无法避免进样时的交叉污染，请用较强的溶剂系统进行清洗。洗针液的溶剂瓶应放于试验台面上，与2695仪器的底部同一水平面上。

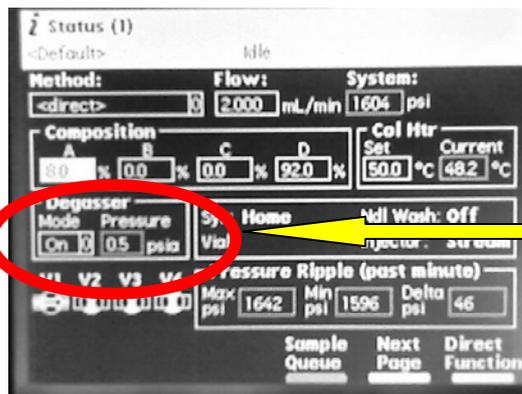
操作步骤：

1. 回到Main 的画面，选择Diag，选择**Prime Ndl Wash**。
2. 缺省设定值为30 秒，若想要多清洗几次时，请按**Start Again**。



1.5 打开真空脱气机 (Degasser)

1. 按“Menu/Status”键，进入Status (1)画面。
2. 利用方向键  将光标移至“Degasser”位置，按Enter。
3. 利用上下键  选择模式为ON，如下图所示：



真空脱气机degasser的模式mode调至ON

注意：
在开启真空脱气机时，要确认所有溶剂管路都充满溶剂；若没有溶剂时请执行溶剂的Dry Prime 操作。

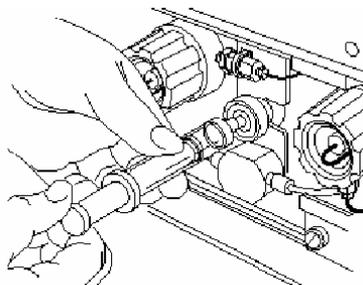
1.6 执行干灌注 (Dry Prime)

何时进行Dry Prime ?

当溶剂的管子是空的时候，或不小心中走干溶剂的时候。

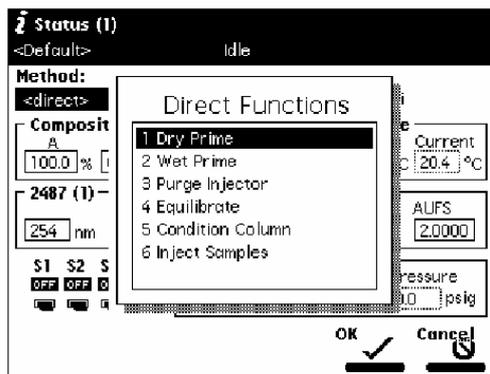
操作步骤：

1. 首先检查确认流动相溶剂的管子在正确的位置，检测器(Detector)废液管及定量环 (Sample Loop) 的废液管置于合适的废液容器中。
2. 摇动溶剂瓶内的过滤器(Solvent Filter)，防止气泡附着在过滤器表面。
3. 将空的针筒插入抽液阀 (Prime/Vent valve) 中，打开抽液阀(以逆时针的方向将抽液阀旋转3 圈)。



4. 按“Menu/Status”键，进入Status (1)画面，按“Direct Function”功能键，选择Dry

Prime , 按Enter。



5. 按下欲使用的溶剂开启阀门(例如:Open A), 然后将针筒向外拉, 抽出约5~10mL溶剂并完全抽出溶剂管子内的气泡, 完成后关闭Prime/Vent 阀门。



6. 在“Enter a duration”中输入3分钟, 按“Continue”键, 泵即以3.0mL/min的流速进行清洗 (Purge)。
7. 重复上述步骤, 对所有要使用的流动相溶剂进行Dry Prime。

1.7 执行湿灌注 (Wet Prime)

何时执行Wet Prime ?

当需要排除气泡时。

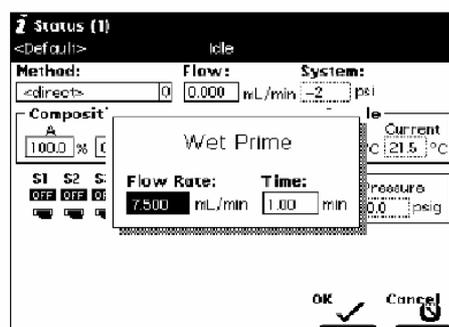
操作步骤 :

1. 按“Menu/Status”键, 进入Status (1)画面, 利用方向键将光标移至“Composition”字段, 将欲Wet Prime 的溶剂输入100%。

2. 按“Direct Function”功能键, 选择

Wet Prime, 按Enter。

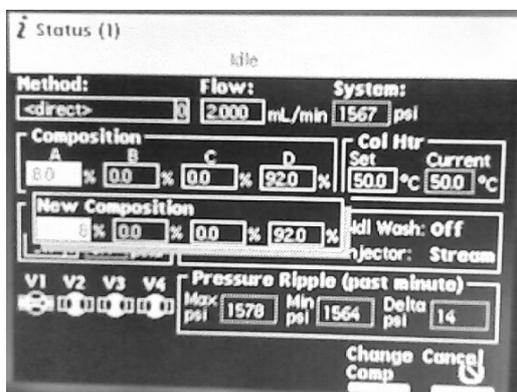
Wet Prime 的设定值, 一般为Flow Rate : 7.5mL/min , Time: 3.0min , 然后按下“OK”键, 泵即开始进行Wet Prime 操作。



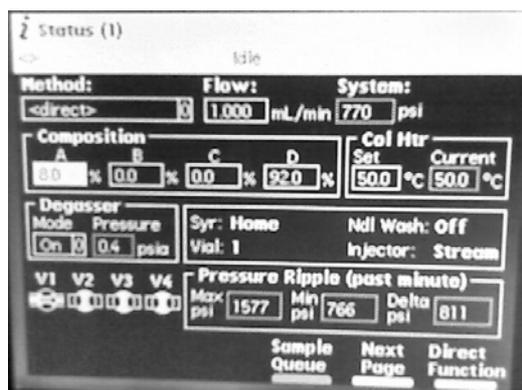
3. 重复上述的步骤直到对所有溶剂的Wet Prime执行完毕。

1.8 设定流动相条件来平衡色谱柱

1. 按“Menu/Status”键，进入Status (1)画面，利用方向键将光标移至“Composition”字段，利用仪器面板右侧的数字键设置试验要求的溶剂组成比例，此时会在原溶剂比例表的下方出现新编辑溶剂比例表（New Composition），如下图所示：



2. 设定好新的溶剂组成比例后，按“Change Comp”功能键（即改变溶剂组成比例 change composition），新设定的溶剂组成比例即确定为当前的比例。



3. 利用方向键将光标移至“Flow”字段，利用仪器面板右侧的数字键设定流速，此时仪器即用设定的溶剂组成比例和流速来平衡色谱柱。

*特别提示:

常规的反相色谱条件约需要20~30倍柱体积的流动相来平衡色谱柱；对于离子对方法，可能需要多达500倍柱体积的流动相来平衡色谱柱。

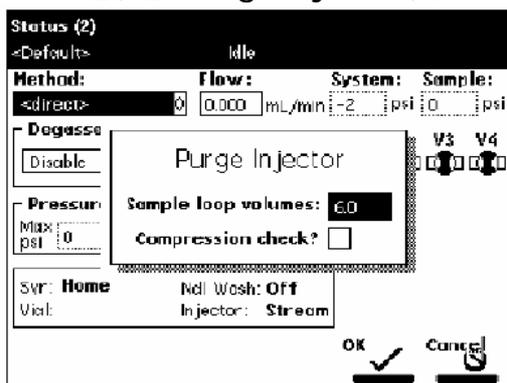
1.9. 冲洗进样器 (Purge Injector)

何时执行？

- 改变溶剂时。
- 发现注射器及其管路内有气泡时。
- 每天开机和关机的时候。

操作步骤：

1. 按“Menu/Status”键，进入Status (1)画面，在设定溶剂的画面中设定适当的流速与溶剂比例（针对缓冲盐或离子对试验，建议设定50%乙腈：50%水的溶剂来冲洗进样器）。
2. 按“Direct Function”键，选择Purge Injector，按Enter。



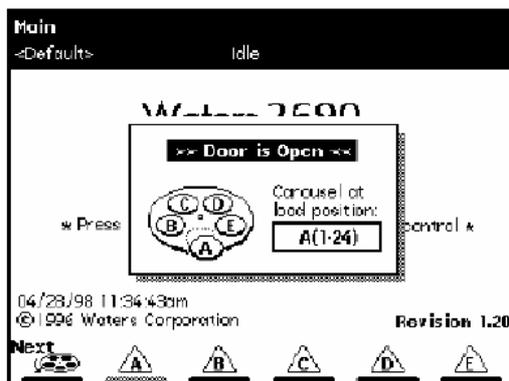
3. 输入Sample Loop 体积清洗的倍数(原定值为6 倍)，按Enter。
4. 压缩测试(Compression Check)请先不需要测试，设定完成后按OK。

1.10. 装载样品转盘 (Loading Carousels)

样品盘的颜色及编号如下

代号	颜色	编号
A	蓝色	1 - 24
B	黄色	25 - 48
C	红色	49 - 72
D	绿色	73 - 96
E	白色	97 - 120

- 打开样品管理器门，放入样品盘。



- 若要换下一个样品盘时请按Next。
- 将样品瓶放入样品盘内，并记录各瓶号名称。
- 当所有样品盘都放入时，关起舱门转盘会自动定位。

附录一 反相色谱柱的使用注意事项

新色谱柱的安装和平衡

使用新色谱柱前需要对色谱柱进行润湿和平衡，**注意确保您所使用的流动相和色谱柱储存溶剂“相溶”**。Symmetry/Sunfire 反相色谱柱是在 100%乙腈中储存的。

- a) 依次用水和乙腈（或甲醇）冲洗液相色谱泵系统中含有缓冲盐的流路，然后将色谱柱按照标签上的箭头方向连接到进样器或保护柱的出口端，标签上的箭头指向检测器流向（先不要接检测器）
- b) 在 0.1ml/min 流速条件下用 100%纯甲醇或乙腈冲洗色谱柱，然后在 5 分钟内将流速升至 1 ml/min。
- c) 当溶液均匀地从柱子出口流出时，停掉流速，将色谱柱出口端接到检测器上（这样操作可以避免气泡进入检测系统，并且可快速达到基线平衡）
- d) 按照步骤 b) 的方法逐渐提高流速
- e) 当压力达到稳定值并且基线平稳后，缓慢降低流速，停泵
- f) 用 5：95 乙腈：水（体积比）冲洗色谱柱 30 分钟【注意流速要从 0.1 ml/min 缓慢上升至 1 ml/min】
- g) 换上含有离子对试剂的流动相，对色谱柱进行平衡，直到基线平稳
- h) 进标准溶液和样品溶液进行分析

注意：

- 至少用 10 倍柱体积的流动相平衡色谱柱直到基线平稳（例如：250×4.6mm 的色谱柱柱体积为 4.2 ml，以 1 ml/min 流速需要平衡 42 分钟）。如果流动相含有离子对试剂，则需要更长的时间进行色谱柱平衡。
- 当改变流动相时，请将新流动相的流速缓慢升高（最好每次 0.1ml/min 的升幅）

说明：

- 色谱柱放置一段时间不用后重新使用时，需要重新平衡色谱柱。
- 请定期监测色谱柱的柱效（测试方法：70%乙腈/水，254nm，进样二氢萘进行分析）

色谱柱清洗建议（针对仪器 24 小时运行的情况）

每 8 个小时后，将流动相中乙腈的比例升高至 60%冲洗色谱柱 45 分钟（此时不需要将含有离子对的缓冲盐溶液换成水，保持柱温 45 度）。

每 24 个小时后，对色谱柱进行彻底清洗，先用 5：95 乙腈：水（体积比）冲洗色谱柱 30 分钟，然后用纯乙腈冲洗 60 分钟。

色谱柱的再生

- 保留时间漂移或者分离度发生变化往往说明色谱柱被污染了，用纯有机溶剂（乙腈或甲醇）冲洗色谱柱通常可以洗去污染物。
- 根据样品的干净程度定期更换保护柱，压力逐渐增加或者出现分叉峰往往表明需要更换保护柱了。如果保护柱更换后问题依然存在，说明色谱柱被强吸附的污染物堵塞，这时需要选择合适的溶剂来溶解这些污染物，比如，变性蛋白可以通过反复几次进 200µl DMSO 来清洗。
- 如果上述方法还是不能解决问题，可以换用一系列疏水性逐渐增强的溶剂来清洗色谱柱。更换溶剂的顺序可以为：水 - 四氢呋喃 - 二氯甲烷 - 四氢呋喃 - 水。

色谱柱的保存

避免将色谱柱在含有缓冲盐的流动相中保存，如果流动相中含有缓冲盐，应该先用 10 倍柱体积的 HPLC 级超纯水（18 MΩ）冲洗，然后用 100%乙腈冲洗保存，并注意将色谱柱两端完全密封，以避免柱子“干涸”。

附录二 液相色谱工作中常见问题解答（共 2 页）

问题	可能原因	解决办法
压力高	<ol style="list-style-type: none"> 1. 温度太低 2. 流速太高 3. 流动相粘度大 4. 仪器或管路堵塞 5. 压力传感器出现问题 6. 柱前在线过滤片或保护柱 7. 色谱柱堵塞 <ol style="list-style-type: none"> A) 流动相中盐浓度过高，与纯溶剂相遇析出 B) 样品溶液和流动相不互溶造成样品析出 	<ol style="list-style-type: none"> 1、升高温度（如 35-40 柱温）可以降低压力 2、注意色谱柱内径减小的时候应当降低体积流速 3、检查所用流动相溶剂是否正确（如错将甲醇用成了乙腈） 4、分段排查，对清洗堵塞部位（如盐堵塞，需用高比例水冲洗） 5、取下色谱柱后观测压力，如果压力还高，则需要更换压力传感器或联系 800 - 820 - 2676 6、更换在线过滤片或保护柱 7、清洗或更换色谱柱 <ol style="list-style-type: none"> A) 检查流动相中各组分是否兼容，是否有盐析出的情况；对于含缓冲盐的流动相，避免直接切换到高比例甲醇或乙腈体系 B) 检查样品溶液是否和流动相互溶，是否有样品在流动相中析出；
压力不稳 (1-5 项依次进行排查)	<ol style="list-style-type: none"> 1. 泵排气操作不充分 2. 流动相没有正确进行脱气处理 3. 所用流动相溶剂不互溶或易挥发 4. 溶剂瓶内的吸滤头部分堵塞 5. 压力传感器问题 	<ol style="list-style-type: none"> 1、对各个管路进行灌注 2、检查在线脱气机是否打开，或脱气包是否漏液 3、检查缓冲盐的称样量是否正确，缓冲盐是否混合均匀；流动相中各成分是否互溶 4、清洗吸滤头(用 30%磷酸,水,甲醇超声) 5、更换,或联系 800-820-2676
压力低 或没有压力	<ol style="list-style-type: none"> 1. 泵关闭 2. 流速太低 3. 所用溶剂不正确 4. 温度太高 	<ol style="list-style-type: none"> 1、打开泵 2、设定合适的流速，一般为 1.0ml/min 3、流动相是不是用错了（甲醇用成了乙腈） 4、设定柱温 35-40

	<p>5.泵输液流速不正确（泵失效）</p> <p>6.泵未输送溶剂：</p> <p>A).储液瓶内无溶剂</p> <p>B).溶剂入口过滤头堵塞</p> <p>C).泵没有正确排气</p> <p>D).入口管路中有空气</p> <p>7.自动进样器在冲洗（PURGE）时被卡住</p> <p>8.泵保险丝断了</p> <p>9.系统内有泄漏</p>	<p>5、测定各个管路的流量是否正确</p> <p>6、</p> <p>A).补加正确的溶剂，并超声脱气（水相过膜）</p> <p>B).过滤头取下清洗(用 30%磷酸,水,甲醇超声)</p> <p>C).做干灌注</p> <p>D).做湿灌注</p> <p>7、清洗进样器，查看进样器针管是否输液</p> <p>8、更换保险丝</p> <p>9、分段检查，更换泄漏部件</p>
保留时间改变、峰形差、柱效下降	<p>1.色谱柱被污染</p> <p>2.偏酸或中性条件下键合相流失</p> <p>3.色谱柱在高 pH 条件下发生溶解</p>	<p>1.根据污染物的特性清洗色谱柱（参考色谱柱部分）</p> <p>2.选择合适的色谱柱进行偏酸流动相条件的分析，如 Sunfire 或 XBridge 色谱柱</p> <p>3.硅胶基质色谱柱耐受的 pH 范围是 2 ~ 8，请选择杂化颗粒技术的色谱柱进行中至高 pH 分离条件</p>
所有色谱峰分叉、变形	色谱柱柱头塌陷，填料颗粒溶解	更换色谱柱，选择杂化颗粒技术色谱柱

附录三 2695 系统状态监控表（用户填写）

检测项目	色谱柱				流动相		系统压力 psi	压力波动 psi
	品牌	尺寸	粒径 μm	柱温	组成	流速 mL/min		
例：三聚氰胺	Sunfire C18	3.9*150mm	5	40	10%乙腈:90% 10mM 辛烷磺酸钠	1	950	50
注：若系统压力过大，清洗色谱柱。 若系统压力过小，分段查漏。 若压力波动大于 50psi，清洗单向阀阀芯和吸滤头（详见《2695 系统速查表》注释）								

建议将本页作为仪器状态检查表，放在仪器旁边，每天检查表中的项目，并做好记录和维护工作使系统处于最佳状态！