

Agilent 1200 LC

现场培训教材

安捷伦科技有限公司
生命科学与化学分析仪器部

一、 培训目的:

- 基本了解1200LC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 1200LC

- G1310A : (单元泵); G1312A, G1312B XL(二元泵); G1311A(四元泵)。
- G1329A (标准型自动进样器)。
- G1316A, G1316B XL (柱温箱)。
- G1314B, G1314C XL (VWD检测器)。
- G1362A (示差检测器)。
- G1315B, G1315C XL (DAD检测器)。
- G1365B, G1365C XL (MWD检测器)。
- G1321A (FLD检测器)。
- 色谱柱: Zorbax Eclipse XDB-C18 150 x 4.6 mm, 5um column
P/N 993967-902 /5063-6600

2、 溶剂准备:

- 色谱级纯或优级纯乙腈或甲醇。
- 二次蒸馏水



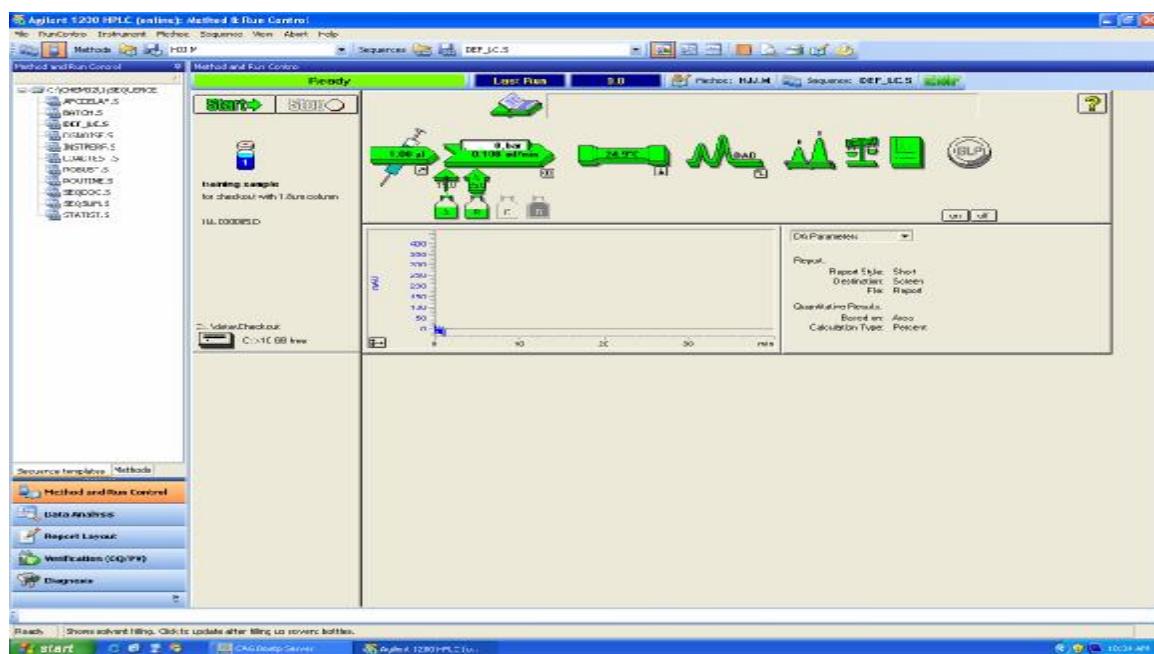
基本操作步骤：

(一)、开机：

1、打开计算机,进入Windows 2000 (或Windows XP) 画面。(IP 地址由Bootp Service 程序写入)

2、打开 1200 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1200LC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, 点击”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、点击“Pump”图标, 点击“Setup pump”选项, 进入泵编辑画面。

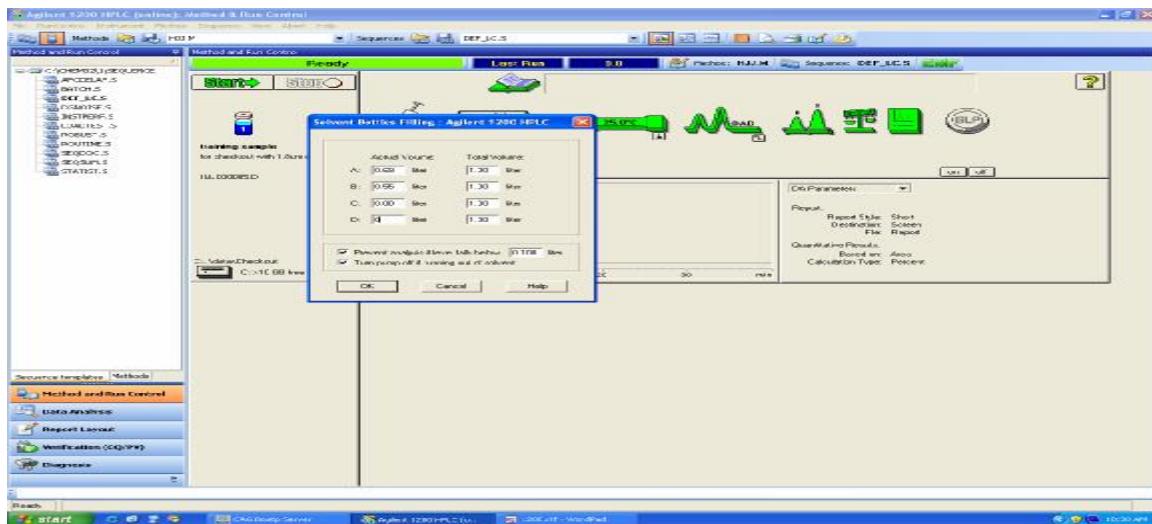
8、设Flow: 3-5ml/min, 点击“OK”。

9、点击“ Pump ”图标, 点击“Pump control”选项, 选中“On”, 点击“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、点击“Pump”图标，点击“Pump Control”选项，选中“Off”，点击“Ok”关闭Purge valve。

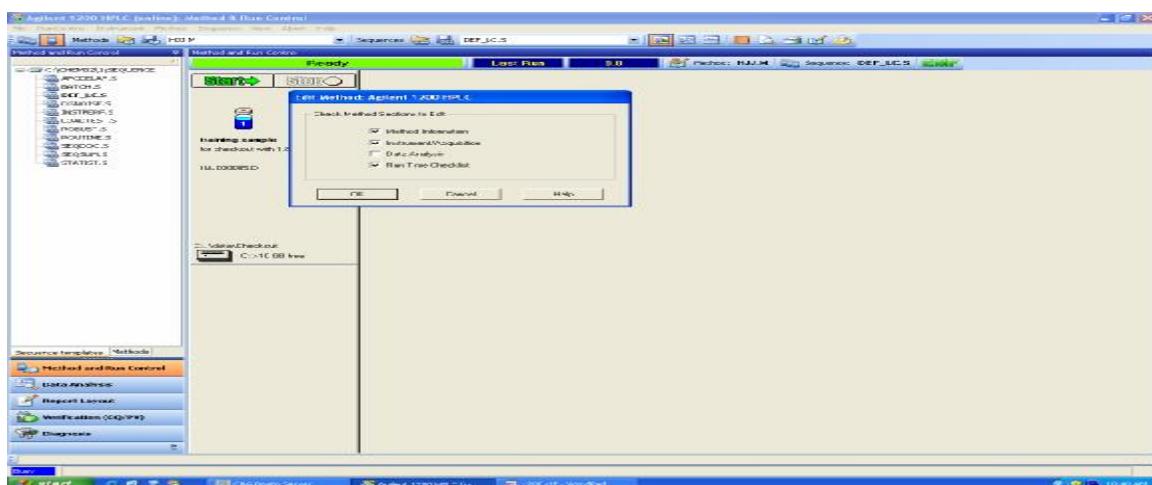
11、点击“Pump”图标，点击“Setup pump”选项，设Flow: 1.5ml/min。

12、点击泵下面的瓶图标，如下图所示（以四元泵为例），输入溶剂的实际体积和瓶体积。也可输入停泵的体积。点击“Ok”。



（二）数据采集方法编辑：

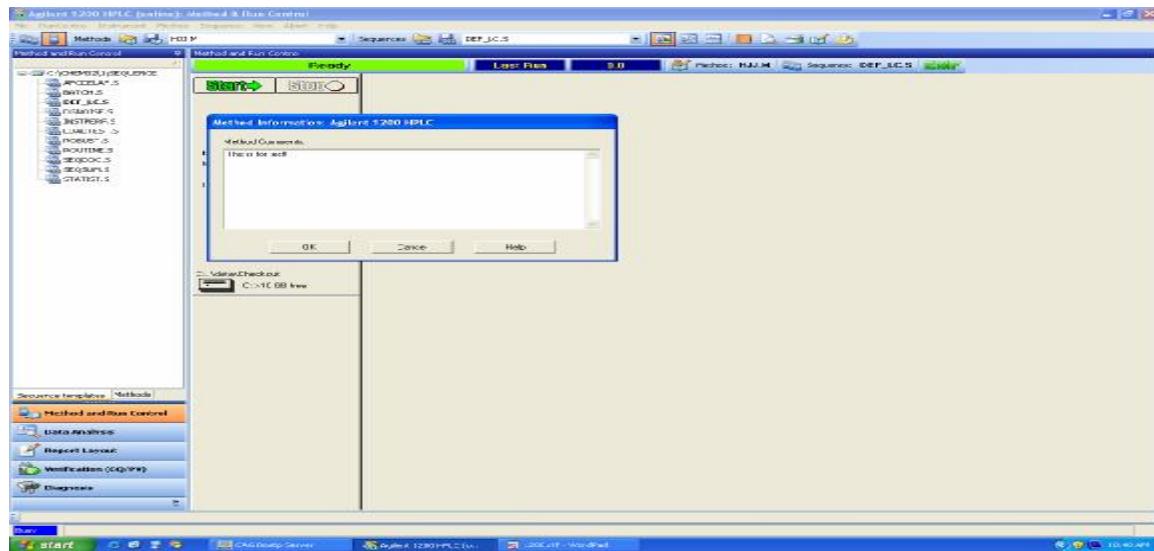
1、开始编辑完整方法：



- 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，点击“Ok”，进入下一画面。

2、方法信息:

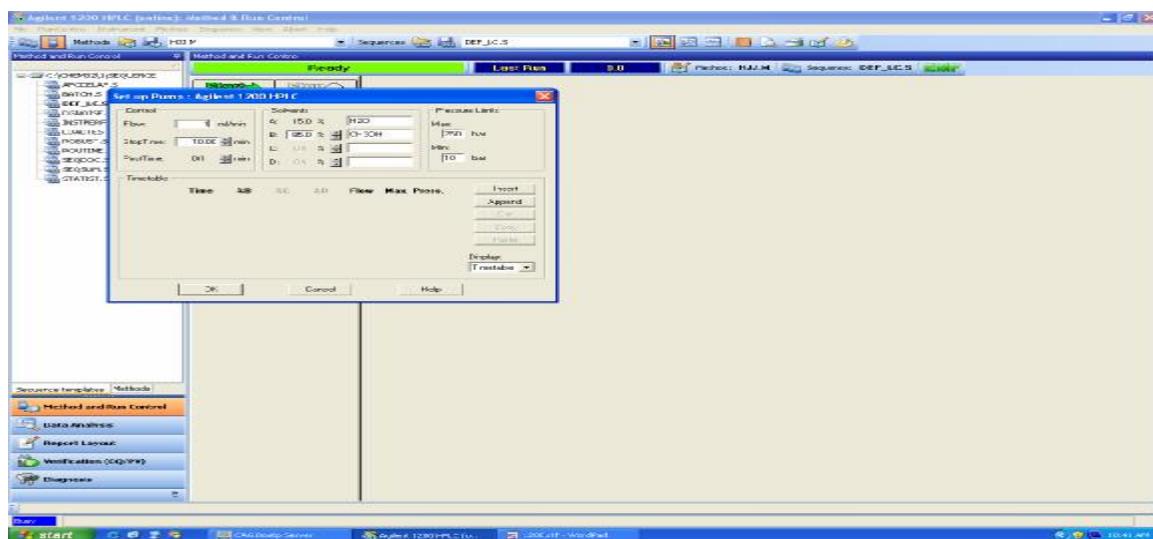
- 在“Method Comments”中写入方法的信息（如: This is for test!）。
- 点击“Ok”进入下一画面。



3、泵参数设定: (以四元泵为例)

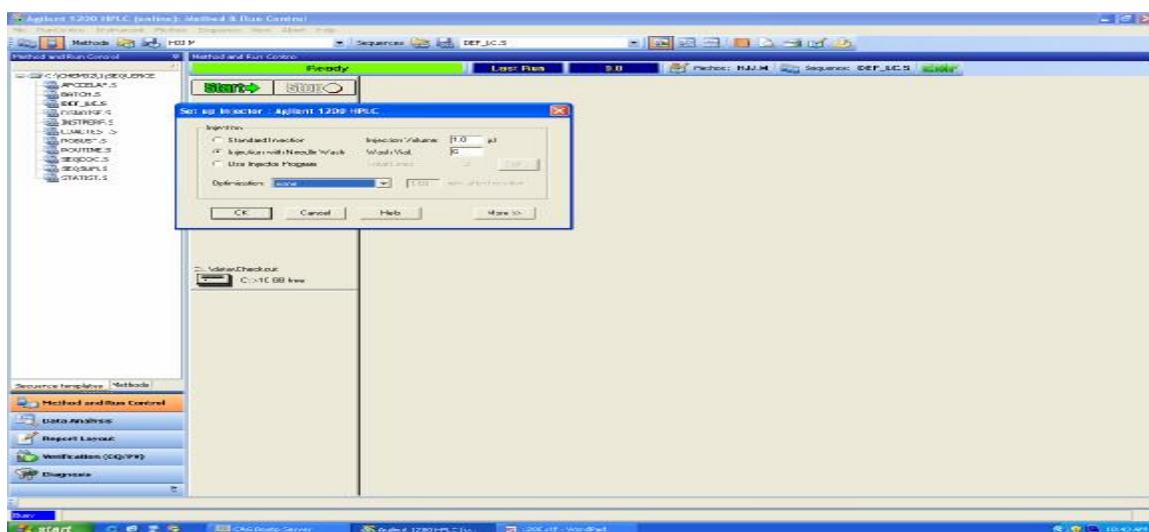
- 在“Flow”处输入流量，如1.5ml/min，在“Solvent B”处输入70,(A=100-B-C-D),也可Insert一行”Timetable”,编辑梯度。在“Pressure Limits Max”处输入柱子的最大耐高压，以保护柱子。

- 点击“Ok”进入下一画面。



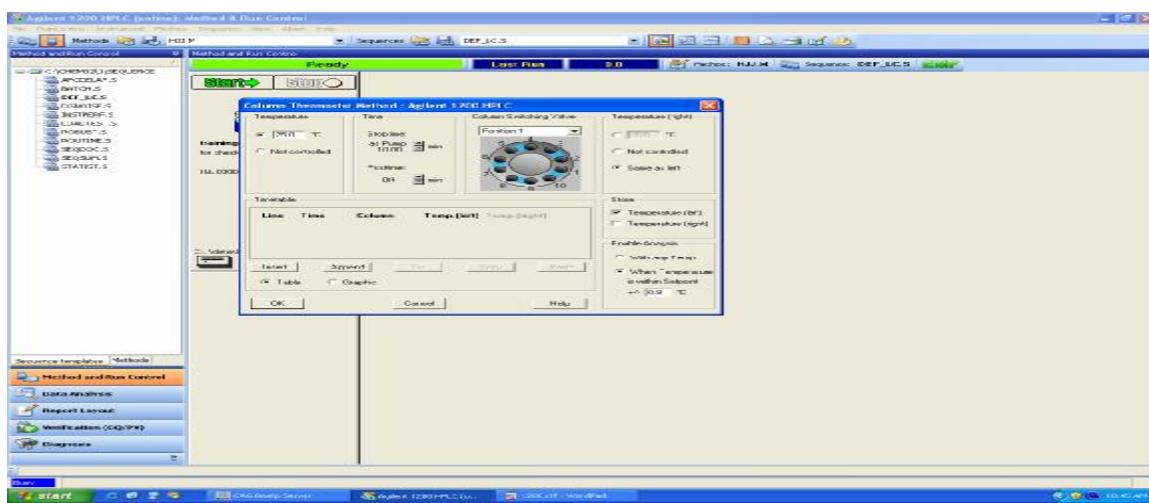
4、自动进样器参数设定：(以标准型G1329A为例)

- 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。

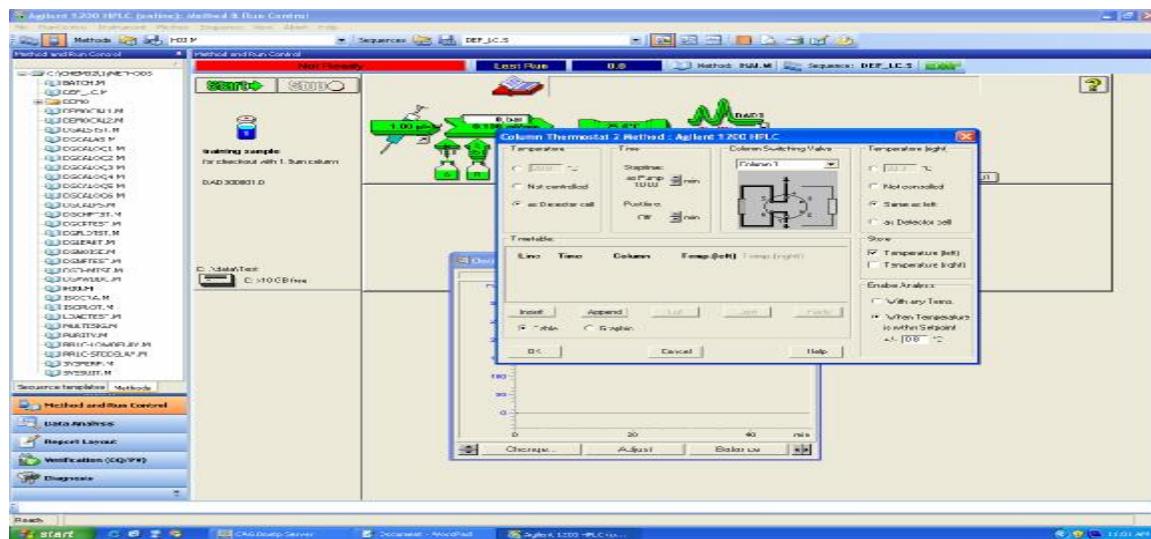


5、柱温箱参数设定：

G1316A : 在“Temperature”下面的空白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。



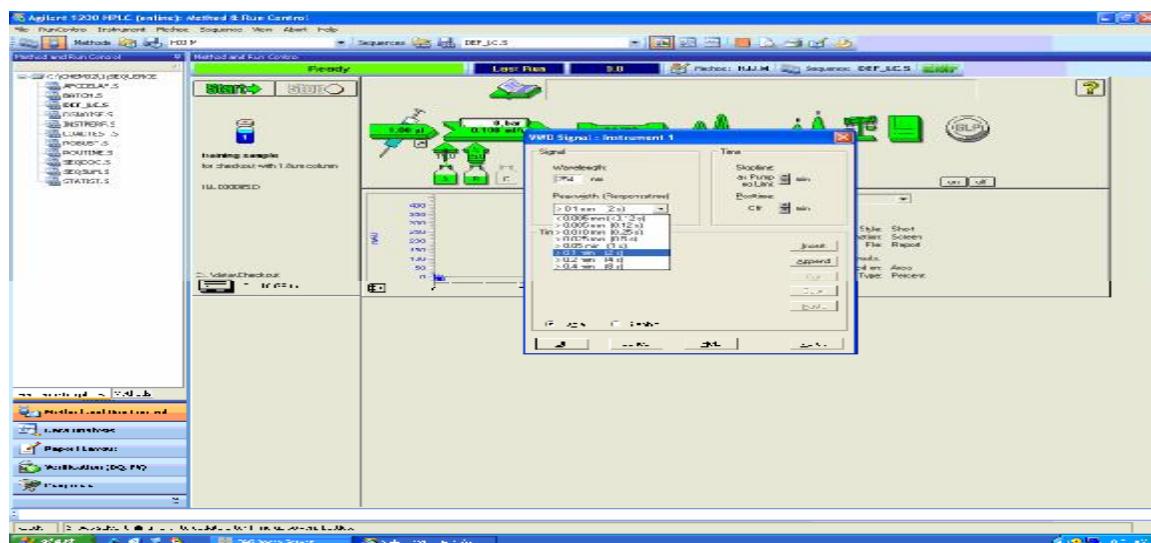
G1316B：在”Temperature”下面的空白方框内输入所需温度或与检测池一致，并选中它，点击”more>>”键，如图所示，选中”Same as left”---使柱温箱的温度左右一致或与检测池一致。



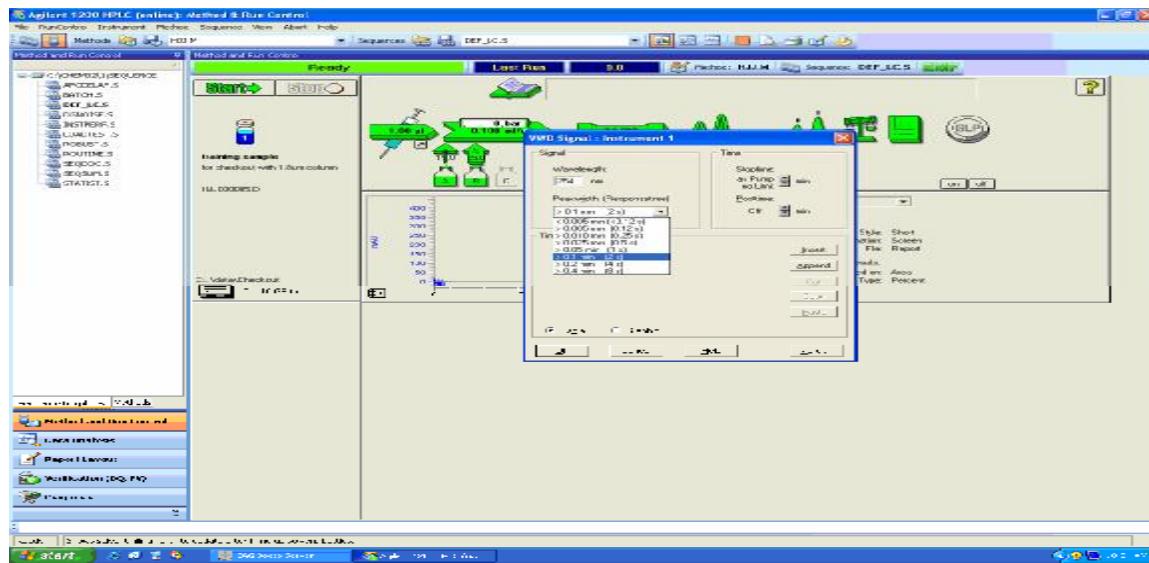
● 点击“ok”进入下一画面。

6、VWD检测器参数设定：

G1314B：在”Wavelength”下方的空白处输入所需的检测波长，如254nm，在”Peak width (Response time)”下方点击下拉式箭头，选择合适的响应时间，如>0.1min (2s)。最快采样速率13.74HZ。



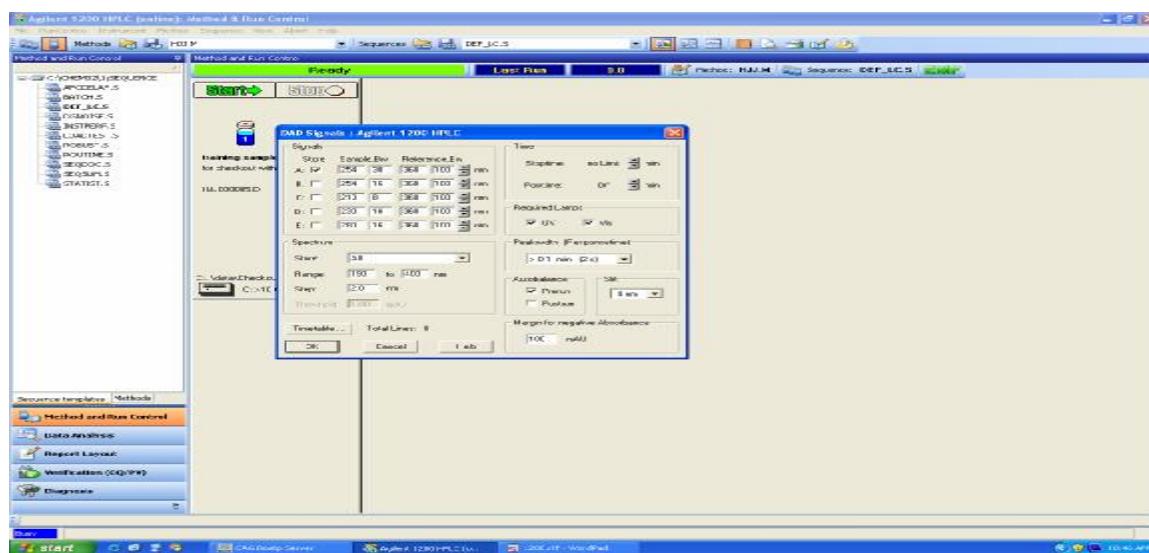
G1314C: 在”Wavelength”下方的空白处输入所需的检测波长, 如254nm, 在”Peak width (Response time)”下方点击下拉式箭头, 选择合适的响应时间, 如>0.1min (2s)。最快采样速率55HZ。



● 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。

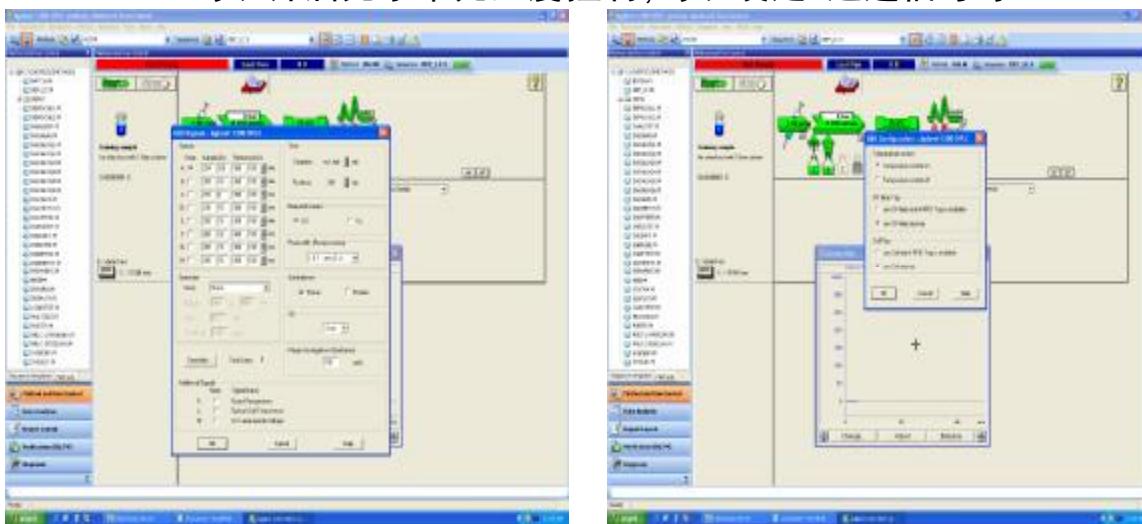
7、DAD检测器参数设定：

G1315B: 检测波长: 254nm, BW=4nm, 参比波长=360nm, BW=100nm;



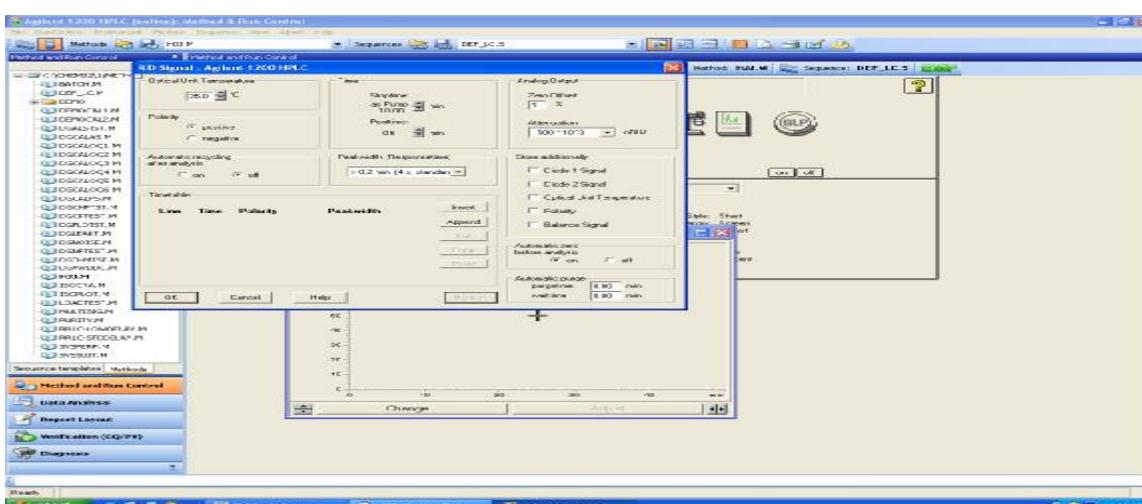
● **检测波长:** 一般选择最大吸收处的波长。**样品带宽BW:** 一般选择最大吸收值一半处的整个宽度。**参比波长:** 一般选择在靠近样品信号的无吸收或低吸收区域。**参比带宽BW:** 至少要与样品信号的带宽相等,许多情况下用100nm作为缺省值。**Peak width (Response time):** 其值尽可能接近要测的窄峰峰宽。Slit-狭缝窄,光谱分辨率高;宽时,噪音低。同时可以输入采集光谱方式,步长,范围,阈值。选中所用的灯。

G1315C XL:可以开启光学单元温度控制;可以设定8通道信号等。



● 点击“Ok”进入下一画面。

8、 RID检测器参数设定:

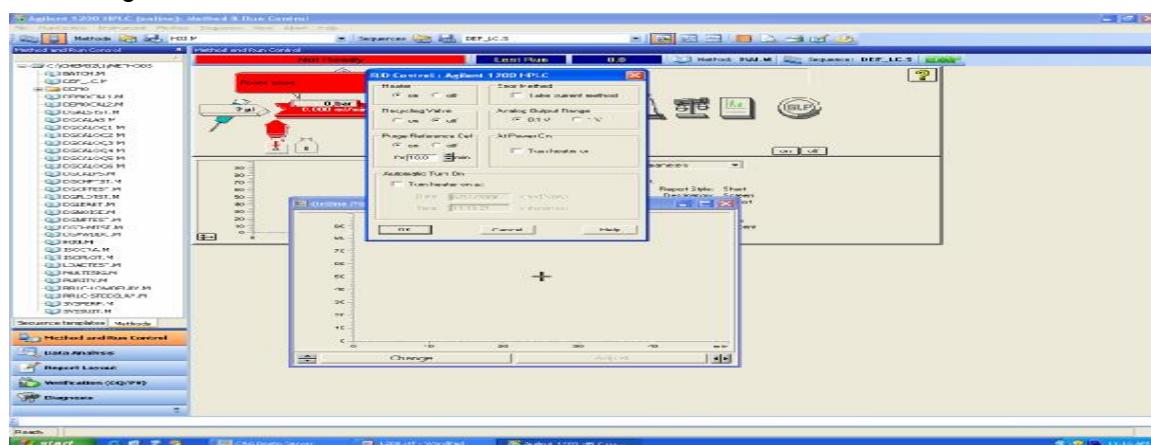


- **色谱条件:**

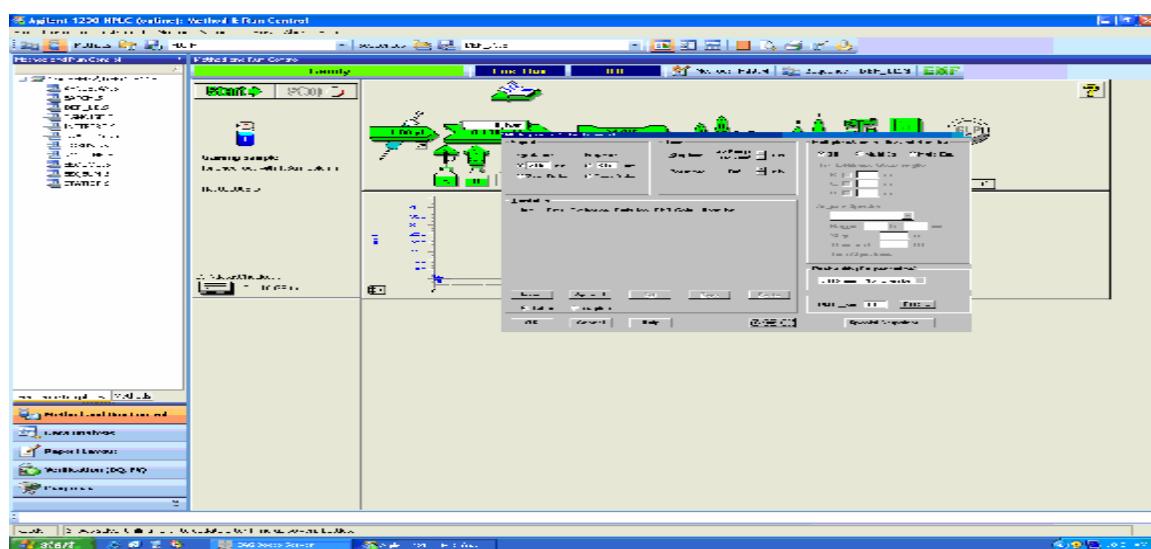
进样体积: 20ul ; 流速: 1.5ml/min; 光学单元温度: 35℃ ;柱箱温度: 25 ℃;极性: 正 ;峰宽(响应时间) : 4s 。

- 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。



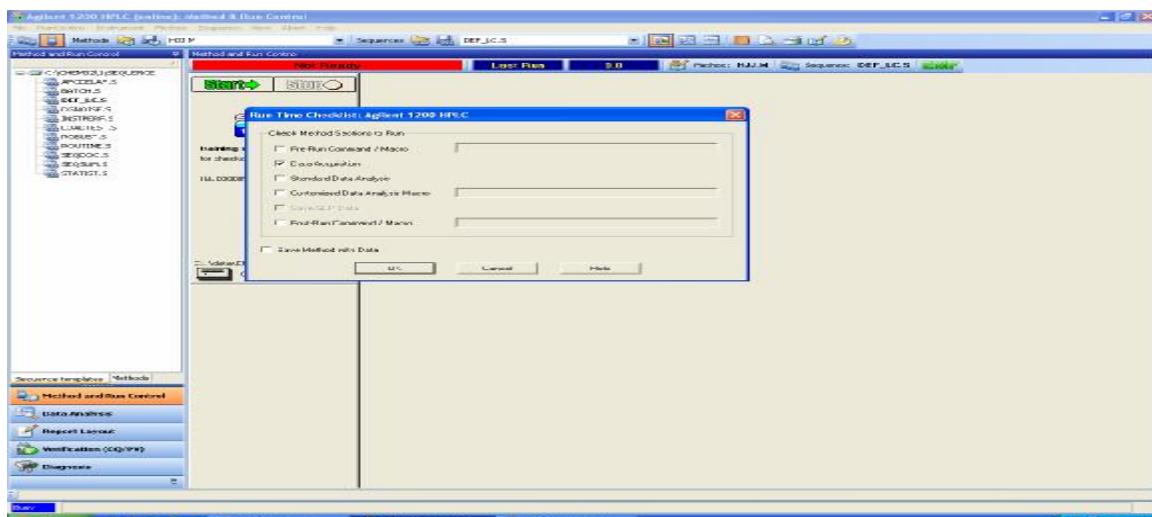
9、 FLD检测器参数设定:



色谱条件:

- 样品: P/N 01018-68704 用甲醇稀释为1:10。
- ODS Hypersial column 125mmx4.0mm IDX5u.
- 流动相: A:Water 35% B:乙腈 65%
- 进样体积: 5ul; 柱温箱: 30°C ; EX=246nm, EM=317nm ;PMT=10.
- 响应时间=4s. 停止时间: 4min.
- 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: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。

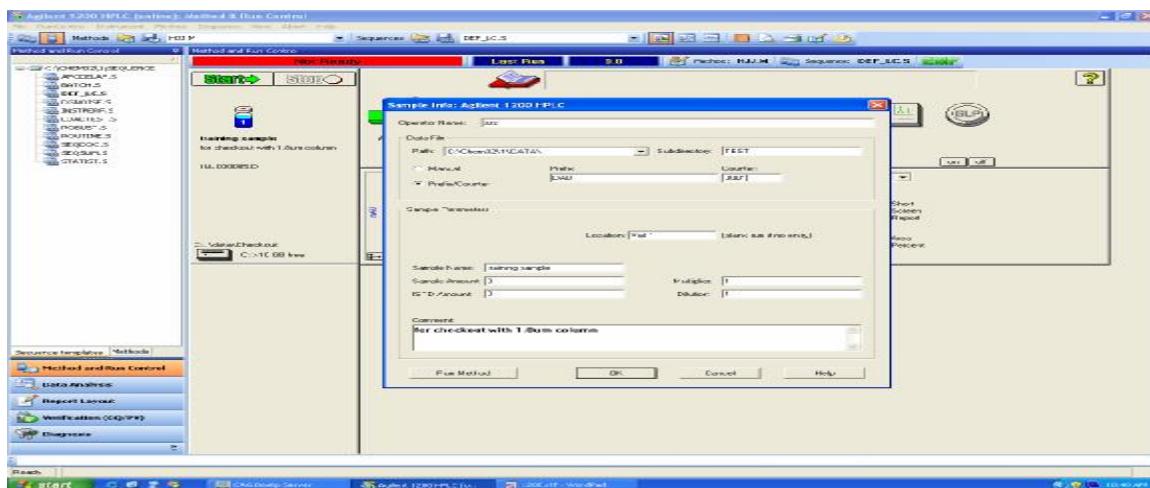
10、在“Run time checklist”中选中“Data acquisition”，点击“Ok”。



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

12、从菜单 “View”中选中”Online signal” , 选中Windows 1, 然后点击“Change” 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)。

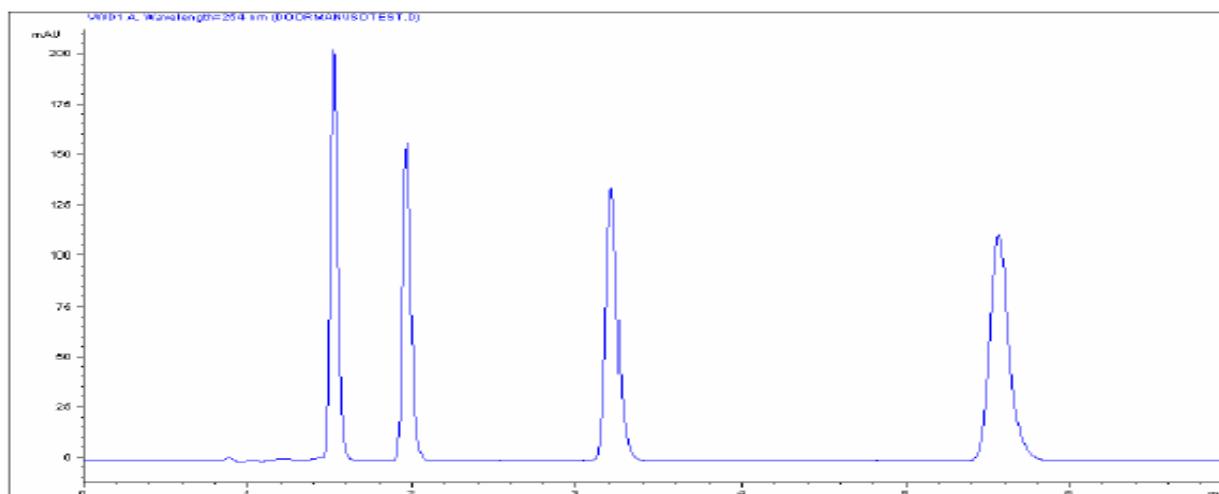
- 13、从“Run control”菜单中选择“Sample info”选项，如下图所示，输入操作者名称，如zzz；在“Data file”中选择“Manual”或“Prefix”。



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.....。

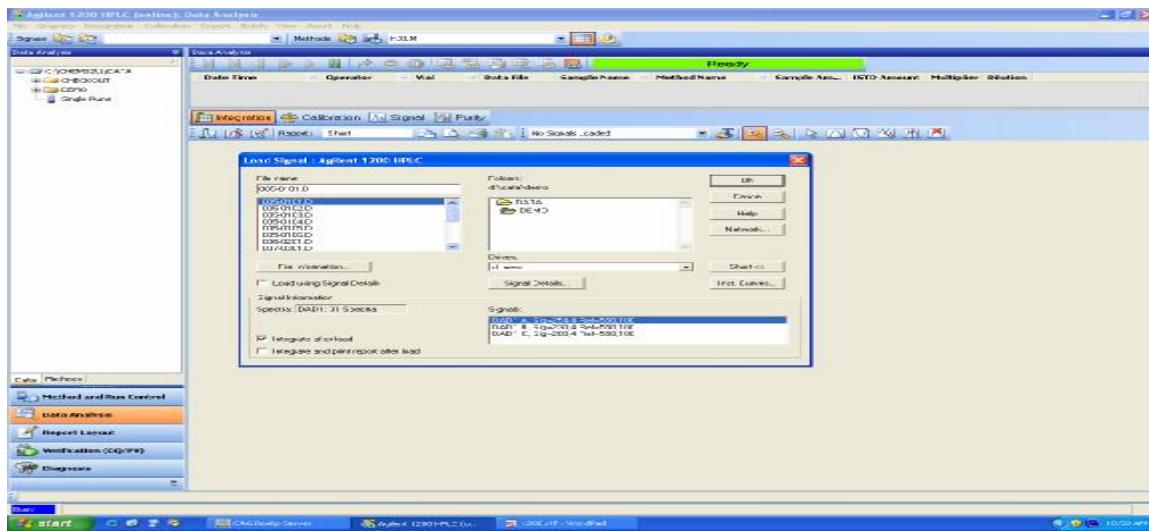
- 14、点击“ok”，从“Instrument”菜单选择“System on”，或依次点击图标开启各模块。

- 15、等仪器 Ready，基线平稳，从“RunControl”菜单中选择“Run method”，进样。(若无自动进样器，则基线平稳后，进样并搬动手动进样阀，启动运行。) (DAD, VWD色谱图如下所示：)



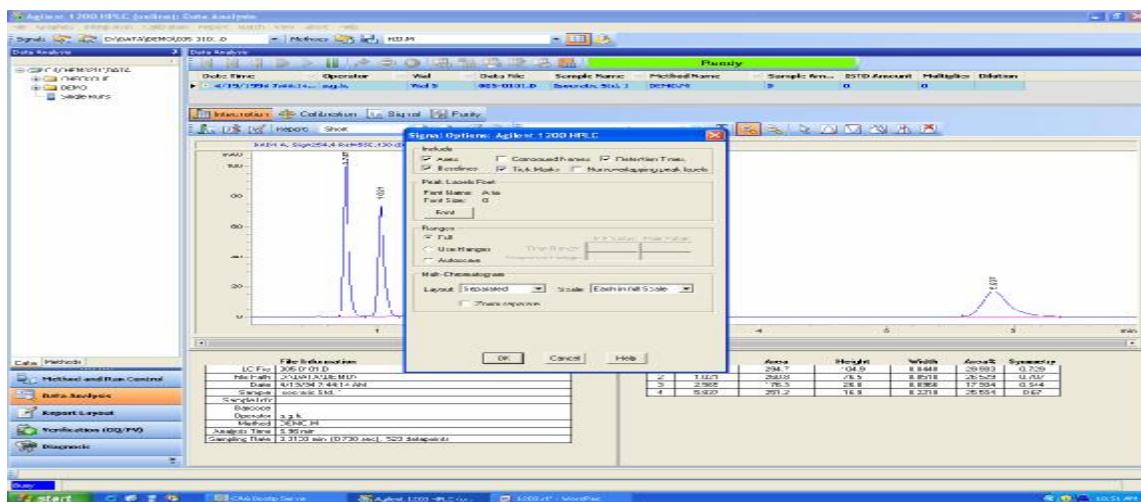
(三)、数据分析方法编辑:

- 1、从“View”菜单中，点击“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。点击“Ok”，则数据被调出。



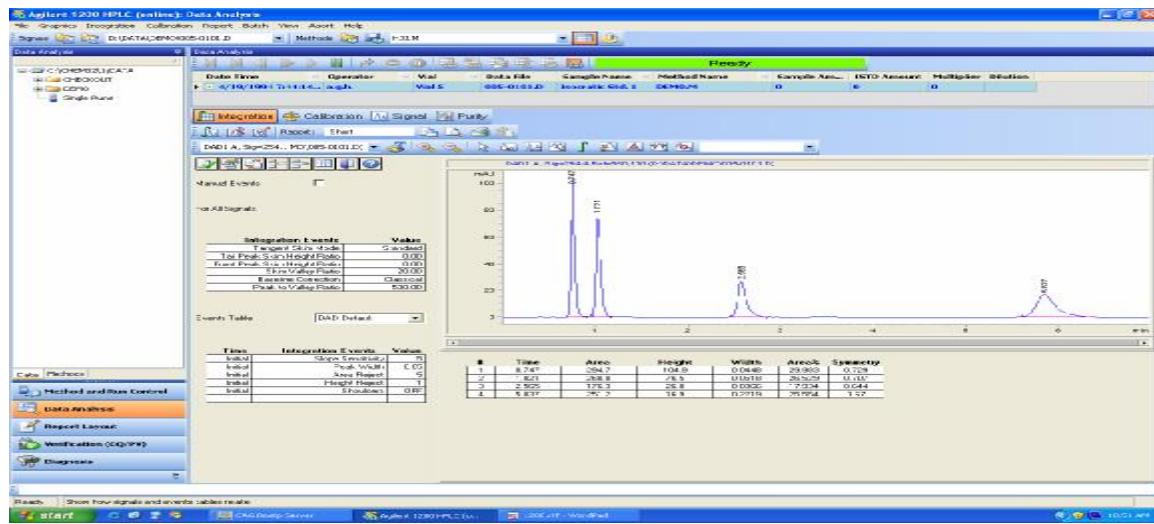
3、做谱图优化:

从“Graphics”菜单中选择“Signal options”选项，如下图所示。从“Ranges”中选择“Full”或“Auto scale”及合适的显示时间或选择”Use Ranges”调整。反复进行，直到图的比例合适为止。点击“ok”。



4、积分：

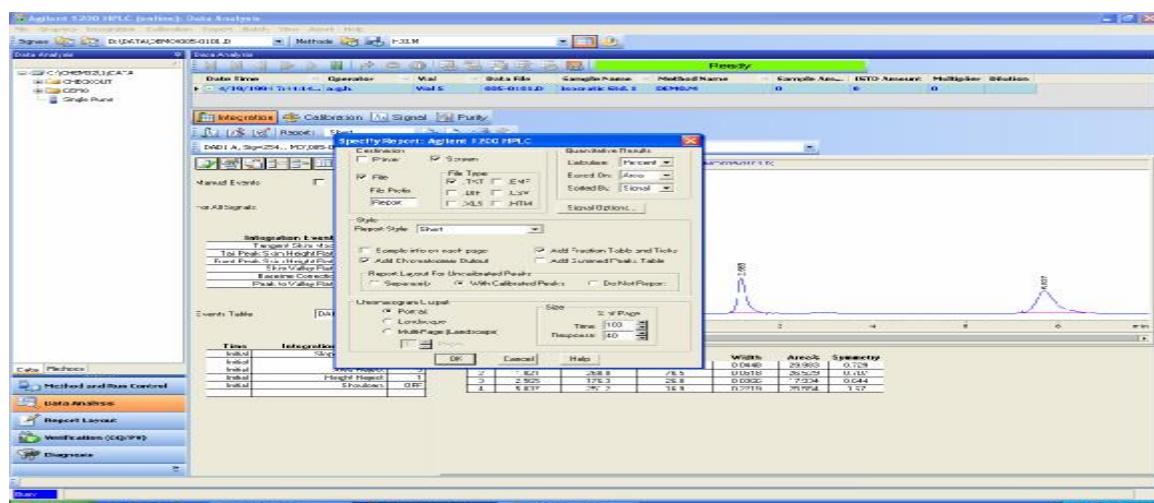
- 从“Integration”菜单中选择“Integration Events”选项，如下图所示。选择合适的“Slope sensitivity”，“Peak width”，“Area reject”，“Height reject”。
- 从“Integration”菜单中选择“Integrate”选项，则数据被积分。
- 如积分结果不理想，则修改相应的积分参数，直到满意为止。



- 点击左边“√”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，进入如下图所示画面。
- 点击“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。点击“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，则点击“Report”底部的“Print”钮。

(四)、关机:

- 关机前, 先关灯, 用相应的溶剂充分冲洗系统。
- 退出化学工作站, 依提示关泵, 及其它窗口, 关闭计算机 (用shut down关)。
- 关闭Agilent 1200各模块电源开关。

(五)、Agilent 1200 LC维护保养:

- 色谱柱长时间不用, 存放时, 柱内应充满溶剂, 两端封死 (乙腈/甲醇适于反相色谱柱, 正相色谱柱用相应的有机相)。
- * ● 手动进样器, 当使用缓冲溶液时, 要用水冲洗进样口。
- 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)。
- * ● 带seal-wash的 1200, 要配制90%水+10%异丙醇, 开启seal-wash清洗泵, 溶剂不能干涸。
- 注意事项及本手册未包括的仪器见说明书, 或由现场工程师介绍。

*****注意:

- 3 本教材仅适用于现场工程师培训讲解参考之用, 内容为工作站现场培训的一般要求, 请根据用户的仪器配置及现场用户的需求进行相应的培训内容增删。
- 4 安捷伦公司对本教材可能存在的错误及其后果不承担任何法律责任, 我们适时推出新版本的培训教材, 恕不另行通知。

维护知识问答

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。

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，不能干涸。

3 为什么Agilent 1200LC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。为使柱外效应减至最小，获得理想的分析结果，Agilent 1200LC 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，且有毒性挥发污染。

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：Agilent1200LC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氩气，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。

6 Agilent 1200LC泵如何维护？

Agilent 1200LC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: 流动相使用前请必须脱气、过滤。
- B: 使用缓冲盐时，要加在线Seal-wash选项。
- C: 关机前，用相应的溶剂充分冲洗系统。
- 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 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。为使柱外效应减至最小，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 1200LC 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：

