Waters 2695-2489 HPLC系统 操作规程





2695-2489系统的标准化操作规程

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;按软件中的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	WET 溶剂		PRIME 时系统压力/ system psi		WET PRIME 时压力波动/Delta psi			
参数		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	清洗单向 阀阀芯 ^a 和 吸滤头 ^b ; 或排气不 充分 ,继续 湿灌注	清洗单向 阀阀芯 ^a 和 吸滤头 ^b ;	清洗在线过 滤器筛板 ^b	9	清洗 阀芯 40 滤头 气不	<mark>清洗单向阀</mark>
	甲醇	110				10		阀芯 ^a 和吸 滤头 ^b ;或排 气不充分,
	水	198		或排气不		12		
	缓冲盐	210			13		继续湿灌注	

<u>注</u>:

^а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。

Banner Area	Main <default> Idle</default>	
	Waters 2695 Separations Module	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。
Data Area	* Press Menu/ for monitoring and direct control * User: User	▲ 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。
	04/21/98 03:22:03pm © 1996 Waters Corporation Revision 1.20	
Screen Keys	Develop Run Methods Samples Diag Config Log	

Main Screen

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。

Main <default></default>	Idle	
	Waters 2 Separations I	695 Module
* Press S	1enu/ t atus for monitorir	ng and direct control *
	User: User	
04/21/98 03:2 © 1996 Waters	2:03pm © Corporation	Revision 1.29
Develop Run Methods Sam	ples Diag Co	mfig Log

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 (1)			
<default></default>	idle		
Method:	Flow:	System:	
	0 0.000 mL	L/min -1pei	
- Compositio	n	Sample	٦l
A 100.0 % 0.0		D Set Current 0 % OFF °C 21.3 °C	
<u>\$1</u> \$2 \$3	S4 Degasser	Vac numn. Pressure	
	Disable		
	Sa Qu	ample Next Direct Jueue Page Functi	on

- (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

🧵 Status (2)			
<default></default>	Idle		
Method:	Flow:	System:	Sample:
<direct></direct>	0 0.000 mL/min	-1 psi	0 psi
Pressure I Max psi 0	Ripple (past minute) — Min Delta psi psi	V1 V2 ■©■□	V3 V4 10101010
Syr: Home Vial:	Ndi Wash: Off Injector: Stream]	
]	
	Samp le Queue	Next Page	Direct Function

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0.45µm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 。				
Diagnostics <default> Idle</default>				
Serial Number: G98SM4582M				
Transducers Lifetime Counters: System: 0 csi Eluent delivered = 0 L	2.	确定Seal Wash的管路放在正确的位置。		
Primary: <u>-1</u> pai Injection count = <u>1</u> Sample: <u>1</u> pai	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。		
Prime Comp Prime Adjust Service Other Seallish Check Ndlush Seals utilities Tests	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:

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

Diagnostics <default></default>		ldle		
Serial Numb Transdue System: [] Primary: [] Sample: []	er: G98SM ers) psi -1 psi pei	4582M Lifetime Cour Eluent delivere Injection count	nters: d = =	
Prime C SealWsh C	omp Prin heck Ndl	ne Adjust Jsh Seals	Service O Utilities T	ther es 1s

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:

Idle System: Verbault> Flow: System: verbault> 1604 psi composition Contract Contract A C D Set So % 0.0 % 920 Set	
Made Pressure On 0 05 psia Vial Vial Vial Max 1642 Mpi 1596 Delta 46 Sample Next Direct Queue Page Function	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;若没有溶剂的 的Dry Prime 操作。	寸请执行溶剂

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,或不小心走干溶剂的时候。

操作步骤:

- 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 value)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:

- 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%.
- 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。

Ž Status (1)			
<default></default>	Idle		
Method:	Flow:	System:	
<direct></direct>	0 0.000 m	L/min _2P	si
Composit'		-	le Current
100.0 % [Wet Pr	ime	C <u>21.5</u> °C
SI S2 S Dia Dia Dia	Flow Rate:	Time:	ressure
	7.500 mL/min	<u>1.00</u> min	0.0 psig
			1
		°К 🗸	Cancel

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

 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。

Ž Status (1)		
0	tile .	
Nethod:	Flow:	System:
<drect></drect>	0 <u>1.000</u> mL/min	770 psi
A B	C D	Set Current
	00 % 920 %	500 °C 500 °C
Mode Pressure	Syr: Home	Ndl Wash: Off
On 10 0.4 psia	Vial: 1	Injector: Stream
VI V2 V3 V4	Pressure Ripple	(past minute)
Sin na na a	psi 1577 psi 7	66 psi 811
	Sample	Next Direct
the second se	A STATISTICS OF	The second se

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。



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
В	黄色	25 – 48
С	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。

Main						
<pre>>Uef duits</pre>	Idle					
M-1 2500						
×× Door is Open ≺∗						
* Press	Corcusel at bod position: A(1·24) corr	rol *				
04/28/98 11:34:43am @1996 Waters Corporation Revision 1.20						
Next	<u>A</u> <u>B</u> <u>A</u> <u>D</u>	Ê				

- 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,<mark>注意确保您所使用的流动相和色谱柱储</mark>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,进样二氢苊进行分析)

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	1.温度太低	1、升高温度(如 35-40 柱温)可以降低压力			
	2.流速太高	2、注意色谱柱内径减小的时候应当降低体积流速			
	3.流动相粘度大	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.仪器或管路堵塞	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.压力传感器出现问题	5、取下色谱柱后观测压力,如果压力还高,则需要更换压力传题			
	6.柱前在线过滤片或保护柱	或联系 800 - 820 - 2676			
	7.色谱柱堵塞	6、更换在线过滤片或保护柱			
	A)流动相中盐浓度过高,与纯溶剂相遇析出	7、清洗或更换色谱柱			
	B)样品溶液和流动相不互溶造成样品析出	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.泵排气操作不充分	1、对各个管路进行灌注			
(1-5 项依次进行排查)	2.流动相没有正确进行脱气处理	2、检查在线脱气机是否打开,或脱气包是否漏液			
	3.所用流动相溶剂不互溶或易挥发	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.溶剂瓶内的吸滤头部分堵塞	4、清洗吸滤头(用 30%磷酸,水,甲醇超声)			
	5.压力传感器问题	5、更换,或联系 800-820-2676			
压力低	1. 泵关闭	1、打开泵			
或没有压力	2.流速太低	2、设定合适的流速 , 一般为 1.0ml/min			
	3.所用溶剂不正确	3、流动相是不是用错了(甲醇用成了乙腈)			
	4. 温度太高	4、设定柱温 35-40			

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

	色谱柱			流动相			压力波力		
检测项目	品牌	尺寸	粒径 µm	柱温	组成	流速 mL/min	系统压力 psi	psi	
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。									
- 石永统広力辺小,力校亘澜。 若压力波动大干 50psi . 清洗单向阀阀芯和吸滤头(详见《2695 系统速查表》注释)									
「中国」(中国)、「PU」(中国)、「PU」(中国)、「PU」(中国)、「PU」(中国)、「PU」(中国)、「PU」(PU)、「PU)、									

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!