

文件编号: WU-ISCMS-QM ××××××××××

版本号: V 2.0

受控状态:

分发号:

分子科学公共实验平台

质量管理文件

圆二色光谱仪 Chirascan-Plus V100 标准操作规程

2020 年 04 月 01 日发布

年 月 日实施

分子科学公共实验平台 发布

目 录

1. 目的	1
2. 范围	1
3. 职责	1
4. 光谱实验室人员职责和安全管理规范	1
5. 光谱实验室仪器设备管理规范	2
5.1 圆二色光谱仪使用制度	3
5.2 圆二色光谱仪预约制度	3
5.3 圆二色光谱仪培训考核制度	4
6. 内容	4
6.1 样品准备	5
6.2 样品常温（等温 Isothermal）测试	5
6.3 液体样品热变温测试	14
6.4 数据分析	16
6.5 停流样品测试	21
6.6 固体 CD、磁 CD 和近红外样品的测试	25
6.7 旋光光谱（ORD）测试	26
6.8 强手性样品信号测试设置	30
6.9 结束前的检查	30
7. 相关/支撑性文件	30
8. 记录	30
附录 1 停流附件安装步骤	31
附录 2 固体样品透射检测和积分球反射法附件安装步骤	34
附录 3 磁 CD 附件安装	38
附录 4 近红外附件安装	40

1. 目的

建立 Chirascan V100 圆二色光谱仪的标准使用操作规程, 使其被正确、规范地使用。

2. 范围

本规程适用于所有使用圆二色光谱仪 (Chirascan V100) 的用户。

3. 职责

3.1 用户: 严格按本程序操作, 发现异常情况及时汇报设备管理员。

3.2 设备管理员: 确保操作人员经过相关培训, 并按本规程进行操作。

3.3 文章致谢格式

根据学校指导意见, 使用各校级平台仪器设备表征产生的科研成果必须致谢平台。如果您在文章成果中使用了光谱、色质谱、磁共振波谱以及其他属于分子科学平台的仪器设备, 请务必在文末致谢分子科学公共实验平台。

英文文章致谢:

① Acknowledgement: The author thanks (Dr. XXX from) Instrumentation and Service Center for Molecular Sciences at Westlake University for (the assistance/discussion/supporting in) ... measurement/data interpretation.

② Coauthorship on the resulting publications would be appreciated if our staff make technical contributions (including but not limited to critical sample preparation, novel experiment designation and comprehensive data analyzation).

Affiliation address: "Key Laboratory of Precise Synthesis of Functional Molecules of Zhejiang Province, School of Science, Instrumentation and Service Center for Molecular Sciences, Westlake University, 18 Shilongshan Road, Hangzhou 310024, Zhejiang Province, China."

中文文章致谢:

① 致谢: 感谢西湖大学分子科学公共实验室平台 XXX 博士(或者 XXX 老师)在.....表征或数据分析上提供的帮助。

② 共同作者: 如果分子科学平台老师在您课题组样品表征或文章发表上有重要技术贡献 (包括但不限于关键样品制备、新型实验设计和深度数据分析), 我们感谢您将相关老师列为共同作者, 作者单位地址如下: 西湖大学, 分子科学公共实验平台, 功能分子与精准合成浙江省重点实验室, 杭州, 310030, 浙江。

4. 光谱实验室人员职责和安全管理规范

- 4.1 相关人员进入实验室之前必须通过学校、中心和平台的安全考试或考核, 并严格遵守光谱实验室的各项安全注意警示标识。严禁无关人员进入实验室。
- 4.2 平台设备须经培训考核后方可操作, 严格遵守仪器操作规程并做好实验记录, 未经考核者严禁触碰和使用仪器。
- 4.3 请按制样要求进行测试或送样, 因样品不符合上机要求造成仪器损坏的, 无论独立上机或是委托测试, 都将由用户所在课题组承担责任。
- 4.4 实验室通道及消防紧急通道必须保持畅通, 所有实验人员应了解消防器材与紧急逃生通道位置, 并应掌握消防器材的正确操作。
- 4.5 使用化学试剂或药品前, 必须了解其物理化学性质、毒性及防护方法, 使用时必须进行个人防范措施。
- 4.6 使用液氮时应穿戴实验服、护目镜、防冻手套。
- 4.7 使用烘箱请先联系技术员, 烘箱用完请及时取走样品, 烘箱不可过夜操作。
- 4.8 使用实验室气瓶, 须经实验室技术员培训指导后方可操作。
- 4.9 严禁戴手套接触门把手。禁止随意丢弃实验废弃物。禁止将锐器、玻璃、枪头丢弃在常规垃圾箱中。
- 4.10 使用激光、射线设备及相关附件时, 应严格遵守设备操作规程, 在激光、射线设备附件未关闭之前, 禁止打开样品仓。使用射线设备时还需打开射线剂量报警器, 无关人员严禁进入控制区。
- 4.11 不可擅自做变温实验, 如有需求请务必联系技术员; 进行高温实验时需技术员在场方可进行。
- 4.12 实验室应保持整洁, 严禁摆放与实验无关的物品如食品和饮料。严禁在实验室进食与抽烟。严禁动物进入实验室。
- 4.13 个人 U 盘、移动硬盘等易带入病毒的存储设备不得与工作站电脑连接。
- 4.14 实验过程中如发现仪器设备及基础设施发生异常状况, 须及时向该仪器负责人或实验室负责人反馈。严禁擅自处理、调整仪器主要部件, 凡自行拆卸者一经发现将给予严重处罚。
- 4.15 保持实验室空气干燥, 在潮湿的季节应进行除湿, 至少每周检查一次除湿机是否有无积水。

5. 光谱实验室仪器设备管理规范

5.1 圆二色光谱仪使用制度

仪器遵从学校“科研设施与公共仪器中心”对大型仪器设备实行的管理办法和“集中投入、统一管理、开放公用、资源共享”的建设原则，面向校内所有教学、科研单位开放使用；根据使用机时适当收取费用；并在保障校内用户使用的同时，面向社会开放。

委托测试：用户需通过“大型仪器管理系统”（以下简称大仪网）进行送样预约，并按照要求登记预约信息。送样预约要求如下：

1. 送样前与仪器负责老师沟通样品信息；
2. 测试结果请自行在大仪网送样记录中下载；
3. 样品如需回收，请在送样时告知老师并在测试后尽快取回；一周未取回的样品，平台将作化学废弃物处理。

5.2 圆二色光谱仪预约制度

为充分利用仪器效能、服务全校科研工作，根据测试内容与时间的不同，光谱实验室制定了 7*24 小时预约制度，用户可根据预约制度可登陆大仪网即时预约机时。包括周末；寒暑假及国庆假期将另行通知。

请严格遵守预约时间使用仪器，以免浪费机时。如需调换时间段，在技术员同意下可与其他使用者协商。因故不能在预约时间内测试者，请提前 30 分钟取消预约并通知技术员。恶意预约机时或有多次无故不遵预约时间的用户，实验室将进行批评教育、通报批评或取消上机资格等处罚。

预约时段		预约时间/每人	测试内容
周一至周日	自主测试 送样测试 维护/开发测试	无限制	1. 圆二色透射光谱 2. 圆二色反射光谱 3. 变温圆二色谱

- (1) 校内使用者须经过技术员的实验操作培训，考核合格后方可上机使用；
- (2) 实验开始时务必在实验记录本上登记，结束时如实记录仪器状态；
- (3) 严禁擅自处理、拆卸、调整仪器主要部件。使用期间如仪器出现故障，使用者须及时通知技术员，以便尽快维修或报修，隐瞒不报者将被追究责任，加重处理；
- (4) 因人为原因造成仪器故障的（如硬件损坏），其导师课题组须承担维修费用；

- (5) 禁止在仪器工作站上删改原始数据, 不允许用 U 盘与移动硬盘直接拷贝。使用者应根据要求通过科研仪器网/数据服务器传送下载原始数据至本地电脑, 保存并做数据处理; 原始实验数据在本实验室电脑中保留 2 年。
- (6) 用户应保持实验区域的卫生清洁, 测试完毕请及时带走样品, 技术员不负责保管。使用者若违犯以上条例, 将酌情给予警告、通报批评、罚款及取消使用资格等惩罚措施。

5.3 圆二色光谱仪培训考核制度

校内教师、研究生均可提出预约申请, 由技术员安排时间进行培训, 培训内容包括仪器使用规章制度、送样须知及安全规范、基本硬件知识、标准操作规程(自主测试)及相应数据处理。

培训结束后, 两周内培训者管理人员监督下进行 3 次左右操作, 培训者根据自己的掌握程度, 联系技术员进行上机考核。初级考核合格后, 在管理人员监督下上机操作, 一周后复考;

实验室技术员认为培训者达到独立操作水平后, 给予培训者授权在所允许的范围内独立使用仪器。如果因为人为操作错误导致仪器故障者, 除按要求承担维修费用之外, 还将给予重考惩罚、培训费翻倍等处罚。

对接受培训人员的核心要求:

- (1) 了解圆二色光谱仪的基本原理及其应用的多学科背景知识;
- (2) 熟练掌握 ActiveNitrogen 及 Chirascan 软件系统, 严格按照标准操作规程操作, 防止因人为操作不当造成仪器故障, 认真做好仪器的使用及故障记录。

6. 内容

***基理系统登陆

接入大仪网的仪器操作电脑均需要登陆基理锁屏界面。

- (1) 如图 (a), 如界面显示“一卡通用户”, 请在 Account 输入预约者的一卡通账户, Password 栏输入相应账户密码, 点击 Submit;

注意: 如账号或密码输入错误, 请按键盘 Delete 键进行删除, 再重新输入; 禁止点击 Cancel, 否则仪器会自行关机。

- (2) 如图 (b), 如界面显示“LIMS User”, Account 显示 Administrator, 请与相关老师联系。



6.1 样品准备

- ① 固体样品、溶液样品均可测试。
- ② 固体样品检测的反射法及透射法见附录 2。
- ③ 溶液样品的比色皿光程有 0.5 mm、1.0 mm、2.0 mm、1.0 cm 规格。

重要提醒: 1) 送样人员必须对测试样品的合法性负责, 未注明合法性和物理化学性质的样品不予测试。如测试过程中发现样品含毒品类非法样品, 送样人将负法律责任。
2) 由于用户的样品问题导致仪器异常或配件更换, 所有责任将由用户及所在课题组或单位承担。

6.2 样品常温 (等温 Isothermal) 测试

6.2.1 仪器开始使用前, 必须先打开氮气进行吹扫, 如图所示, 打开氮气压力阀, 检查氮气钢瓶及氮气压力表是否正常, 设定氮气的输出压力为约 0.4 MPa。

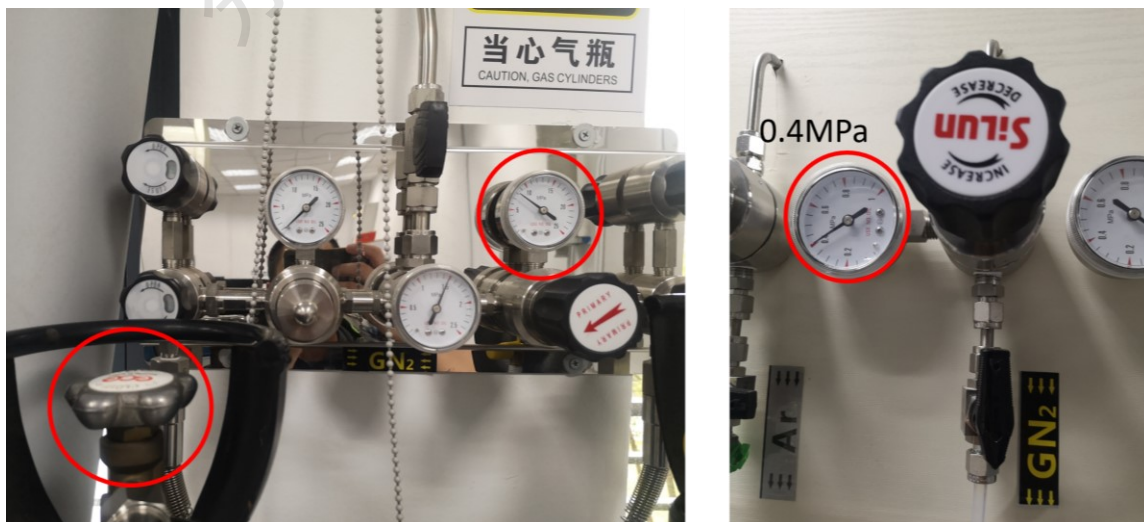
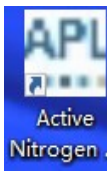


图 6-1 氮气瓶开关及氮气压力表图示

6.2.2 开启仪器的电源：按 Lamp 开关（左侧黑色按钮），此时氙灯未被点亮；按 System 开关（右侧黑色按钮），仪器自检后 Status 指示灯渐渐变为稳定的绿色。



图 6-2 仪器电源开关

6.2.3 开启电脑，点击电脑桌面的 ActiveNitrogen  软件图标，打开吹扫氮气软件。如果显示未连接，则选择左上角处的 COM3 连接。点击 N₂ On Only（仅氮气），目的是先吹扫氮气。**注意：通氮气至少约 20 分钟后，才能点亮氙灯光源，长时间（1 个月以上）未启用仪器，需使仪器通氮气的 1 小时以上。**然后可以点击 Lamp Immediate Start，点亮氙灯。

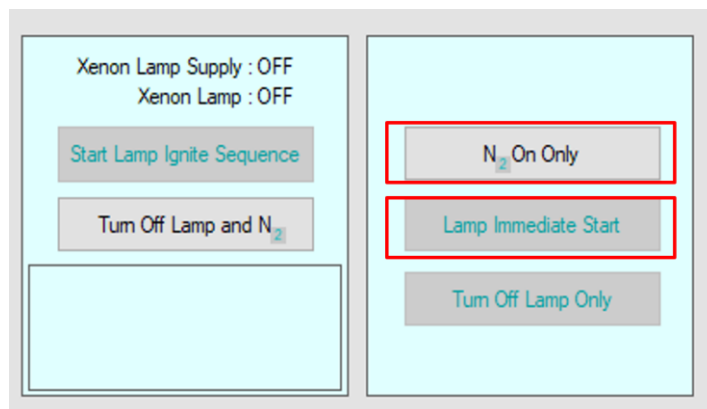




图 6-3 ActiveNitrogen 氮气吹扫软件图示



6.2.4 开启软件操作, 双击桌面上 **Chirascan** 图标, 主界面弹出, 同时 Pro Data 自动弹出 (不要点击电脑桌面上的 Pro Data, 这时为 off-line 离线状态, 仅可用于查看已有文档, 但不能用于扫描测试中)

6.2.5 设定当前工作目录或新建文件夹:

单击 Pro Data Viewer 界面工具栏中的图标  新建文件夹, 并将其设为当前工作目录 (点击 )。

说明: 文件夹和数据文件必须用英文或数字命名, 不能用点和句号等特殊字符, 不支持用中文, 否则无法打开数据文件

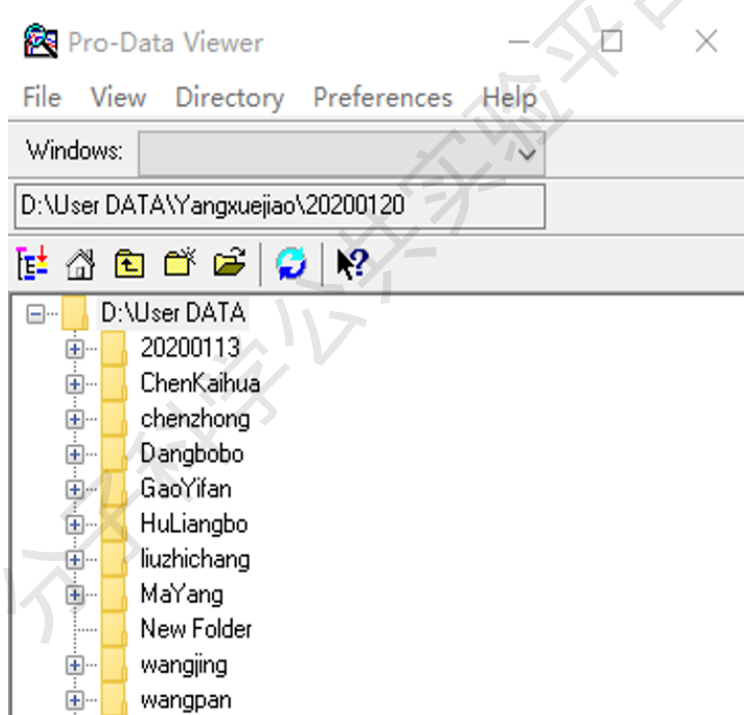


图 6-4 Pro Data Viewer 界面

6.2.6 测量参数设置

(1) 设定带宽 Bandwidth, 开机默认设置为 1.0 nm。当测量波长大于 500 nm 时, 需适当增加带宽, 比如 1.5 nm 或 2 nm 等, 单击 Set 确认。如果测量范围到 1200 nm, 需要分段设置, 参考建议为 900 nm 之前 Bandwidth 设为 1.5 nm; 900 nm -1200 nm, Bandwidth 设为 3 nm, 两段数据进行拼图即可。如果都用 3 nm 的 Bandwidth, HV 的值一旦低于 230, 仪器会发出警告信息, 但不影响检测。如果只测到 1100 nm, 可以尝试用 1.5 或者 2.0 nm 的 Bandwidth 一次性测完。

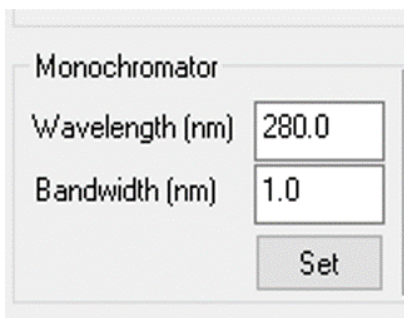


图 6-5 带宽 Bandwidth 参数设置

(2) 选择光谱的测量范围（蛋白样品如 180 - 260 nm）及步进（0.5 nm, 1 nm 等），单击 **Set** 确认。

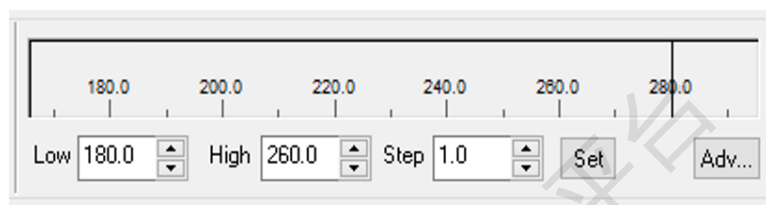


图 6-6 光谱的测量范围设置

(3) 设置单个数据点的采样时间，默认 Time-per-point (s) 为 0.5 s

说明：设置的采集时间越长，数据信噪比越好，曲线越平滑，但是整个扫描时间会增加，右侧显示的预估扫描时间(Approximate scan-time)。建议设置的采样时间 Time-per-point (s) 最小值不小于 **0.01 s**。

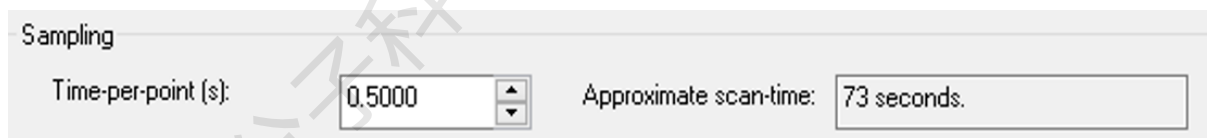


图 6-7 单个数据点的采样时间设置

(4) 如需要使用控温系统，则在启动软件之前先开启循环水浴和电子控温器，点击操作界面右上方温度 **Setting** 后出现选项界面，可以输入设置温度（-40 - 150 °C）。

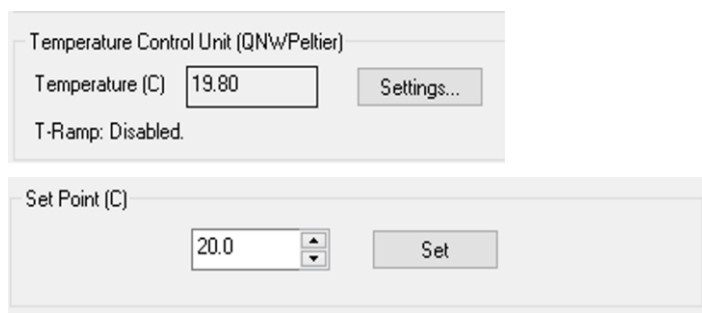


图 6-8 温度 Setting 选项界面

6.2.7 实验测量步骤

- (1) 主界面上方快捷栏中的 Spec 图标是命名界面, 如果是空气背景命名就在 Background 后填写文件名; 如果是溶剂或样品命名就在 Spectrum 后填写文件名; 如果是动力学测试就命名在 Kinetics 后填写文件名, 以此类推。

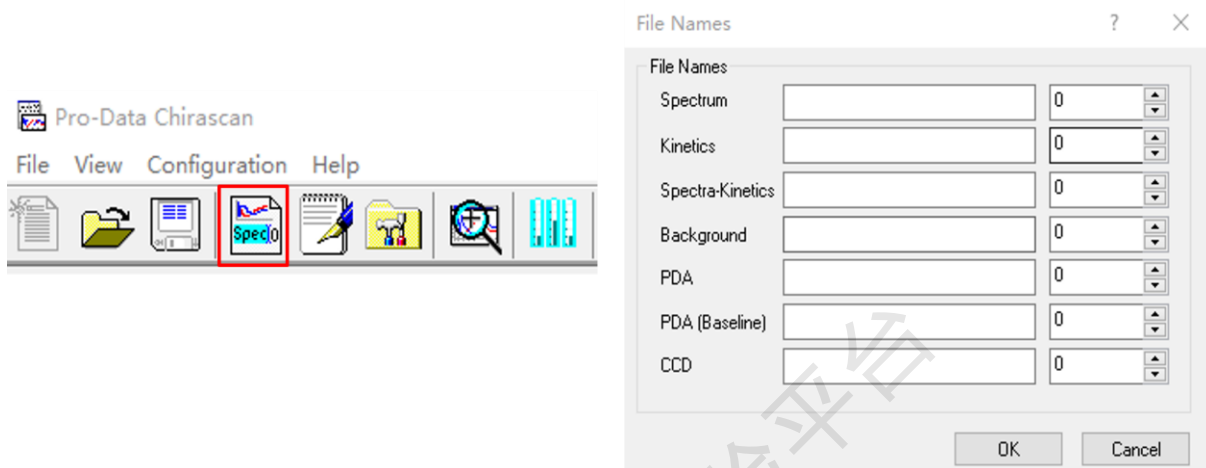


图 6-9 Spec 图标下的命名界面

- (2) 测量仪器背景, 记录吸光度的零值 (后面我们所说的紫外吸收值都是相对于空气背景的吸收)。具体操作为: 样品仓空置, 直接采集空气 (氮气) 的值, 点击 Background。注意: 在收集样品信号前必须先采集背景, 否则不能 Acquire。



图 6-10 仪器背景采集界面

- (3) 测量溶剂 (Buffer/Solvent)

选择合适的比色皿, 装入 Buffer/Solvent, 单击 Acquire 后仪器自动开始扫描并采集数据。

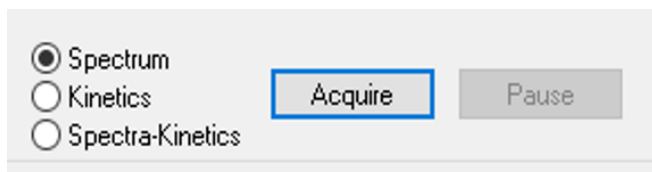


图 6-11 数据采集界面

说明: 放入比色皿时要记得比色皿朝向及其在样品槽中的位置, 在一个系列的实验中建议用同一个比色皿; 保持同样朝向和同样放入位置; 0.5 mm 和 1 mm 比色皿要用垫片牢固, 两片式的比色皿要用夹具固定。

点击正在扫描图谱界面的上方的 Window 选项, 出现下拉菜单, New Windows 里点击 Absorbance, 可以显示吸收图谱。

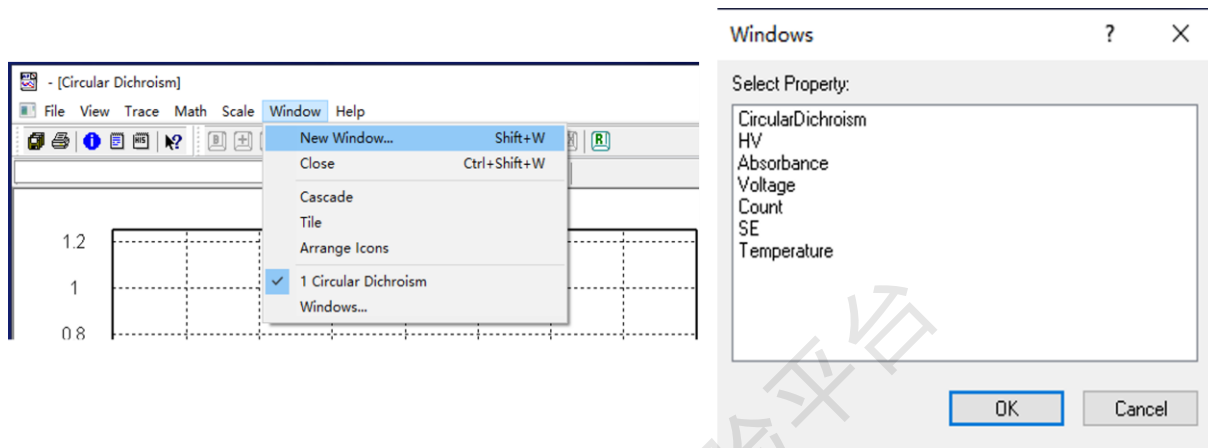


图 6-12 Window 选项界面

(4) 测量样品

取出测试 Buffer/Solvent 的比色皿, 倒空其中的 Buffer/Solvent, 用待测样品润洗 2-3 次, 加入待测的样品, 操作步骤同 (3)。单击 Acquire。

(5) 多次测量

通常建议对溶剂采集 2 次, 对样品采集 3 次数据, 可勾选主界面左下方的 Repeat 设置重复次数。

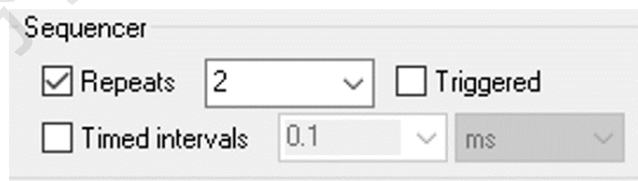


图 6-13 多次测量设置

6.2.8 数据处理

将所有要处理的数据都拖入同一数据界面, 图谱上方点击绿色的 D 按钮可弹出处理界面

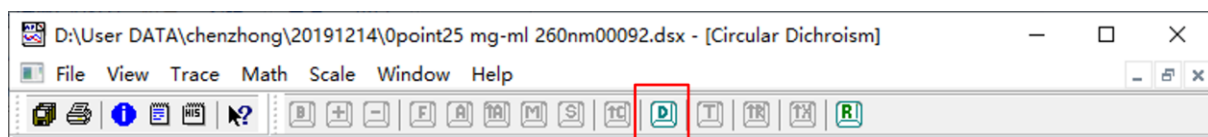


图 6-14 数据处理按钮键

(1) 多组重复数据求平均 Average

首先平均溶剂数据, Buffer 的 2 次测量数据, 全部选中后点击 Average, 得到 Average:0 文件; 再平均样品数据, Sample 的 3 次测量图谱, 全部选中点 Average, 得到 Average:1 文件

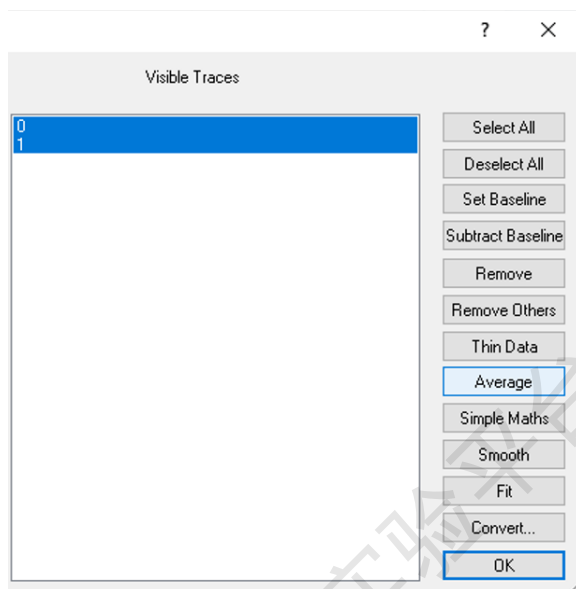
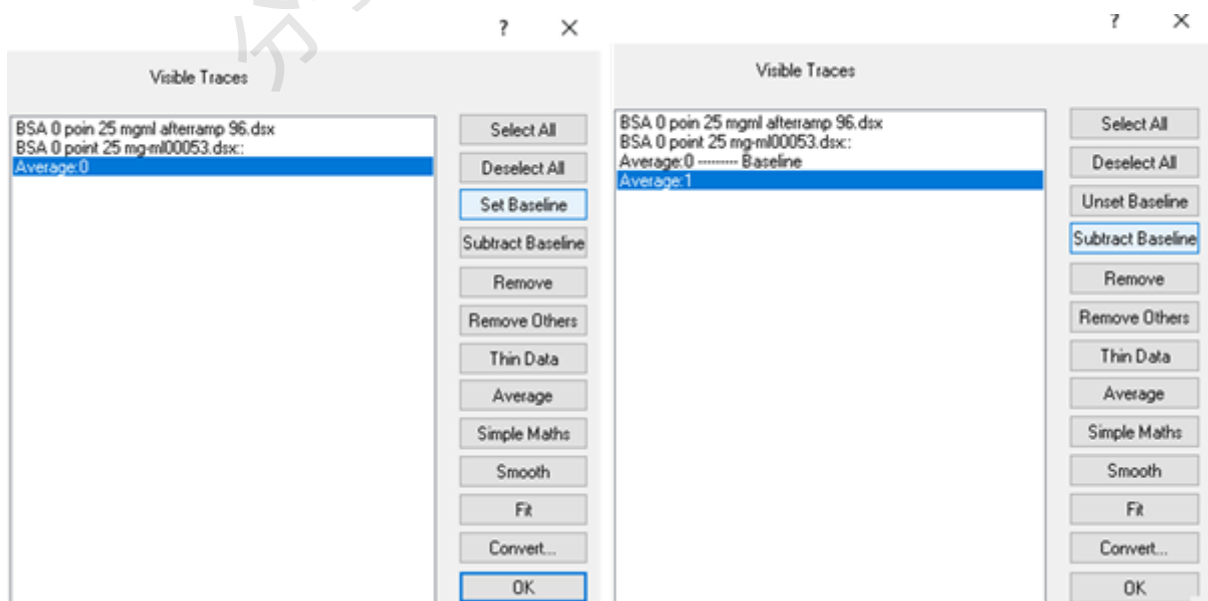


图 6-15 多次重复数据求平均

(2) 扣除体系背景 (即 Subtract Baseline)

选中溶剂文件 (取平均后的溶剂图谱), 如上一步平均后的溶剂数据 Average:0, 点击 Set Baseline; 再选中样品数据, Average:1, 点 Subtract Baseline 得到 Subtracted:0 文件。然后解除背景设置 (单击 Unset Baseline), 选中扣除溶剂后的样品文件 Subtracted:0 文件, 点击 Remove Others



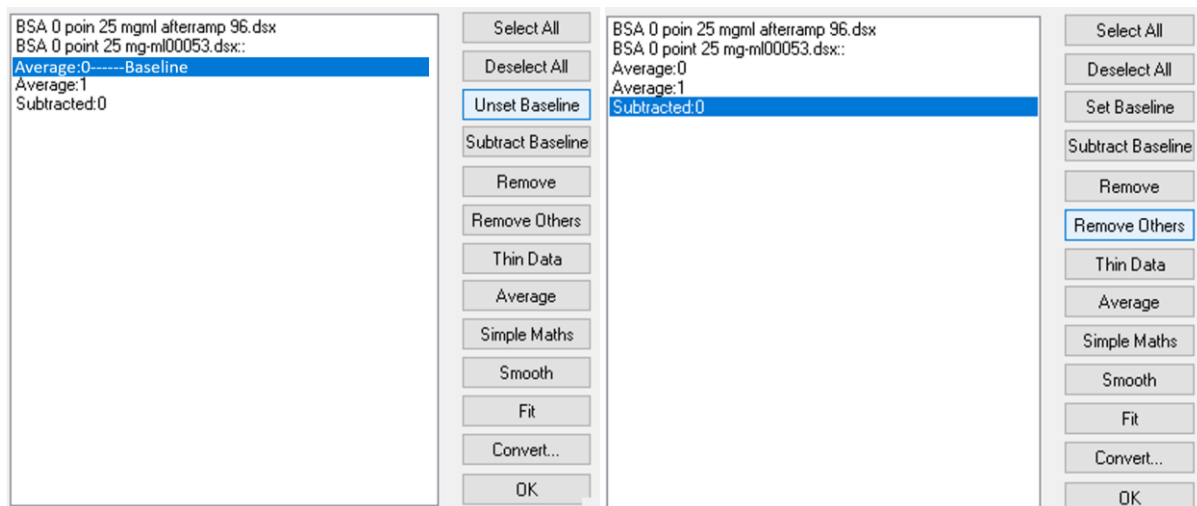
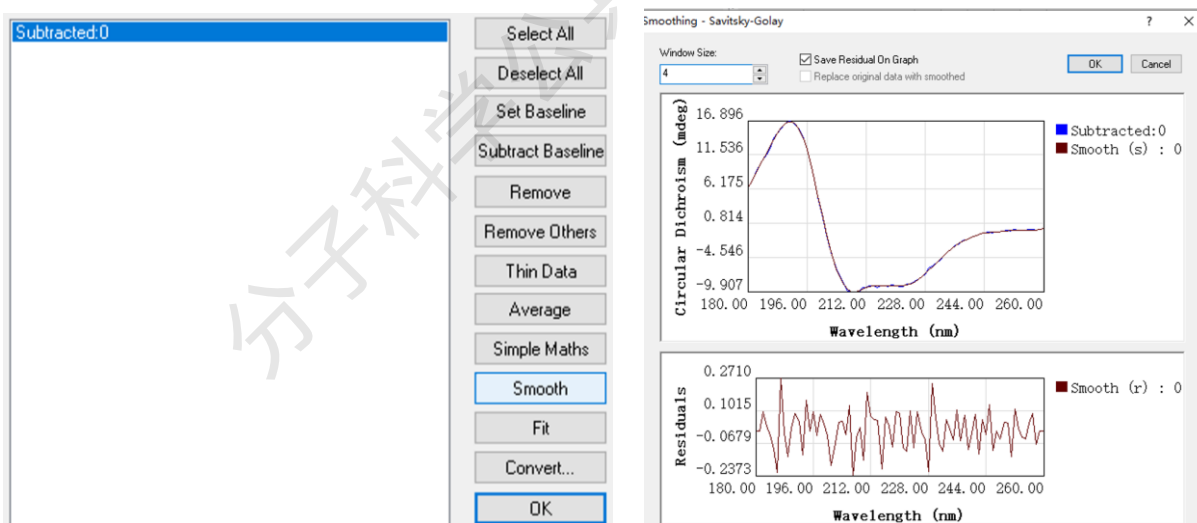


图 6-16 扣除体系背景

(3) 平滑处理 Smooth

选中要平滑处理的文件，如 Subtracted:0，点击 Smooth，进入 Smooth 界面，左上角的 Window 选择平滑次数，例如 4 次。要满足数据曲线不失真，噪音水平在零值附近上下平衡随机震荡，点 OK，得到平滑后的文件 Smooth(s):0（需保留）和平滑后的噪音信号 Smooth(r):0（需去除）。



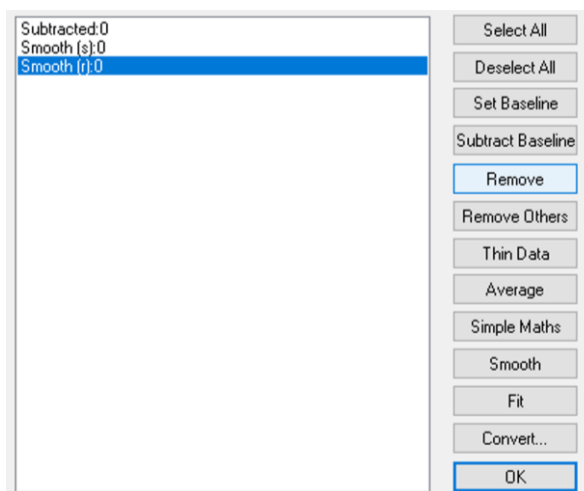


图 6-17 平滑处理界面

(4) 保存处理结果：点击图谱左上方的保存图标，输入合适的文件名。

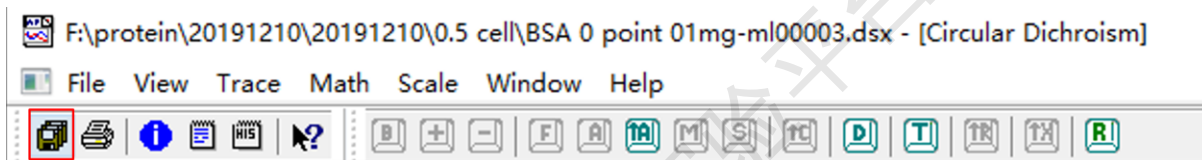


图 6-18 数据存储按钮

6.2.9 数据文件输出

测量得到的原始数据文件会自动保存，但是处理后的数据需要再次保存。

测量数据可以输出为各种格式，如 ASCII, CSV, TXT 等。CSV 的文档可用 Excel 软件打开。另存为 SimpleCSV，可以存单条曲线；如果另存为 ProDataCSV，则测试条件等都会被存储输出到 EXCEL 文件中，并且可以将多条曲线的数值存入同一个 EXCEL 中。

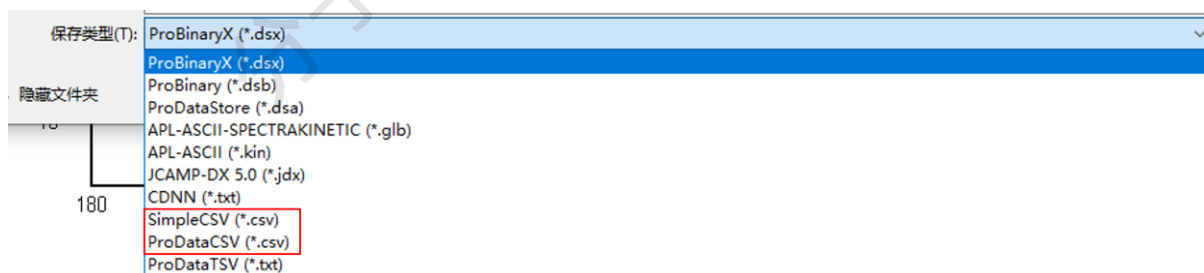


图 6-19 数据文件输出格式

6.2.10 清洗比色皿

数据文件输出实验结束后应严格清洗比色皿，依据样品性质用 Buffer、水、乙醇、甲醇以及稀酸（2 M 硝酸）或浓硝酸清洗；如果测试蛋白质样品，可以用专门的复合表面活性剂清洗，也可以用专门的复合表面活性剂在 50 – 60°C 环境中浸泡清洗 10 - 15 min（如 Hellma NEXIII 或 Decon 90 等）。如遇到蛋白质变性粘结在比色皿壁上的情形，

建议用专门的复合表面活性剂（如 Hellma NEXIII 或 Decon 90 等）在 50 – 60°C 环境中浸泡清洗 10 - 15 min，最后要用水冲洗除去这些活性剂，**或者用稀酸（2M 硝酸）或浓硝酸**。测试核酸样品，建议用乙醇清洗比色皿；测试有机化合物小分子或材料样品，建议用适当的溶剂如甲醇或丙酮等清洗比色皿。

说明：判断比色皿是否干净，可装入水后测量 180 - 260 nm 范围 CD 谱线，看看是否平整并接近零值。

6.3 液体样品热变温测试

6.3.1 热变温实验测试过程



图 6-20 循环装置（左）、温控仪（中）、针式温度计（右）照片

先开循环装置、温控仪，再打开软件，若先打开软件则温控模块不会被激活。将样品加入比色皿中（可选择 0.5 mm 或 1 mm 光程或者其它光程规格的比色皿），并且插入针式温度计（针式温度计不会影响测试，即长度没有到透射窗口）。样品量为能够接触到温度计的顶端即可，无需装满整个比色皿。

当采用**全图谱模式**进行热变温测试时，主界面参数设置等同于静态图谱（波长范围、带宽、步进、每点采集时间）；当采用**单点模式**进行热变温测试时，主界面参数需将波长范围 Low 和 High 设为同一个波长（例如，220 nm - 220 nm），并且每点时间可以设为 5 - 50 s。

软件设置：点击下图中红框内的 Settings，显示温度设置选项界面如下。

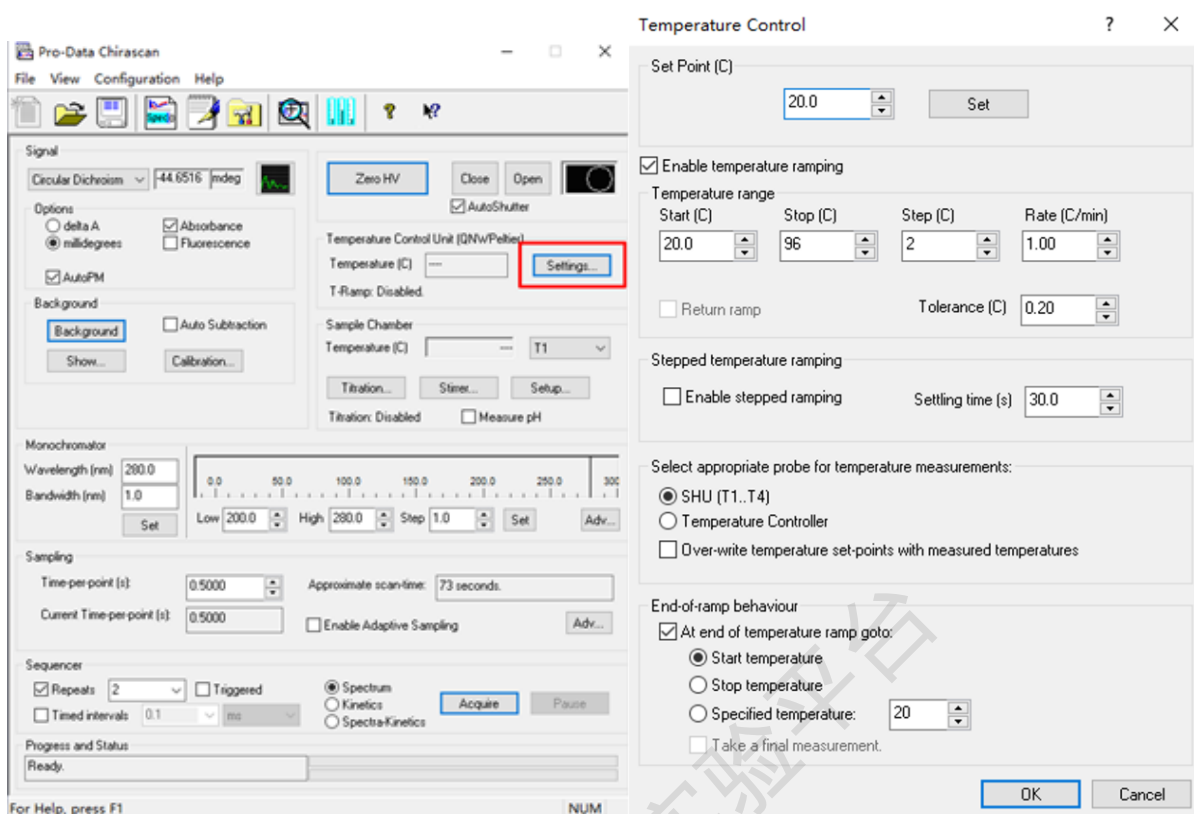


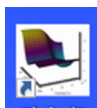
图 6-21 温控设置界面

- ① 首先勾选 Enable temperature ramping
- ② Start(°C): 起始温度
- ③ Stop(°C): 终止温度
- ④ Step: 温度步进, 隔多少度采集一次, 输入适当的步进, 如 0.5、1、2 °C 或者其它数值。
- ⑤ Rate: 升温速度, 一般为 1 °C/min, 也可以设置为 0.5 °C/min, 0.3 °C/min, 0.25 °C/min, 或者 2 °C/min 等合适的或者需要的数值。
- ⑥ Tolerance: 允许的温度偏差, 默认为 0.20 °C, 可以设置为其它合适的值。
- ⑦ Enable stepped ramping: 勾选时为阶梯式升温模式, 需同时设置稳定时间 (即采集图谱过程中温度不变化)。
- ⑧ Setting time: 稳定温度的时间。
- ⑨ SHU(T1-T4): 记录比色皿内温度计的温度
- ⑩ Controller: 记录设定的温控仪的温度;
- ⑪ Over-write temperature: 以比色皿内样品溶液的温度计的温度覆盖温控仪上的温度。
- ⑫ At the end of temperature ramp go to: 确定实验结束后的温度, 一般恢复到室温。

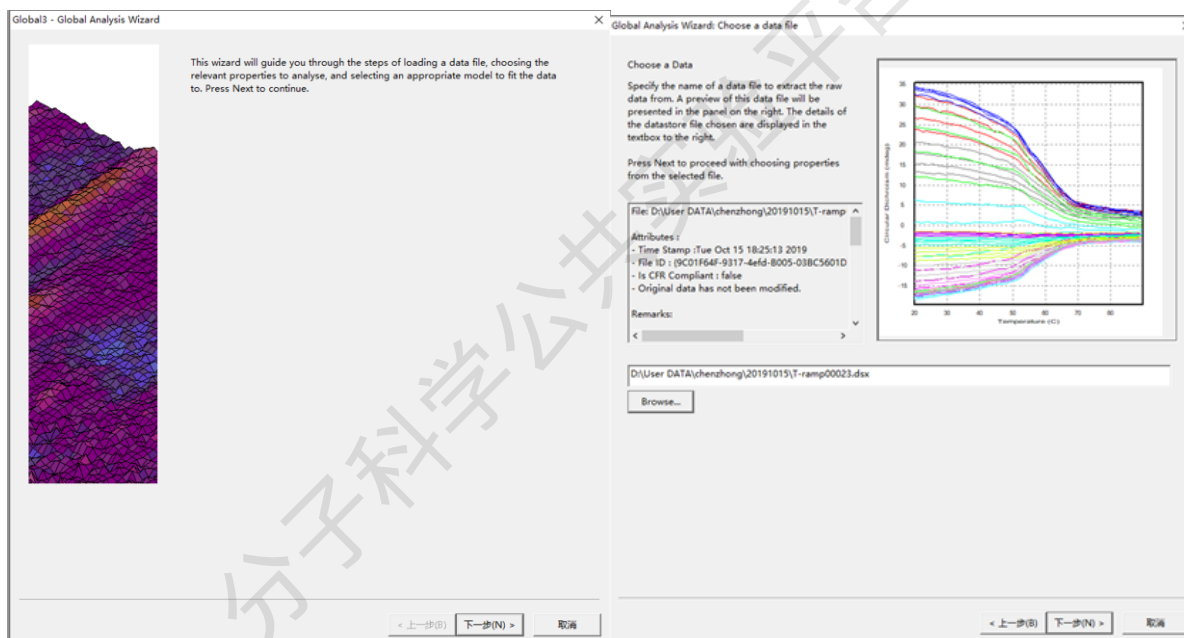
注意：如果变温试验的起始温度不是室温，比如从 4 °C 或 40 °C 起，那么必须首先将温控仪温度定温到该起始温度，等待比色皿内温度计也显示该温度或接近该温度后，再启动变温试验。温控仪使温度从 20 °C 上升到 40 °C 不到一分钟，而样品的实际温度（温度计温度）到达 40 °C 则需要数分钟。

6.4 数据分析

6.4.1 全谱采集模式 Tm 分析步骤：



- (1) 点击桌面 Global3 软件图标 打开 Global3 数据处理软件。
- (2) 打开后点击下一步，出现 Browse，选择需要分析的图谱数据，再点击 Next。



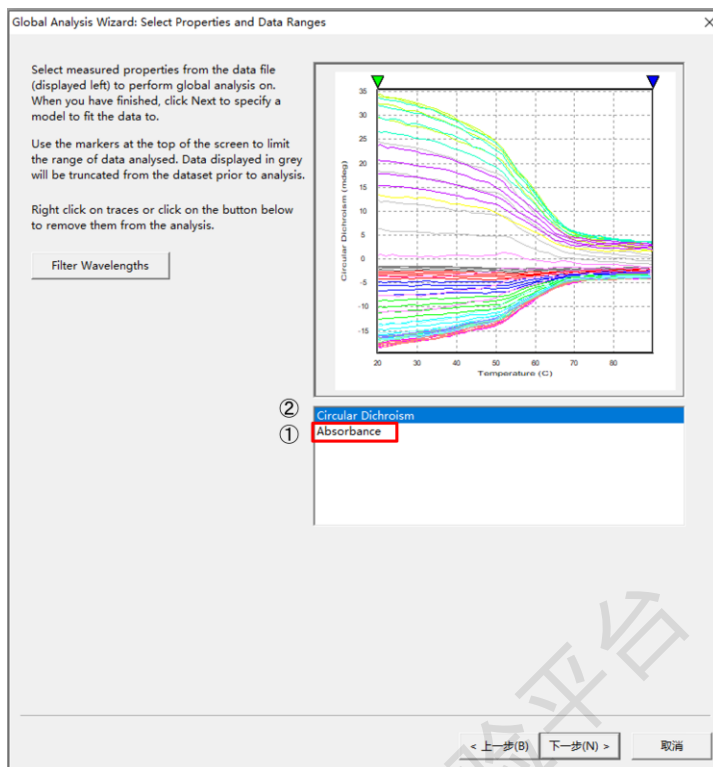


图 6-22 Global3 数据处理软件界面

(3) 先选择 Absorbance, 把 Absorbance 值不合格 (大于 2.5 AU) 的部分数据剔除。做法是: 选择 Absorbance, 点击 **Filter Wavelength**, 按照下面①②③顺序操作, 去除 Abs 大于 2.5 AU 的这些波长的变温曲线, 点 OK 确定。

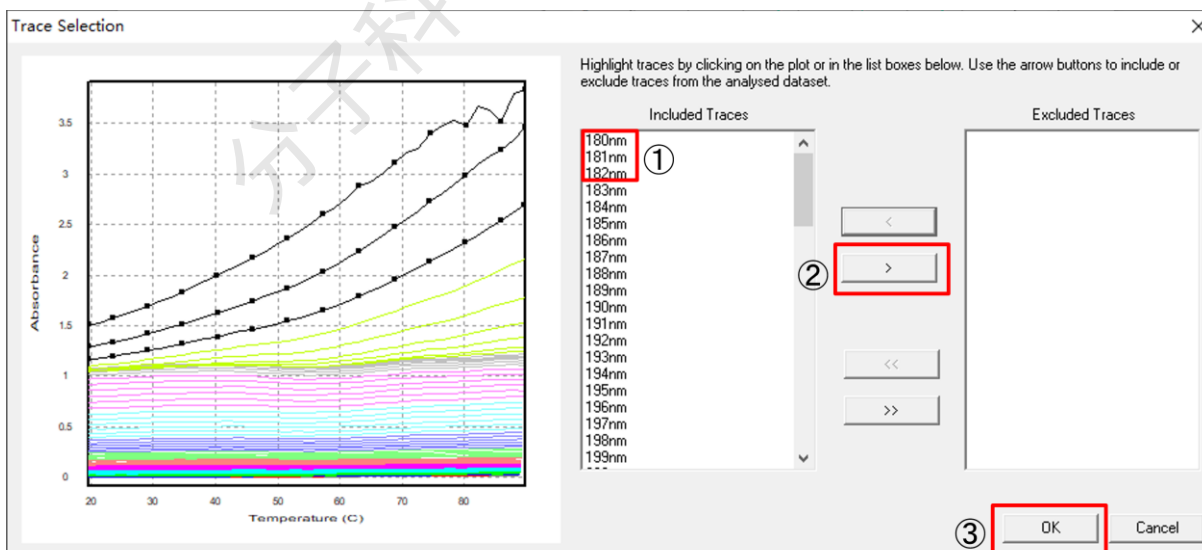


图 6-23 数据筛除界面

(5) 选择 Circular Dichroism, 再点击 Next 后, 如果是单个变温点, 显示如下图。用鼠标将两个黑色 ▼ 分别拖到最左侧和最右侧。

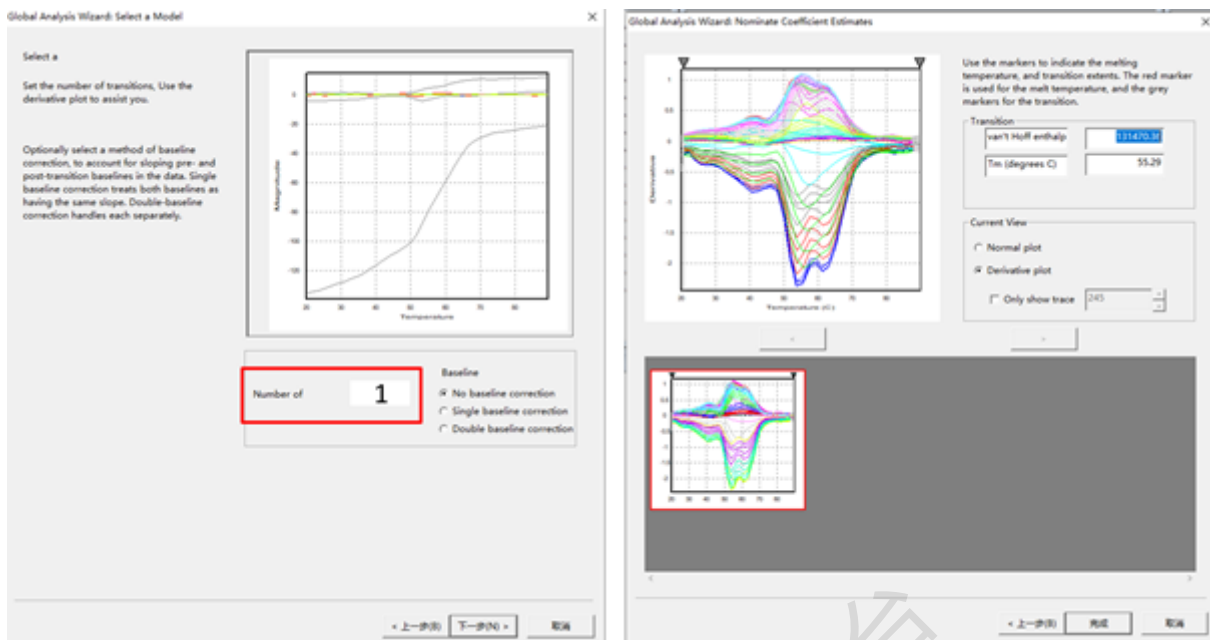


图 6-24 单个变温点处理界面

(6) 一般情况下，输入转折点数 1 和 No baseline correction（如果认为有 2 个或者以上变温点，可以输入 2 或者以上的数字。），再点击 Next 后，显示下图。如下图当有 3 个转折时，则依次在下方的三个小图中用黑色 ▼ 确定每个范围。最后点击 Next。

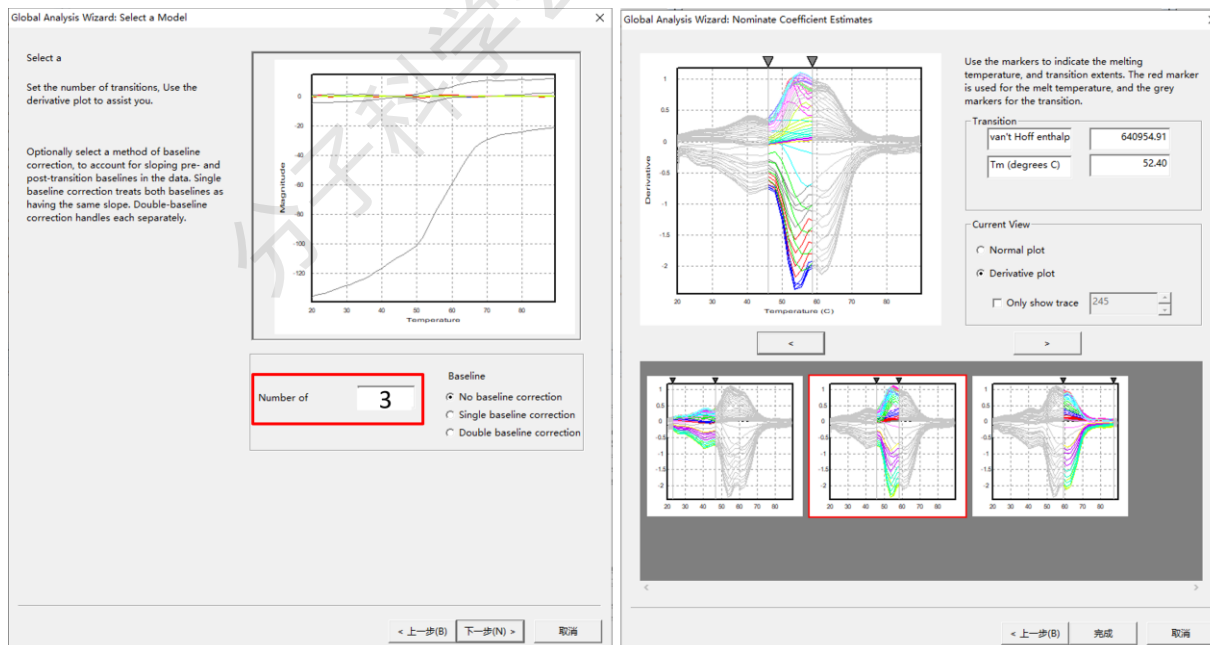


图 6-25 多个变温点处理界面

(7) 用 1 个转折点生成的分析图如下图，得到 6 个小窗口。从左上方到右下方，依次为：

- 计算出和所观察的每个波长的温度曲线
- 计算出的独立的、各个构象变化前后的光谱（如起始图谱、变温点后的图谱）
- 计算出的温度-波长 CD 三维图谱
- 计算出的各个构象态物种的浓度分布随温度的函数
- 噪音的三维图谱
- 计算出的热力学参数（最重要的是 Melting point，即变温点 T_m 值以及焓变 ΔH ）

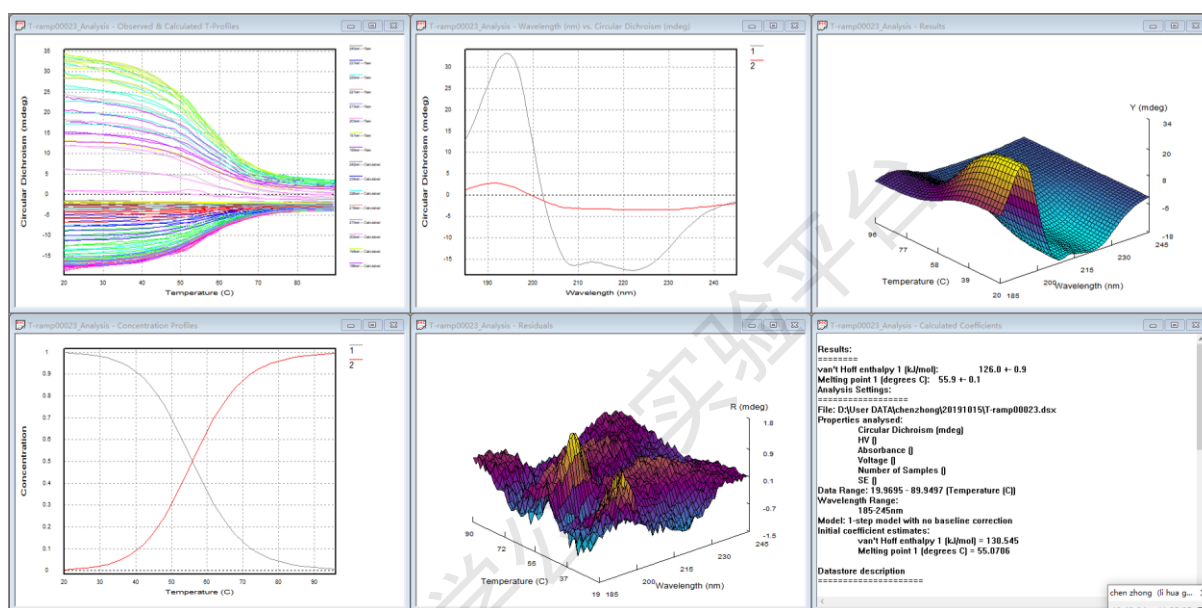


图 6-26 单个变温点分析图

6.4.2 单点采集模式 T_m 分析步骤:

以下是单波长点变温曲线的图谱（192 nm，20 - 90 °C）

点击图谱上方的功能选项图标 **D**，进入处理界面。用鼠标选中要处理的曲线名字，然后点击右侧的 Fit。

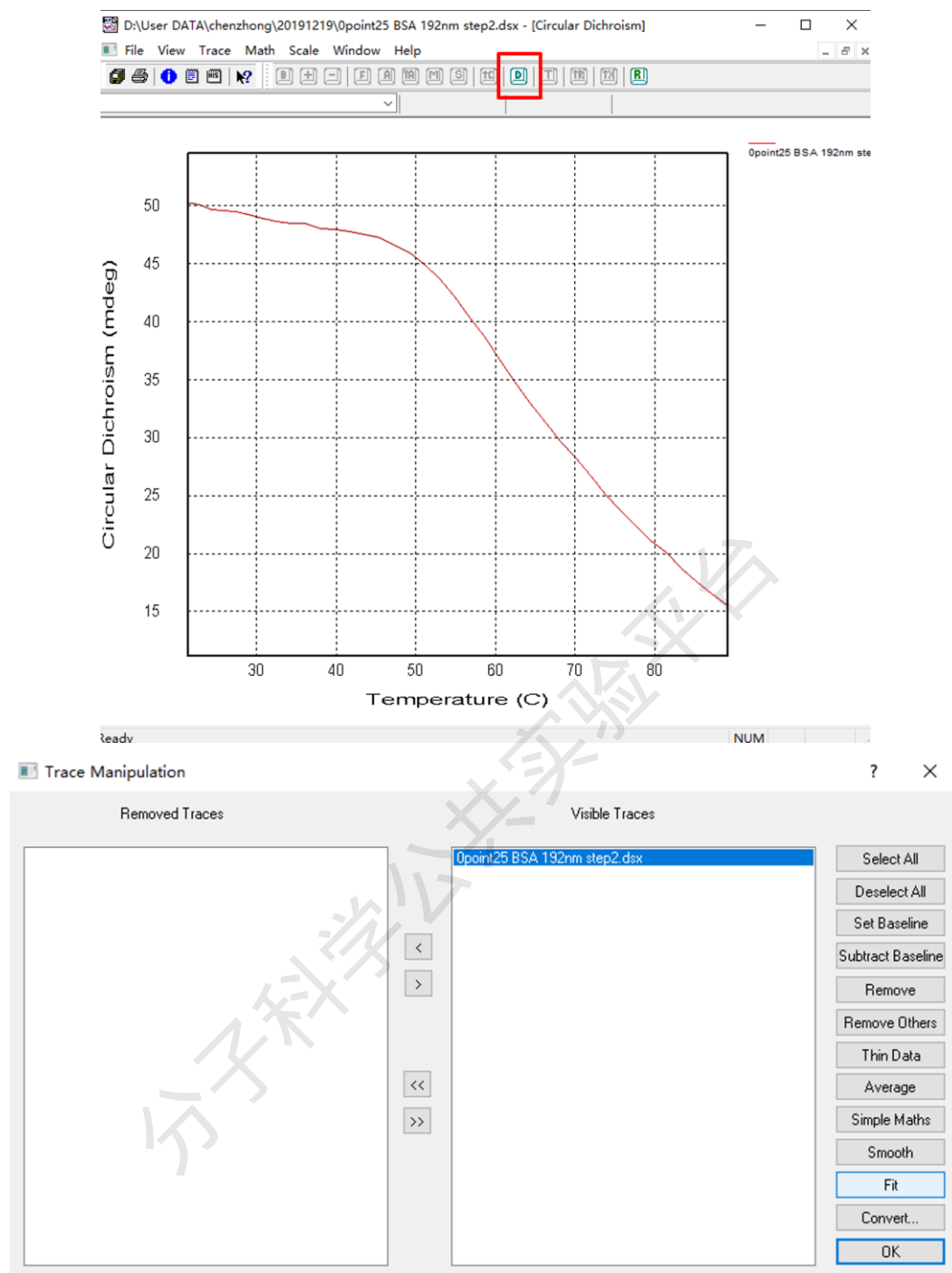


图 6-27 数据处理界面

如下图所示，首先选择拟合的方程模型 Sigmoid Curve，点击一次 Estimate，再点击 2-3 次 Fit。参数 x_0 即为 T_m 值，Error 为正负误差。当 Error 大于 5% 时，表示该方程模型不适合。可从下拉菜单中选择其它方程。

拟合结束后，点击界面右侧上方的 OK。保留 Fit(f) 为拟合后曲线。其余移除。

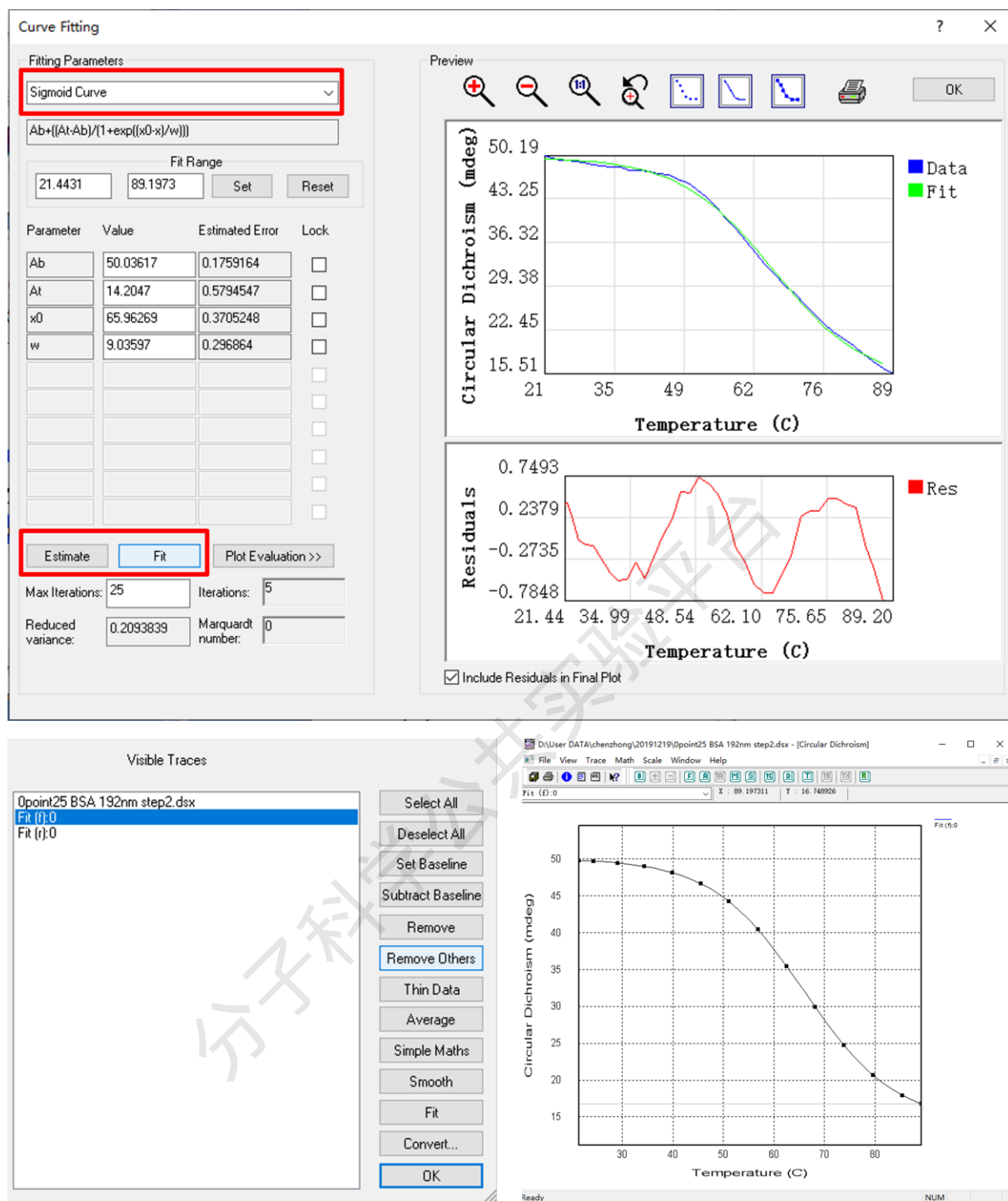


图 6-28 数据拟合界面

在图谱曲线界面，点击 View/History 下拉，可以看到拟合过程及拟合后的结果。

6.5 停流样品测试

6.5.1 停流附件的安装步骤见附录 1

6.5.2 停流测试步骤

完成停流附件安装后, 开启 System 电源。打开 Pro-Data Chirascan 软件, 软件会自动识别停流附件。

6.5.3 停流圆二色实验

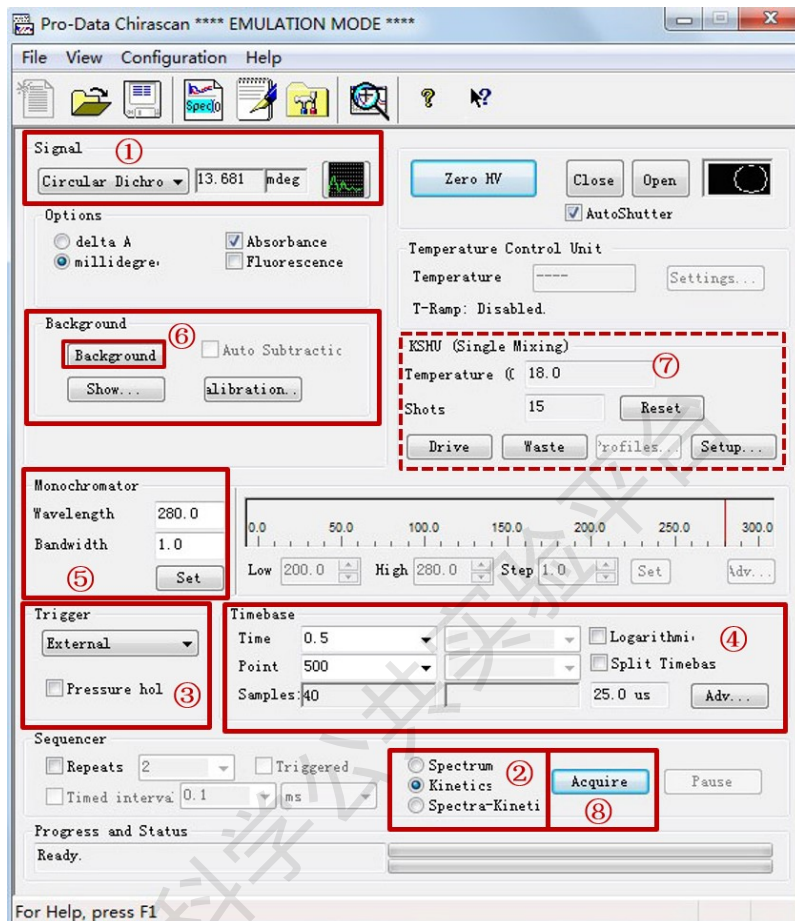


图 6-29 Pro-Data Chirascan 软件界面

- ① Signal 选择信号 Circular Dichroism (可选 Circular Dichroism、Absorbance、Fluorescence、Fluorescence Polarization 等多种光信号, 下面分别说明)
- ② 选择扫描模式 Kinetics
- ③ 选择 Trigger 模式为 External
- ④ 设置 Time base 的参数
- ⑤ 设置波长和带宽, 点击 Set 保存
- ⑥ 装载参照物质, 如蒸馏水或溶剂, 检测背景 Background, 点击 Background
- ⑦ 装载样品 Loading Sample 润洗管路, 手动或软件控制 (润洗管路一般要点击 Drive 键 4 或 5 次)
- ⑧ 采集数据, 点击 Acquire

6.5.4 停流吸收实验

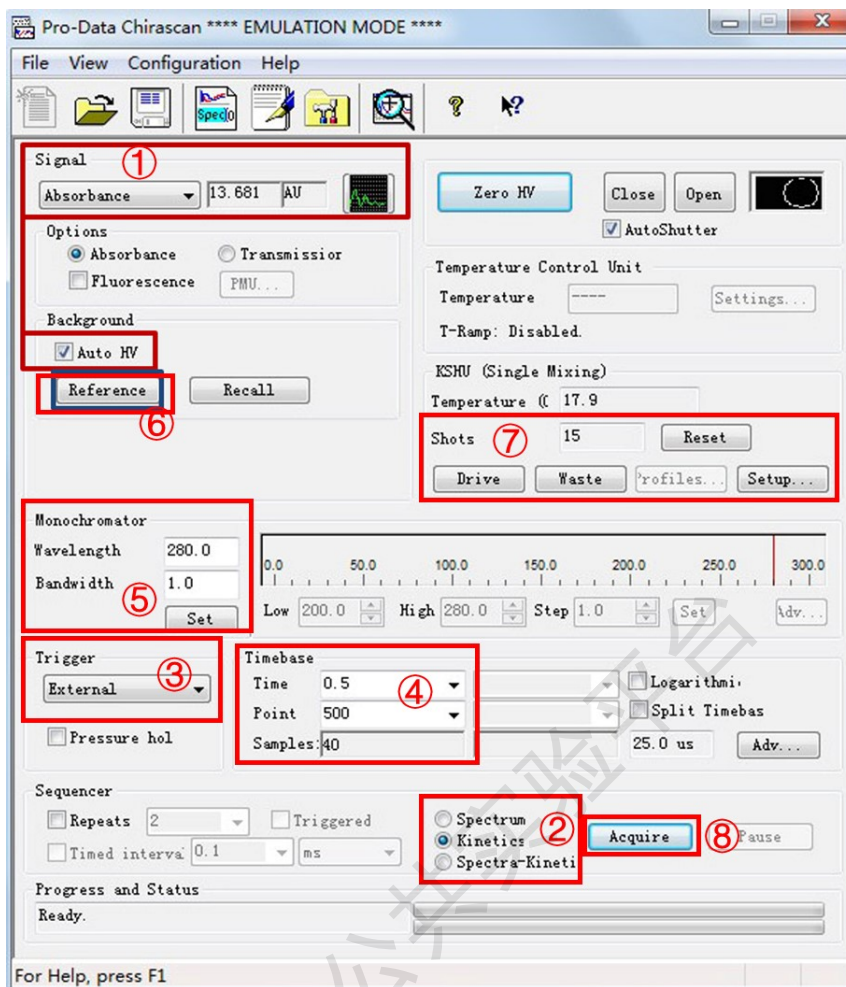


图 6-30 停流吸收测试界面

- ① 选择信号 Absorbance, 激活 Auto HV
- ② 选择扫描模式 Kinetics
- ③ 选择 Trigger 模式为 External
- ④ 设置 Time base 的参数
- ⑤ 设置波长和带宽, 点击 Set 保存
- ⑥ 装载参照物质, 如蒸馏水或溶剂, 点击 Reference
- ⑦ 装载样品 Loading Sample 润洗管路, 手动或软件控制 (润洗管路一般要点击 Drive 键 4 或 5 次)
- ⑧ 采集数据, 点击 Acquire

6.5.5 停流荧光测试实验

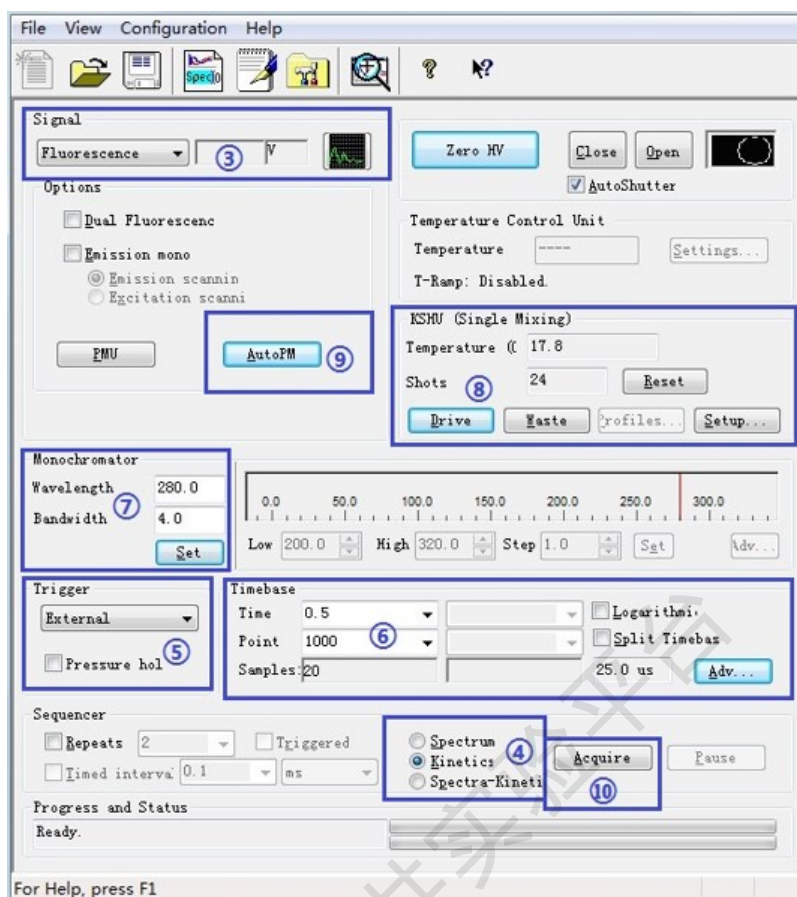


图 6-31 停流荧光测试界面

- ① 选择光程(2 mm/10 mm), 对于荧光弱的样品优选 10 mm 光程
- ② 选择适当的滤光片, 通常比激发波长大 15-20 nm



- ③ 选择信号 Fluorescence
- ④ 选择分析模式 Kinetics
- ⑤ 选择 Trigger 模式为 External
- ⑥ 设置 Time base 面板参数
- ⑦ 设置波长和带宽如 4 nm, 点击 Set 保存
- ⑧ 装载样品 Loading Sample, 润洗管路, 手动或软件控制 (润洗管路一般要点击 Drive 键 2 或 5 次)
- ⑨ 自动检测电压, 点击 AutoPM
- ⑩ 采集数据, 点击 Acquire

6.5.6 停流圆二色实验数据处理

数据处理的步骤基本和光谱测试一样，主要是以下几个步骤：

- 1.取平均值 Average
- 2.扣除背景 Subtract Baseline
- 3.拟合方程 Fit（选择合适的参照模型，也可以自己编辑方程处理）

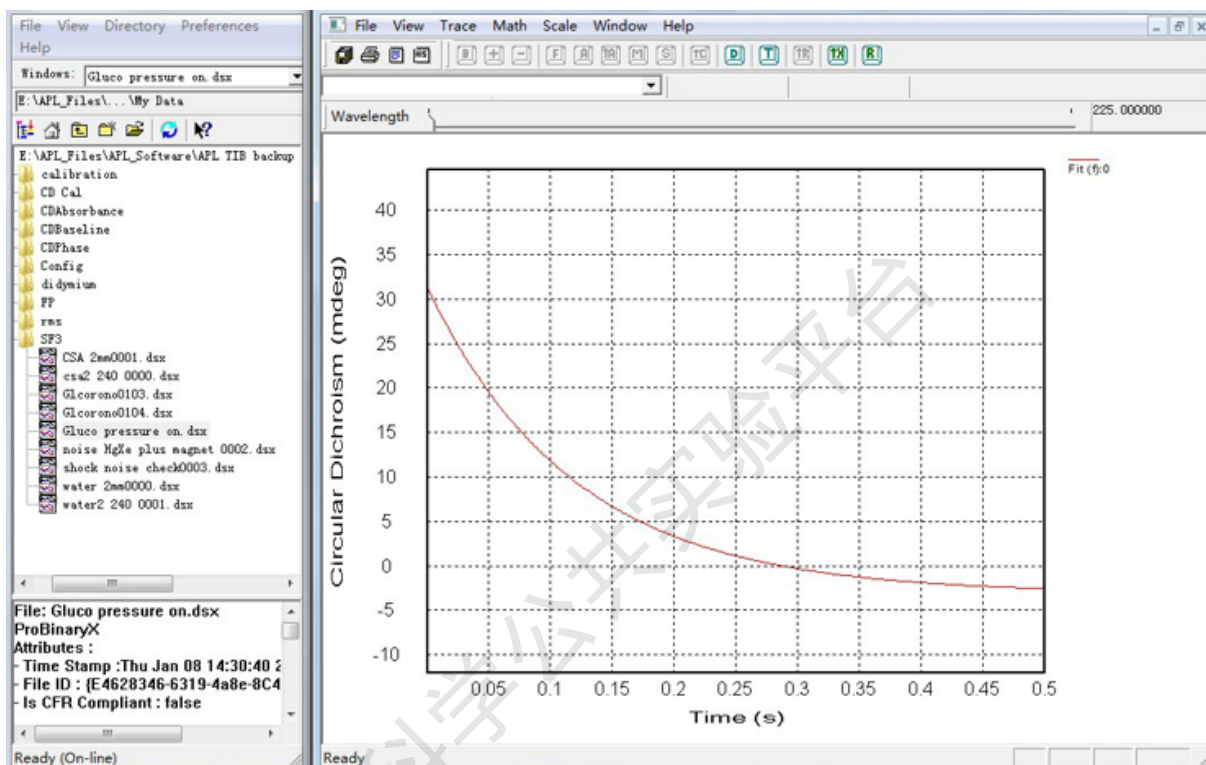


图 6-32 停流圆二色实验数据处理界面

6.6 固体 CD、磁 CD 和近红外样品的测试

6.6.1 固体 CD 测试

固体样品测试需要安装固体附件或者积分球附件，见附录 2。软件的操作步骤和液体样品测试基本一致：先测空气作 Background, Buffer 用 KBr 晶体或者样品的空白底板，然后再进行固体样品测试。

6.6.2 磁 CD 测试

磁 CD 测试需要安装磁 CD 附件，安装过程见附录 3。软件的操作步骤同液体样品基本一致。因为磁场有两个方向（S-N，或 N-S），一般都要调换磁场方向测试一次，也就是一个样品测两次即可。

6.6.3 近红外样品测试

近红外样品测试也需要安装近红外附件，安装过程见附录 4。测试时，设置合适的带宽如 6 - 10 nm 带宽，其他软件操作步骤和液体样品一致。

6.7 旋光光谱（ORD）测试

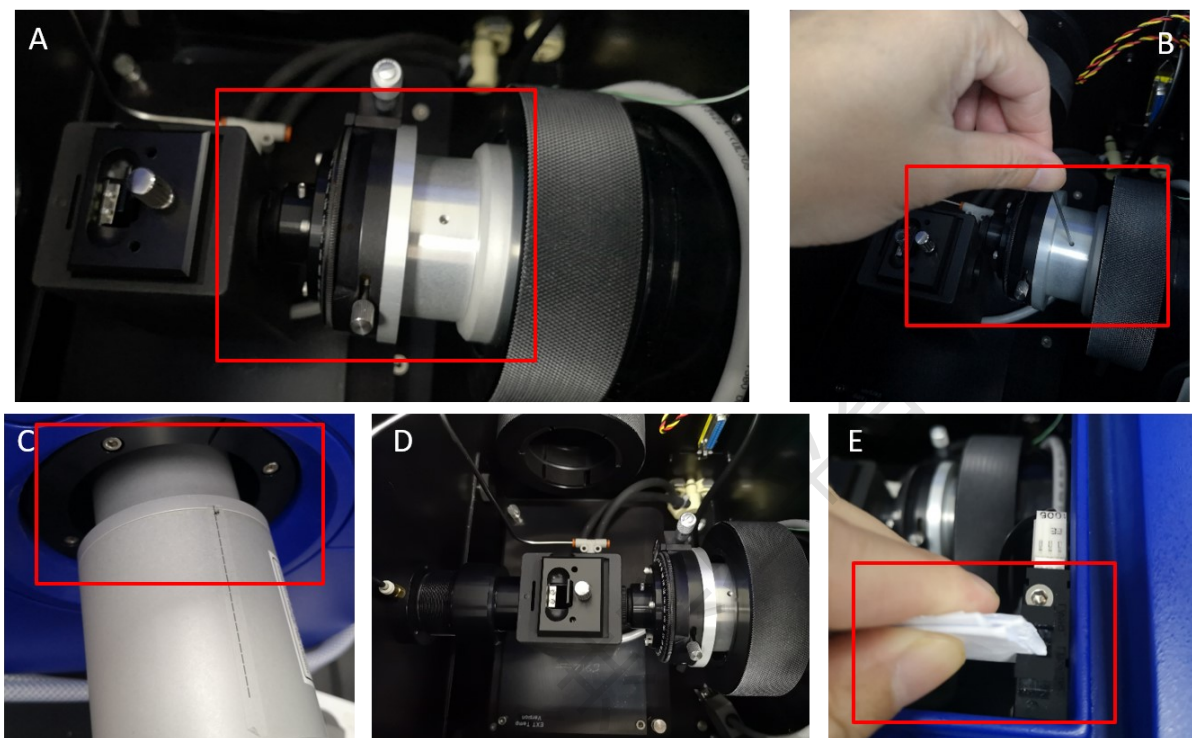


图 6-33 ORD 附件的安装

(1) 安装 ORD 附件：

将液体支架的水管和气管都拆除，将右边与检测器连接的部分拿出，ORD 附件按上图所示放入此位置，将检测器从右边的口插入至 ORD 附件的接口上，用小六角螺丝刀旋紧将检测器和 ORD 附件固定（图 6-33 B），检测器仍然会有少部分不能完全插入仪器中是正常的（图 6-33 C）

(2) 右键以管理员方式打开操作软件

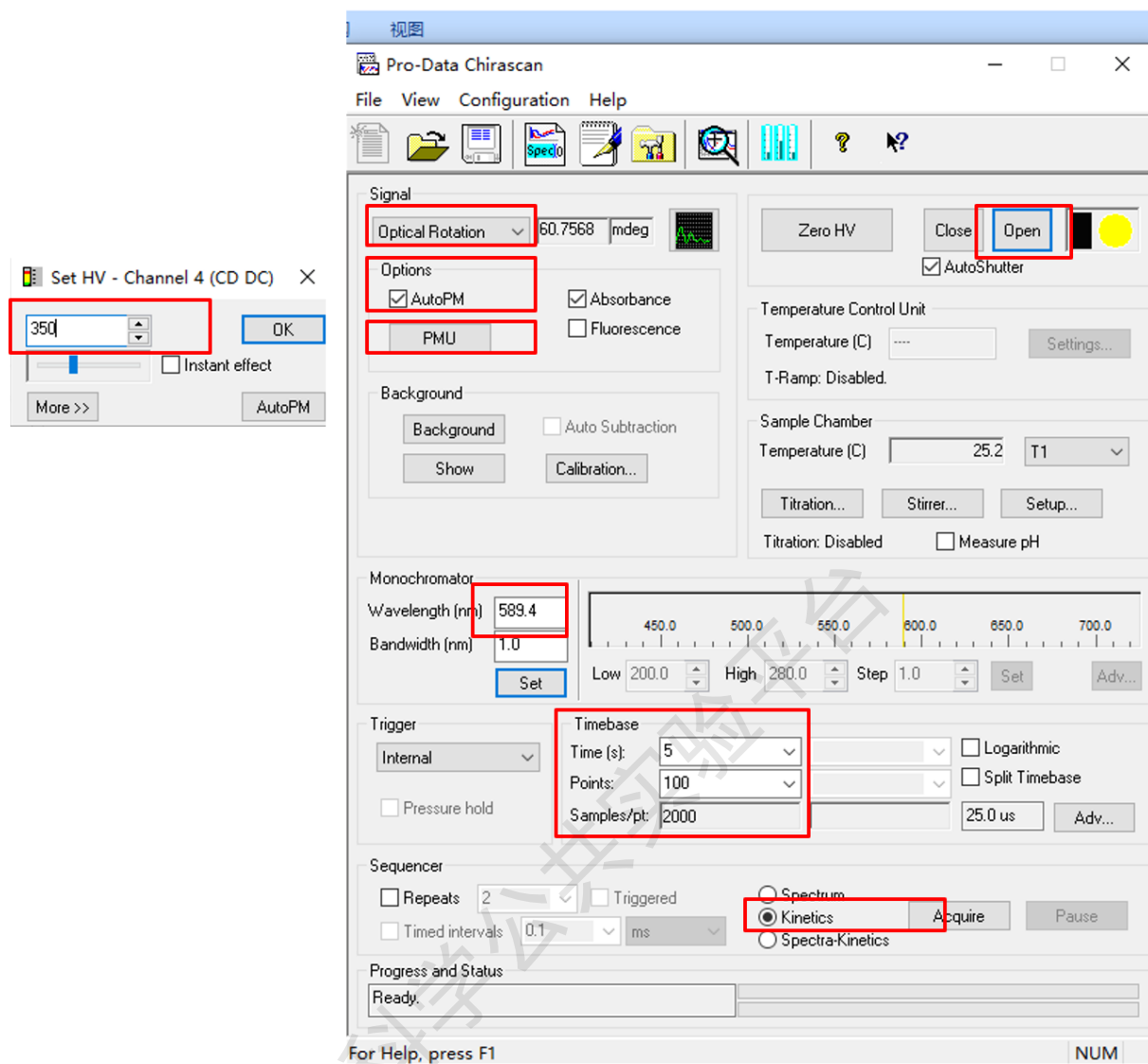


图 6-34 ORD 附件的软件设置

- (3) 下拉菜单选择 Optical Rotation
- (4) AutoPM 前面的钩去掉
- (5) PMU: 设置为 350, 点 OK 确认
- (6) Wavelength 输入 589.4 nm, 点 SET
- (7) 选 Kinetic 模式, time 为 1s, Points:100, 200, 300 都可以
- (8) 右上的 Open 打开

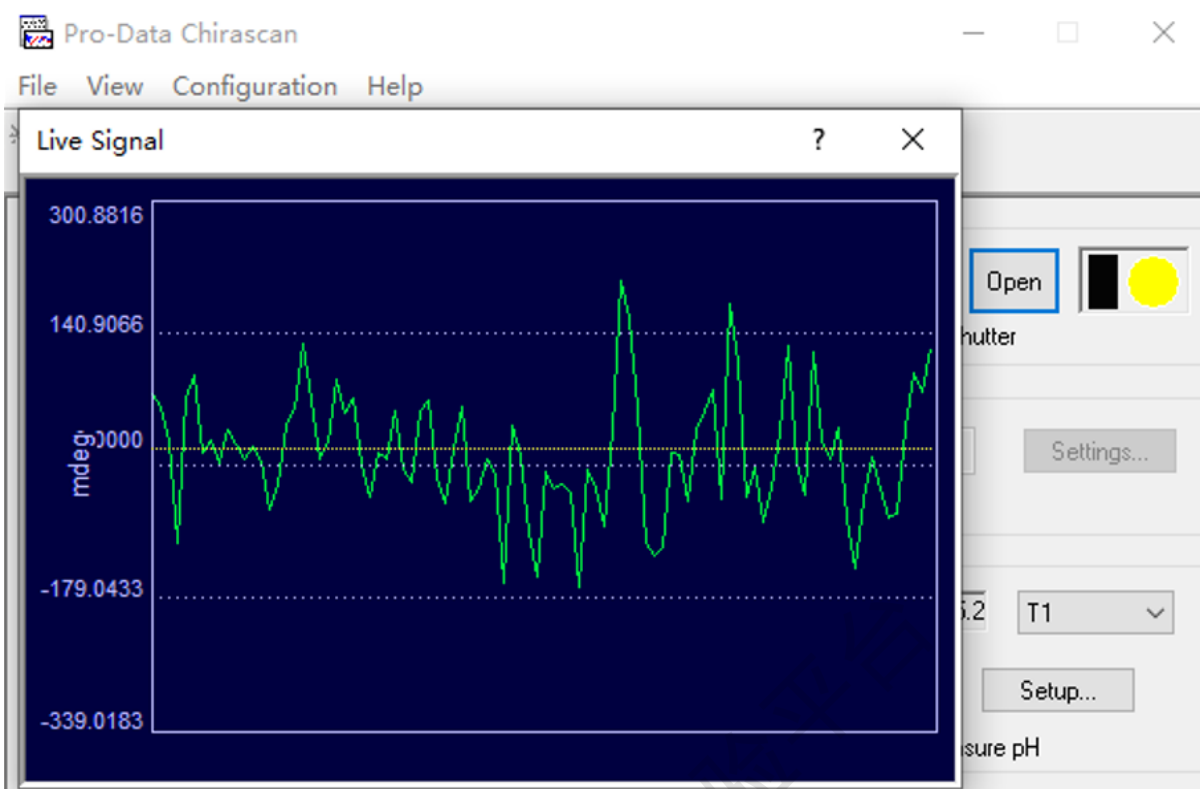


图 6-35 ORD 附件的调零

(9) 打开左上 Signal 的图，调零值

(10) 打开样品仓，盖子边角上用一张纸放入（图 6-33 E），调零才能激活

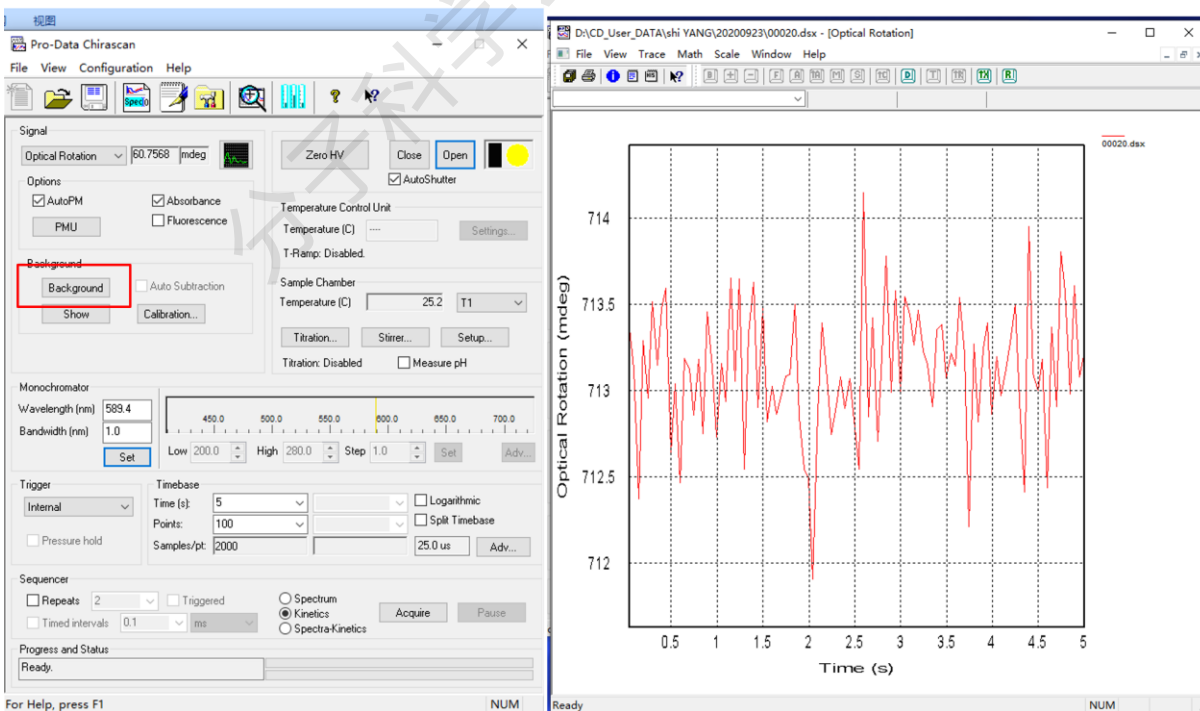


图 6-36 ORD 附件的调零

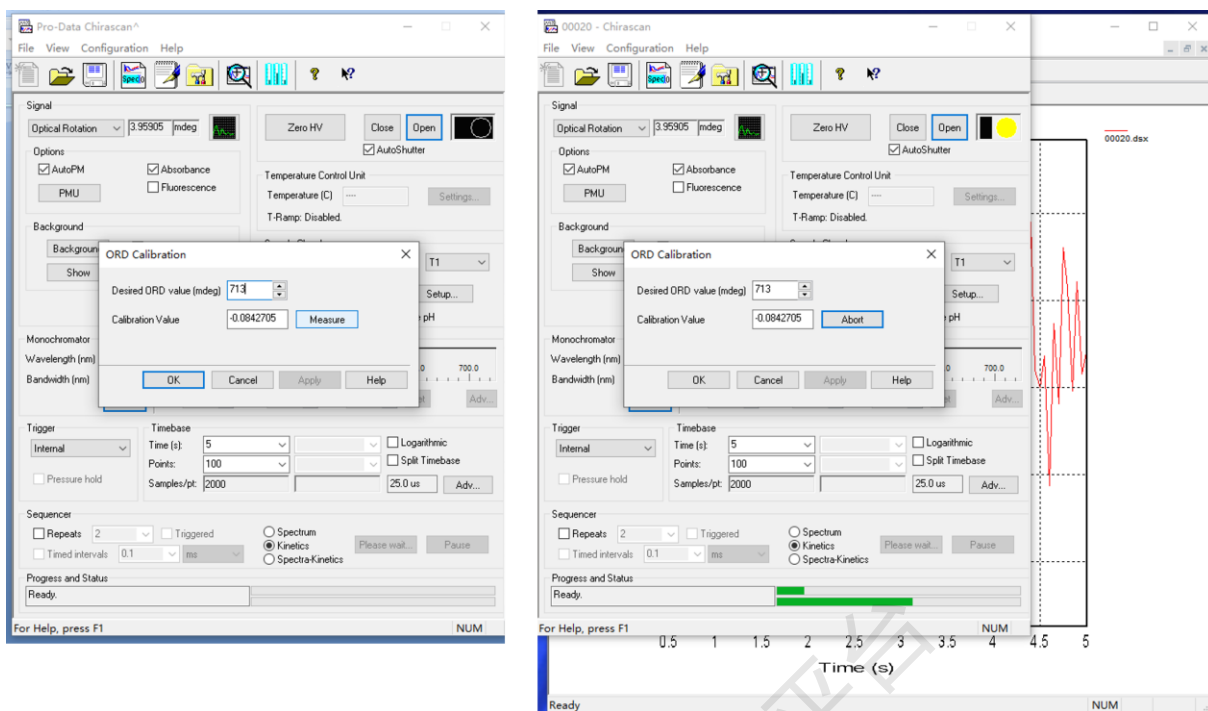


图 6-37

- (11) 点 background
- (12) 放蔗糖溶液 (1g/10ml 水), Auto subtraction 勾上
- (13) 点 Acquire
- (14) 打开 Open, 点 Calibration
- (15) 再点 Acquire, 看是否是 663°m, 如果不是, 将测出的值转入图 6-37 的框内, 点 Measure, 完成后, 点 Apply, 再点 OK。

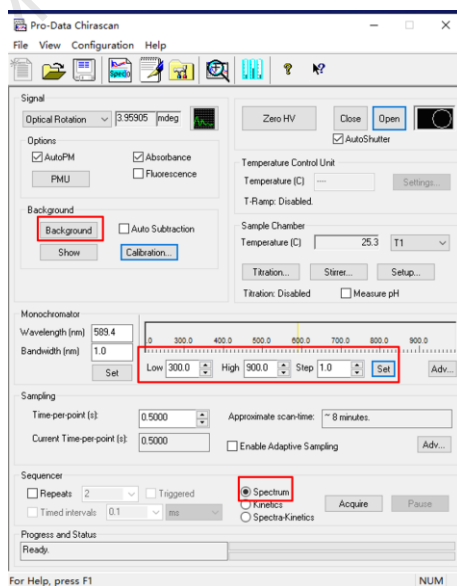


图 6-38

- (16) 改为光谱模式, 再测试背景, 然后测光谱

6.8 强手性样品信号测试设置

- (1) 当待测样品的 CD 在以下区间, $1400 \text{ mdeg} < \text{手性信号} < 6000 \text{ mdeg}$, 需要对仪器进行特殊设置, 【View】 - 【Device】, 双击【CD DC】后, 双击【Advanced】, 输入密码【danger】, 将【Target Signal】从 8 V 改为 2 V 或者 1.5 V。做完强手性样品之后必须按以上设置改回 8 V。
- (2) 当待测样品的 $\text{CD} > 6000 \text{ mdeg}$ 时, 设置方法如下, 在主菜单的【Auto PM】的勾去掉, 然后【View】 - 【Device】, 双击【CD DC】后, 直接将【PMT HV】调低至 150 或 100, 点击【Apply】, 完成。做完后, 将【Auto PM】的恢复勾选即可。

6.9 结束前的检查

6.9.1 退出账号

6.9.2 关闭仪器

6.9.3 收拾桌面和处理废液

7. 相关/支撑性文件

Q/WU FLHR001 文件编写规范

附录 1 停流附件安装步骤

附录 2 固体样品透射检测和积分球反射法附件安装步骤

附录 3 磁 CD 附件安装

附录 4 近红外附件安装

8. 记录

《仪器设备使用记录》

附录 1 停流附件安装步骤

关闭主机 System 电源，关闭并断开 Sample 的吹扫气体，断开水浴，取下 PMT 检测器，卸下静态样品室。

1. 安装连接板

装上 Locating plate，固定三个螺丝，连接氮气管路。

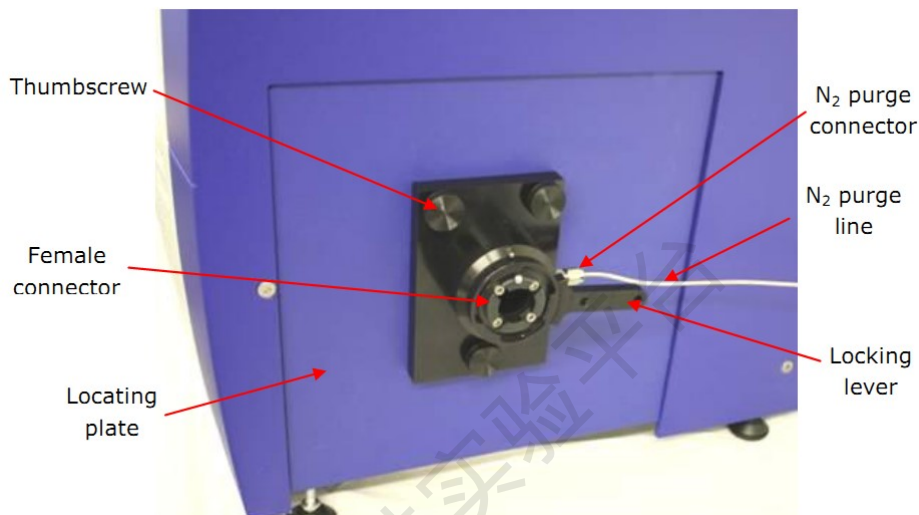


图 S1-1

2. 连接快速混合装置和比色皿

取下快速混合装置上的 Cell block 的隔离橡胶圈 Split O-ring，选择适当的光程后，用手将锁杆 Locking Lever 扳起，然后与固定板的接口 Female Connector 连接，位置吻合后锁杆可以自动落向锁死位置。



图 S1-2

3. 固定底座

确保停流装置底部与圆二色光谱仪主机没有碰触，旋紧快速混合装置四角的螺杆固定位置，并检查（如晃动）装置看是否稳固。

4. 连接氮气管路和控制电缆线

调整氮气钢瓶出口压力为 6 - 8 bar (1 bar = 0.1 Mpa);

其中第 2 路通过减压阀减为 3-4 bar 用于驱动 Single Drive Ram。

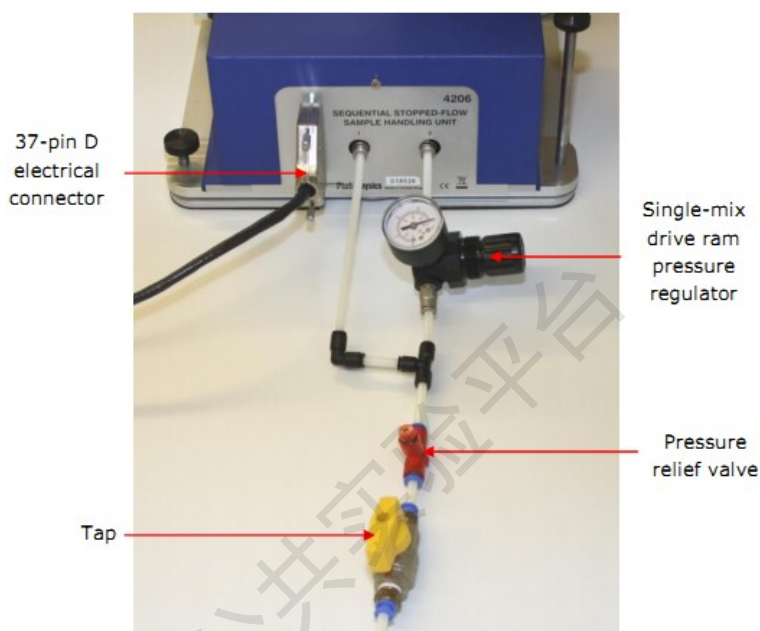


图 S1-3

5. 连接水浴

如果需要温度控制可以连接水浴，左边低水位是入口，右边是出口

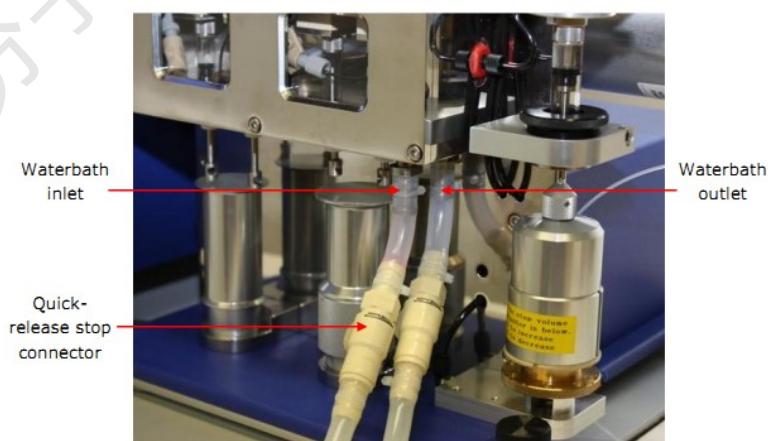


图 S1-4

6. 安装检测器

PMT 检测器头部需装上固定卡口（工具箱内），旋转固定在 Cell block 上，连接电缆。完成上述连接后，打开 Pro-Data 软件，设置实验参数。

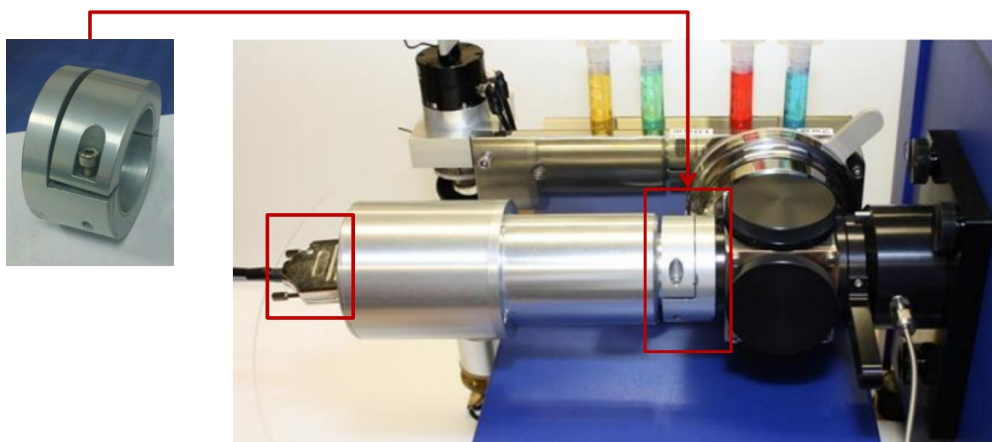


图 S1-5

分子科学公共实验平台

附录 2 固体样品透射检测和积分球反射法附件安装步骤

固体 CD 检测附件的安装



图 S2-1

1. 安装固体 CD 检测附件之前, 必须首先从样品仓里所有附件拆除, 包括检测器、水管、氮气管路、电源插线、比色皿支架等。最后松掉固定螺丝。

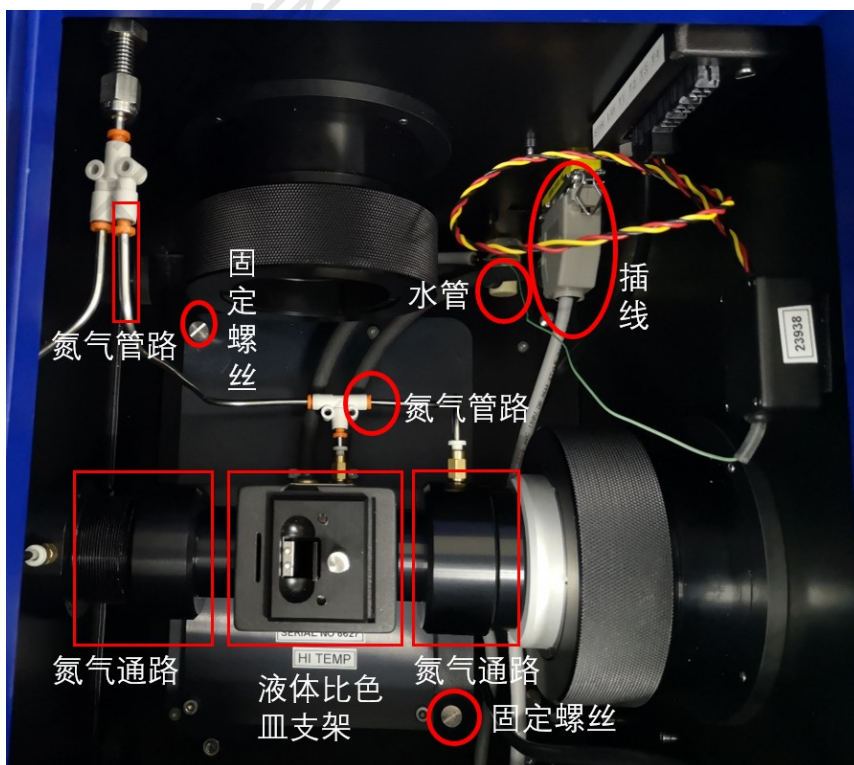


图 S2-2

2.将固体附件放入样品仓内。如图 S2-2 所示, 底板上有孔和螺丝, 所以有各自对应的**固定的放置方向**。然后装好两端的氮气通路和右边的探测器, 探测器上的虚线要和仪器上的缝对齐。

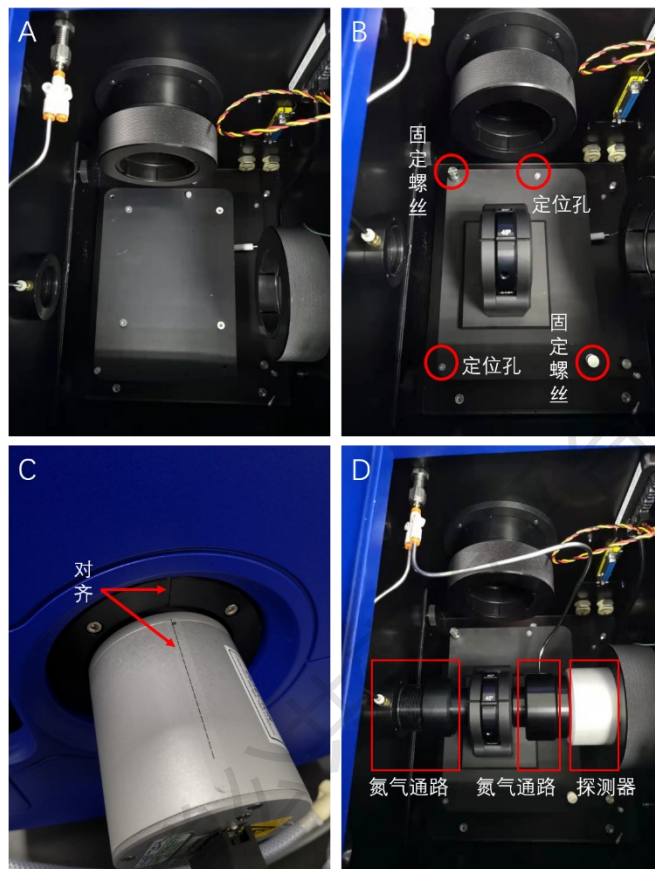


图 S2-3

积分球反射法检测附件的安装



图 S2-4

如上图 S2-4 中的 H 所示, 积分球的光路上分成左右两侧, 将右侧样品仓的附件取下来, 盖子旋转松开 (A), 将小石英片放入小孔中, 然后将制备好的粉末样品轻轻地放进去, 将盖子盖上旋转关好 (C-D), 将样品仓安装在积分球的右侧 (E-F), 左侧放入小圈 (美观作用), 完成积分球样品的装样。

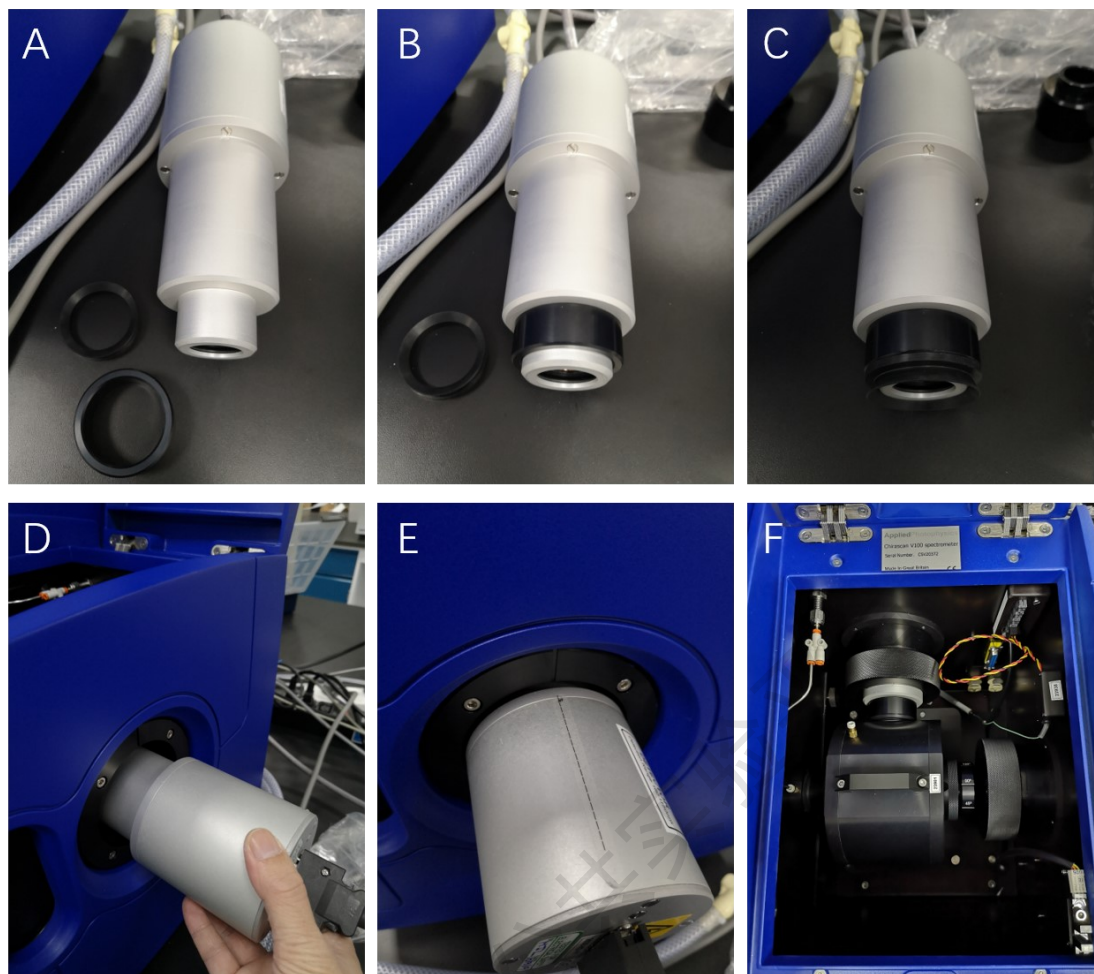


图 S2-5

积分球放入样品仓的过程和固体样品池放入样品仓的操作基本一致，最主要区别是需要在检测器上加上两个套环（如图 S2-4 A-C），然后检测器对齐接入积分球，积分球左侧再接上氮气通路完成安装。

附录 3 磁 CD 附件安装

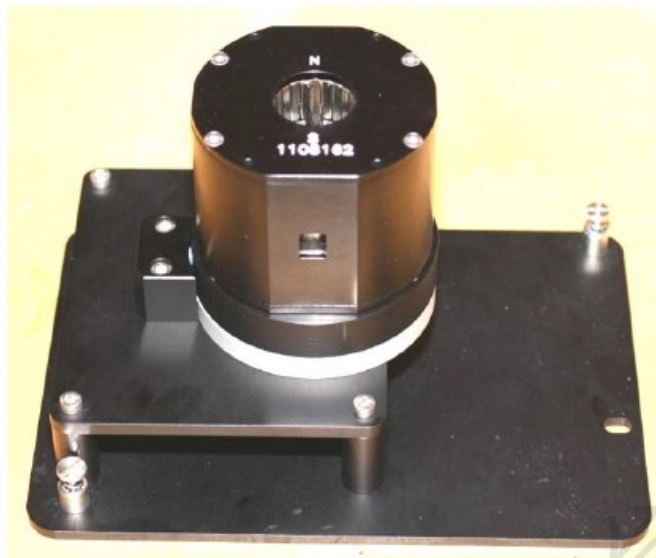


图 S3-1

注意：如果你有心脏起搏器或铁（钢或不锈钢）的植入物（如钢板，螺丝钉等），请不要接触该磁铁。不要在磁铁附近放置磁性的工具或其它物体。不要让这个磁 CD 附件靠近计算机、磁盘、磁带或卡磁条。不要带手表。

安装 MCD 磁体附件之前，必须首先从样品仓里拆除所有附件。如检测器、水管、氮气管路、比色皿支架。

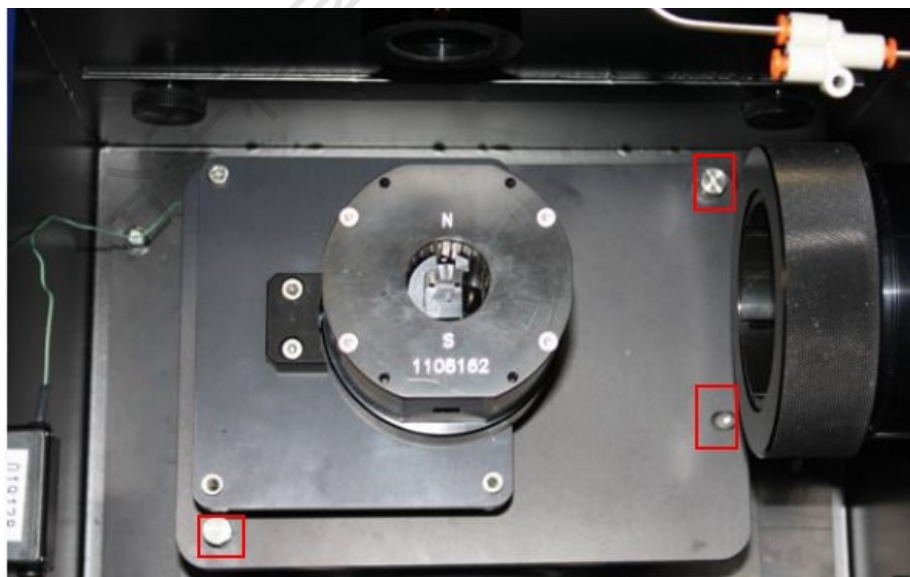


图 S3-2

然后将 MCD 磁体附件放入样品仓内。如上图所示，磁体底板上有孔和螺丝，所以有**固定的放置方向**。

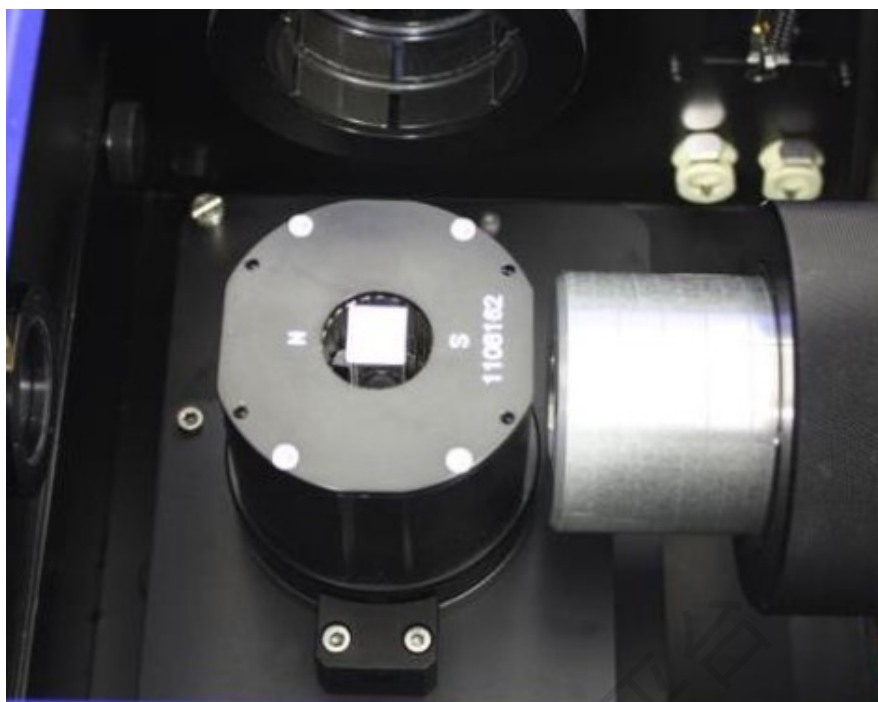


图 S3-3

如上图所示，放入 10 毫米比色皿。测试流程和普通 CD 一样：即背景、溶剂和样品。须注意的是，磁场方向不同会产生不同的信号，所以需转动磁体 N-S 和 S-N 测试两轮。

附录 4 近红外附件安装

1. 按照以下步骤拆下氙灯

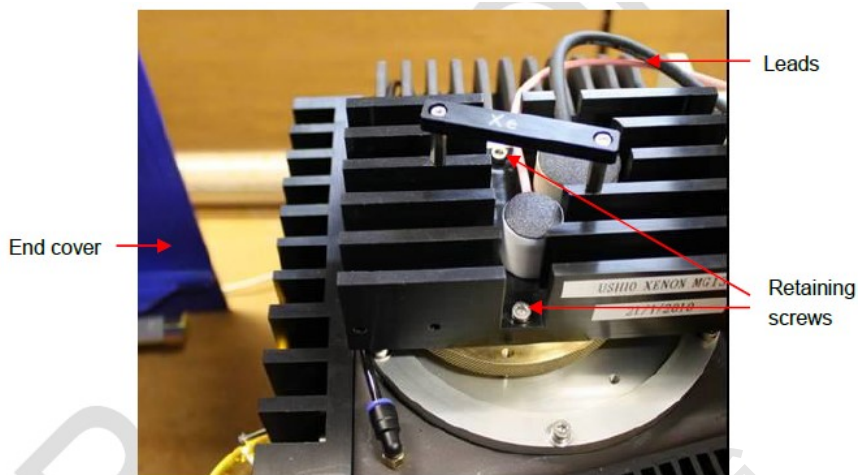


图 S4-1

- 1.1 准备一只空的灯存储盒。
- 1.2 关灯后，等待至少 30 分钟，直到灯完全冷却。
- 1.3 将光源处的蓝色罩子向左平行拉开，移走，然后可以看到上图中的结构。
- 1.4 将上图 Leads 所指的黑红两根线缆从主机后面拔下。
- 1.5 将上图 Retaining screws 所指的两个螺丝拧松（不用完全除去）。
- 1.6 小心地向上提起氙灯（握住标有 Xe 的手柄），放入灯存储盒内，然后拧紧固定螺丝。

2. 安装钨灯



图 S4-2

注意：每次都使用灯把手（标记 W），千万不要接触灯泡。

- 2.1 拧松固定螺丝后，从灯存储盒内取出，小心地放入到灯壳里。
- 2.2 拧紧固定螺丝，并连接缆线（如下图示）。

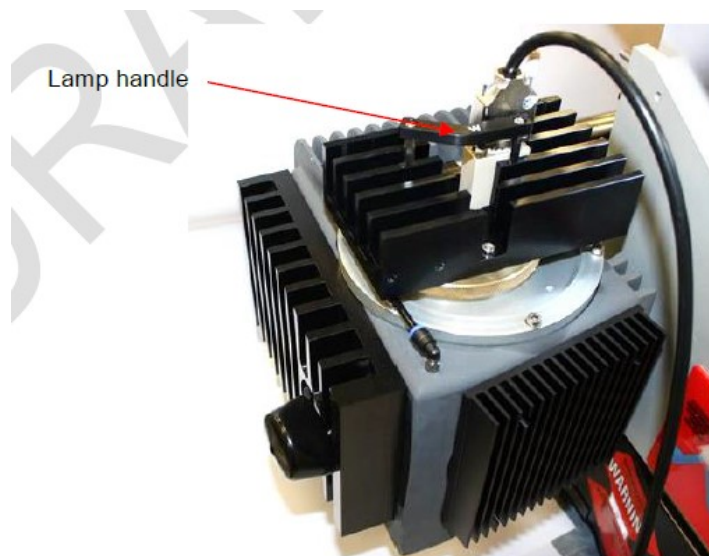


图 S4-3

钨灯电源应放置于仪器灯外壳蓝色罩子的左侧（如下图示）。

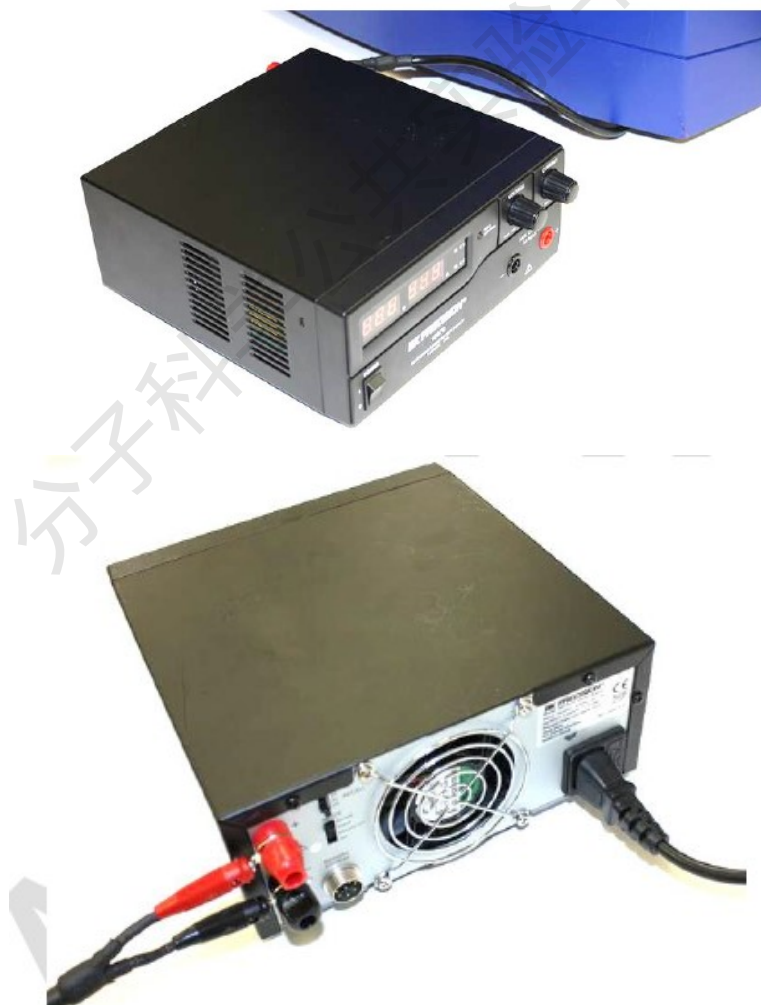


图 S4-4

3. 上图是钨灯电源的的背面。按以下步骤连接灯和电源：

3.1 将灯电源连接到总电路板。

3.2 使用灯电源前面的旋钮将电压设置为零（这是为了避免当超过 12 伏时会打破灯泡）。

3.3 保持电源断电状态。

3.4 用电缆线连接钨灯和灯电源，注意红色连红色和黑色连黑色（如上图示）。

关闭仪器 System 之后，替换 InGaAs 检测器，然后再打开 System，仪器会自动识别新的检测器。

使用钨灯时，**无需吹扫氮气！**

4.点灯步骤



图 S4-5

4.1 按下 switch，此时电压应为零。

4.2 **顺时针旋转**电压控制旋钮设置为 **12** 伏。

4.3 旋转电流控制旋钮到最大--这应该是约 **9** 安培。

4.4 等待大约 10 分钟，使灯达到平衡。现在可以使用近红外附件了。

在近红外波长范围中，由于光的强度降低，必须提高 Bandwidth 参数，从 6 nm 起步，通过 HV 图谱来判断，可能选择 8 nm 甚至 10 nm。

