

文件编号：Q/WU FLHA19010013R028

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

超高效液相色谱仪

Waters UPLC 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. 质谱实验室仪器设备管理规范.....	2
6.1. 超高效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 确认项目文件.....	5
7.4 运行样品.....	5
7.5 运行结束处理.....	20
7.6 数据查看.....	22
7.7 退出.....	27
8. 相关/支撑性文件.....	28
9. 记录.....	28

理化公共实验平台

1. 目的

建立超高效液相色谱仪使用操作规程, 使其被正确、规范地使用。

2. 范围

本规程适用于所有使用超高效液相色谱仪的用户。

3. 职责

3.1. 用户: 严格按本程序操作, 发现异常情况应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。由于样品问题造成色谱柱损坏或仪器配件更换, 费用将由用户所在课题组承担, 自主上机, 因色谱洗脱梯度错误造成色谱柱损坏的, 该用户课题组也需承担相关费用;

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. 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。
- 5.5. 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。
- 5.6. 空压机及 UPS 所处房间应使用空调, 要保持室内空气干燥, 在潮湿的季节应该除湿。至少每周检查一次有无积水。

6. 色谱实验室仪器设备管理规范

6.1. 超高效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, 并按照要求登记预约信息。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, 用户在技术员指导下可用实际样品进行上机测试, 本测试将按送样进行计费, 两周内该用户需进行上机考核, 考核通过的用户即获得自主上机权限, 两周内独立上机两小时方可开通门禁资格; 未考核或考核不通过的用户, 需重新接受培训;
- (4) 用户按规定制样并在大仪网上进行送样或机时预约;
- (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 5 分钟预约机时, 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 1 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 23:00	每人可预约最短机时为 30 分钟	色谱分析

- (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, 结束后如实记录仪器状态;
- (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。
- (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。

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

使用须知: 委托测试需要按大仪网送样要求进行送样申请。待测分析物若有比较成熟或已发表的样品分离分析方法, 建议提前告知技术员。

流动相: 超高效液相色谱仪使用的有机流动相必须为进口HPLC纯度, 实验用水须使用超纯水, 请根据色谱洗脱梯度及实验室需要配置所需流动相;

制样要求: 该仪器默认是使用反相模式, 使用正相分离请提前联系技术员进行正反相模式切换。

反相模式: 样品首选甲醇/乙腈/水等极性溶剂溶解, 建议送样量1.0 ml; 珍贵样品, 可使用内衬管样品瓶; 待测溶液经15000 rpm离心15 min以上或经过0.22 μm膜过滤后(须注明前处理方法), 转移至预开口2 ml样品瓶, 完成后对着灯光检查确保瓶中没有气泡。

补充说明: 样品溶液须过滤澄清, 严禁含有不可溶性颗粒或含有蛋白质、核酸、多糖等大分子; 样品溶液pH在2-8生物样品、微生物培养液等样品, 必须经过去除蛋白质、脂类和多糖的操作, 然后用流动相溶解; 不得含有表面活性剂; 不得含有机或无机强酸强碱。送样需说明样品保存条件、稳定性、溶解性、毒性、余样是否需要取回等信息。

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) 因送样溶液不符合要求而导致管道堵塞或对仪器造成损坏的, 根据情节严重情况进行通报批评、禁用或赔偿等处罚。

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

用户名: PI姓名小写全拼; 密码: PI姓名小写全拼123。输完后, 点击OK

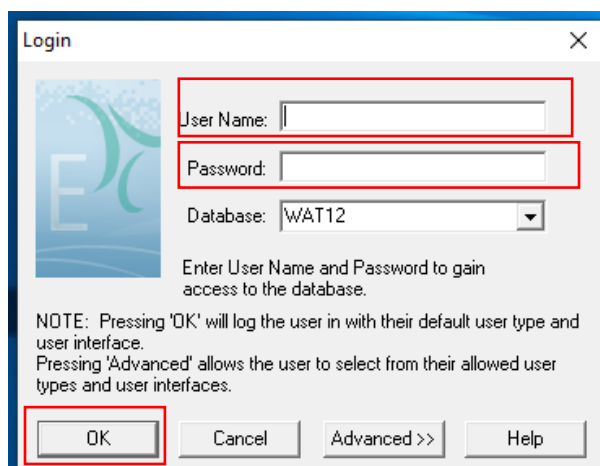


图7-1

7.3 确认项目文件

点击Empower主页 Configure the System，查看PI Project项本组项目文件。如不存在，请联系技术人员。

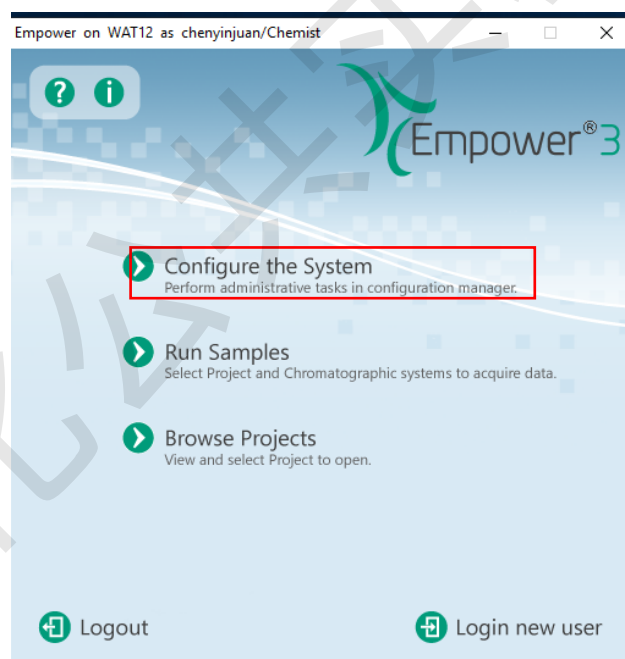


图7-2

7.4 运行样品

7.4.1 进入

点击图7-3中Run Sample项，弹出Run Sample界面；

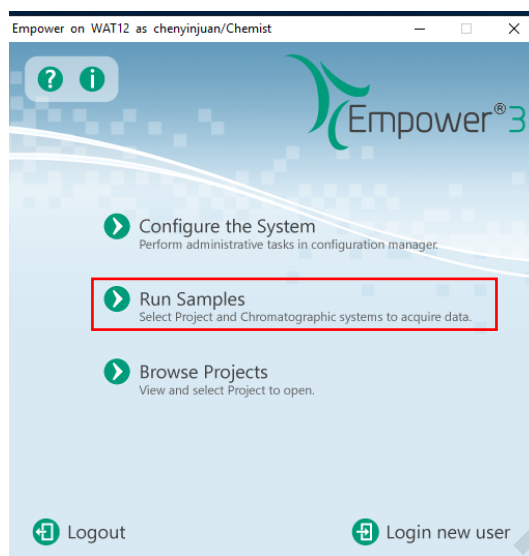


图7-3

7.4.2 选择项目文件路径和仪器配置。

文件路径: Projects-PI Projects-PI姓名-UPLC

仪器配置: Hclass_pda@Lace02

选择后, 点击OK

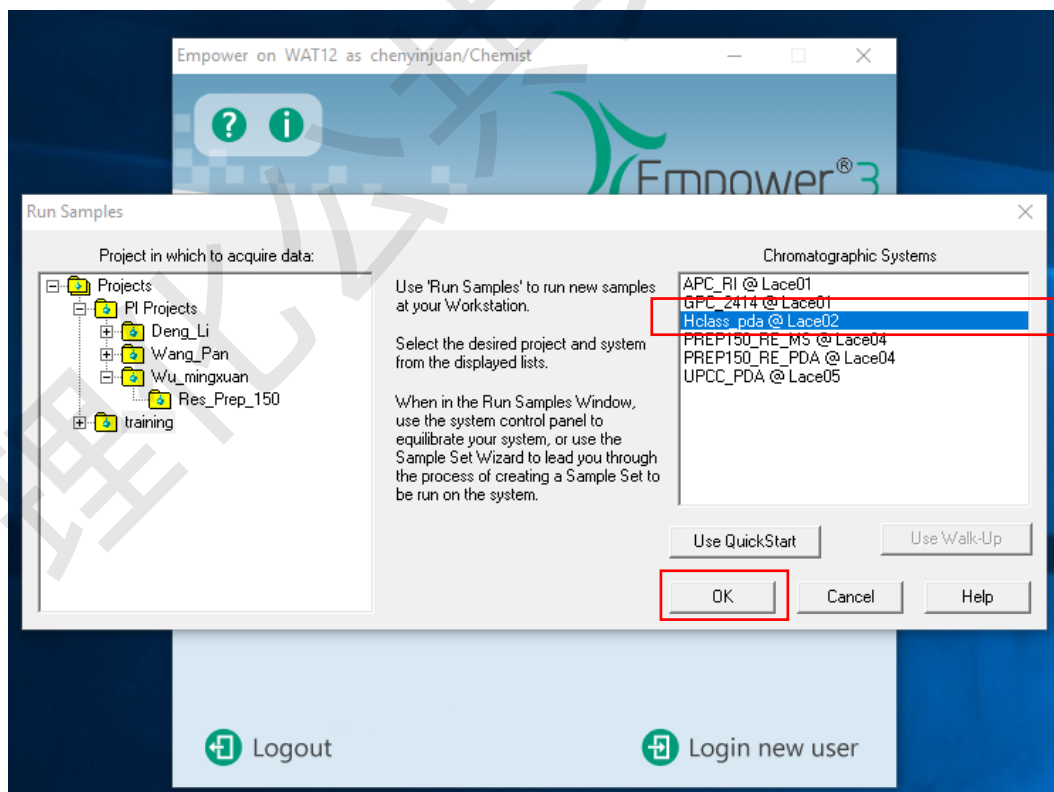


图7-4

7.4.3 Run Sample 界面

完成7.4.2操作后, 显示Run Sample界面, 该界面包括样品运行序列编辑区、样品管理器 (Sample Manager)、四元溶剂管理器 (Quaternary Solvent Manager)、色谱柱管理器 (Column Manager)、PDA检测器 (PDA Detector) 以及仪器方法编辑 (Instrument Method) 等子窗口。

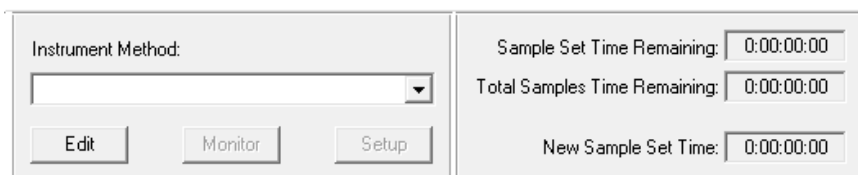
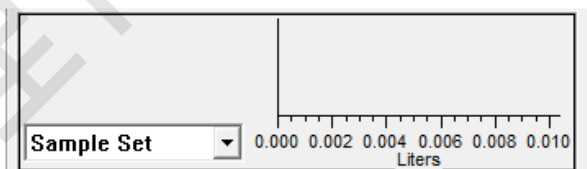
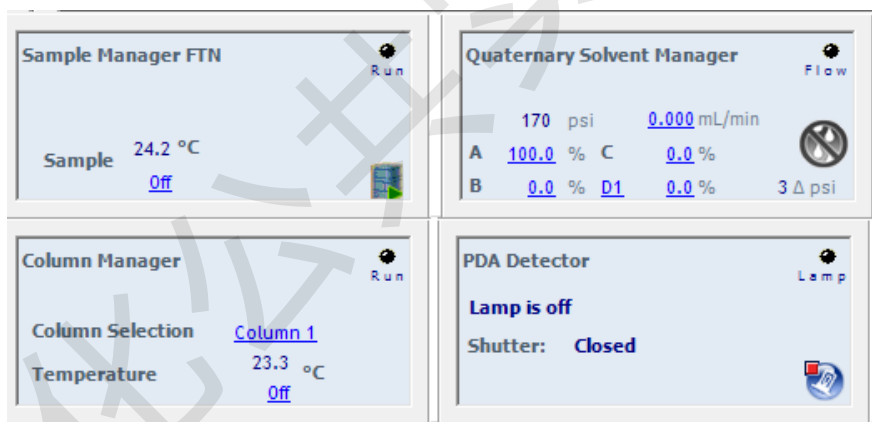
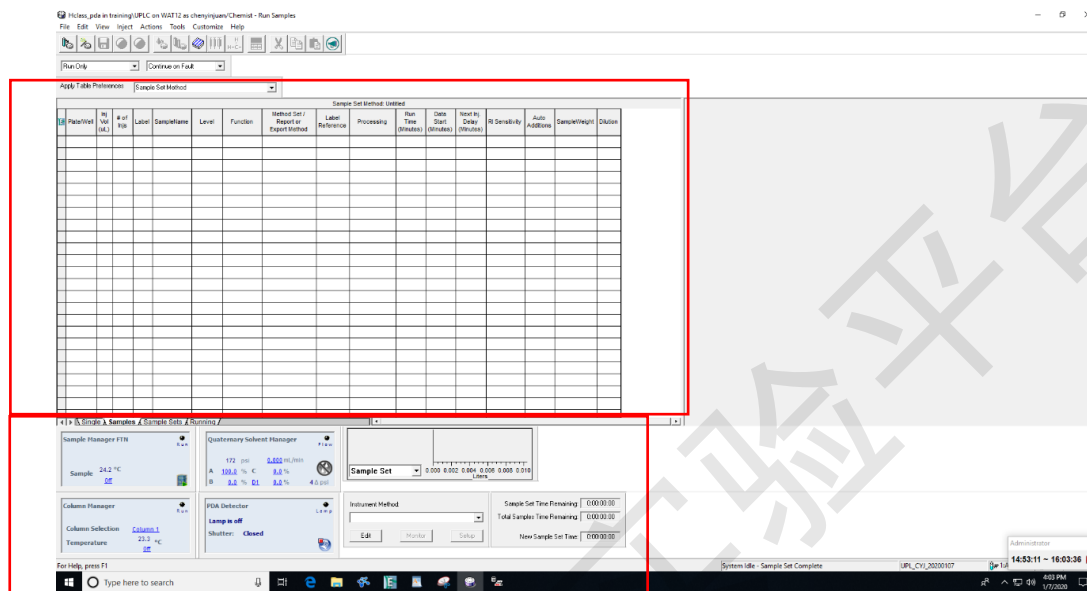


图7-5

7.4.4 系统灌注清洗操作

7.4.4.1 进入系统控制台

点击Sample Manager右下角图标，打开Console界面（图7-7）

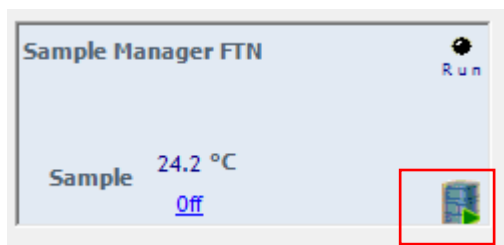


图7-6

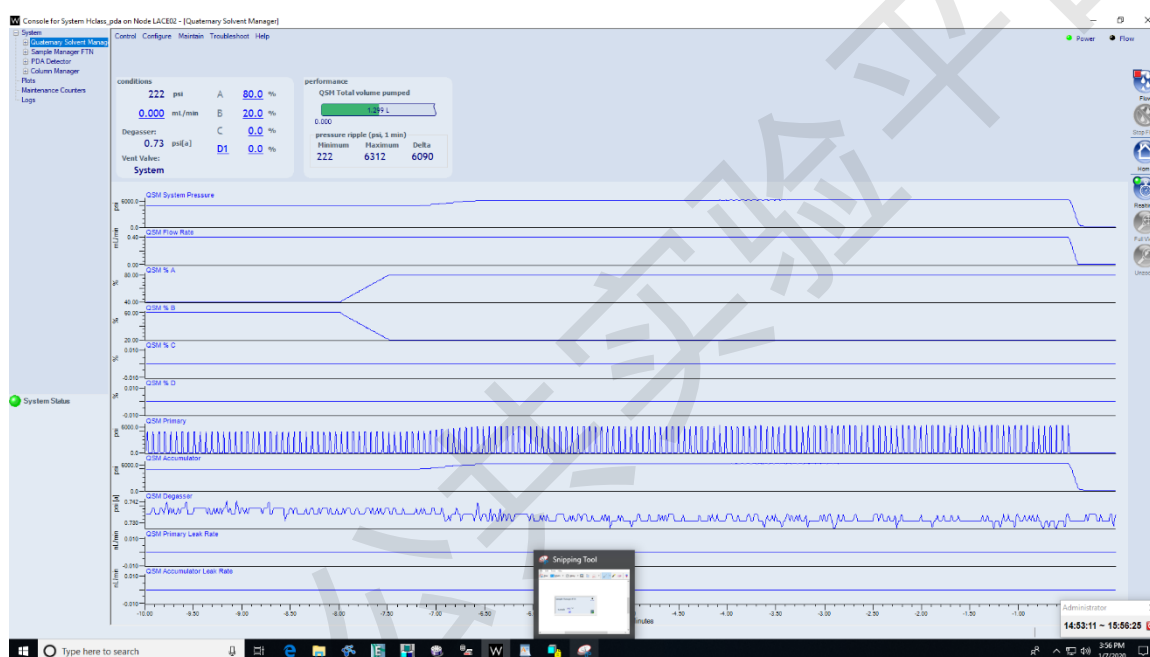


图7-7

7.4.4.2 流动相灌注操作

选择Quaternary Solvent Manager; Control-Prime solvent, 弹出图7-9对话框

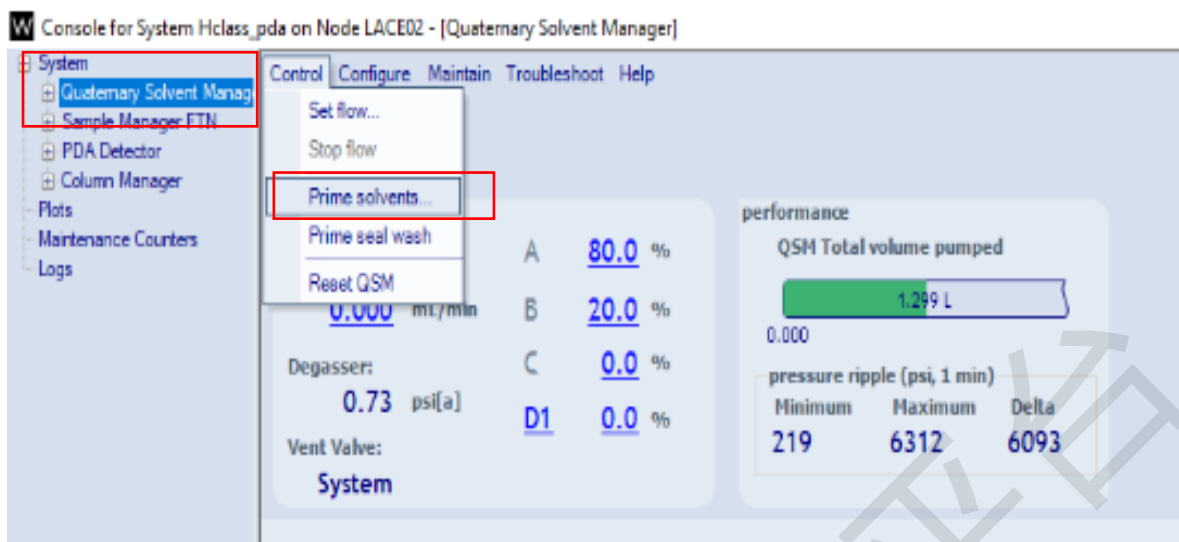


图7-8

7.4.4.3 勾选所需的流动相流路（A为水相，B为有机相），设置每一相流路的灌注时间（2-4 min），点击Start。灌注操作，Console界面显示Quaternary Solvent Manager: Priming状态提示。

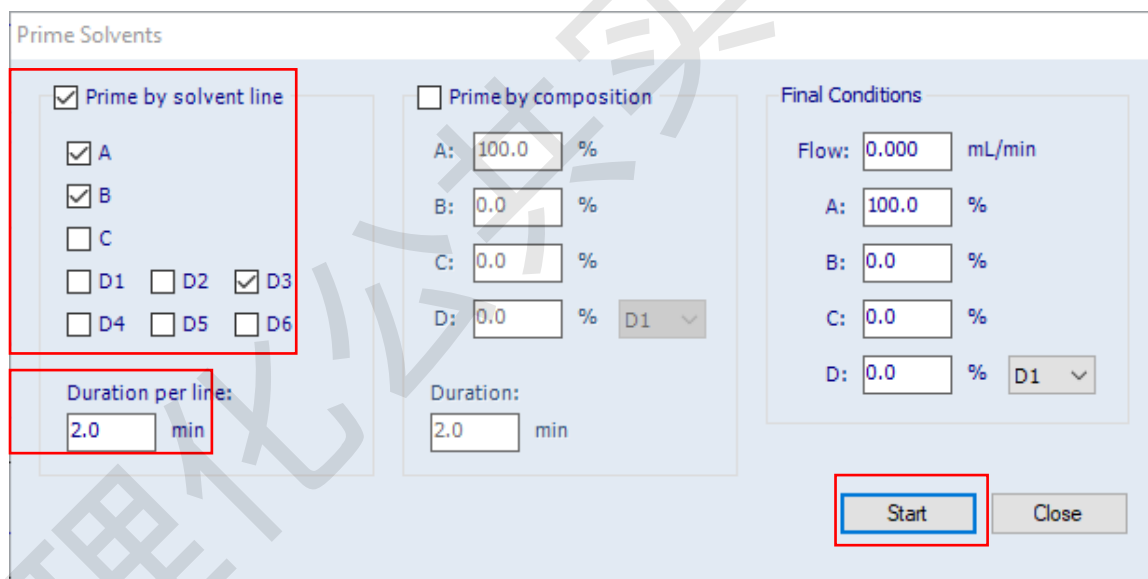


图7-9

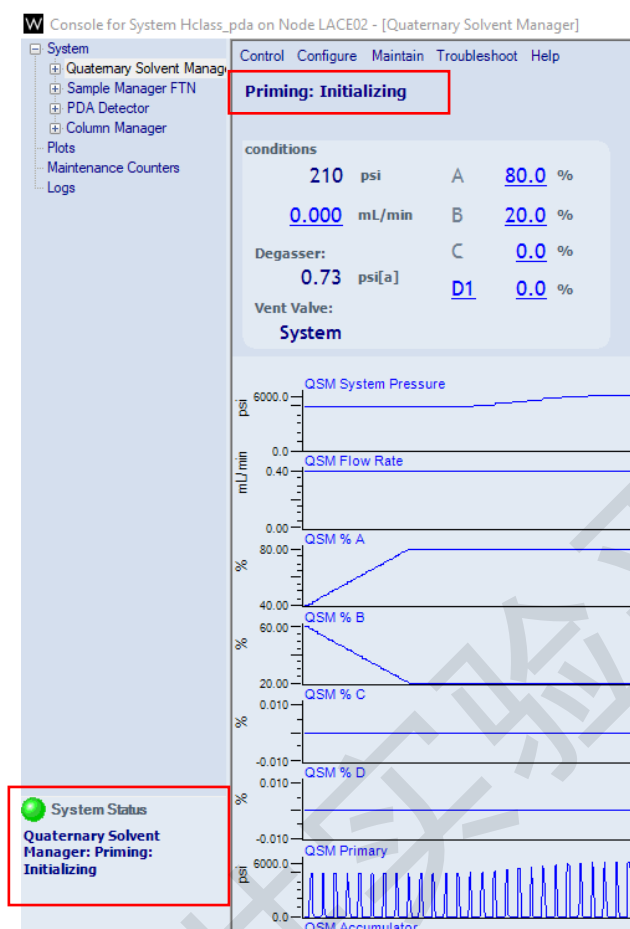


图7-10

7.4.4.4 样品注射器清洗

Console界面, 选择Sample Manager FTN; Control-Prime操作, 弹出图7-12对话框。设置Wash Solvent清洗时间为20 sec, Purge Solvent次数为2-5次, 点击OK。样品管理器Purge阶段, Console界面显示Sample Manager: Priming状态提示(图7-13)。

注: 7.4.4.4 和7.4.4.3 可同时操作。

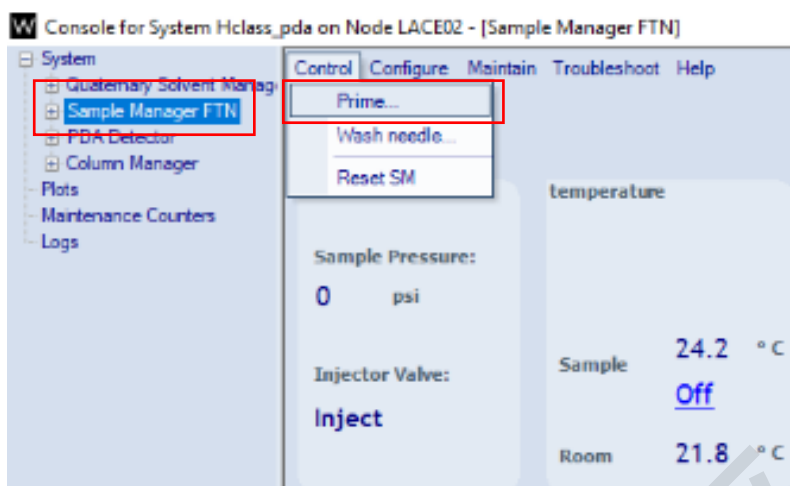


图7-11

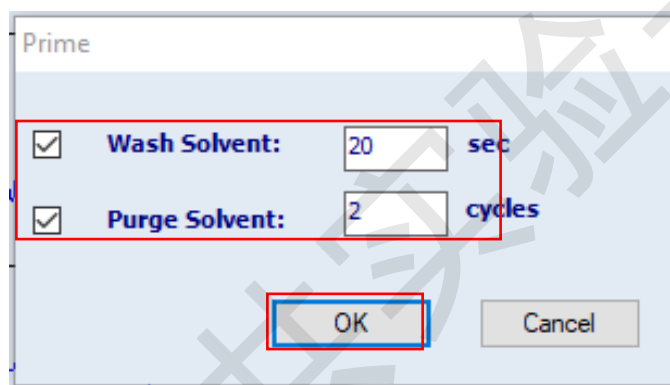


图7-12

仪器灌注清洗结束，Console界面显示如图7-13右图所示，System Status指示灯亮，无其他状态显示。



图7-13

7.4.5 编辑液相方法

7.4.5.1 在Run Sample界面，选择Instrument Method子窗口，点击Edit，进入方法编辑页面。

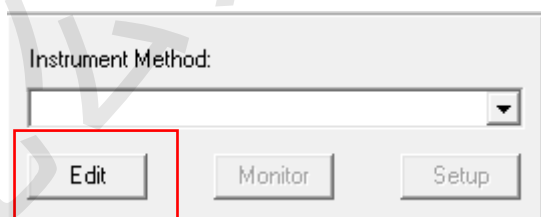


图7-14

7.4.5.2 液相方法编辑页面

液相方法编辑页面显示如图7-15，显示仪器配置QSM、FTN、CM及PDA模块图标。

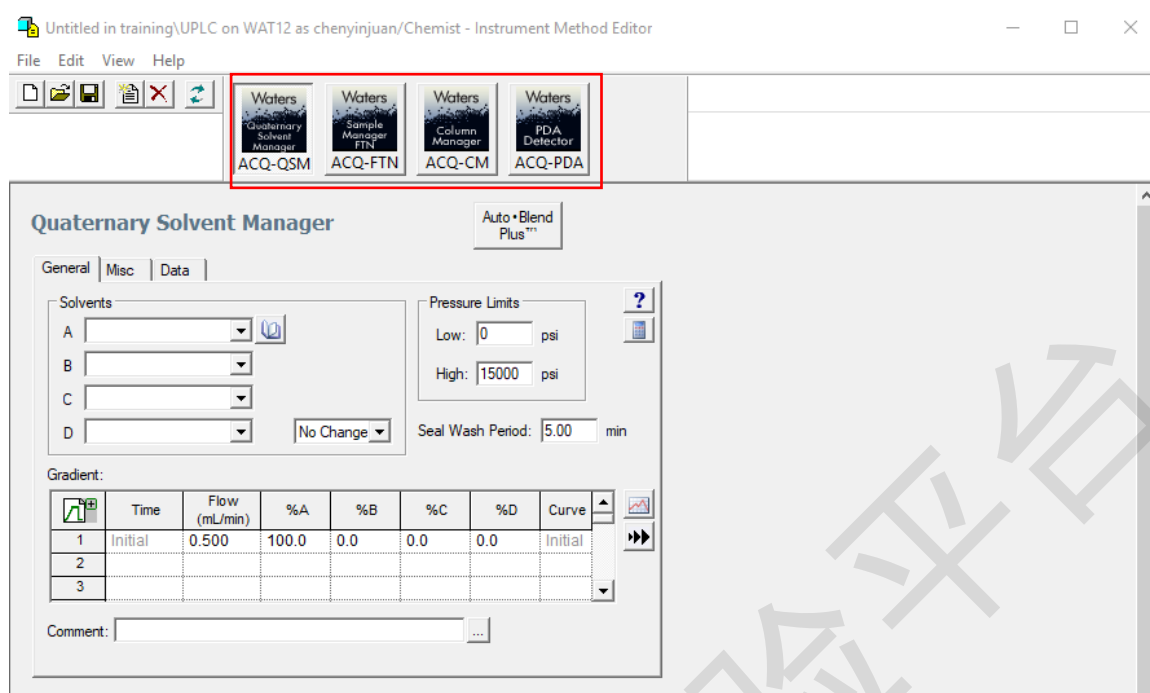


图7-15

7.4.5.3 编辑溶剂管理器

选择ACQ-QSM图标，进General栏项目设置。设置A、B相成分（A为水相，B为有机相），系统压力上下限及洗脱梯度。

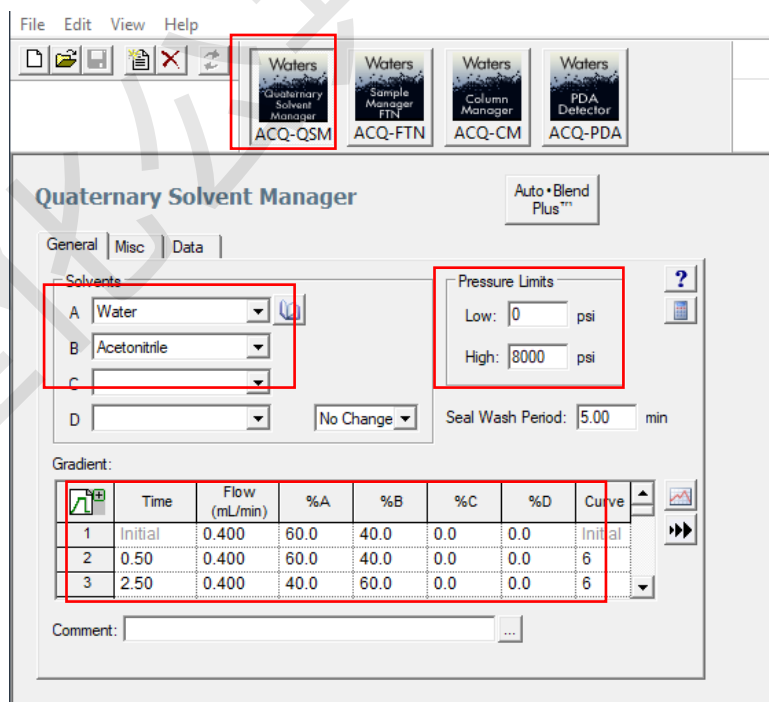


图7-16

7.4.5.4 编辑样品管理器

选择ACQ-FTN图标, 进General栏项目设置。设置样品箱温度。

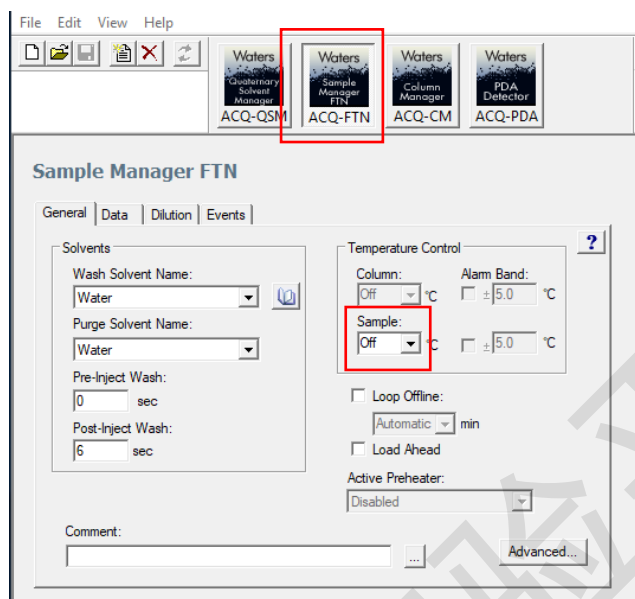


图7-17

7.4.5.4 编辑色谱柱管理器

选择ACQ-CM图标, 进General栏项目设置。设置色谱柱温箱温度及色谱柱位置。

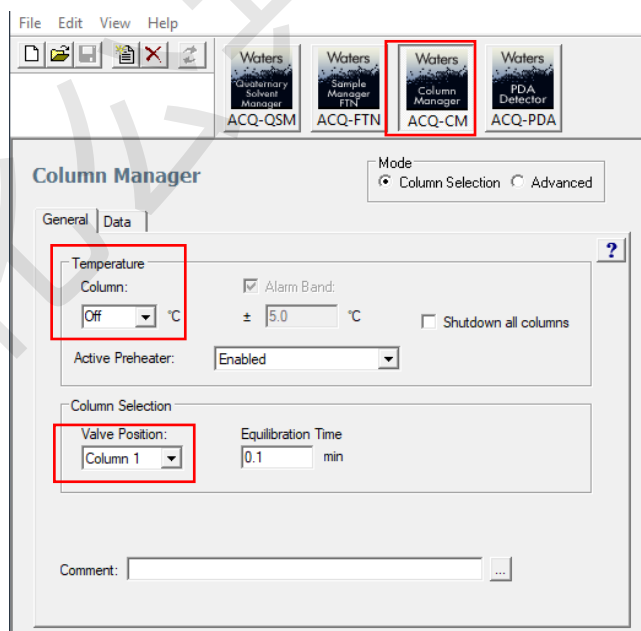


图7-18

7.4.5.5 编辑PDA检测器

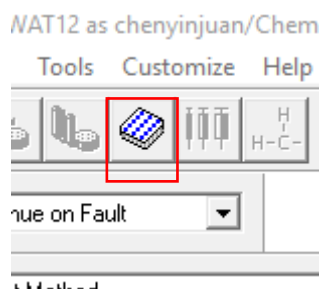


图7-20

样品盘选择对话框：样品盘类型48位2 ml样品盘 ANSI-48Vial 2ml Holder，选择1号或者2号样品盘，点击右侧样品瓶位置，再点击Insert，最后点击OK退出对话框。本次演示，插入1号盘，A2瓶，Insert-OK之后，样品序列显示如图7-22。

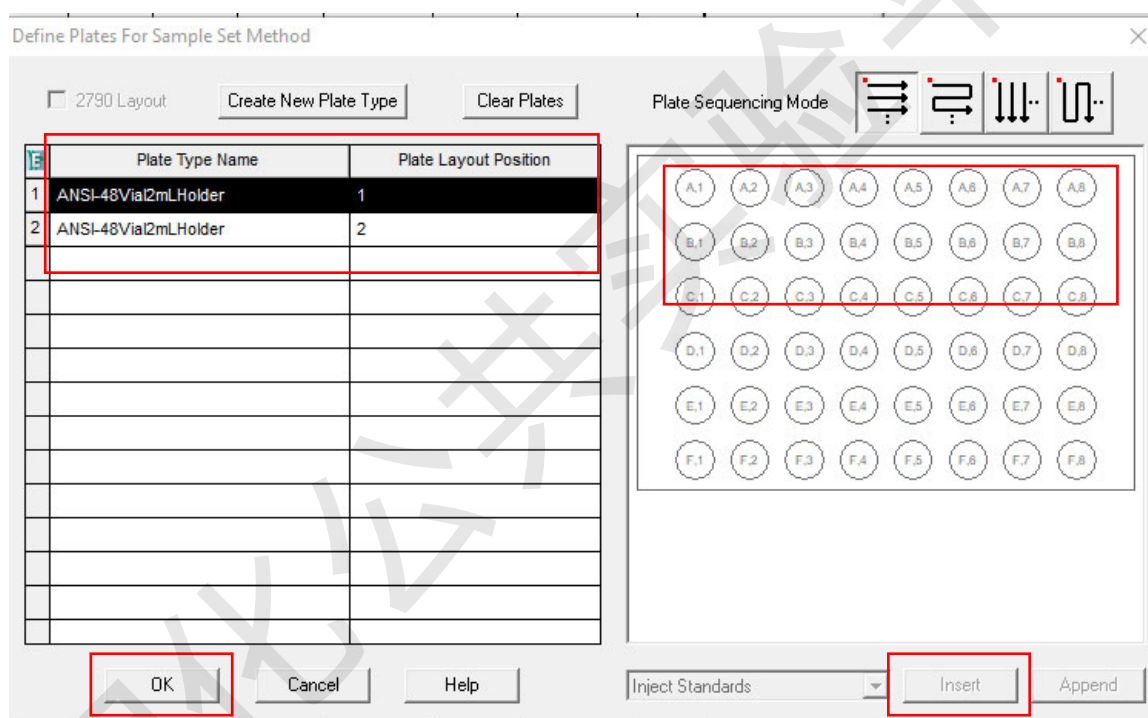


图7-21

Sample Set Method: Untitled																	
#	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)	RI Sensitivity	Auto Additions	SampleWeight	Dilution
1	1:A,2	10.0	1				Inject Standards			Normal	10.00	0.00	0.00			1.00000	1.00000

图7-22

7.4.5.8 样品序列/样品组序列继续编辑

进样体积 (Inj Vol ul)：标准进样2 ul;

进样次数 (# of injs)：根据实验需要，通常单次进样;

样品名称 (SampleName) : 根据样品情况自定义;

功能 (Function) : 样品选择 Inject Samples; 标样选择: Inject Standard

方法组文件 (Method Set) : 下来选择7.4.5.6中保存的方法组文件。

处理 (Processing) : Don't Report

运行时间 (Run Time) : 根据洗脱梯度进行设置。

其他栏可以不填写。

最终样品序列参见图7-23.

Sample Set Method: Untitled																	
	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)	RI Sensitivity	Auto Additions	SampleWeight	Dilution
1	1:A,2	2.0	1		sm		Inject Samples	UPLC_CYJ_20200107_test		Don't Report	8.00	0.00	0.00			1.00000	1.00000

图7-23

7.4.5.9 加载液相方法

在Console界面, 选择Instrument Method子窗口, 下来选择7.4.5.6中保存的方法文件, 点击Setup加载液相方法, 此时溶剂管理器开始运行, PDA紫外灯打开, 进行初始流动相平衡。在Console界面四元溶剂管理器子界面或Run Sample界面, 观察系统压力差, 当差值<50 psi, 表示初始流动相已平衡, 可开始运行样品。

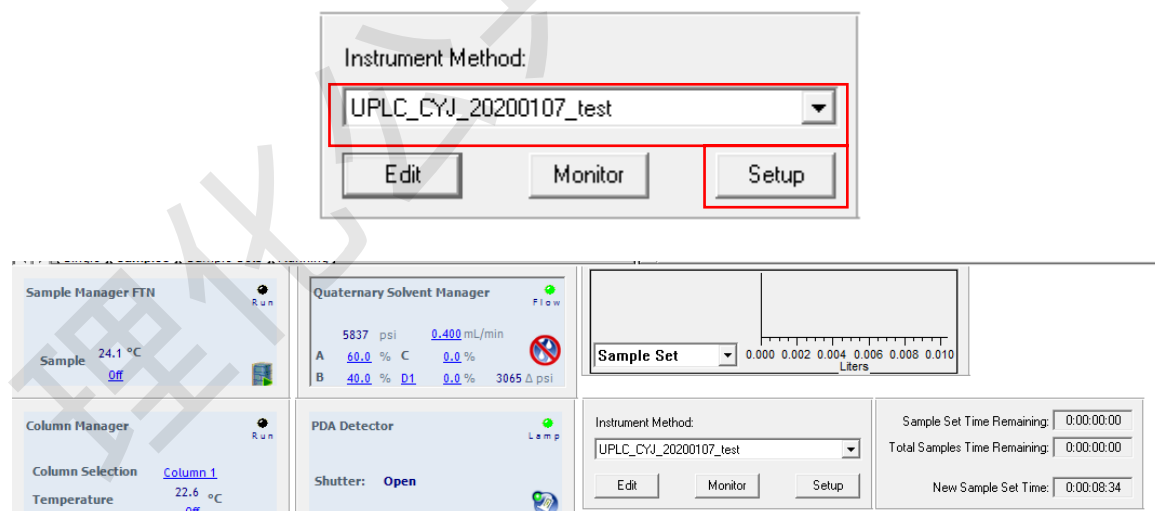


图7-24

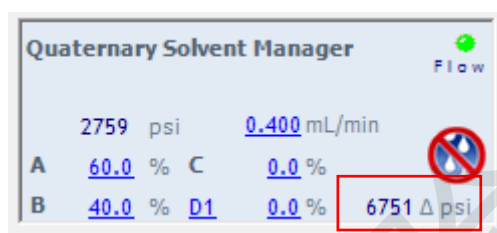
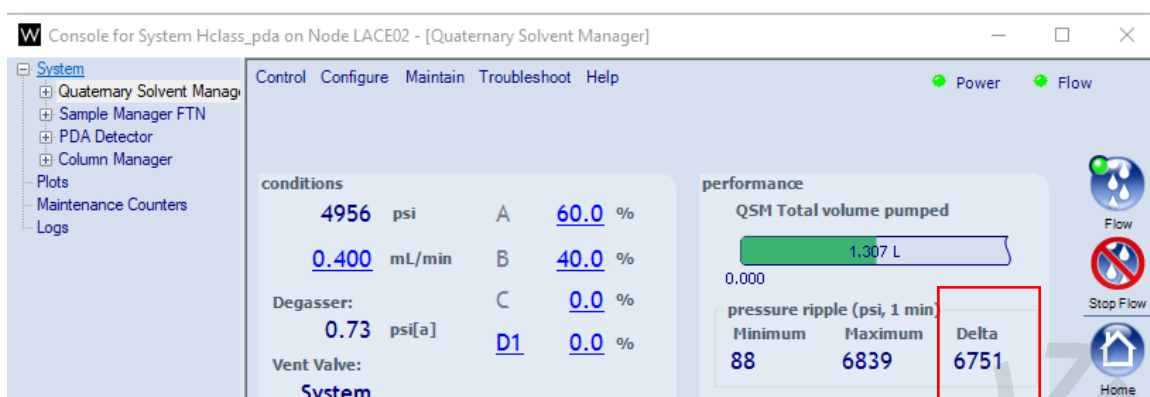



图7-25

7.4.5.10 运行样品序列

选中7.4.5.8中编辑好的样品序列，点击运行图标，弹出对话框（图7-27），选择确认运行所有行或是运行选中行，输入文件名，点击Run按钮，仪器开始运行。

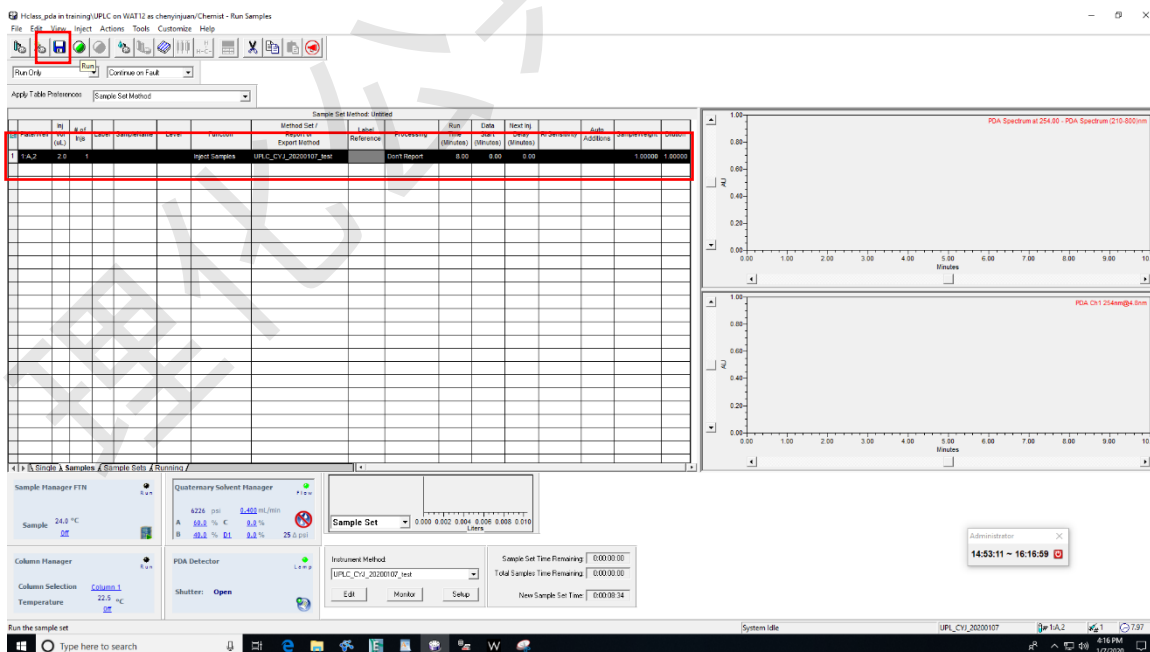


图7-26

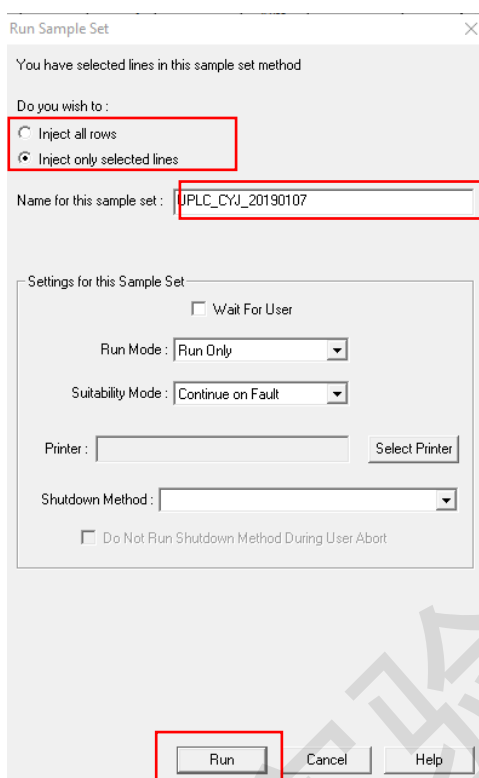


图7-27

7.4.5.11 运行样品序列显示

样品序列运行后, 之前编辑的样品序列行会转跳到Running栏, 当前运行的序列标记为红色, Run Sample界面会实时更新当前运行样品的色谱图, 可进行放大查看。

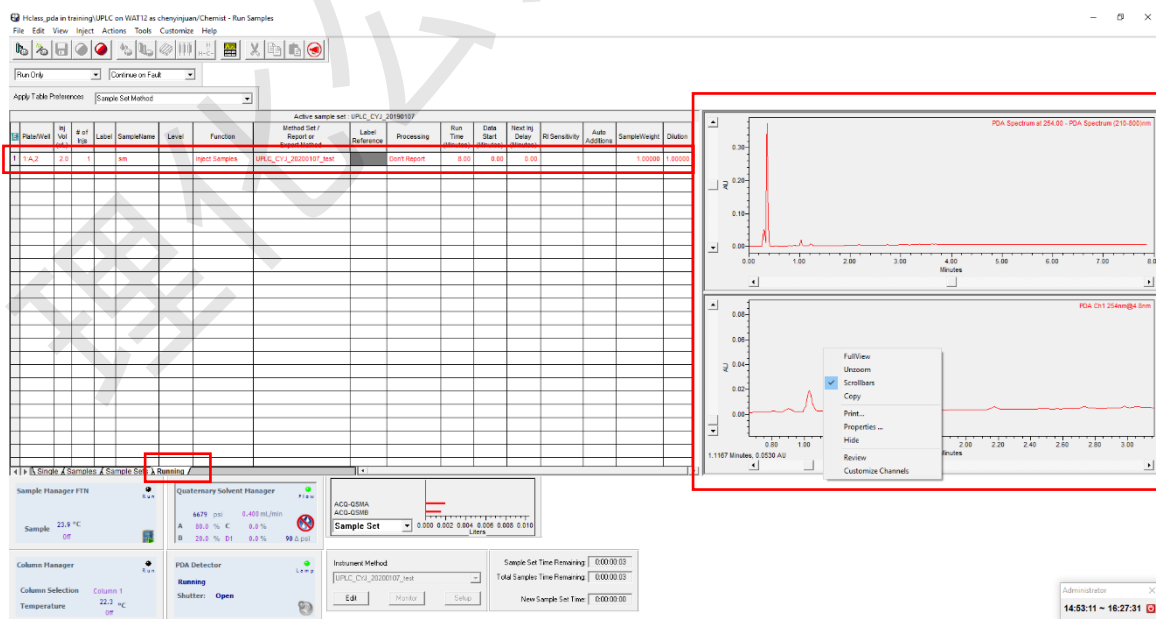


图7-28

7.4.5.12 样品序列运行结束显示

样品序列运行结束后，样品行会转跳至 Samples 栏，Running 栏空白。

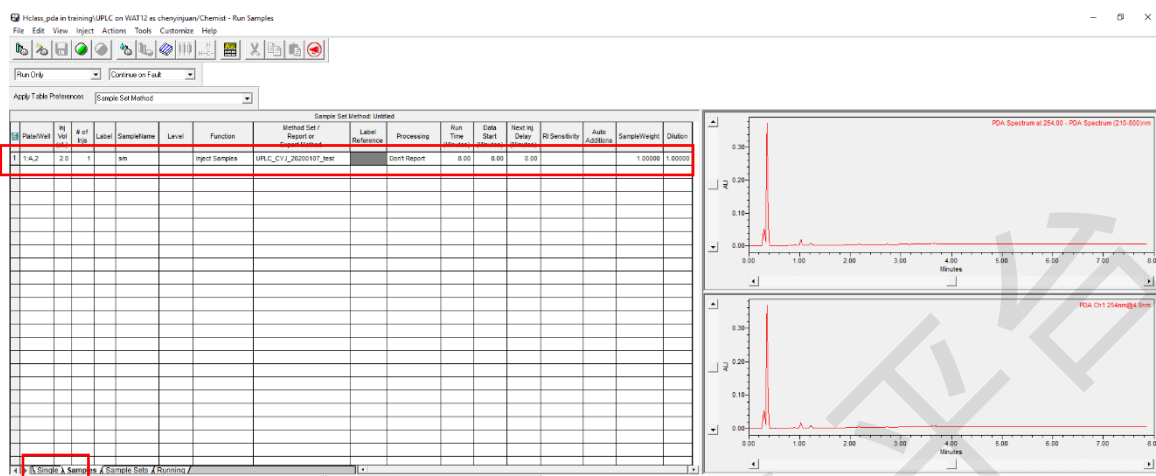


图 7-29

7.5 运行结束处理

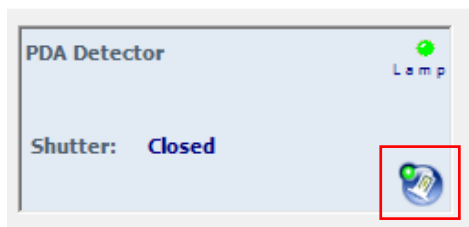
7.5.1 冲洗柱子

根据色谱柱维护方法，对色谱柱进行冲洗处理。通常对于反相色谱柱进行：1）高比例水相冲洗，冲洗体积为柱体积20倍以上；2）高比例有机相冲洗，冲洗体积为柱体积20倍以上。

7.5.2 关仪器

7.5.2.1 关PDA紫外灯

Run Sample主页面，点击右下角图标一次，弹出紫外灯关闭确认对话框，点击Yes，可关闭PDA灯。



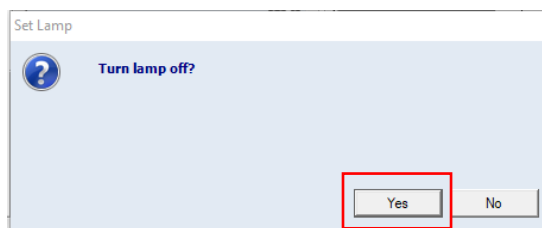


图7-30

7.5.2.2 停流动相

Run Sample界面, 选择Quaternary Solvent Manager子窗口, 点击流速, 在Set Flow弹出界面, 设置流速为0, 点击对勾确认即可。

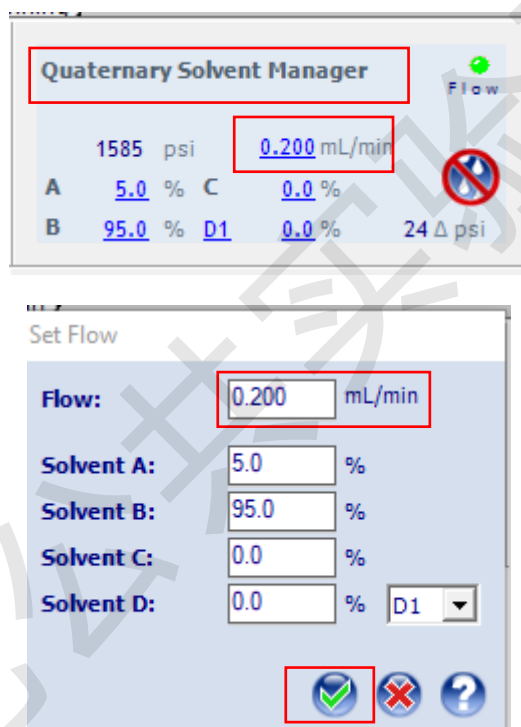


图7-31

7.5.2.3 关闭温度设置

如果色谱方法中涉及样品及色谱柱温度设置, 请在Run Sample界面, 选择Sample Manager和Column Manager子窗口, 点击蓝色实时温度, 输入0, 回车即可。仪器界面关闭前, Run Sample界面显示如图7-32所示。(无灯、无流动相、无温度)

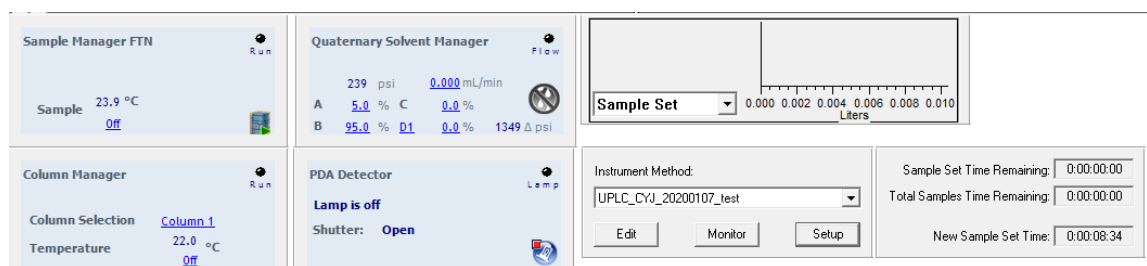


图7-32

7.6 数据查看

7.6.1 登入

在Empower界面，点击Browse Projects选项（图7-33），然后选择7.4.2中的数据保存路径，选择数据文件，点击OK（图7-34），进入数据查看界面。

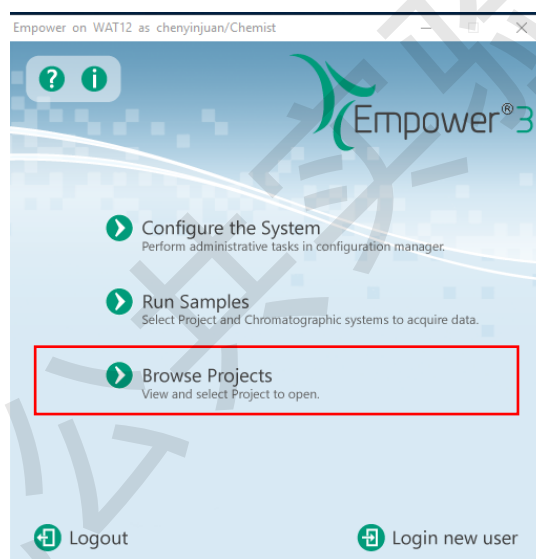


图7-33

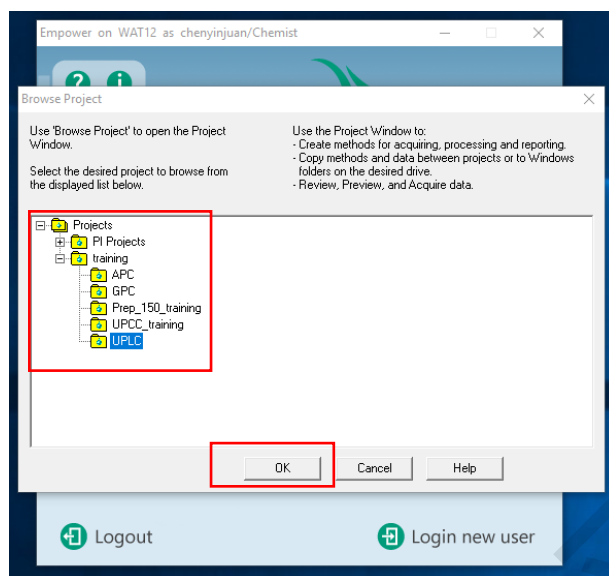


图7-34

7.6.2 数据查看页面

数据查看主页面显示如图7-35，Sample Sets显示目前已运行的样品组文件。如图7-36，选中要查看的样品组文件行，右键-View as-Injections/Channels/Methods,可按不同方式进行查看。通常以Channel方式查看数据文件。

	Sample Set Name	Sample Set Start Date	System Name
1	UPLC_CYJ_20190107	1/7/2020 4:18:53 PM CST	Hclass_pda
2	UPL_CYJ_20200107	1/7/2020 3:42:25 PM CST	Hclass_pda
3	UPLC_CYJ_20200107_test	1/7/2020 3:17:10 PM CST	Hclass_pda
4	ZKC_WJL_20191126_BK_01	11/26/2019 2:05:24 PM CST	Hclass_pda
5	ZKC_WJL_20191126_AA_01	11/26/2019 1:23:22 PM CST	Hclass_pda
6	ZKC_WJL_20191126_AA_01	11/26/2019 10:20:00 AM CST	Hclass_pda
7	ZKC_WJL_20191125_01	11/25/2019 5:43:44 PM CST	Hclass_pda
8	ZKC_WJL_20191125_AA_01	11/25/2019 5:22:05 PM CST	Hclass_pda
9	ZKC_WJL_20191125_AA_01	11/25/2019 3:52:23 PM CST	Hclass_pda
10	ZKC_WJL_20191125_AA_01	11/25/2019 3:51:31 PM CST	Hclass_pda
11	ZKC_WJL_20191125_AA_01	11/25/2019 2:57:03 PM CST	Hclass_pda

图7-35

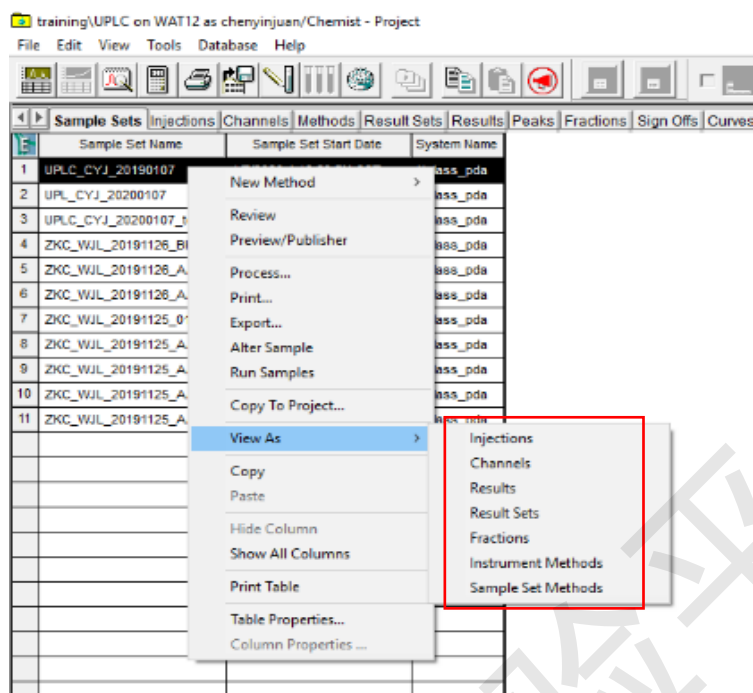


图7-36

7.6.3 Channel方式查看结果

图7-37是以Channel方式查看数据，在当前Channels栏，选中需要查看的数据，右键-Review，即可查看数据。

SampleName	Vial	Injection	Sample Type	Date Acquired	Channel	Channel Description	Injection Status	Channel Status
1 sm	1:A,2	1	Unknown	1/7/2020 4:19:28 PM CST	PDA Spectrum	PDA Spectrum (210-800)nm	Complete	Acquisition Finished
2 sm	1:A,2	1	Unknown	1/7/2020 4:19:28 PM CST	PDA Ch1 254nm@4.8nm	PDA Ch1 254nm@4.8nm	Complete	Acquisition Finished

图7-37

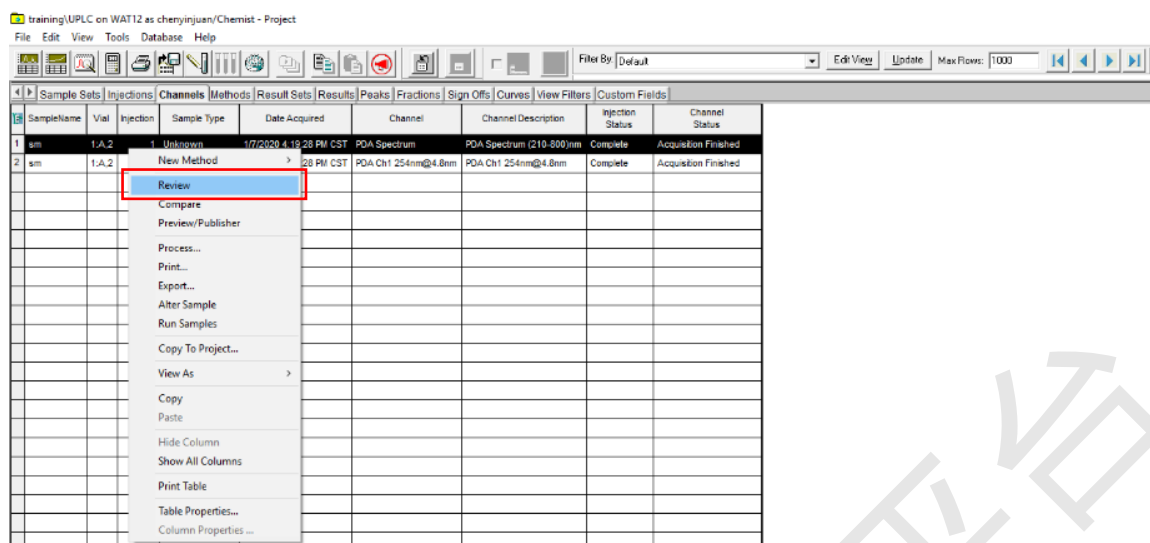


图7-38

7.6.4 3D中提取2D数据

在3D数据查看窗口输入某一波长，即可查看该波长下的2D色谱图。

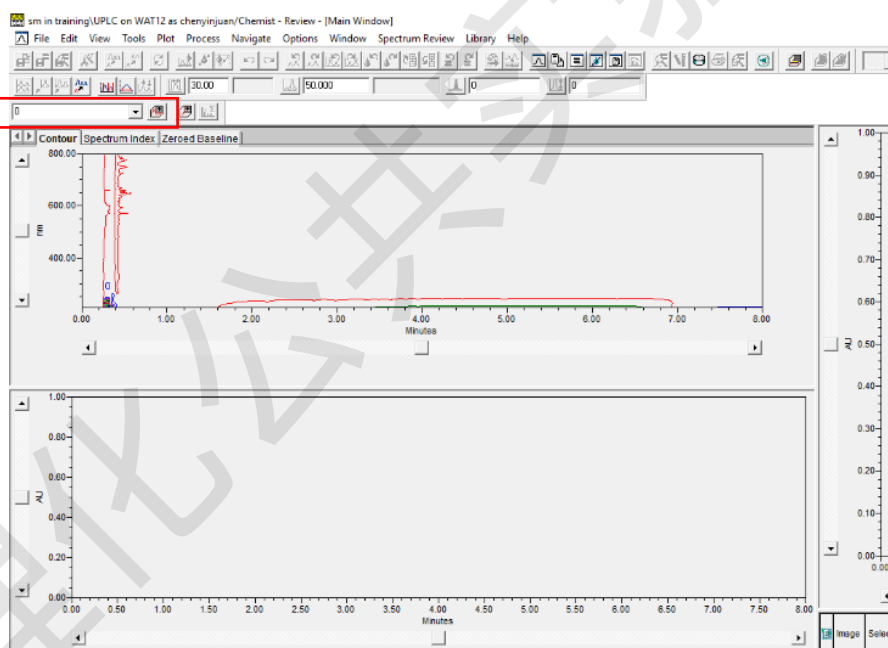


图7-39

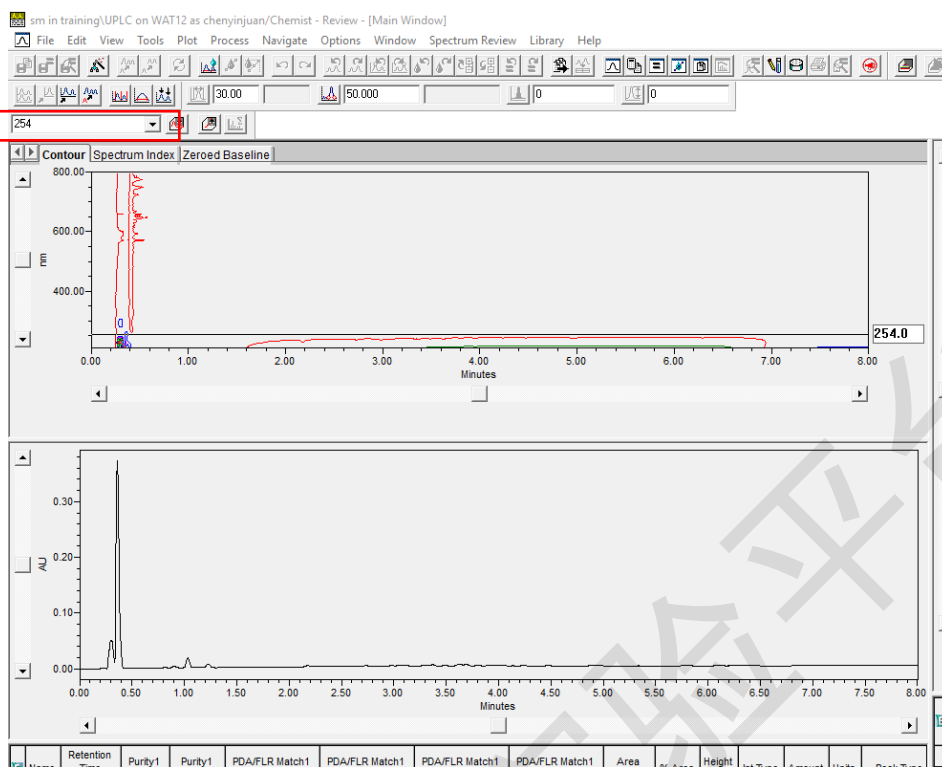


图7-40

7.6.5 归一化处理

查看2D数据, Review-Process-Integrate

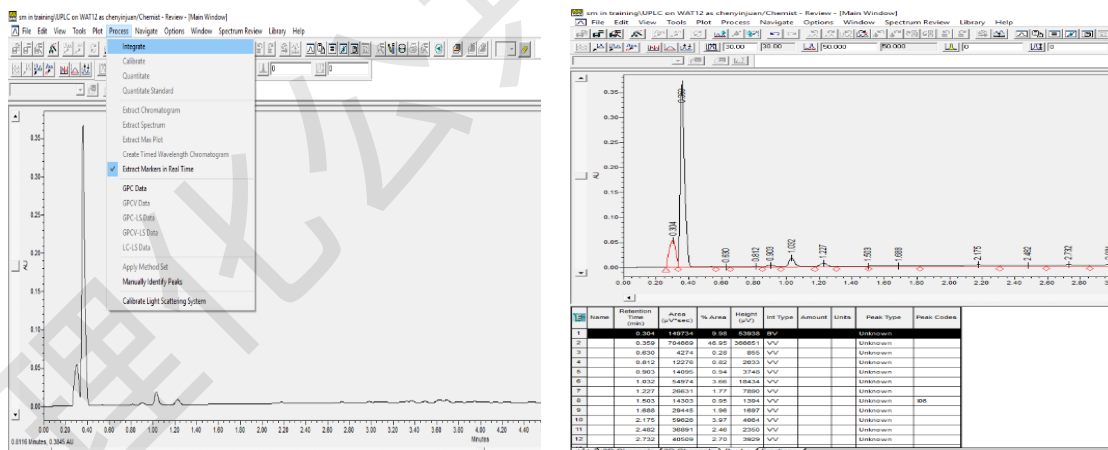


图7-41

色谱峰面积积分后, 可以放大色谱图, 优化积分起始点, 另外可以通过Options选项, 设置色谱峰峰高、宽度、面积阈值。

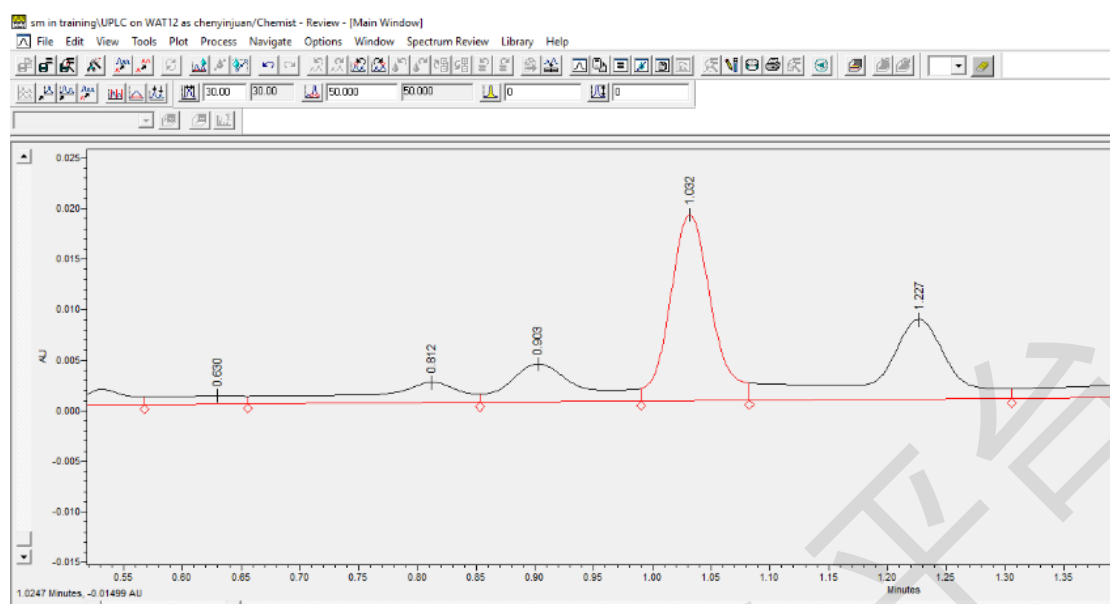


图7-42

7.6.6 原始数据导出

File-New Method-Export method, 新建数据导出方法文件, 本仪器仅可导出ASCII文件; 然后选中相关文件, 右键-Export,应用导出方法文件即可导出数据(.raw)。该数据可使用Origin等软件进行编辑处理。

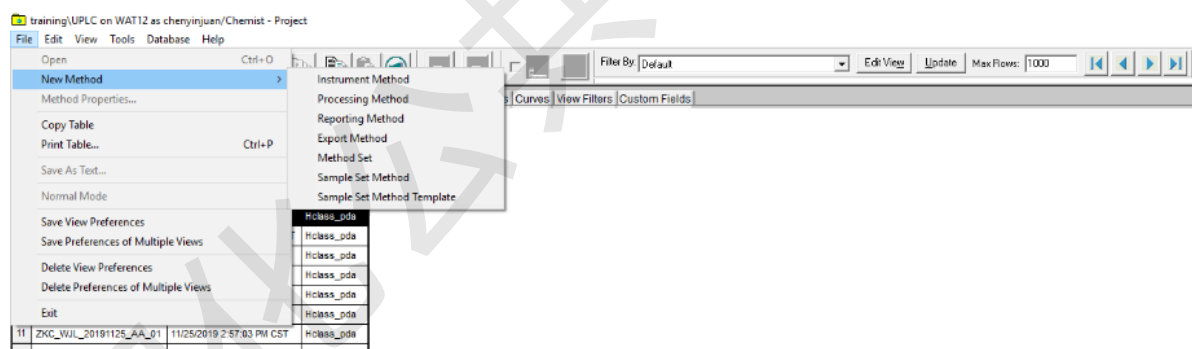


图7-44

7.7 退出

实验结束请先关闭所有样品运行及数据查看窗口, 再退出Empower系统; 退出基理系统前, 请自行上传数据至NAS网盘课题组所有文件, 最后退出基理系统;

离开实验室前, 请进行测试登记, 从样品管理器中取出测试样, 整理实验桌, 确认无误后, 方可离开。

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 FLHS054 超高效液相色谱仪 Waters UPLC 使用记录。

理化公共实验平台

高效液相色谱仪使用记录											
日期 (yy,mm,dd)	使用人	导师	样品名称 或代号	检测方式 (√)		测试项目 (√)		样品数	数据文件	仪器状态	备注 (仪器报错; 培训/ 上机; 流动相说明 等)
				送样	自主	分析	定量		导师名首字母_使用人名首字母 _日期_样品名_数字	正常 √	
2019.12.18	张三	王五	P1		√	√		2	WW_ZS_20191218_P1_01	√	上机考核

**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，默认为使用前谱仪状况良好；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。