

文件编号：Q/WU FLHA19010009R029

版本号：V1.0

受控状态：

分发号：

理化公共实验平台

质量管理文件

制备液相色谱仪（正相） Waters Prep_150 (NP)标准操作规程

2020年03月10日发布

年 月 日实施

理化公共实验平台 发布

理化公共实验平台

理化公共实验平台

目录

1. 目的	1
2. 范围	1
3. 职责	1
4. 重要说明	1
5. 实验室安全管理规范.....	1
6. 色谱实验室仪器设备管理规范.....	2
6.1. 制备液相色谱仪预约与使用.....	2
6.2. 预约制度	2
6.3. 培训考核制度.....	3
7. 实验内容	4
7.1. 样品的准备.....	4
7.2. 登录系统	4
7.3. 查看项目文件.....	5
7.4. 运行样品	5
7.5. 创建样品列表.....	16
7.6. 样品收集	21
7.7. 运行状态查看.....	24
7.8. 实验结束后处理.....	25
7.9. 结果查看	25
7.10. 其他数据处理.....	27
7.11. 实验结束处理.....	29
8. 相关/支撑性文件	29
9. 记录	29
附 1: 正相手性色谱柱使用说明.....	31
附 2: 制备液相色谱仪操作思路.....	32

理化公共实验平台

1. 目的

建立制备液相色谱仪（正相）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制备液相色谱仪（正相）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实验室技术员。

3.2. 实验室技术员：确保操作人员经过相关培训，并按本规程进行操作。

4. 重要说明

4.1. 进入色谱实验室，请仔细阅读本实验室的安全管理规定；

4.2. 严禁将自己授权的门卡转借他人，一旦发现将进行禁用处理；

4.3. 禁止将实验无关人员带入实验室；

4.4. 严禁在实验室饮食、吸烟或随意走动；

4.5. 禁止随意使用本实验室制样间相关耗材；

4.6. 夜间实验，需两人在场；

4.7. 请严格按送样要求进行制样。由于样品问题导致 ESI 毛细管堵塞或仪器配件更换，费用将由用户所在课题组承担；

4.8. NAS 网盘是本实验室获取数据的唯一有效途径，禁止用 U 盘、移动硬盘等进行数据拷贝；

4.9. 请严格按仪器操作规程进行操作。实验过程中有任何不确定或报错提醒必须联系技术员，否则造成损伤或实验室损失的，用户将承担相关责任并进行通报批评。

5. 实验室安全管理规范

5.1. 严格遵守色谱实验室的各项安全注意警示标识。

5.2. 色谱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具与紧急逃生通道位置。

5.3. 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。

- 5.4. 实验室应保持整洁，严禁摆放与实验无关的个人物品。严禁在实验室饮食与抽烟。严禁动物进入实验室。
- 5.5. 当没有气体时，严禁开启仪器。
- 5.6. 非常规实验测试须技术员同意并指导方可进行。个人 U 盘、移动硬盘等易带入病毒的存储设备不得与各色质谱仪器工作站电脑连接。
- 5.7. 空压机及 UPS 所处房间应使用空调，要保持室内空气干燥，在潮湿的季节应除除湿。至少每周检查一次有无积水。

6. 质谱实验室仪器设备管理规范

6.1. 制备液相色谱仪预约与使用

该仪器遵从学校“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；并在保障校内使用的同时，面向社会开放。

该仪器的使用实行预约制度，请使用者根据样品的测试要求在学校“大型仪器共享管理系统”（以下简称大仪网）进行预约，并按照规定登记预约信息，本仪器校内用户不接受送样测试。校内用户使用的基本流程包括：

- （1）大仪网进行预约培训并提交培训申请材料；
- （2）技术员进行现场培训；
- （3）两周内，用户进行实际样品测试，并进行上机考核以开通门禁资格；
- （4）用户按规定制样并在大仪网上进行机时预约；
- （5）进入实验室进行登记；
- （6）上机实验。

6.2. 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，实验室仪器需进行网上预约制度。根据预约制度可登陆大仪共享网站最少提前 2 小时预约机时，包括周末；寒暑假及国庆假期最少提前一天预约机时。

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 2 小时取消预约并通知技术员。如无故不遵预约时间，将被取消一个月的预约资格。

预约时段		预约时间/每人	测试内容
周一至周日	08:00 至 22:30	每人可预约最短机时为 60 分钟	纯化制备

- (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），用户课题组须承担维修费用；
- (5) 本实验室所有原始数据不允许在仪器工作站上删改，尤其不允许用 U 盘与移动硬盘直接拷贝。用户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，以保存并做数据处理；实验数据在本实验室电脑中保留 2 年。
- (7) 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。

6.3. 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，两周内培训者需管理人员监督下进行 5 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，可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**可操作实验^a**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，给予重考惩罚、培训费翻倍。

对接受培训人员的核心要求：

- (1) 了解液相色谱仪器的基本原理及其应用的多学科背景知识；
- (2) 熟悉电喷雾离子源的原理、构造及各部分的功能，严格遵守仪器部件的开

- 关顺序，在突然停电时能及时处理仪器并上报，关注仪器各部件有无异常；
- (3) 熟练掌握 Empower 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。

7. 实验内容

7.1. 样品的准备

- (1) 为获得良好的纯化效果，合成的初产物需在用户所在实验室进行过柱子/爬板等纯化处理；
- (2) 溶剂：正己烷、异丙醇、四氢呋喃、氯仿等非极性或弱极性溶剂，严禁使用遇到正己烷、异丙醇、四氢呋喃、氯仿析出的样品溶液；严禁样品中含三苯基膦类化合物；
- (3) 样品浓度：10-50 mg/ml；
- (4) 样品量：<10 ml；
- (5) 样品瓶要求：10 ml 样品瓶，要求十字花纹预开口。
- (6) 制备溶液之后，过 0.45 μm 的滤膜。

注意：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。

7.2. 登录系统

7.2.1 登录Windows Ctrl+Alt+Delete 输入用户名及密码，回车（当前阶段，技术人员会进行相关操作）

7.2.2 登录到大仪网

7.2.3 登录服务器：点击  图标，账号：课题组负责人姓名全拼；密码：首次登录同账号名

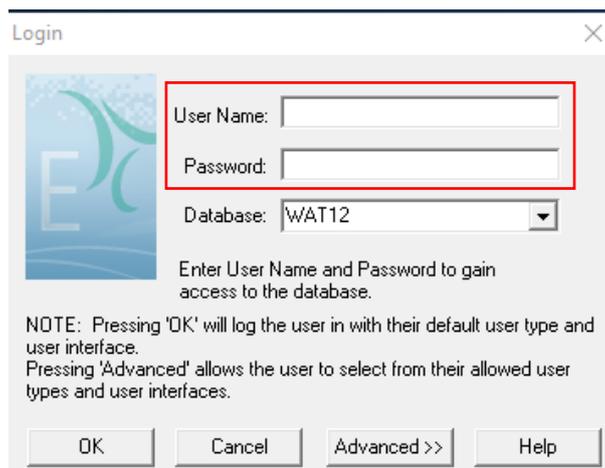


图 7-1

7.3. 查看项目文件

在 Empower 主界面，点击 Configure the System，弹出 Configure the System 页面，查看 PI Projects 项目文件，是否有课题组二级项目及与所用仪器对应的三级项目。如果没有，请联系技术员。

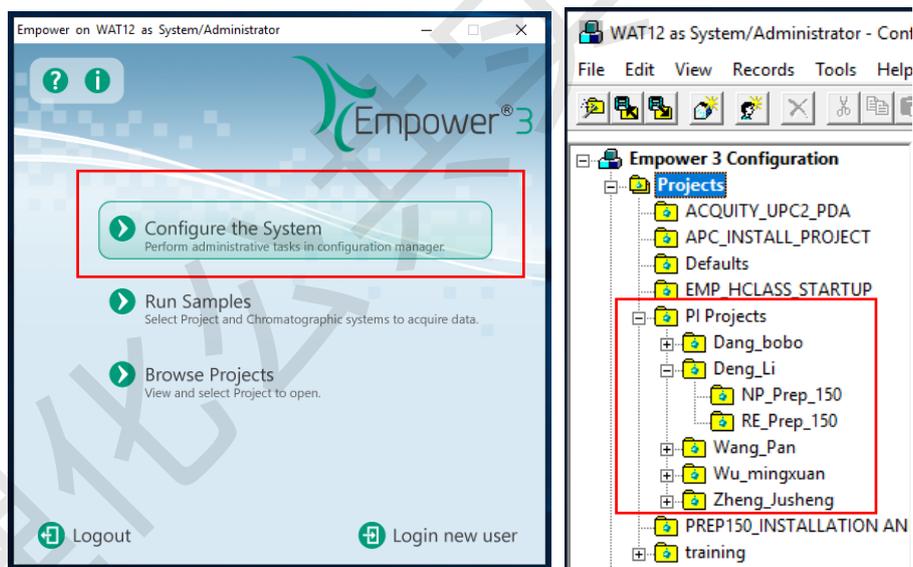


图 7-2

7.4. 运行样品

7.4.1 Empower 服务器界面，选择Run Sample

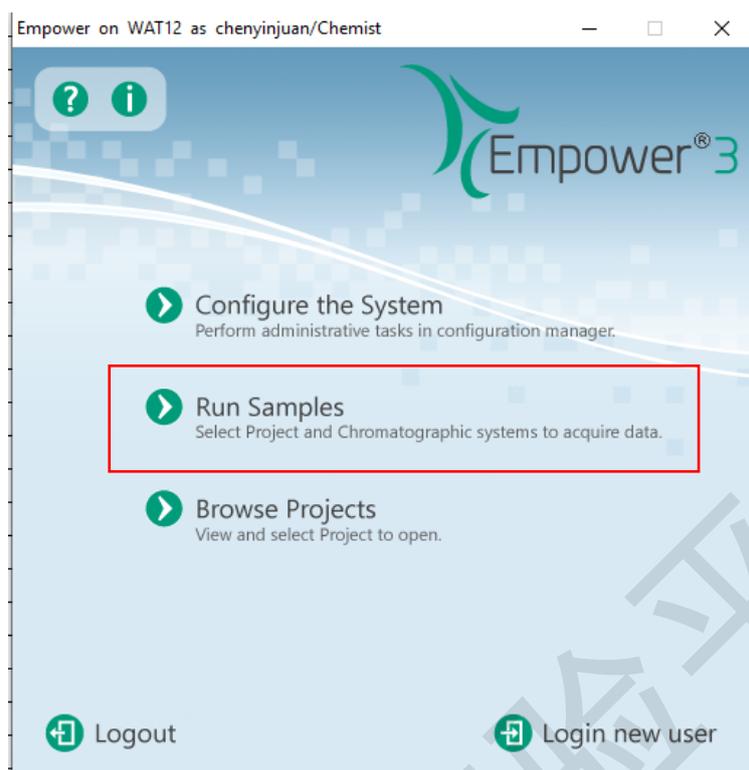


图 7-3

7.4.2 选择正确的项目文件及仪器配置系统

注：制备液相色谱仪(正相)有两种配置：（1）液相+PDA: PREP150_NP_PDA;（2）液相+PDA+MS: PREP150_NP_MS。

正相色谱由于流动相缘故，通常不接质谱，选择PREP150_NP_PDA，点击OK

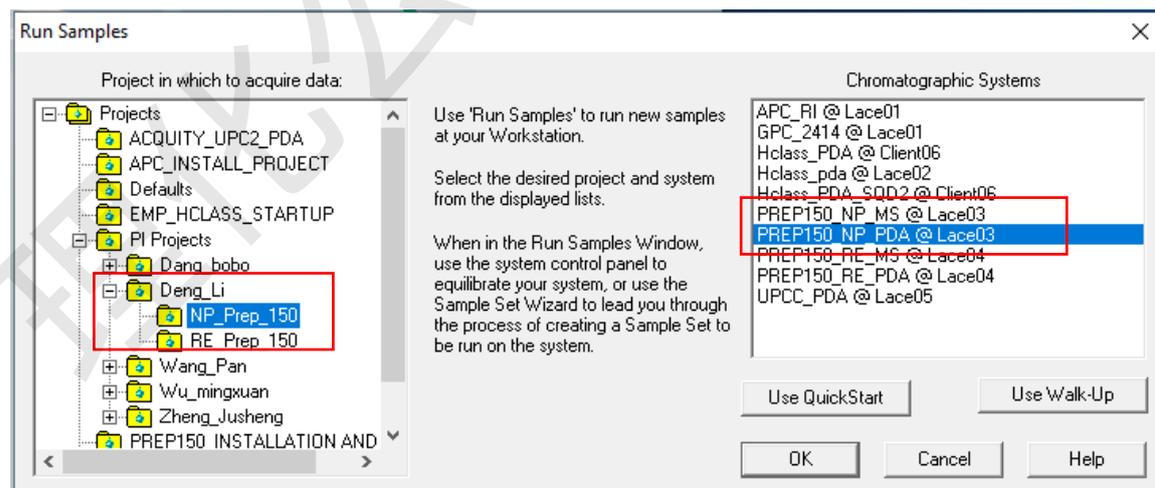


图 7-4

7.4.3 上述操作结束，进入运行样品窗口。该窗口下方包含二元溶剂管理器（2545）、自动进样器（2707 Autosampler）、二极管阵列检测器（2998 PDA

Detector）、样品回收器（WFCIII Fraction Collector）以及样品运行列表。如开机发现有部件显示通信错误，请选择该子窗口，右键-Reset即可。如有其它情况，请联系技术员。

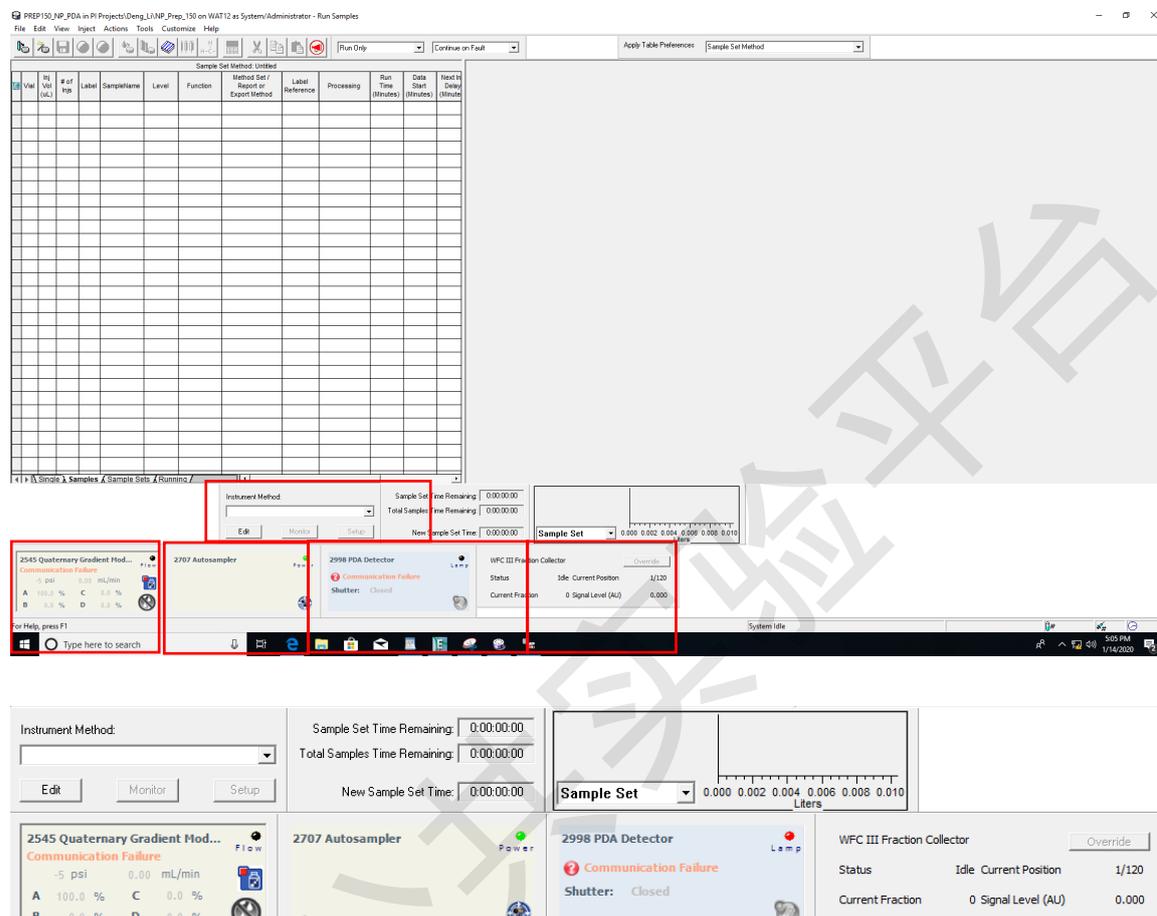


图 7-5

7.4.4 打开控制台。

操作：自动样品管理器（2707），单机右下角按钮，等待。进入仪器控制台

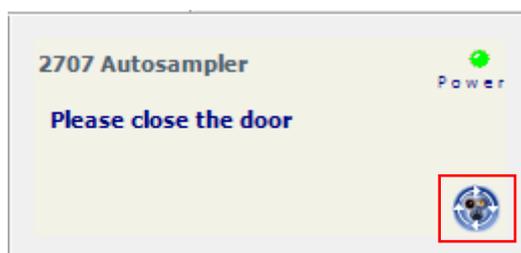


图 7-6

控制台界面（Console）：左列显示溶剂管理器（K1845Q817M）、自动进样器（27072 Autosampler）、二极管阵列检测器（2998 PDA Detector）。

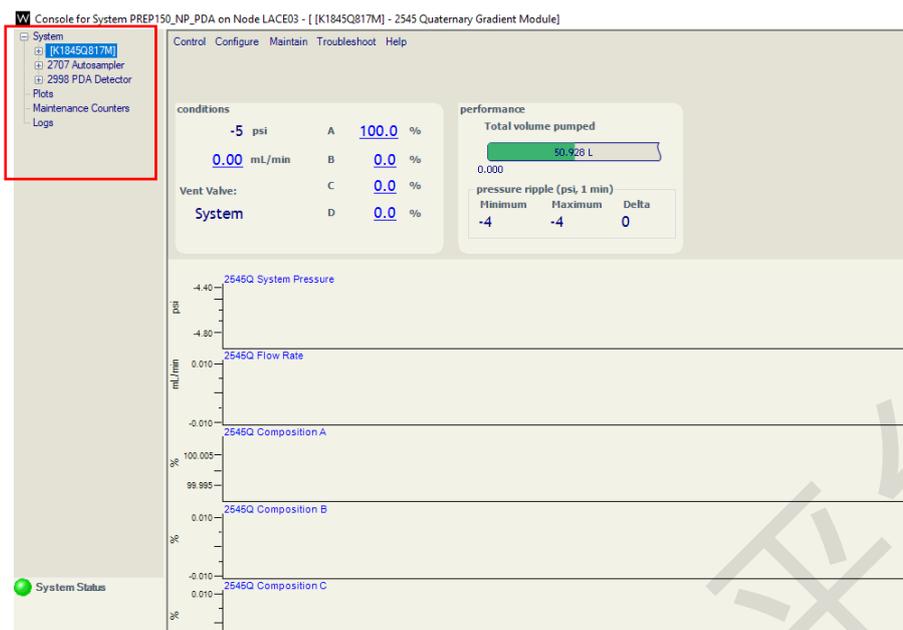


图 7-7

7.4.5. 灌注/清洗操作

目的：驱赶溶剂流路中的气泡。

7.4.5.1. 灌注操作

在Console界面，选中K1845q817M溶剂管理器，选择Control-Prime solvent，弹出Prime solvents对话框。选择灌注的流动相：对于正相色谱，默认A相正己烷，B相异丙醇。灌注操作时间为0.5 min，点击start。

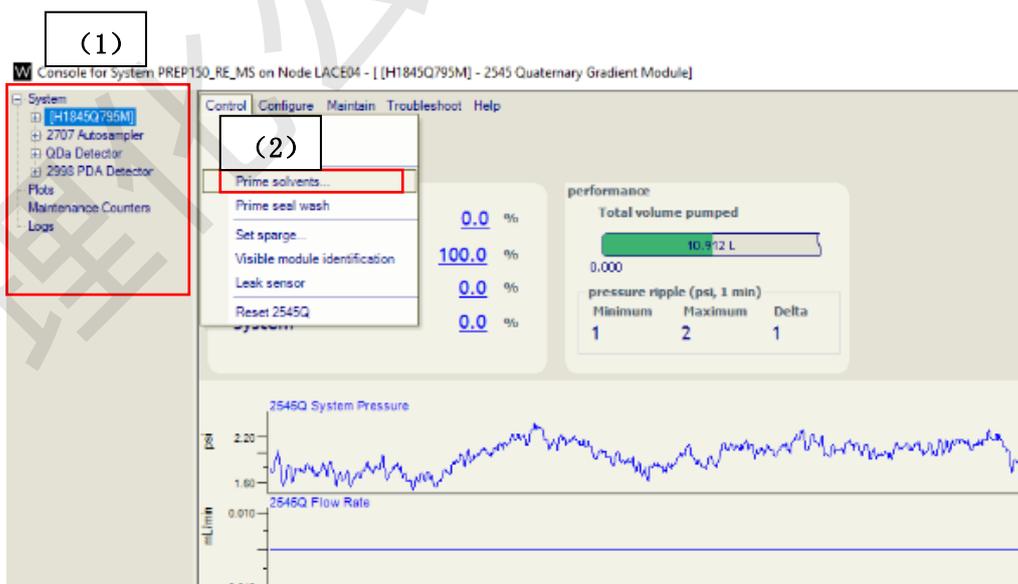


图 7-8

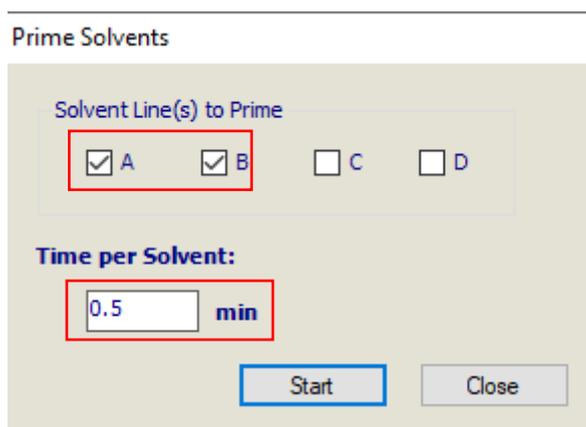


图 7-9

上述操作完成之后，溶剂管理器开始进行灌注操作，A、B为独立流路，分别进行100% A和100% B相的灌注操作。Console左下角显示Priming,提示灌注结束。

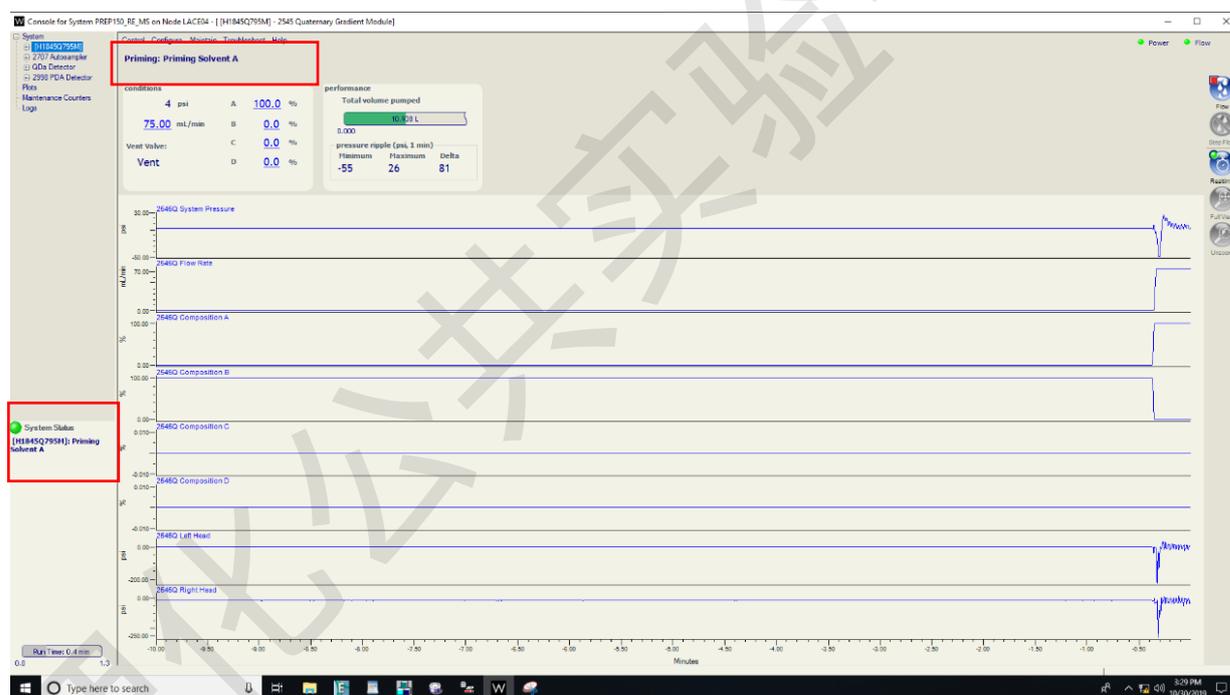


图 7-10

7.4.5.2. 清洗进样针

在Console界面，选中左列2707 Autosampler, Control-Wash/Prime needle, 弹出 Wash needle,设置Number of cycle为2次，点击OK。上述操作完成之后，样品管理器开始进行清洗操作， Console左下角显示Solvent washing,提示清洗结束。

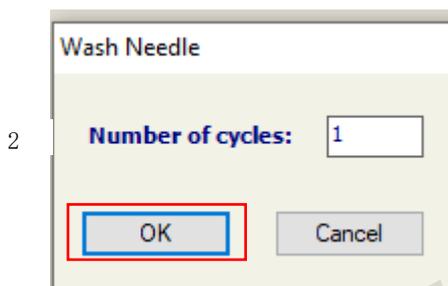
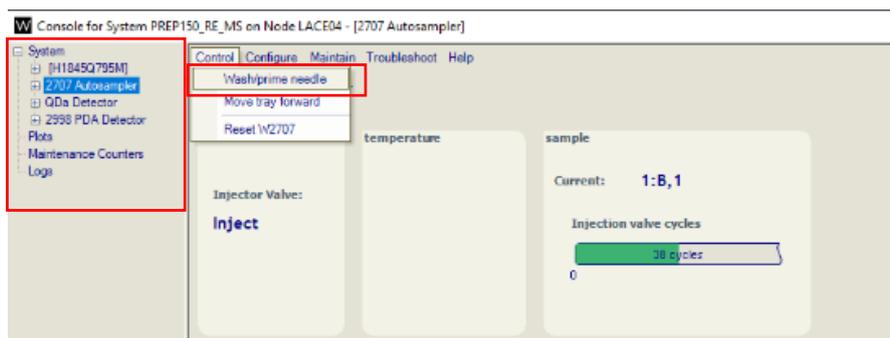


图 7-11

7.4.6 编辑液相方法

7.4.6.1 在 Run sample 界面，找到 Instrument Method 小窗，点击 Edit,进入 Instrument method editor 方法编辑窗口。图表栏显示 W25X5Q、W2707、W2998、WFCIII。依次对上述模块进行设置。

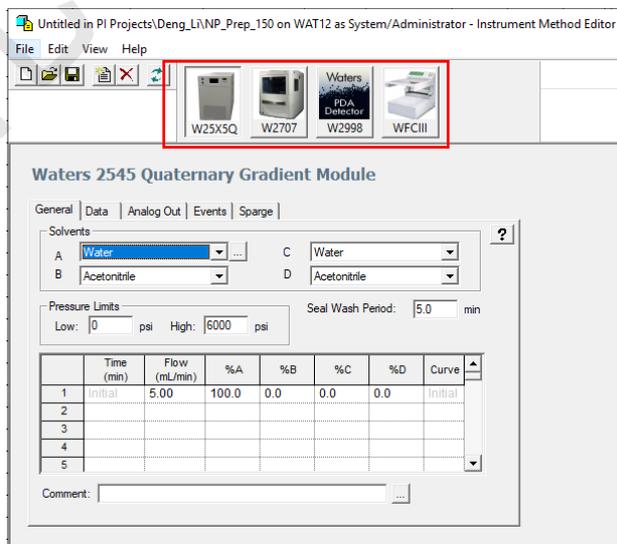
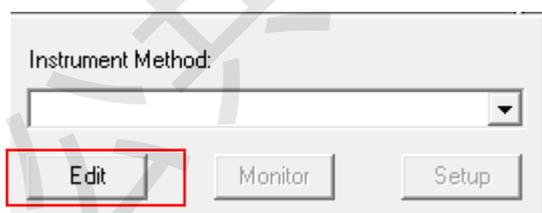


图 7-12

7.4.6.2 W25X5Q模块（溶剂管理器）

选中W25X5Q模块图表，显示General、Data、Analog out、Events 以及Sparge子选项。

操作：通常只需设置General选项的梯度方法，压力值以及A、B流动相成分。

注意事项：

- 1) 默认A相正己烷，B相异丙醇；
- 2) 系统压力：当前显示6000 psi为系统压力，高压建议设置为色谱柱承受的最大压力的2/3。
- 3) 正相梯度洗脱：洗脱程序一般包括“平衡-洗脱-冲洗-平衡”四个阶段。（平衡）开始梯度为A%>B%；洗脱阶段逐步过渡到A%<B%；冲洗是让洗脱梯度保留一段时间；随后逐渐回到A%>B%初始状态，并进行2min左右的平衡维持。

注意：手性化合物制备，严禁使用丙酮、氯仿、DMF、二甲基亚砜、乙酸乙酯、二氯甲烷及THF等溶剂。

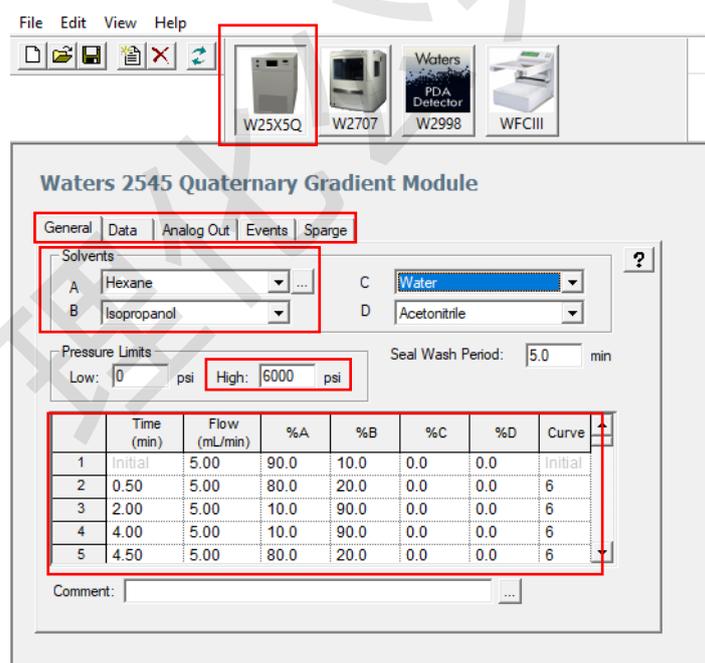


图 7-13

7.4.6.3 W2707模块（样品管理器）

本模块可不进行相关设置。**注意严禁用手拉动进样盘；进样瓶移除操作，请在Run sample右键-Move tray forward。**

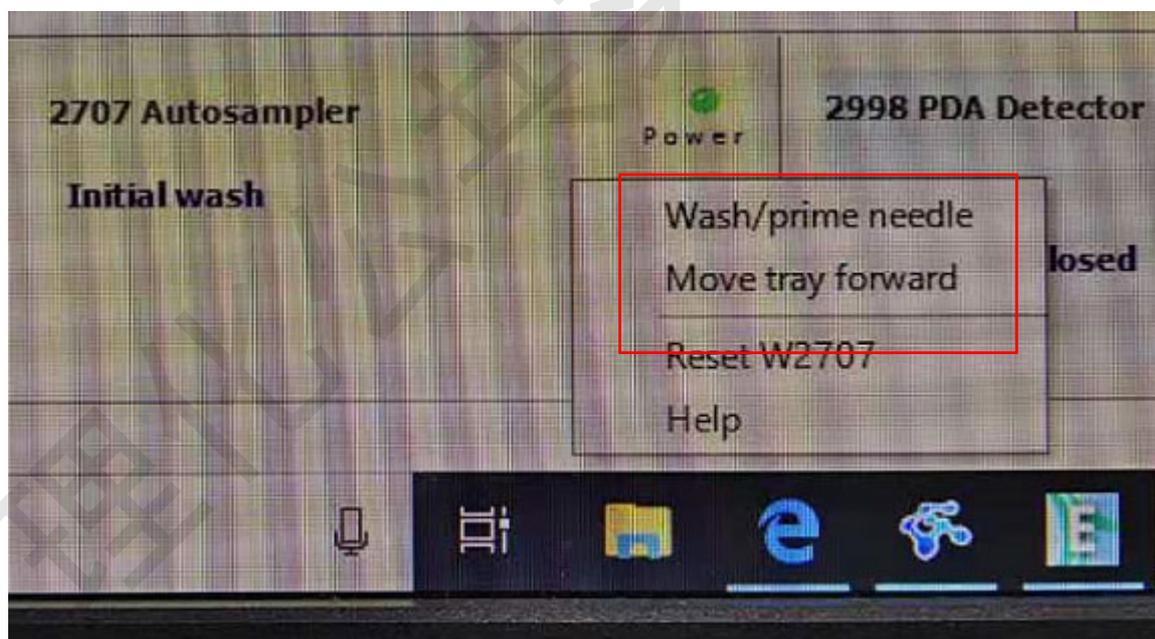
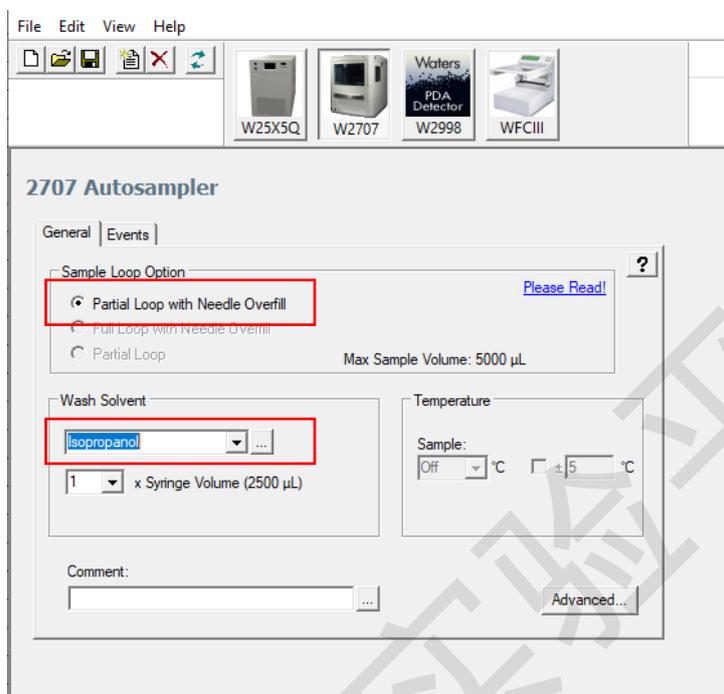


图 7-14

7.4.6.4 ACQ-QDA模块（质谱检测器）（正相系统，通常无需质谱模块）

操作：选中ACQ-QDA模块图标，设置General选项，自上而下进行以下操作：1) 勾选 Operate;2) 设置 m/z 扫描范围，max 为 1250 Da;3) 设置样品采集速率 >5

points/sec,通常设置为10 points/sec;4)设置ESI+或者ESI-毛细管电压: ESI+: 0.8-1.5 kV; ESI-: -0.5-1.8 kV.

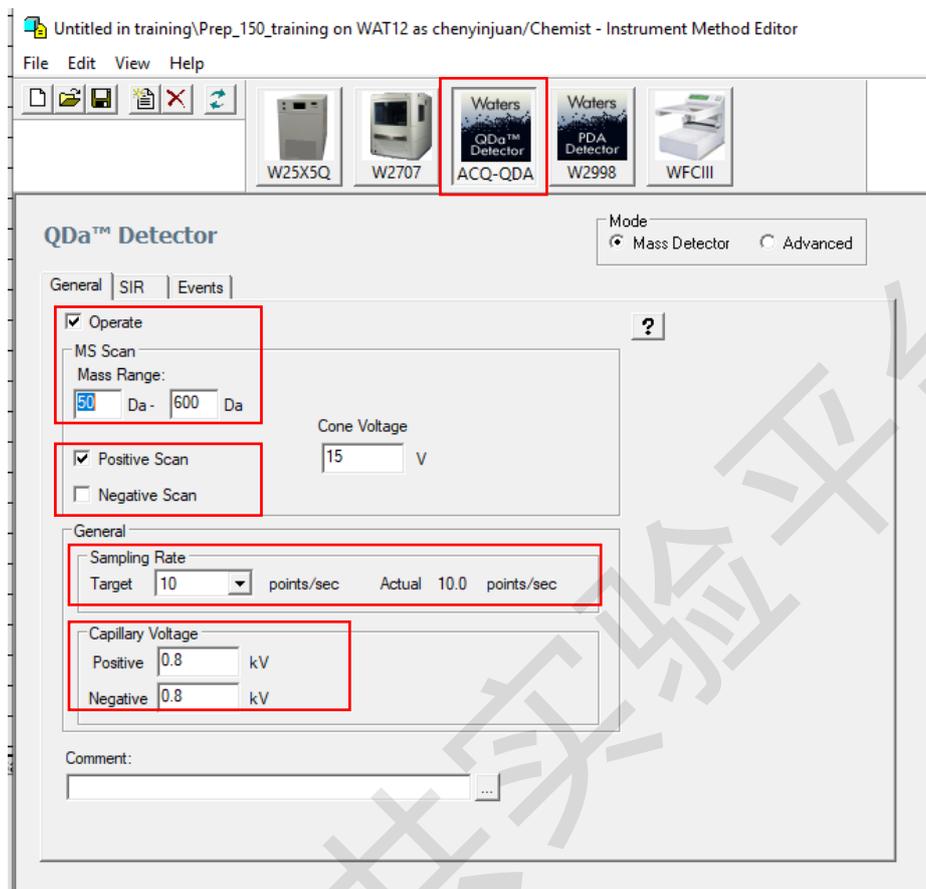


图 7-15

7.4.6.5 W2998模块（PDA检测器）

操作：选中W2998模块图标，设置General选项，波长范围为190-800 nm，General为全波长扫描，某一波长扫描，选择2D channel,设置波长即可。Analog out和events无需设置。

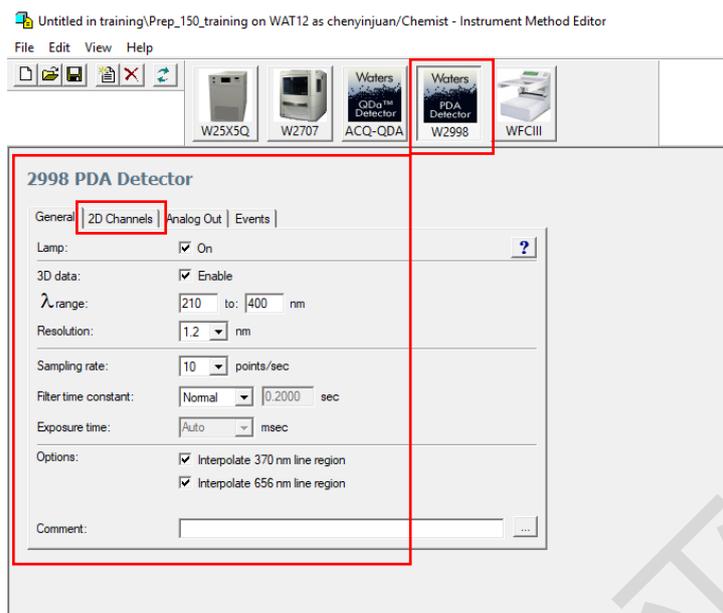


图 7-16

7.4.6.6 WFCIII模块（馏分收集器）

操作：选中WFCIII模块图标，设置General选项：Instrument parameters:

Flow rate: 5 ml/min, 同流动相（正相色谱流速较小，请根据色谱柱使用指南，合理设置流速）；

Analog sensitivity (AU/V): 默认1;

%monitor collect between windows: 两个流动相谱峰之间的时间段是否收集，100%表示全回收。

勾选Enable aux chromatogram;

Collect multiple injections per position不勾选;

Skip tube between injections不勾选。

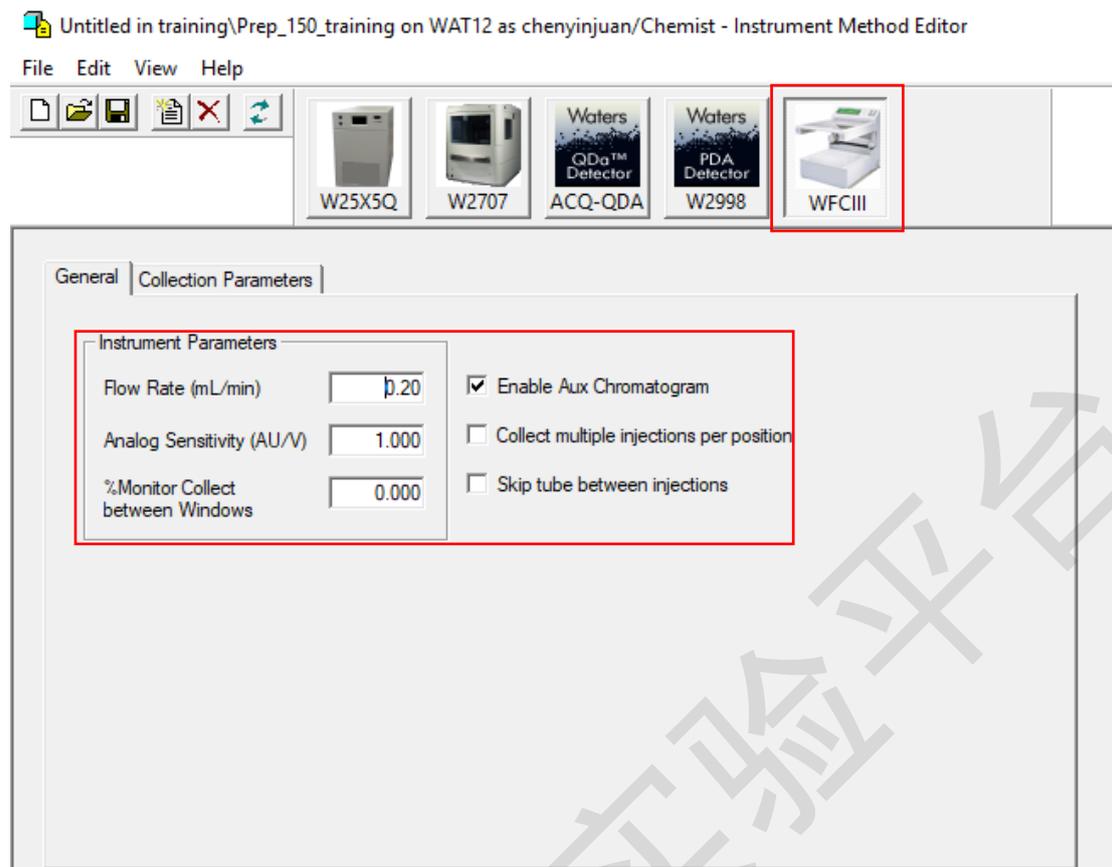


图 7-17

操作：选中WFCIII模块图标，设置Collection Parameters选项：

设置收集时间段：收集条件，一般为time，一定要设置%peak collection.

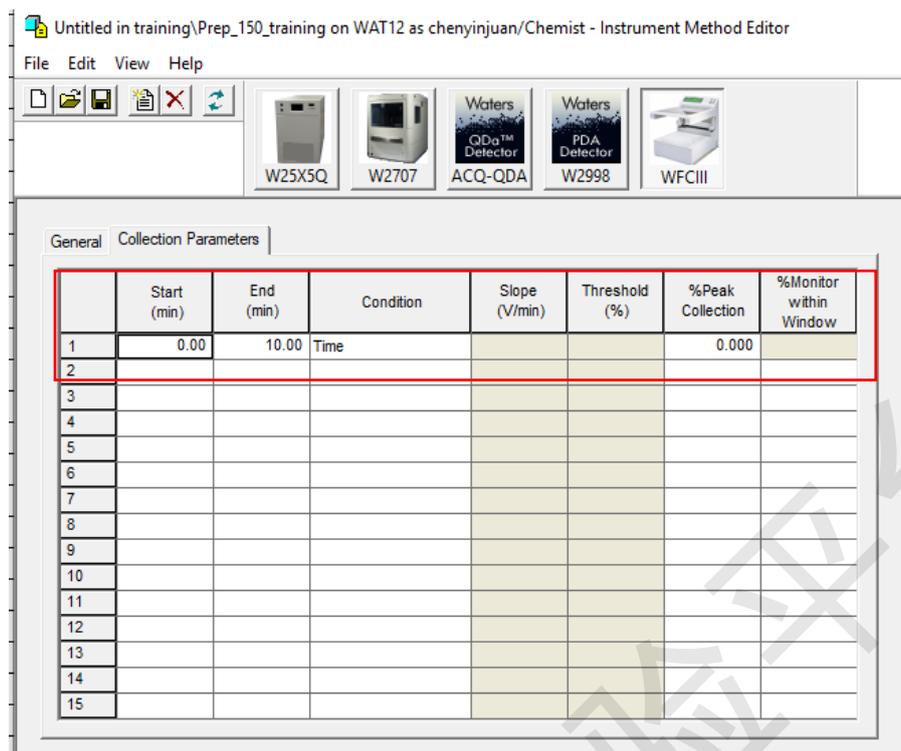


图 7-18

7.4.7 保存方法文件

File-Save 文件命名规则：系统_操作者姓名缩写_日期_样品_A1,如李四在2019年10月30日用正相制备色谱仪进行样品std制备，首个分析文件可以为：

NP_PDA_LS_1030_STD_A1,同时Save with method set为相同名称。文中保存的方法为NP_PDA_1030_STD_A1

7.5. 创建样品列表

7.5.1 样品盘设置：在Run sample界面，样品列表，点击样品盘图表，弹出样品盘选择，选择2707PREP 12*10vials类型样品盘。非常重要。选中后，选择样品瓶位置，insert, OK.

THIS IS VERY VERY IMPORTANT. (此项选择非常非常重要)

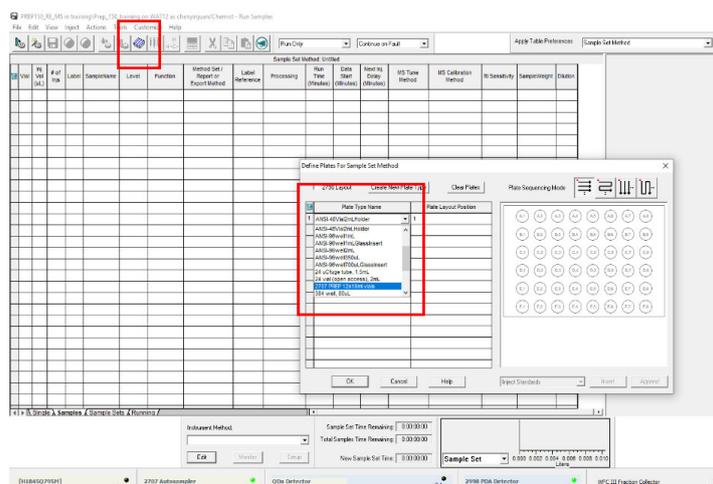


图 7-19

7.5.2 编辑样品序列

注意事项：1) 进样体积：一般方法摸索，进样体积为10 ul；进样次数，一般为1次；Function设为Inject broad samples；Method set下来选择7.4.7中设置的方法组文件，Run time可设置为方法中的时间。

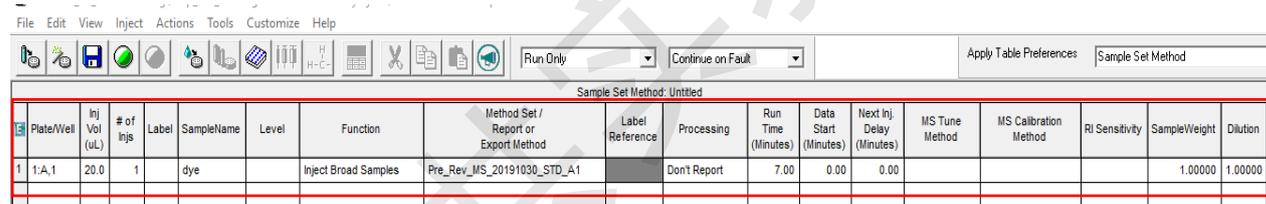


图 7-20

7.5.3 加载方法

操作：在Run sample界面，找到Instrument method方法，下来选择7.4.7中保存的方法，点击Setup。加载之后溶剂管理器溶剂泵开始工作，回到Console界面观察系统压力差。小于50 psi。

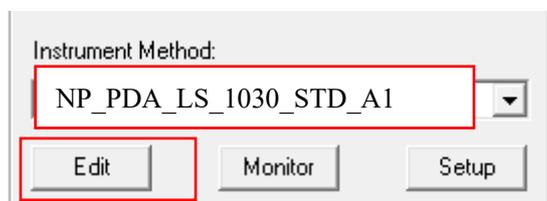


图 7-21

7.5.4 运行/保存样品序列文件

待系统压力差<50 psi，选中要运行的序列，点击Run按钮，弹出Run sample set

对话框。系统默认是运行所有的样品序列，请根据实验需要进行勾选；Name for this sample set命名样品组名称，命名规则：系统_操作者_日期_样品_A1，系统PDA或MS，如李四用制备液相系统PDA，于10月30号进行std样品测试，该方法文件可命名为PDA_LS_1030_std_A1。最后点击Run确认。

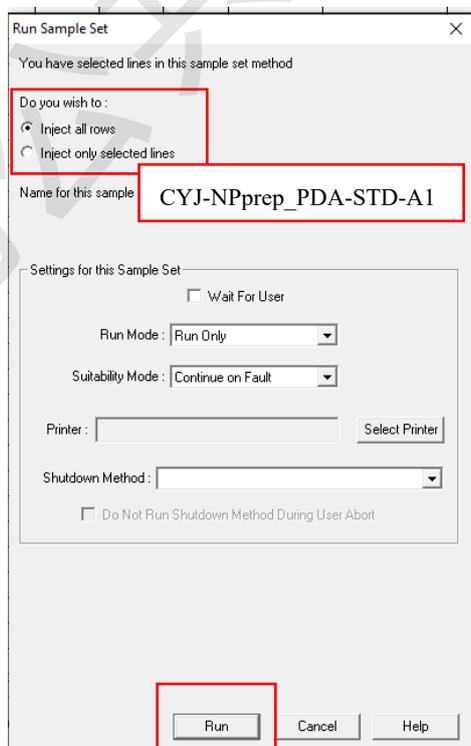
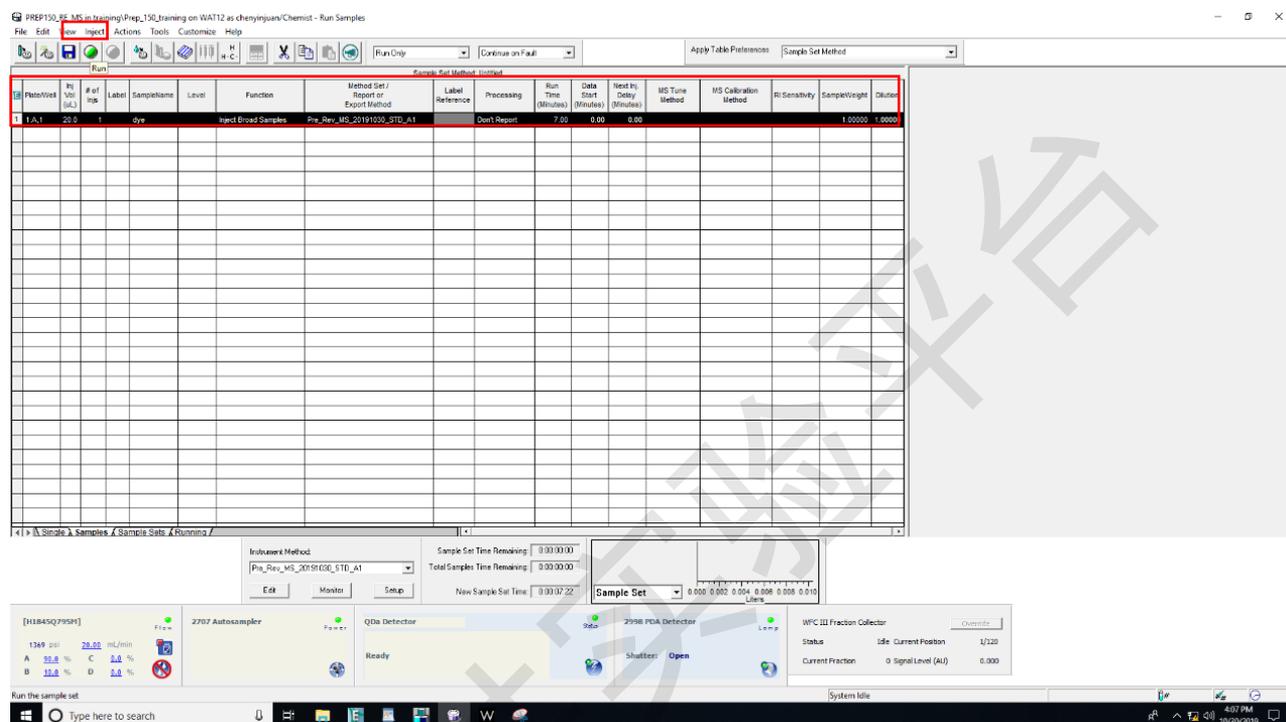


图 7-22

7.5.5 状态显示

在7.5.4操作之后，系统开始运行。样品序列文件开始转至到Running栏，当前运行的样品序列为红色。为了更好的优化分析方法，序列文件运行过程中，请留意出峰位置对应的A/B相浓度，以便进行方法优化。该序列运行结束，Running 行空白，序列文件将自动转到Samples栏。

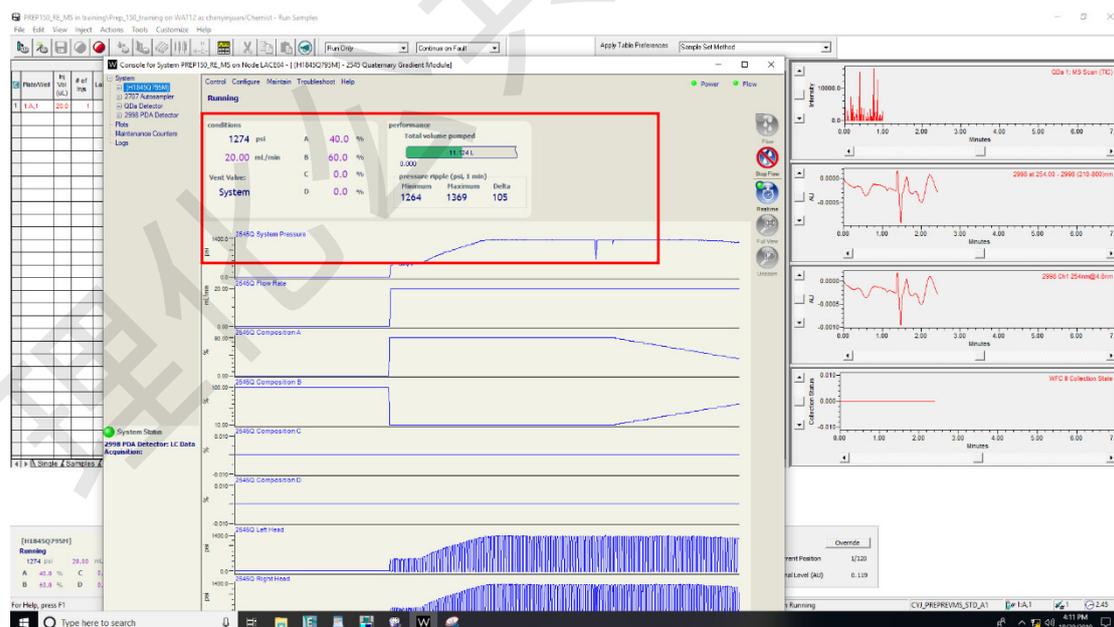
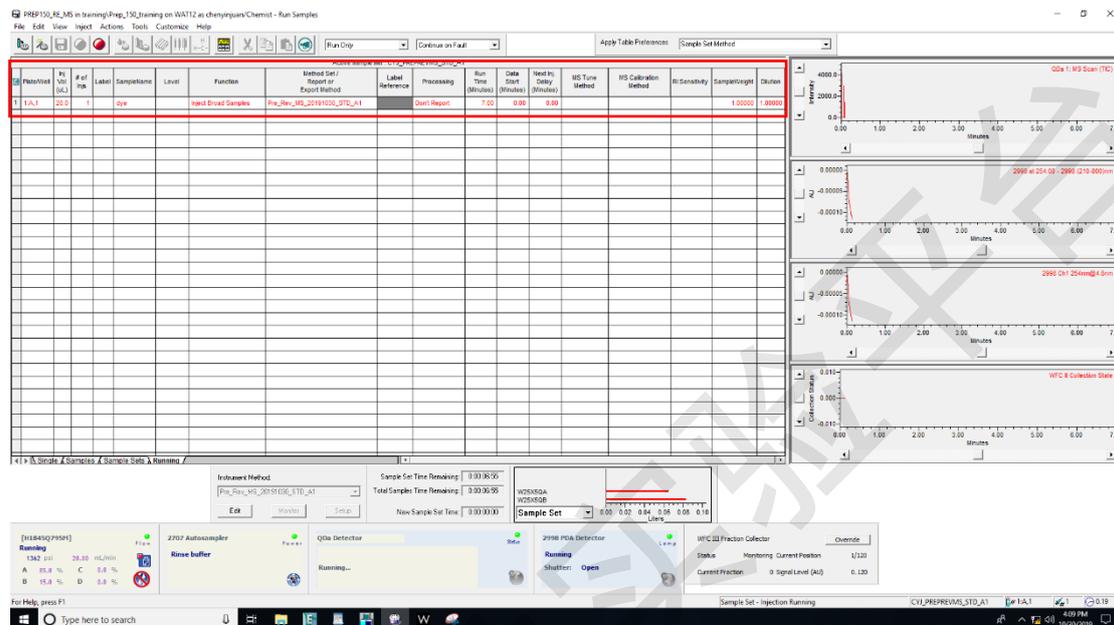


图 7-23

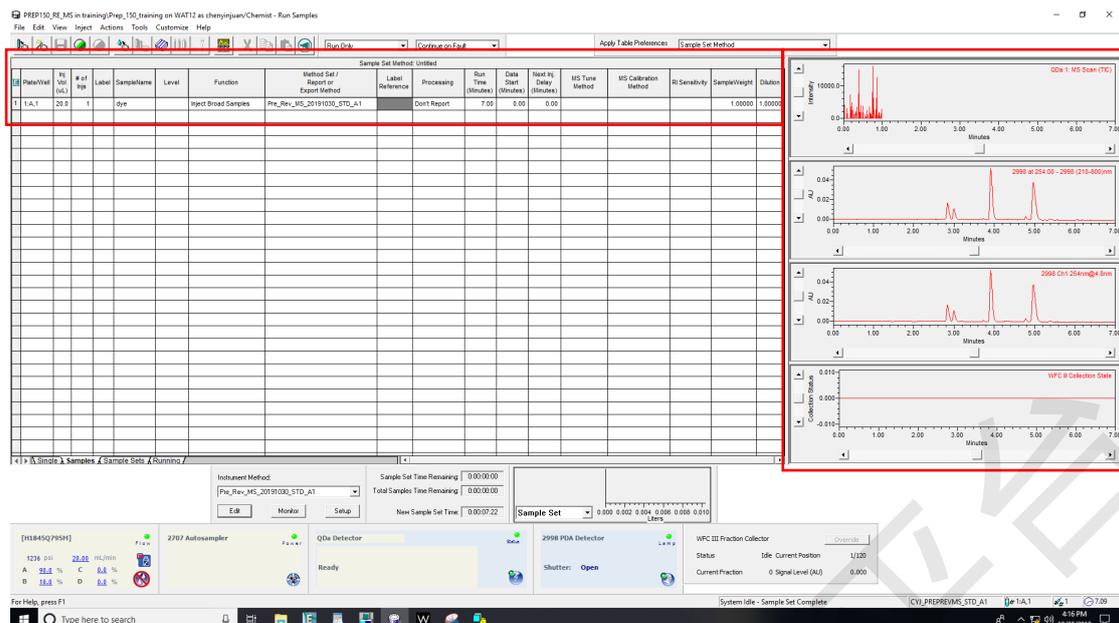
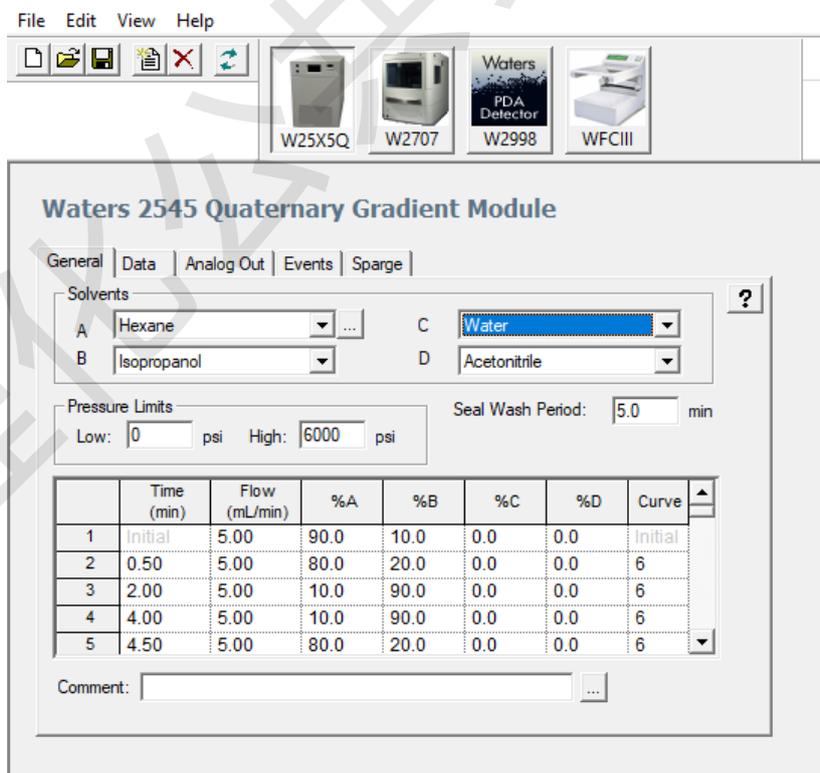
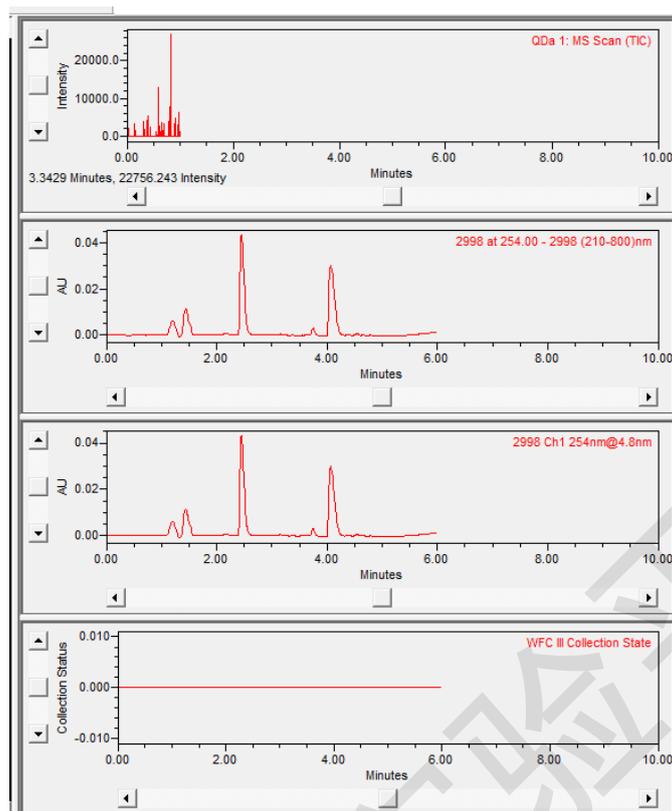


图 7-24

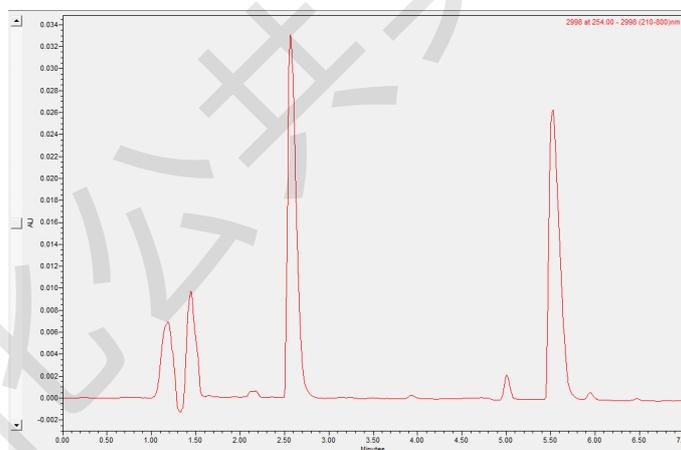
7.5.6 方法优化

根据7.5.5中的分离效果，可以选择性优化分离方法。修改分离方法，请按7.4.6至7.5.5进行重复。





此后可以进一步优化方法。



现在可以制备样品。

图 7-25

7.6. 样品收集

注意：本仪器样品收集采用S型路径进行收集。

7.6.1 编辑纯化方法

根据10 ul方法摸索中得到的色谱图，编辑采集方法。可在分析方法上进行修订，在WFCIII模块，选择Collection Parameters，设置需要采集的色谱时间，%peak

collection设为100，流速同流动相流速一致。另外，请更改WFCIII的延迟体积为1.5 ml（右键-Configuration-1.5 ml-OK，reset WFCIII操作，采集器将回到初始状态）。

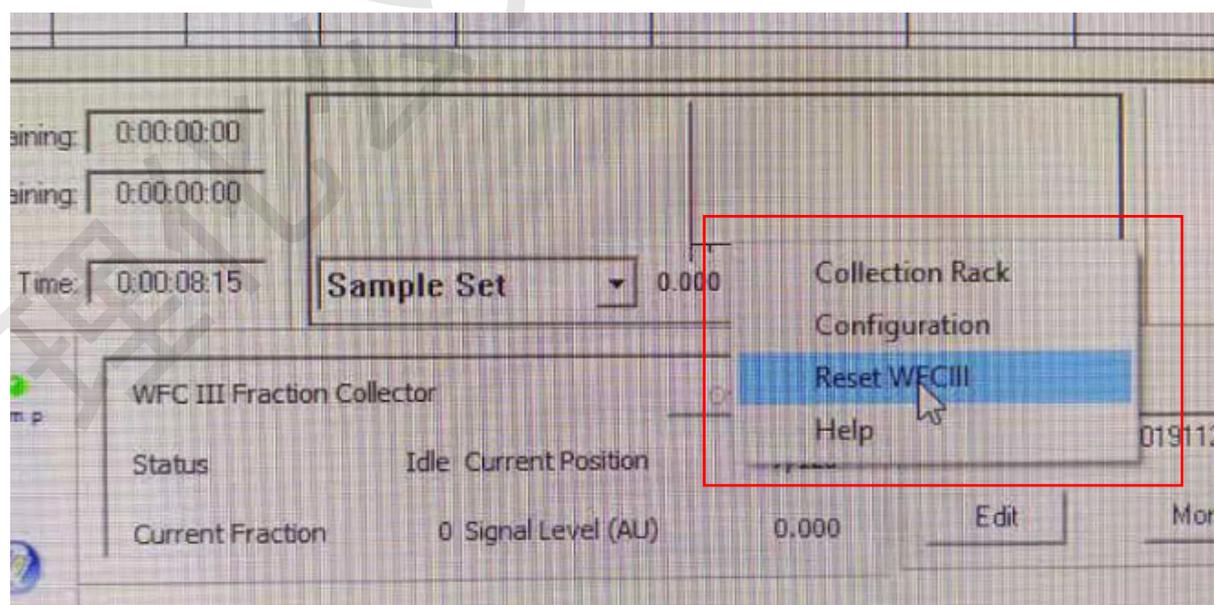
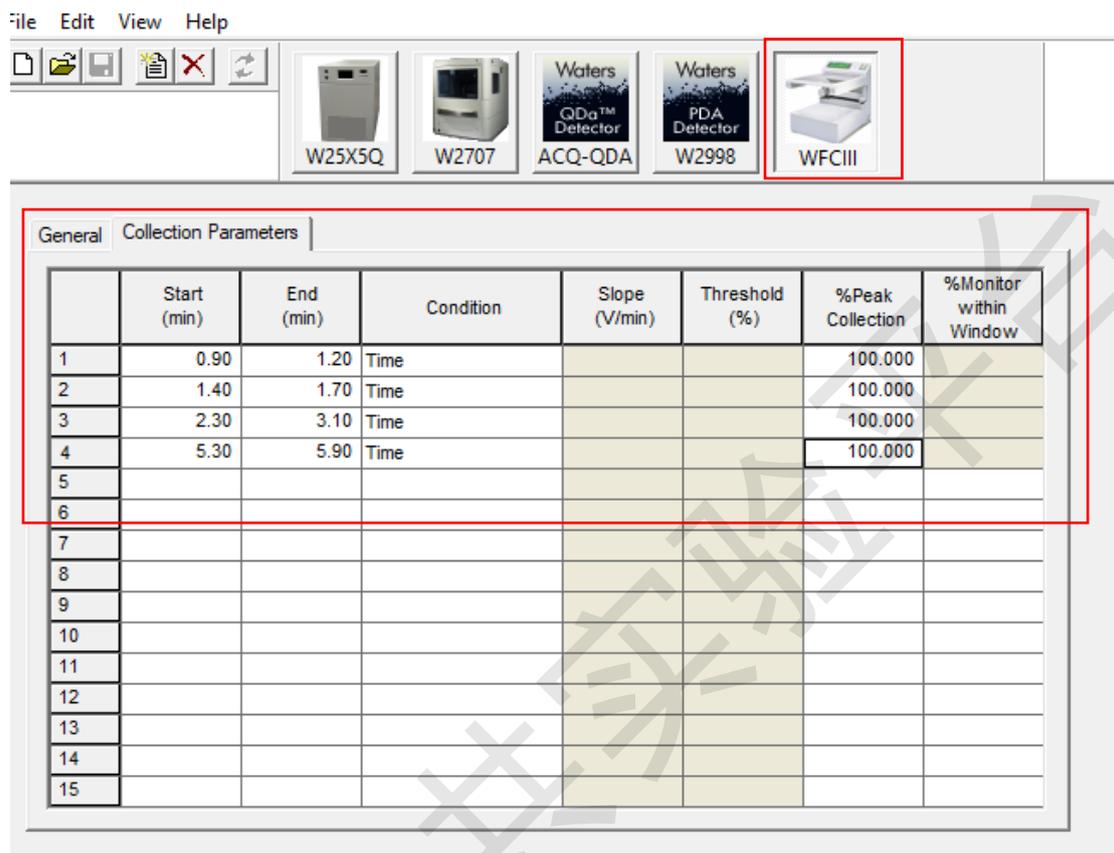


图 7-25

7.6.2 保存方法

保存7.6.1中编辑的方法及方法组文件（Method set），命名规则：**系统_操作者姓名缩写_日期_样品_P1**，如李四在2019年10月30日进行样品std制备，首个分析文件可以为：**NP_PDA_LS_1030_STD_P1**

7.6.3 建立纯化的样品组文件

主要同7.5.2至7.5.4，注意，纯化需增加上样量；但增加上样量，色谱峰会展宽。建议逐步进样；另外，请更新Method set为7.6.1至7.6.2中设置并保存的方法。

Plate/Well	Inj Vol (uL)	# of Injs	Label	SampleName	Level	Function	Method Set / Report or Export Method	Label Reference	Processing	Run Time (Minutes)	Data Start (Minutes)	Next Inj. Delay (Minutes)	MS Tune Method	MS Calibration Method	RI Sensitivity	SampleWeight	Dilution
1	1:A,1	50	1	dye		Inject Broad Samples	Prep_NP_MS_20191030_STD_P1		Don't Report	7.00	0.00	0.00				1.00000	1.00000

图 7-27

7.6.4 运行纯化的样品组文件

7.6.4.1 Instrument Method下拉选择7.6.2中的方法文件，点击**Setup（重要）**；

7.6.4.2 在样品组文件，点击Run按钮，操作请参考7.5.4运行/保存样品序列文件待系统压力差<50 psi，选中要运行的序列，点击Run按钮，弹出Run sample set对话框。系统默认是运行所有的样品序列，请根据实验需要进行勾选；Name for this sample set命名样品组名称，命名规则：**系统_操作者_日期_样品_P1**，系统PDA或MS，如李四用制备液相系统PDA，于10月30号进行std样品制备，该方法文件可命名为NP_PDA_LS_1030_std_P1。最后点击Run确认。

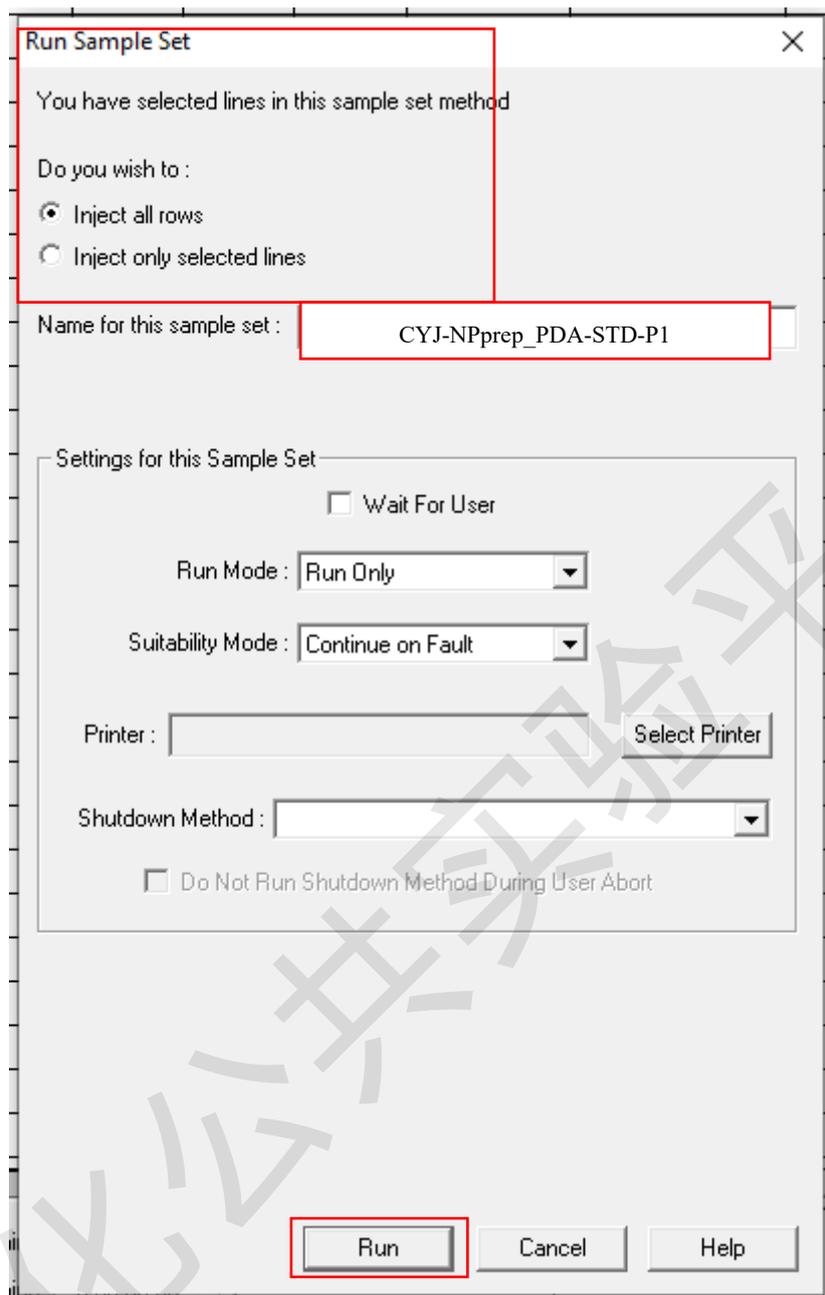


图 7-28

7.7. 运行状态查看

在7.6.4.2操作之后，系统开始运行。样品序列文件开始转至到Running栏，当前运行的样品序列为红色。

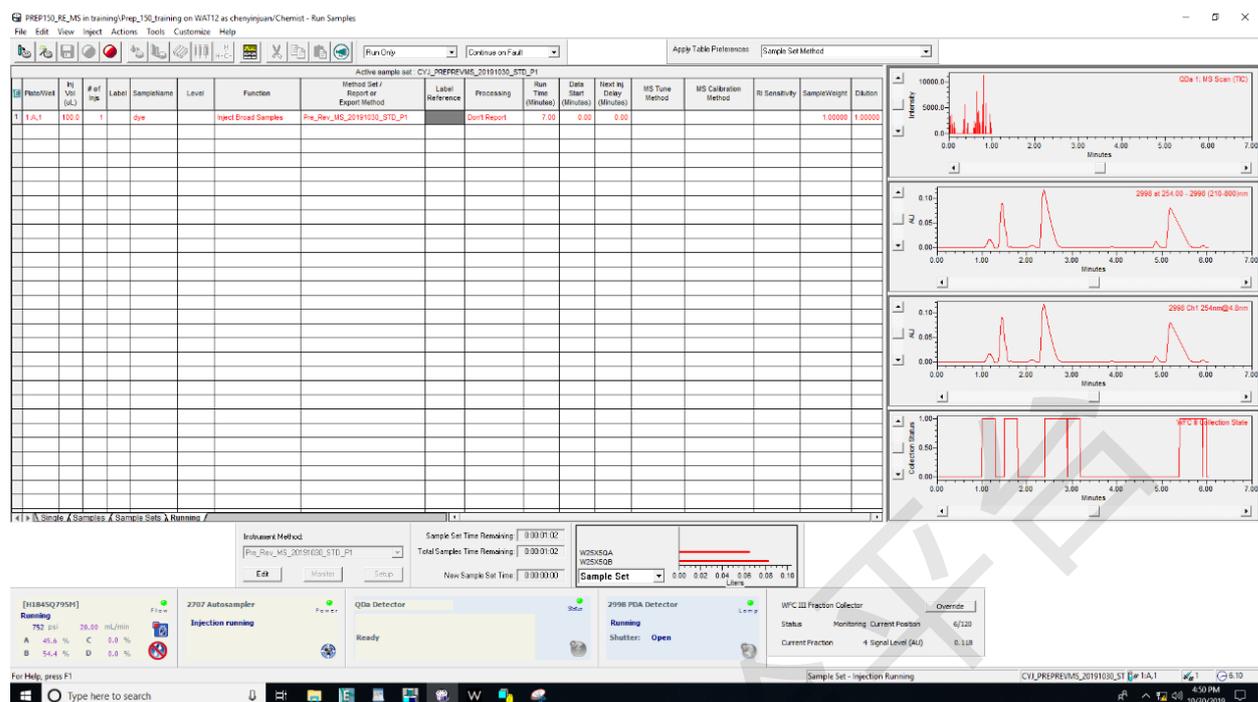


图 7-29

7.8. 实验结束后处理

7.8.1 关闭流动相,将流速设为0/off,回车;

7.8.2 关闭电喷雾电压;

7.8.3 关闭PDA灯。

7.9. 结果查看

7.9.1 在Empower界面,选择Browse Projects选项,选择同7.4.2相同的项目文件及仪器配置,进入结果查询界面;

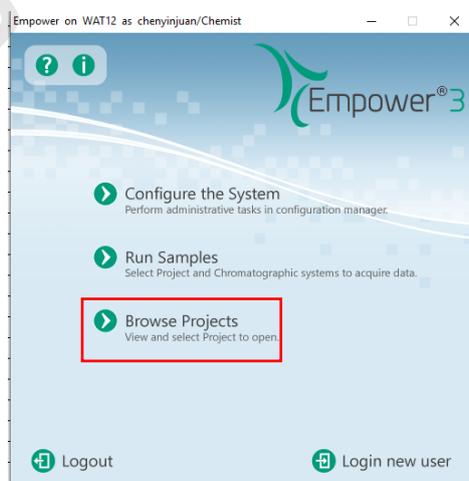


图 7-30

7.9.2 结果查询界面，选择查看不同的样品组，可以按不同方式进行分类查看（Injection、Channel、Results等）；

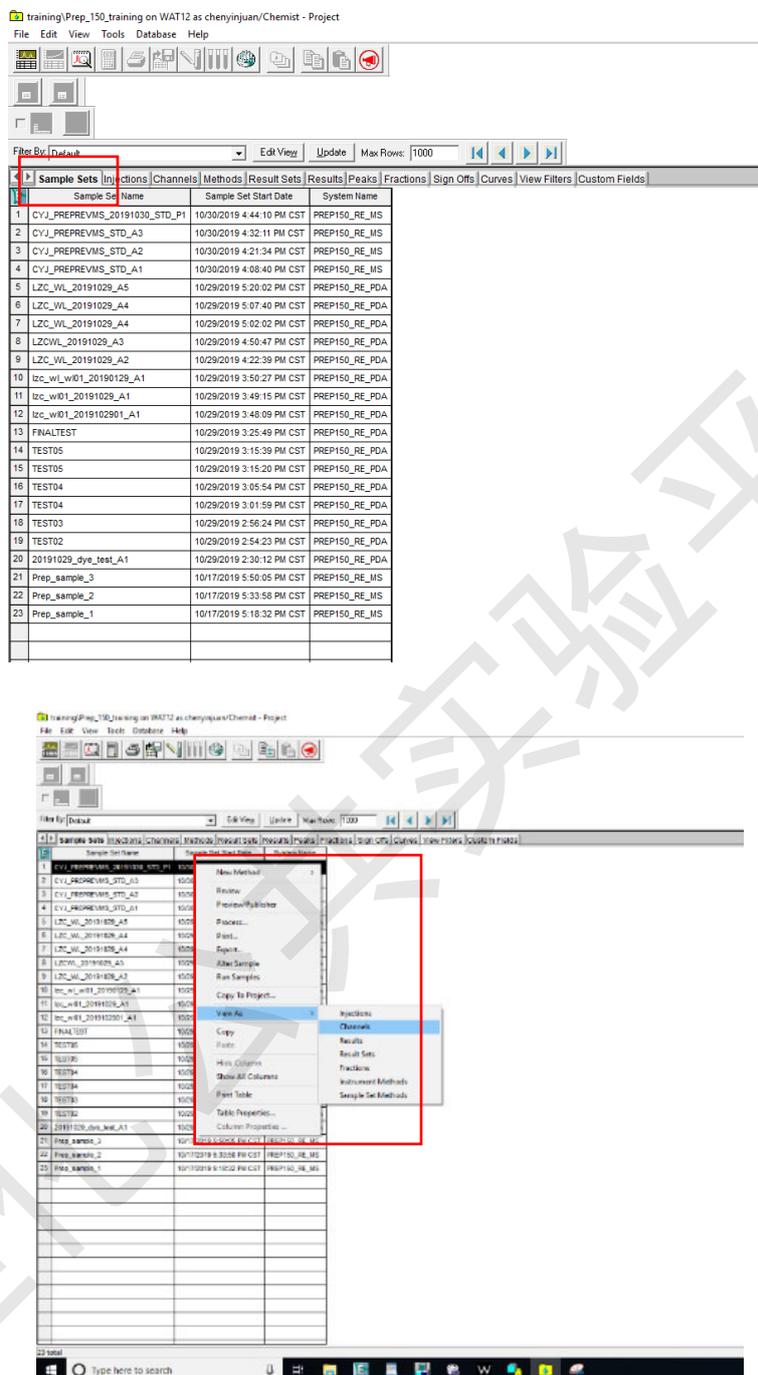


图 7-31

7.9.3 选择PDA通道产生的色谱图和Collection curve, 点击Click compare

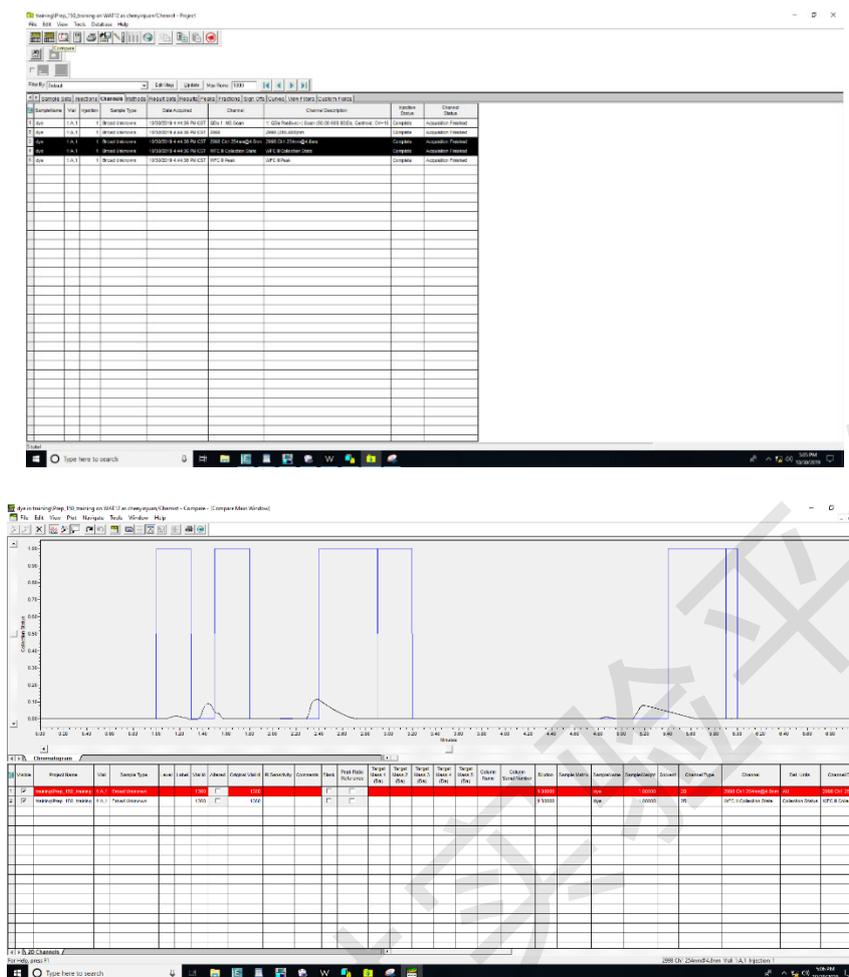


图 7-32

7.10. 其他数据处理

7.10.1 3D色谱图转化为2D色谱图

选择Channel-Choose 2998 210-800 file（full wavenumber），右键选择Review；

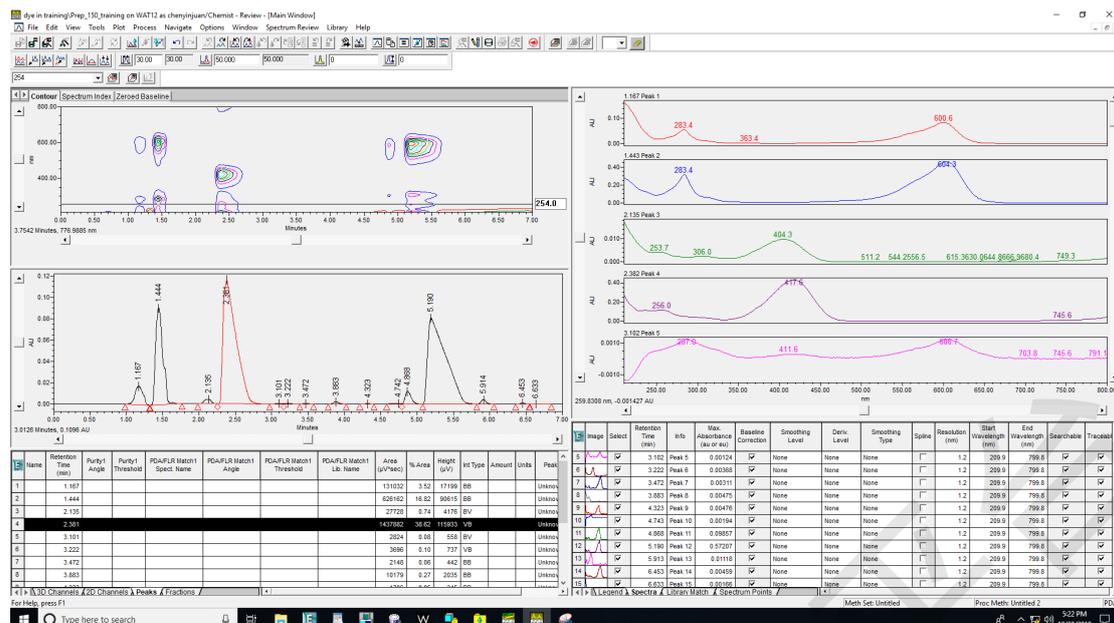


图 7-35

7.11. 实验结束处理

- 退出大仪网系统登录
- 实验结束，请整理实验桌，并将自己的测试样品带出实验室。

请注意：使用前先检查仪器状况流动相体积，尤其确保水相为新鲜，一切正常方可操作；一旦开始实验，默认为使用前仪器状况良好；使用过程中出现故障须立即联系技术员；测试后请及时取回样品。

8. 相关/支撑性文件

Q/WU FLHR001 文件编写规范

9. 记录

Q/WU FLHS055 制备液相色谱仪（正相）Waters Prep_150 (NP)使用记录。

制备液相色谱仪（正相）使用登记表

日期		使用人	导师	检测方式 (√)		自主
时间	开始时间 (hh:mm)	结束时间 (hh:mm)	总计(hh:mm)			
样品信息	样品名称 或代号	样品种类及 数目(个)				
	文件名(见 备注)					
	毒性及防 护说明					
测试信息	使用溶剂					
	检测器	PDA 检测器 <input type="checkbox"/>		质谱检测器 <input type="checkbox"/>		
	色谱柱类 型					
耗材使用 登记	溶剂	自备 <input type="checkbox"/>		品牌:		
		平台提供 <input type="checkbox"/>		规格:		
进样瓶 (个)	馏分回 收管 (个)	色谱柱 (√)	自备			
			平台			
其他说明						

备注：导师名首字母-使用人名首字母-日期-样品编号；

**请注意：使用前先检查谱仪状况，一切正常方可操作；一旦开始实验，默认为使用前仪器状况良好；使用过程中出现故障须立即联系技术员；测试后请及时取回样品。

附 1：正相手性色谱柱使用说明

警告：

- （1）将色谱柱接到色谱仪之前，必须先用合适的溶剂冲洗流路（包括流通阀和定量环）。如果之前是反相系统，先用水把系统中可能含有的盐冲洗干净，再用异丙醇以 0.5ml/min 冲洗 8 小时左右，再接色谱柱；
- （2）有些溶剂(比如丙酮、氯仿、DMF、二甲基亚砷、乙酸乙酯、二氯甲烷、THF)会破坏手性固定相，应禁用；
- （3）如有用的是自动进样器，进样间隔的冲洗液也必须更换成合适的溶剂。

色谱条件：

- （1）流动相组成

流动相条件：正己烷/异丙醇=100/0-0/100(V/V)

流动相中异丙醇换成乙醇，样品的保留时间缩短；

流动相中醇含量增加，样品的保留时间缩短。

- （2）如果分离碱性或酸性的化合物，需要加入少量的添加剂：

碱性样品添加碱性添加剂，一般为二乙胺，比例为 0.1%；

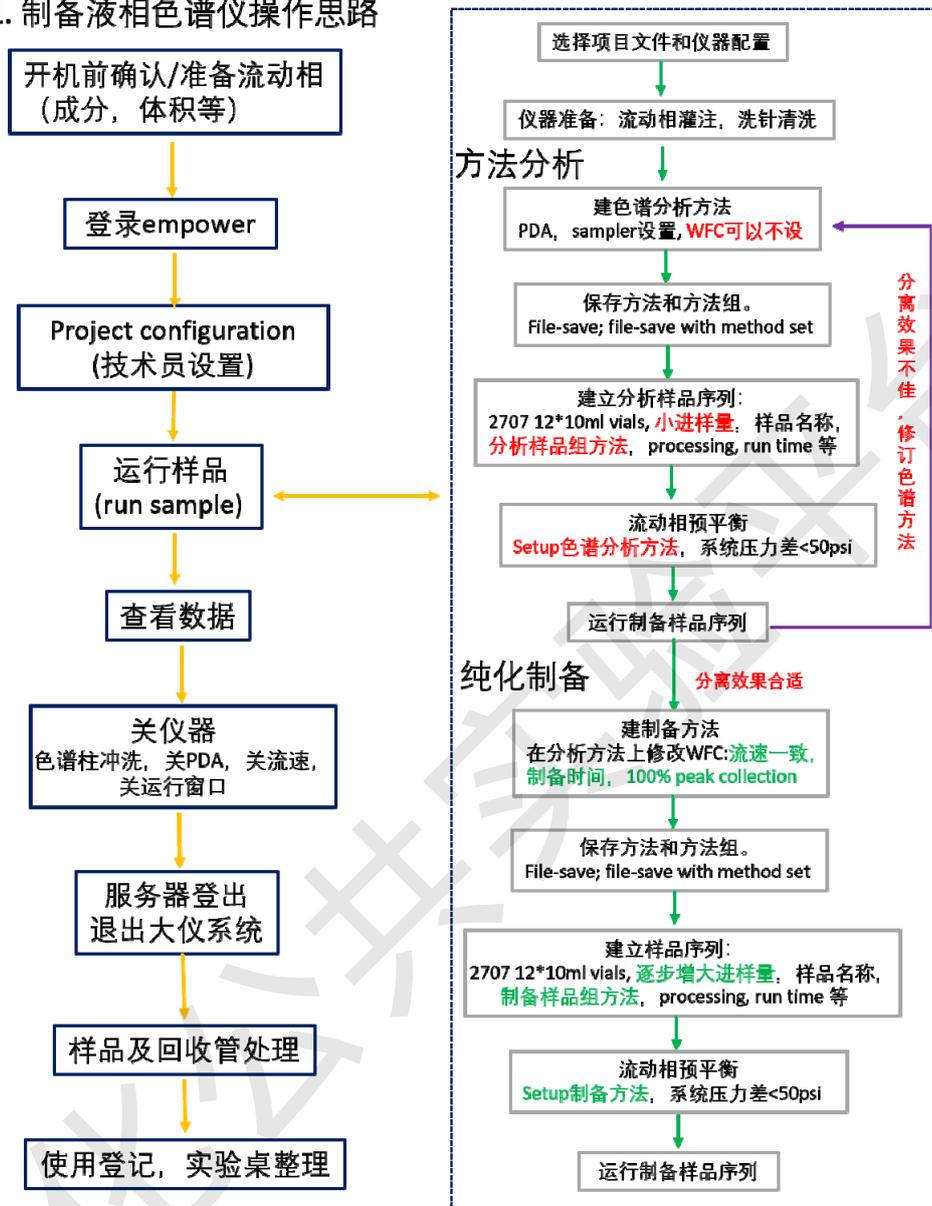
酸性样品添加酸性添加剂，一般为三氟乙酸，比例为 0.1%

色谱柱保养及注意事项：

- （1）待测样品，如果含丙酮、氯仿、DMF、二甲基亚砷、乙酸乙酯、二氯甲烷、THF，需尽量烘干。样品尽量溶解在流动相中，并用 0.45um 的滤膜过滤，不能使用强碱性物质作为流动相添加剂或者溶解样品，这样会损坏填料中的硅胶成分；
- （2）系统中或者色谱柱中含较高浓度的异丙醇或乙醇时，由于他们的粘度较大，平衡色谱柱时需特别注意压力变化，可采用低流速平衡，当柱压下降后再逐渐升高至要求的流速；
- （3）样品检测完毕，用 100%无水乙醇清洗色谱柱，注意控制好流速；
- （4）按色谱柱维护信息，保存色谱柱到一定比例的流动相中。

附 2：制备液相色谱仪操作思路

1. 制备液相色谱仪操作思路



2. 制备液相色谱仪使用---色谱方法确认过程

