

# 高效逆流色谱仪操作规程

## 一、开机：依次打开以下电源

1. 恒流输液泵；
2. 紫外检测器；
3. 高效逆流色谱仪主机；
4. 电脑；
5. ECW 工作站软件（待紫外检测器自检通过后——面板显示“ON”）；
6. 恒温水循环器（待高效逆流色谱仪开始旋转后）。

## 进样前的准备

### 二、恒流输液泵排气泡：

1. 拧松泵上灰白色螺母；
2. 恒流输液泵分为 A 泵和 B 泵，泵吸液管对应的溶剂如下：
  - 1) A 泵：上相溶剂；
  - 2) B 泵：下相溶剂；
3. 排气泡流速控制：
  - 1) Analytical: 5 mL/min;
  - 2) Preparative: 10 mL/min;

#### 注意：

- 1) 排气泡时注意泵的压力变化，超压时 ( $>15\text{MPa}$ )，降低流速，看压力是否下降，或者停泵检查各接口是否堵塞；
  - 2) 所用溶剂粘度较大时，可适当降低流速排气泡；
4. 排气泡时间：1-2 min，排液管流出溶剂无气泡即可。

### 三、选择高效逆流色谱仪操作模式：

高效逆流色谱仪主机侧板 NP/RP 旋钮，根据分离方法选择：

1. NP：正相；
2. RP：反相。

#### 四、选择高效逆流色谱仪色谱柱：

高效逆流色谱仪主机侧板 Analytical / Preparative 旋钮，根据上样量选择：

1. Analytical：分析柱，上样量：0.5-2 mL；
2. Preparative：制备柱，上样量：3-12 mL。

#### 五、选择高效逆流色谱仪样品环：

根据上样体积选择相应的样品环：0.5、1、2、3、6、12 mL。

#### 六、进固定相溶剂两个柱体积：

1. 两个柱体积：
  - 1) Analytical：60 mL；
  - 2) Preparative：300 mL；
2. 流速：
  - 1) Analytical：5 mL/min；
  - 2) Preparative：15 mL/min；

**注意：**

- 1) 泵压力超压时 ( $>15\text{MPa}$ )，降低流速或停泵检查各接口是否堵塞；
- 2) 用量筒接排除溶剂，溶液出现分层即可停泵。

#### 七、进流动相溶剂：

1. 运行高效逆流色谱仪，待转速稳定 (1600 rpm) 后，泵入流动相溶剂；
2. 流速：若超压 ( $>15\text{MPa}$ )，降低流速或停泵检查各接口是否堵塞
  - 1) Analytical：1 mL/min；
  - 2) Preparative：10 mL/min；
3. 量筒内排出的溶液分层即可，分层时固定相溶剂体积：
  - 1) Analytical： $\leq 15$  mL；
  - 2) Preparative：40-50 mL；

**注意：**

- 1) 正相：固定相为下相溶剂，流动相为上相溶剂；
- 2) 反相：固定相为上相溶剂，流动相为下相溶剂。

## 八、打开工作站 ECW，编辑方法，扫描基线：

1. 在 ECW 中选择仪器对应硬件，并连接各相关硬件（也可以在原有基础上直接编辑方法）；
2. 编辑方法：
  - 1) 在 Method 模块中调用已连接的硬件，设定扫描时间（如 100min）与扫描频率（10Hz）点击保存并键入方法名称；
  - 2) 编辑流动相溶剂（A/B）与流速，保存：  
Analytical: 1 mL/min;  
Preparative: 10 mL/min;
  - 3) 基线扫描开始：点击相应的快捷键图标。

## 进样检测：

## 九、装样：

1. 将进样阀调至 Load 状态；
2. 用注射器将样品推入样品环中；  
**注意：**
  - 1) 一定要排尽注射器中的气泡；
  - 2) 擦干针头及注射器上残留的溶剂；
  - 3) 样品中杂质较多时，注射器加装过滤头（有机系），排除杂质干扰。

## 十、进样并采集谱图：

1. 基线稳定后，停止基线扫描：在 Method 模块中点击与基线扫描开始相同图标；
2. 将进样阀调至 Inject 状态；
3. 在 Method 模块中点击采集谱图的黑色三角形图标（做完后点击同样的三

角形图标停止谱图扫描)。

### 十一、做完样品后的 Extrusion 操作:

1. 谱图扫描继续, 停止流动相泵;
2. 停止高速逆流色谱仪与恒温水循环器, 即 OFF;
3. 打开固定相泵, 泵入固定相推出高效逆流色谱仪中残留组分, 注意检测器出峰情况;
4. 固定相流速设定:
  - 1) Analytical: 5 mL/min;
  - 2) Preparative: 15 mL/min。

### 十二、清洗管道或柱子:

1. 打开混合器, 甲醇: 纯水=1:1 清洗柱子;
2. 流速: (注意是否超压)
  - 1) Analytical: 5 mL/min;
  - 2) Preparative: 15 mL/min;
3. 冲洗两个柱体积:
  - 1) Analytical: 60 mL;
  - 2) Preparative: 300 mL;
4. 最后用两个柱体积的纯水冲洗即可, 冲洗完后停泵。

### 十三、关机: 依次关闭以下电源

1. 高效逆流色谱仪主机;
2. 恒温水循环器;
3. 恒流输液泵;
4. 紫外检测器;
5. 电脑: 先关闭 ECW 软件, 再关机。

## 日常维护

1. 做完样品后必须进行 Extrusion 操作，排出仪器中残余的样品；
2. 做完样品后必须及时按操作冲洗仪器管道或柱子；
3. 单向阀维护：长期使用仪器或流动相被污染时极易使单向阀污染

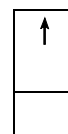
### 单向阀污染判别：

- 1) 将在线过滤头提离流动相液面，将放空阀旋钮拧松，运行泵；
- 2) 在入液管中放入一段气泡；
- 3) 马上将在线过滤头放入流动相内；
- 4) 然后将放空阀旋钮拧紧，以观察气泡行程：
  - a. 若气泡往前走又向后退，说明下单向阀污染，将下单向阀取下后放入丙酮中超声即可（超声时要让单向阀保持竖直状态）；
  - b. 若气泡往前走，但行程比放空阀旋钮拧松时慢，说明上单向阀污染，即将上单向阀取下后放入丙酮中超声即可（超声时要让单向阀保持竖直状态）。

### 单向阀清洗维护步骤：

- 1) 用英制扳手将泵头的 U 形管上的空心螺钉拧松，拧至完全离开单向阀座为止。然后取下 U 形管；
- 2) 用活扳手将右边的单向阀固定座拧松，然后取下固定座，用镊子将单向阀取出来；

### 单向阀放置方式为：



- 3) 将单向阀放于烧杯中，在烧杯中放入丙酮，超声清洗。清洗的时候，单向阀保持上图中的方式，站立清洗；
- 4) 单向阀共有两个，上下各一个，需要分别清洗；
- 5) 清洗完毕后，保持与拆卸时的方向，回放到泵头的安装位中：安装时单向阀的方向与上图中的方向一致；
- 6) 按照拆卸时的方法，安装就可以；
- 7) 安装完毕后，用洗耳球将流动相吸进入液管中，然后将之拧到下阀座上；

8) 打开放空阀，启动泵，将气泡排出。

**注意：** 请保持实验室与实验仪器的整洁。