

文件编号：WU-ISCMS-QM 20214702

版本号：V2.0

受控状态：

分发号：

分子科学公共实验平台

质量管理文件

超临界流体制备色谱仪 Waters Prep100q 标准操作规程

2020 年 8 月 3 日发布

年 月 日实施

分子科学公共实验平台 发布

修订页

修订日期	版本号	修订说明	修订	审核	批准
2020.08.03	V1.0	发布试行	陈银娟	陈银娟	卢星宇
2022.05.15	V2.0	修订安全及操作规范	陈银娟	陈银娟	卢星宇

分子科学公共实验平台

目 录

1. 目的	1
2. 范围	1
3. 职责	1
4. 色谱实验室安全管理规范	2
4.1. 进入或离开实验室规定	2
4.2. 实验操作规定	2
4.3. 气瓶使用规定	3
5. 色谱实验室仪器设备管理规范	4
5.1. 超临界流体制备色谱仪预约与使用	4
5.2. 预约制度	4
5.3. 培训考核制度	5
6. 仪器操作	6
6.1 准备工作	6
6.1.1 仪器核对	6
6.1.2 制样要求	6
6.2 仪器组成及原理	7
6.2.1 仪器组成及作用	7
6.2.2. 仪器运行框架图	8
6.2.3 安全须知	8
6.3 开机顺序	10
6.4 运行仪器	11
6.4.1 软件及项目新建	12
6.4.2 仪器准备工作	16
6.4.3 输入文件名 (File Name)	19
6.4.4 输入 File text	19
6.4.5 新建 MS File 文件	19
6.4.6 新建 Inlet File 文件 (即 SFC 洗脱文件)	22
6.4.7 设置 Bottle 位置	31
6.4.8 设置 Inject volume 进样体积:	34

6.4.9 设置 Fraction File (重要,样品回收的触发条件)	34
6.4.10 设置 Fraction Trigger 1	40
6.4.11 仪器状态或其他方法参数查看	43
6.4.12 系统背压、色谱柱及柱温设置	43
6.4.13 收集器重置	44
6.4.14 Sample list 显示	48
6.4.15 运行样品列表	48
6.5 数据查看	51
7. 相关/支撑性文件	57
8. 记录	57

分子科学公共实验平台

1. 目的

建立超临界流体制备色谱仪 (SFC) 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超临界流体制备色谱仪的用户。

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. 质谱实验室安全管理规范

4.1. 进入或离开实验室规定

- 4.1.1. 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, 严格遵守本实验室的各项安全警示标识。
- 4.1.2. 进入质谱实验室, 请仔细阅读本实验室的安全管理规定。
- 4.1.3. 进入实验室需穿戴实验服, 严禁穿拖鞋、高跟鞋进入实验室, 长发请束发。
- 4.1.4. 进入实验室应了解消防器具与紧急逃生通道位置, 实验室通道及消防紧急通道必须保持畅通。
- 4.1.5. 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。
- 4.1.6. 禁止将实验无关人员带入实验室。
- 4.1.7. 严禁在实验室饮食、吸烟或随意走动。
- 4.1.8. 夜间实验, 需两人在场。
- 4.1.9. 为保持实验室内环境温度及湿度稳定, 进入实验室后保持实验室门窗关闭。实验结束后, 实验人员必须进行清场。最后离开实验室人员需检查水、电、门窗等。
- 4.1.10. 严禁戴手套接触门把手或电梯。禁止随意丢弃实验废弃物。
- 4.1.11. 实验室应保持整洁, 严禁摆放与实验无关的个人物品。
- 4.1.12. 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。至少每周一次检查除湿机有无积水。

4.2. 实验操作规定

- 4.2.1. 实验室内均为大型科研设备, 有专人负责管理, 未经培训人员, 不得擅自上机使用。
- 4.2.2. 送样或自主上机的用户, 均需使用大仪系统进行系统。
- 4.2.3. 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, 无论独立上机或是委托测试, 费用将由用户所在课题组承担;

- 4.2.4. 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必须联系技术员, 自主上机因操作错误造成设备或色谱柱等损坏的, 该用户课题组也需承担相关费用。
- 4.2.5. 实验过程中如发现仪器设备发生异常状况、仪器报错、报警等, 务必立即联系仪器负责人严禁擅自处理、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。
- 4.2.6. 色谱类仪器, 必须根据样品分离方法和要求, 选择合适的色谱柱或设置洗脱梯度、进样盘等, 因用户本人选择色谱柱或梯度设置错误, 导致仪器故障或色谱柱耗材损坏的, 所有费用由课题组全权负责。
- 4.2.7. 仪器均为高压设备, 使用仪器需严格遵守用电安全规定, 严禁擅自更改电路或切断仪器电源等相关危险操作。
- 4.2.8. 实验室内的药品、试剂必须存放药品柜, 并做好使用登记。
- 4.2.9. 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, 使用时必须配戴护目镜、手套等, 做好个人防护。
- 4.2.10. 非常规实验测试须技术员同意并指导方可进行。实验数据须通过学校数据中心进行下载, 禁止将个人 U 盘、移动硬盘等易带入病毒的存储设备与各色质谱仪器工作站连接拷贝数据。
- 4.2.11. 垃圾、废液必须严格按标识进行分类, 禁止将锐器、玻璃丢弃在常规垃圾箱中。
- 4.2.12. 自主上机用户须在预约时间内须使用本人的账号登陆基理系统进行仪器使用; 使用结束应做好仪器使用登记, 如实记录仪器使用状态。

4.3. 气瓶使用规定

- 4.3.1. 首次使用实验室气瓶, 须经实验室技术员培训指导。
- 4.3.2. 请按实验室气瓶标识选择正确的气源。
- 4.3.3. 打开气瓶, 先确认管路已连接稳妥, 禁止未接气路或气路未连接稳妥, 开气瓶减压阀。

- 4.3.4. 更换气瓶, 首先确保减压阀关闭, 且管路中气压排空归零, 先用扳手拧松后, 再用手旋下管路。换气瓶, 确认气瓶螺纹吻合后, 先手紧气体管路, 再用扳手拧 1/8 圈左右。
- 4.3.5. 开气瓶或更换气瓶, 禁止站在减压阀出气口正前方。
- 4.3.6. 测试过程中, 请根据需要及时更换气瓶。使用者应根据气瓶使用情况, 变更气瓶使用牌状态“满瓶”“使用中”“空瓶”等。
- 4.3.7. 气瓶应保持正立并固定。

5. 质谱实验室仪器设备管理规范

5.1. 超临界流体制备色谱仪预约与使用

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。根据预约制度可登陆大仪网站即时预约机时, 包括周末; 寒暑假及国庆假期将另行通知。

自主上机

- ① 色谱谱仪器培训至少需要两小时, 申请培训前先与仪器负责人联系。
- ② 请在大仪网预约培训机时, 培训时请携带纸质版仪器培训申请表。
- ③ 技术员进行现场培训。
- ④ 培训后两周内, 用户可在技术员指导下用实际样品进行上机测试, 并按自主上机计费; 根据自身掌握情况, 用户需在两周内进行上机考核, 考核通过的用户即获得自主上机权限, 原则上一星期复考; 未考核或考核不通过的用户, 需重新接受培训。

5.2. 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。超临界流体制备色谱仪, 自主上机用户需根据预约制

度登陆大仪共享网站最少提前 30 分钟预约机时, 包括周末; 寒暑假及法定节假日请关注实验室实时通知。

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	测试内容
周一至周日	09:00 至 22:00	不限制	超临界样品制备

- (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。

5.3. 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) 了解仪器的基本原理及其应用的多学科背景知识;
- (2) 熟悉 SFC 组成及各部分的功能, 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 SFC 的软件系统, 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. 仪器操作

6.1 准备工作

6.1.1 仪器核对

- ① 检查有机流动相的成分和体积, 并根据需要进行更换;
- ② 检查液体补偿泵及质谱补偿溶剂成分与体积, 尤其是液体补偿泵溶剂体积;
- ③ 检查进样器洗针液体积, 并确认洗针液管路端口至少距离液面 **3.0 cm**
- ④ 核对CO₂钢瓶的气压6-7 MPa;
- ⑤ 核对N₂气流稳定;
- ⑥ 核对冷却循环器开启, 设置温度为3 °C
- ⑦ 按要求制备样品;
- ⑧ 自备回收管 (直径**25 mm**的试管, 高度为**100 mm**) 和进样管 (直径**13 mm**, 高度为**100 mm**的试管。)

6.1.2 制样要求

浓度10-50 mg/mL, 样品中不得含有磷酸盐、硫酸盐、盐酸盐等不挥发性盐类, 样

品中不得含有表面活性剂类（或去污剂）、强酸、强碱、三氟乙酸、水。使用溶剂：甲醇/异丙醇/乙醇混合溶剂，或根据色谱柱的使用条件选择合适溶剂，有限选择流动相。过0.22 μm滤膜；去水去盐。**一定要去水。**

手性化合物样品制备：溶剂中**不得含有丙酮、氯仿、二甲基甲酰胺（DMF）、二甲基亚砷、乙酸乙酯、二氯甲烷、四氢呋喃（THF）等破坏色谱柱填料的溶剂。**

禁止因素：控制好浓度；无盐，无无机酸碱，无特殊有机溶剂，无表面活性剂、离子液体、三苯基膦类化合物等。

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范围内，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、三氟乙酸等。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。

6.2 仪器组成及原理

6.2.1 仪器组成及作用

部件名称	作用
① CO ₂ 泵	提供超临界 CO ₂
② 液相泵 2545	提供改性剂（有机相）
③ 热交换器	供热，CO ₂ 加热到超临界温度，改性剂相类比
④ 流量计	检测 CO ₂ 注入流量
⑤ 柱温箱	容纳制备柱（最多六根）

⑥ 515 泵及其控制模块	为质谱检测器补充液流
⑦ ABPR 背压调节器	超临界压力控制
⑧ GLS 气相分离器	分离馏分气液成分
⑨ 2767 自动进样器/样品回收器	进样或样品回收部分
⑩ 2998 PDA 检测器	二极管阵列紫外检测器
⑪ QDa 质谱检测器	质谱检测器
⑫ SSI 馏分回收溶剂补偿器	CO ₂ 气化, 补充损失的液体

6.2.2. 仪器运行框架图

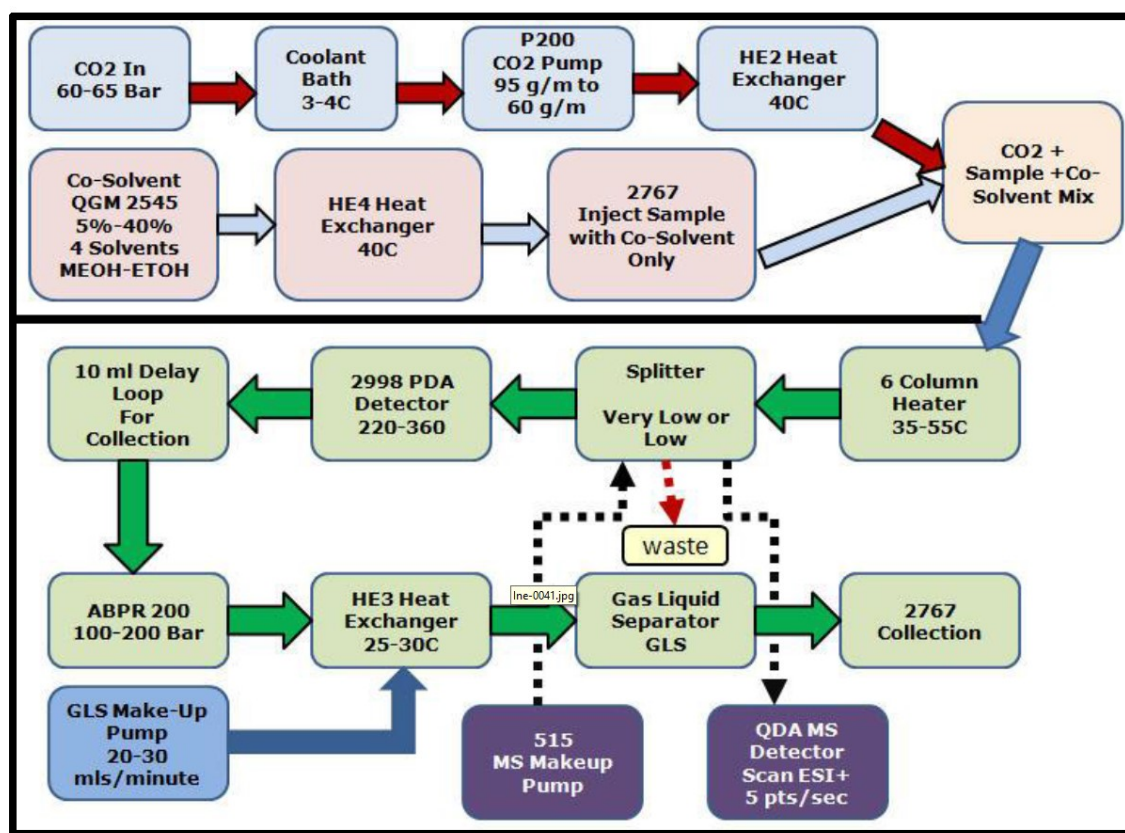


图 6-1

6.2.3 安全须知

(1) CO₂ 的危险性:

窒息性气体, 容器损漏时, 室内空气中的 CO₂ 过饱和, 可引起窒息死亡。

浓度>3%, 呼吸困难、头痛、眩晕、呕吐等;

>10%, 视力障碍、痉挛、呼吸加快、血压升高、意识丧失;

>35%, 中枢神经一直、昏睡、痉挛、窒息。

超临界 CO₂: 可引起皮肤或眼睛严重的低温灼烧。

(2) 夜间实验须 PI 同意, 两人实验, 其中一人远离仪器。

分子科学公共实验平台

6.3 开机顺序



6.3.1 总则: 仪器主要部件为待机状态, 正常测试, 冷却循环器(3°C)-开 515 泵-开软件-检查溶液-灌注-开 515 及 SSI 面板 Run 按钮-开气瓶-仪器准备-载入方法-平衡仪器-运行仪器

6.3.2 515 泵开机方法: 先开 515 泵, 并将 mode 调为 Ren 后, 再开泵控制模块;



开机: 先开515泵,并将mode调为Ren后, 再开泵控制模块

515 仪器参数: purge 5 ml/min; 系统高压 (HPL) 6000psi, 低压限 (LPL) 不设

工作参数: 流速 0.5-1 ml/min; 压力: 1600 psi

图 6-2

6.3.3 冷却循环器开机

冷却剂: 乙二醇: 水=1:1; 长时间使用, 更换冷却剂: 开前面板-拧螺丝-排出溶液

开机: 1-开机; 按回车键制冷; 长按回车键-OFF; 0-关机

6.4 运行仪器

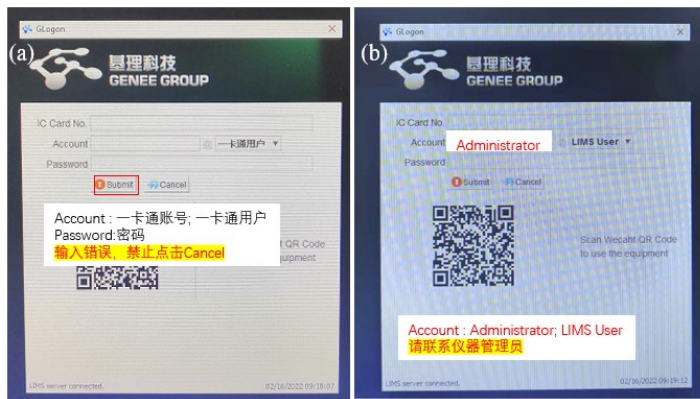
***基理系统登陆

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。



6.4.1 软件及项目新建

Step1. 点击电脑桌面Masslynx图标(图6-3(a)), 进入Masslynx操作界面(图6-3(b)), 当前显示为上一次仪器实验的测试序列(图6-3(b)蓝色方框显示)。

➤ **注:** 测试结束, 通常不关闭Masslynx软件操作界面, 主窗口及子菜单操作窗口会显示在电脑桌面下方(图6-3蓝色方框显示), 直接点击Masslynx图标即可。

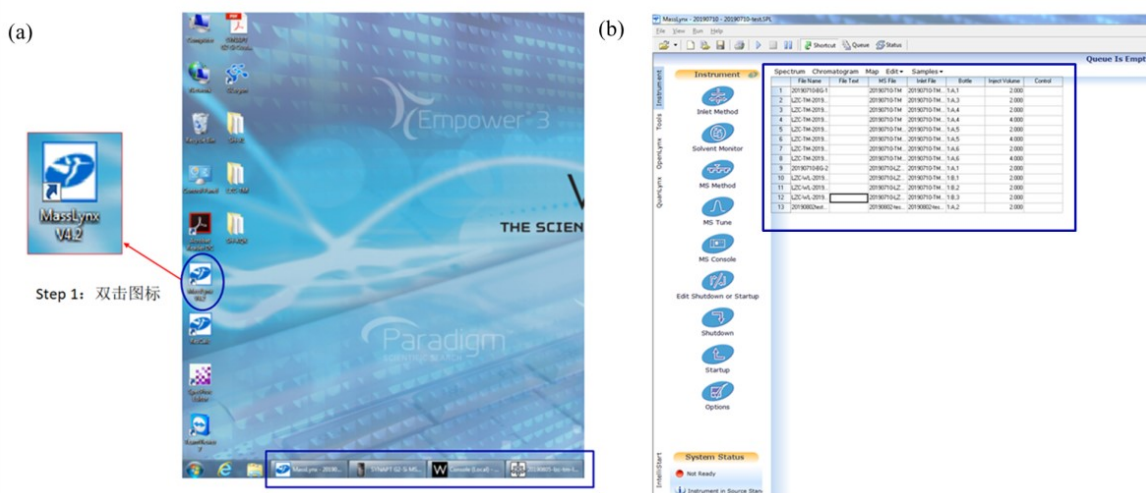


图 6-3

Step2. 点击 File - Project wizard(图 6-4, 蓝绿色方框), 弹出对话框(图 6-4(b)), 点击 Yes 进入项目新建向导(图 6-5(a))。

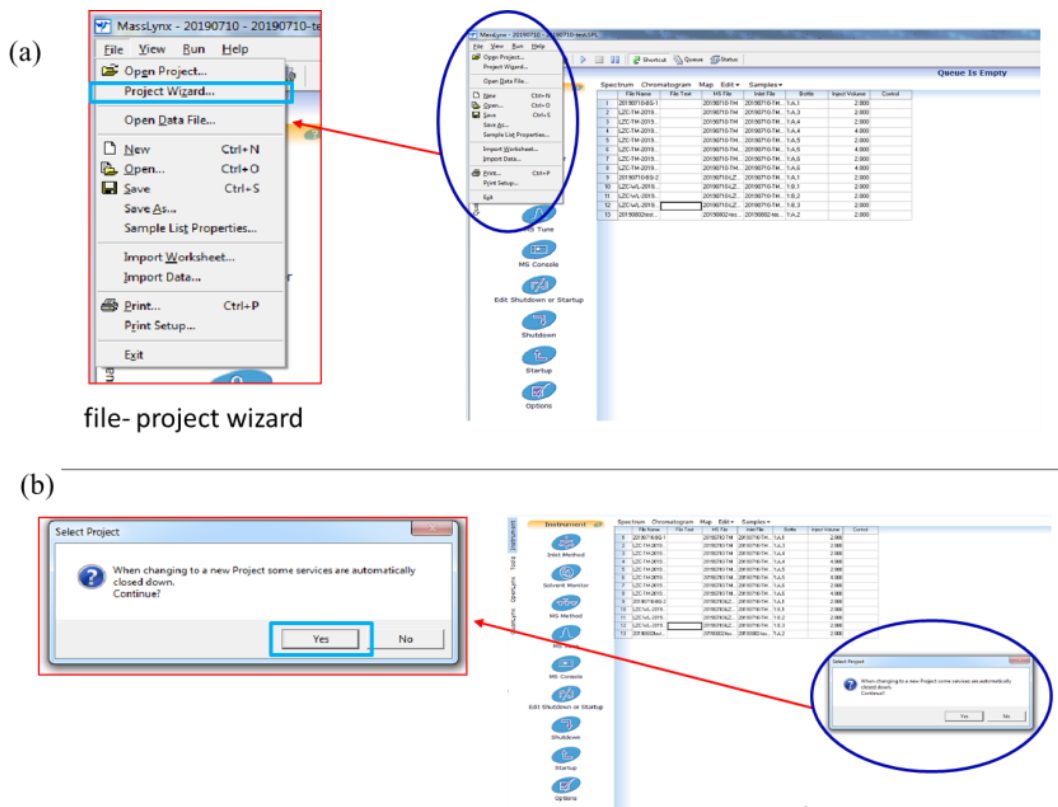


图 6-4

Step3. 项目新建向导。如图6-5, 通过Browse选择正确的项目路径(location), 输入项目名称(Project name), 点击Next, 弹出对话框(图6-5 (b)), 勾选**Create using current project as template**选项, 点击Finish, 弹出显示序列文件无效提醒窗口(图6-6), 点击OK进行确认。至此完成新建项目(图6-7)。

➤ **注:** 本实验室所有文件按课题组进行分类和命名。每一个测试的课题组都会有一个项目文件存在于 PI folder 路径下。如果没有课题组项目, 请以 PI 全名进行新建, 如张三, 则输入 Zhang San, 点击 Next。

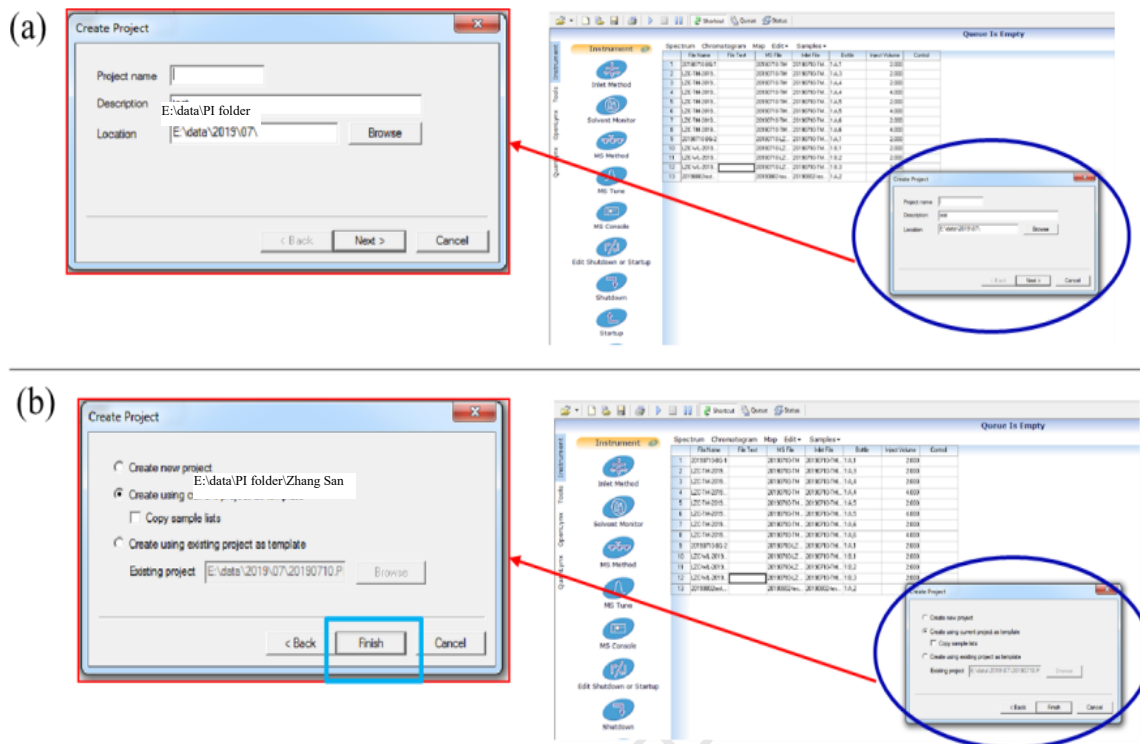


图 6-5

Step4. 新建项目完成后, 弹出....spl 无效的的软件提醒(图 6-6), 点击 OK。随后软件将显示新建项目及其全新的进样序列, 如图 6-7 所示。依次输入或新建方法: FileName/File Text/MS File/Inlet File/Bottle/Inject Volume/Fraction File/Fraction Trigger1/Wavelength A/Mass A 等信息。

_50 Gradient, 5min, 4 Mix, ES+ Cont	ESI+ 5Hz 15V Cont 5m 500 deg	INSTALL 4MIX QDa Prep 100q SFC	5,1:2	500.000
_50 Gradient, 5min, 4 Mix, ES+ Cont	ESI+ 5Hz 15V Cont 5m 500 deg	INSTALL 4MIX QDa Prep 100q SFC	5,1:2	500.000
_50 Gradient, 5min, 4 Mix, ES+ Cont	ESI+ 5Hz 15V Cont 5m 500 deg	INSTALL 4MIX QDa Prep 100q SFC	5,1:2	500.000
				0.000
_50 Gradient, 5min, 4 Mix, ES+ Cont	ESI+ 5Hz 15V 1_5V Cont 5m	INSTALL 4MIX QDa Prep 100q SFC	5,1:1	1000.000
_50 Gradient, 5min, 4 Mix, ES+ Cont	ESI+ 5Hz 15V 1_5V Cont 5m	INSTALL 4MIX QDa Prep 100q SFC	5,1:1	1000.000
_50 Gradient, 5min, 4 Mix, ES+ Cont	ESI+ 5Hz 15V 1_5V Cont 5m	INSTALL 4MIX QDa Prep 100q SFC	5,1:1	1000.000
_50 Gradient, 5min, 4 Mix, ES+ Cont	ESI+ 5Hz 15V 1_5V Cont 5m	INSTALL 4MIX QDa Prep 100q SFC	5,1:3	1000.000
_50 Gradient, 5min, 4 Mix, ES+ Cont	ESI+ 5Hz 15V 1_5V Cont 5m	INSTALL 4MIX QDa Prep 100q SFC	5,1:3	1000.000
_50 Gradient, 5min, 4 Mix, ES+ Cont	ESI+ 5Hz 15V 1_5V Cont 5m	INSTALL 4MIX QDa Prep 100q SFC	5,1:3	1000.000
_50 Gradient, 5min, 4 Mix, ES				0.000
_50 Gradient, 5min, 4 Mix, ES				0.000
_50 Gradient, 5min, 4 Mix, ES				0.000
_50 Gradient, 5min, 4 Mix, ES				0.000
_50 Gradient, 5min, 4 Mix, ES				0.000
_50 Gradient, 5min, 4 Mix, ES				0.000
_50 Gradient, 5min, 4 Mix, ES				0.000
_50 Gradient, 5min, 4 Mix, ES- SIR	ESI- 5Hz 15V SIR 5m	INSTALL 4MIX QDa Prep 100q SFC	5,1:3	1000.000
_50 Gradient, 5min, 4 Mix, ES- SIR	ESI- 5Hz 15V SIR 5m	INSTALL 4MIX QDa Prep 100q SFC	5,1:3	1000.000
_50 Gradient, 5min, 4 Mix, ES- SIR	ESI- 5Hz 15V SIR 5m	INSTALL 4MIX QDa Prep 100q SFC	5,1:3	1000.000
_50 Gradient, 5min, 4 Mix, ES- SIR	ESI- 5Hz 15V SIR 5m	INSTALL 4MIX QDa Prep 100q SFC	5,1:3	1000.000
_50 Gradient, 5min, 4 Mix, ES- SIR	ESI- 5Hz 15V SIR 5m	INSTALL 4MIX QDa Prep 100q SFC	5,1:3	1000.000
				0.000
ollect Fluorescein	ESI+ 5Hz 15V Cont 5m	INSTALL 4MIX QDa Prep 100q SFC	5,1:2	500.000 Qda Perf Tes

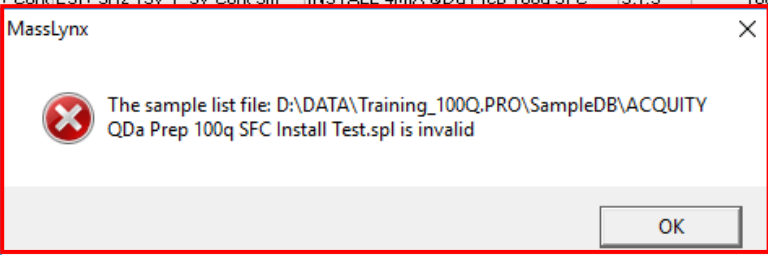


图 6-6

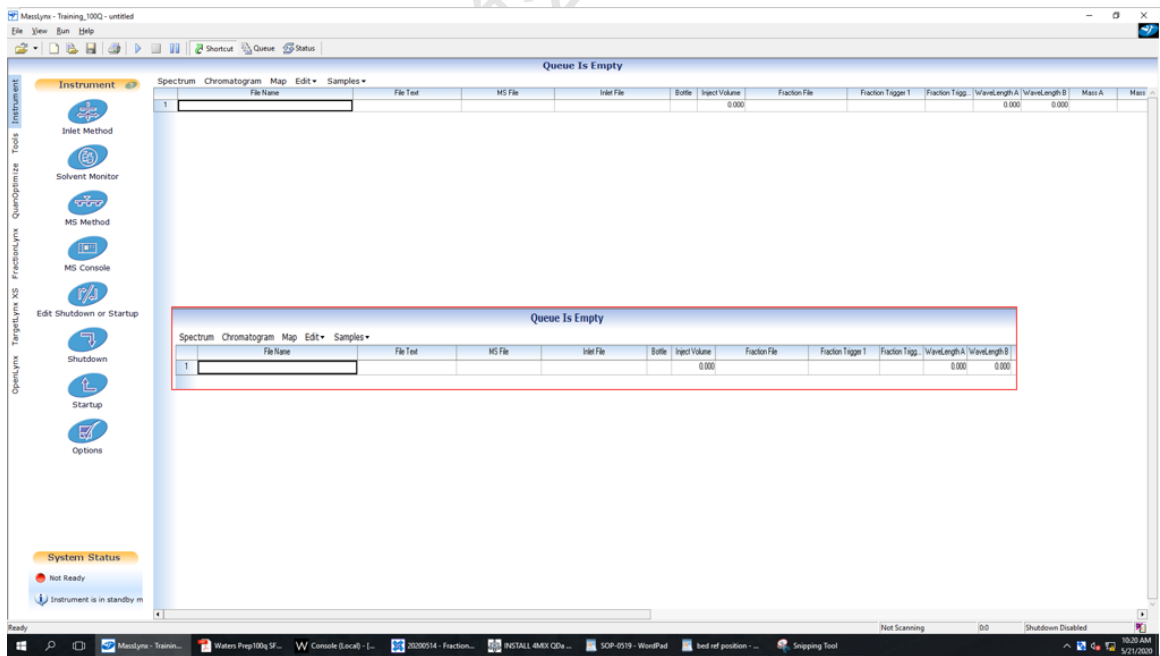


图 6-7

6.4.2 仪器准备工作

Step1. 仪器控制台: MassLynx 主界面-Shortcut-Instrument-MS console, 点击 MS console, 弹出仪器控制台界面;

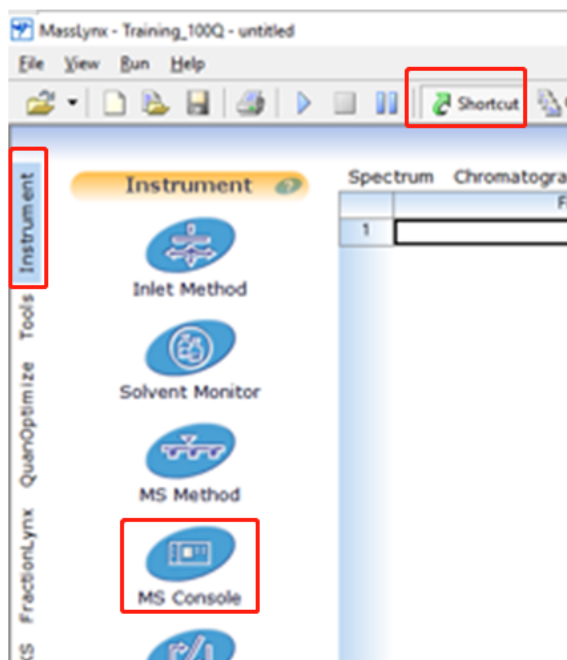


图 6-8

Step 2. 515 泵、SSI 泵手动灌注

利用注射器手动灌注515 泵。

- 515泵溶液通常为0.1%甲酸的甲醇或乙腈溶液（进口HPLC及以上级别）；
- 515泵，前面板-Edit-Enter-Prime;
- 逆时针旋转阀门，手动灌柱至无气泡；
- 顺时针关闭阀门，515泵前面板- Menu-Mode-Edit-上下切换至Rem- Enter。



图 6-9

利用注射器SSI 馏分回收溶剂补偿器

- 逆时针旋转阀门，手动灌柱至无气泡；
- 顺时针关闭阀门。



图 6-10

Step 3. MS 加电压: Console 界面-选中左侧 QDa Detector-点击右侧 Operate

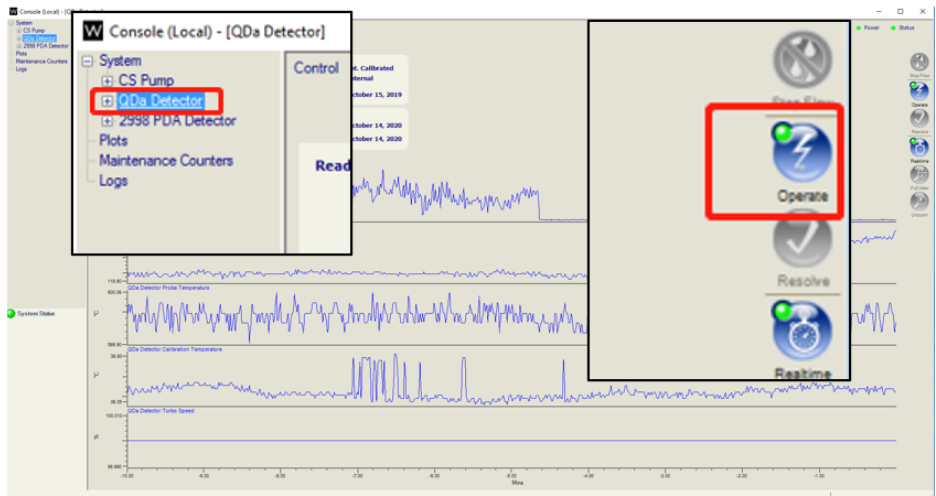


图 6-11

Step 4. 液相泵灌注: Console 界面-选中左侧 CS Pump-Control-Prime solvents
注: 长期不用, 灌注5 min, 通常灌注2 min;

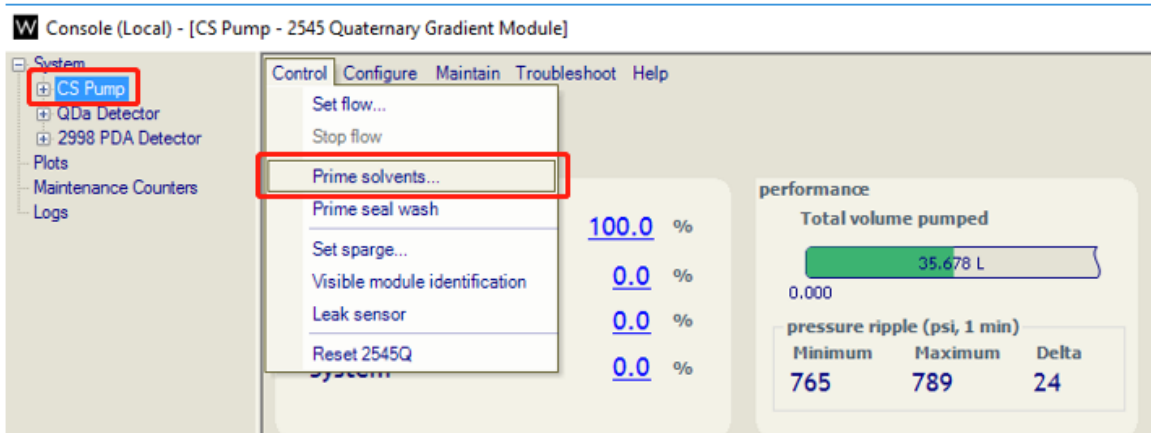


图 6-12

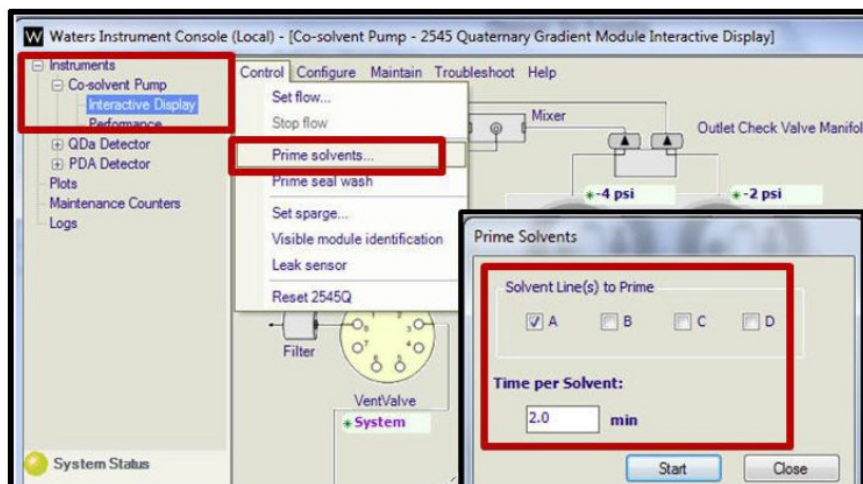


图 6-13

6.4.3 输入文件名 (File Name)

操作: 在 Masslynx 操作界面主页, 选中 File name 下方空格, 双击至显示光标, 即可输入文件名。命名原则: **导师姓名首字母-个人首字母-日期-样品编号-测试序号**
例如: 张三老师李四的样品, 测试时间为 2017 年 6 月 15 日, 样品编号为 pep, 进行第一针测试, 那么文件命设为: ZS_LS_20170615_pep_01; 进行二次测试, 则增加另一序列, 文件名为 ZS_LS_20170615_pep_02, 以此类推。

注: 文件名不可重复, 每个序列, 只能进行一次测试, 同一样品, 进行两次测试, 需重新添加序列。

添加序列: 选中序列-右键-add, 可增加若干实验序列, 默认添加的序列, File name, Bottle 的编号, 以数字结尾的, 系统自动按数字或样品瓶序列进行

6.4.4 输入 File text

可根据需要进行编辑或区分, 比如样品信息、质谱模式等等。

6.4.5 新建 MS File 文件

MassLynx 软件, 必须载入质谱文件, 时间与方法时间一致, 样品序列才可运行。

操作:

- (1) 选中 MS File 空格-右键-Edit, 弹出 Experiment setup 对话框 (图 6-14)
- (2) 选择 SIR 模式 (单个离子扫描) 或者 MS 模式 (全质谱扫描 1250Da)
- (3) 输入 Total Run time: 与 SFC 分离方法保持一致;

(4) 双击选择的 SIR 或 MS 栏, 进行相关参数键入

- **MS 模式(图 6-15):** Start/End m/z 范围(正常范围控制在 100-1000Da); Start/End Time 扫描时间 (与液相运行时间一致); Mode: ES+或者 ES-, Data: Continuum; Cone voltage. 点击 OK
- **SIR 模式(图 6-16):** Mode: ES+或者 ES-; Start/End Time 扫描时间 (与液相运行时间一致); Channels: 输入目标物名称、离子质荷比、Cone 电压。多个目标物, 点击 Add 进行增加。最后点击 OK 确认。

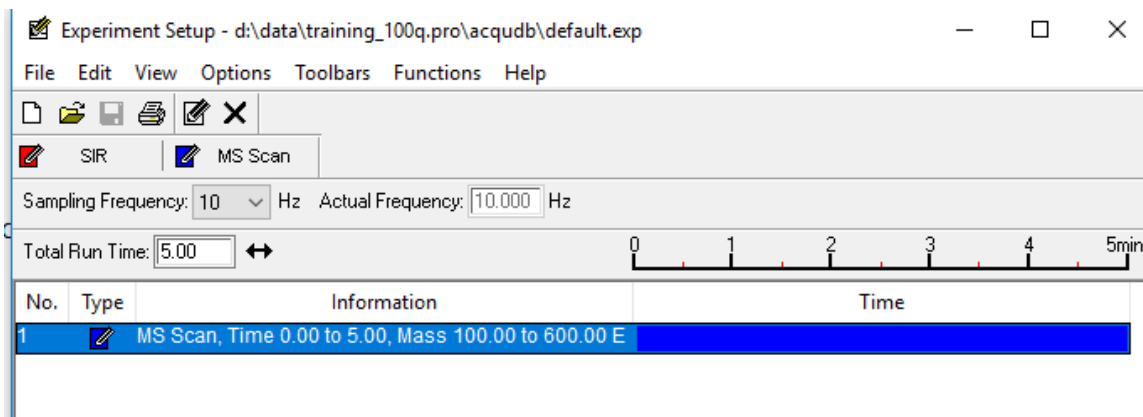


图 6-14

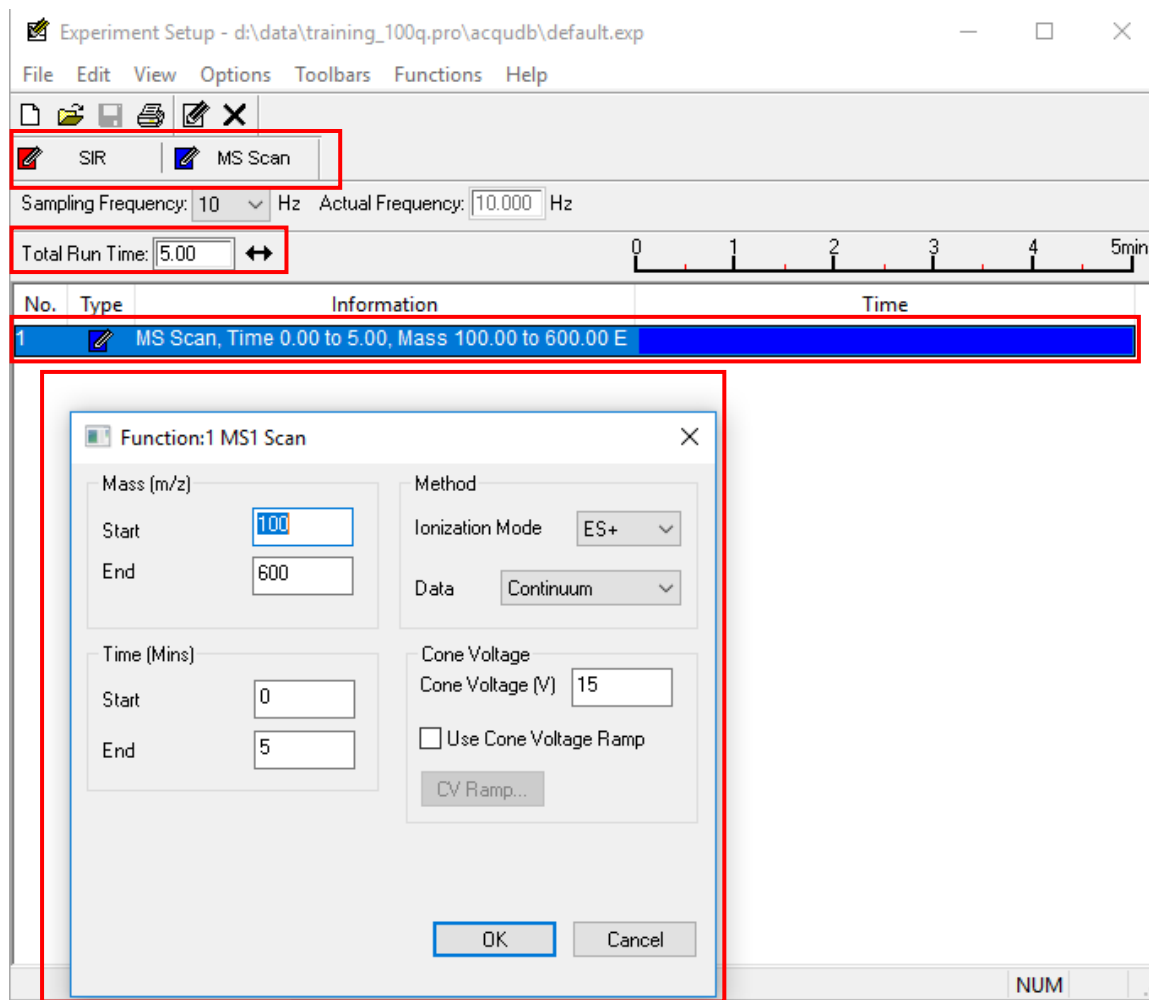


图 6-15

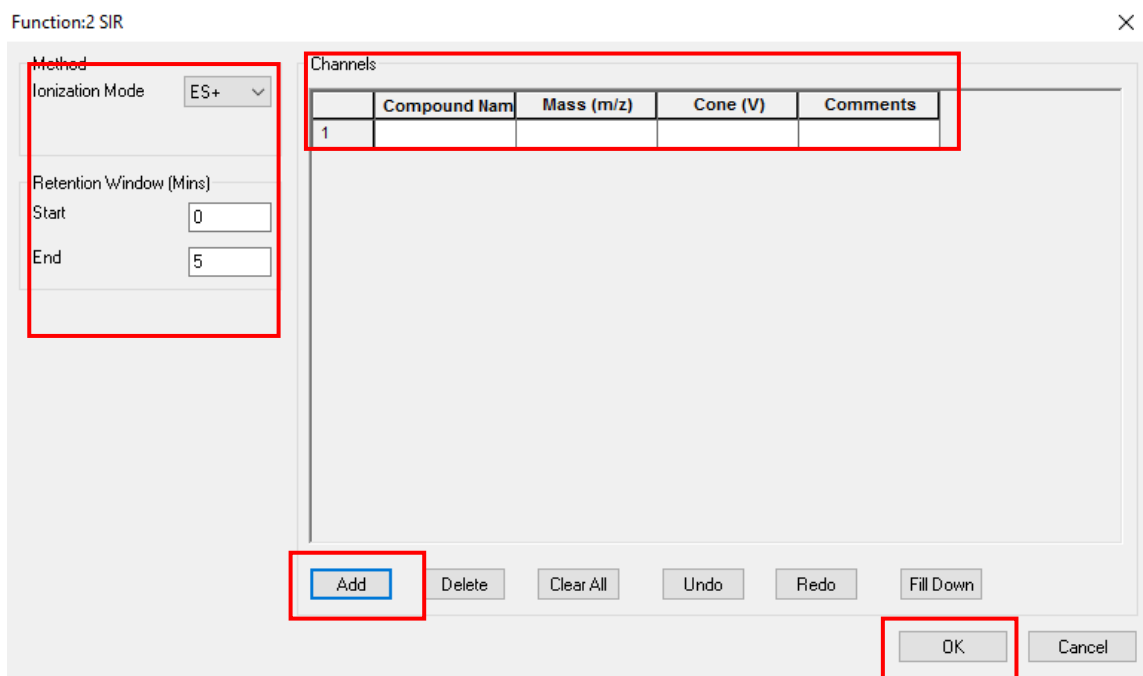


图 6-16

(5) 其他参数设置:

Options-Temperature Settings/ESI Capillary voltages

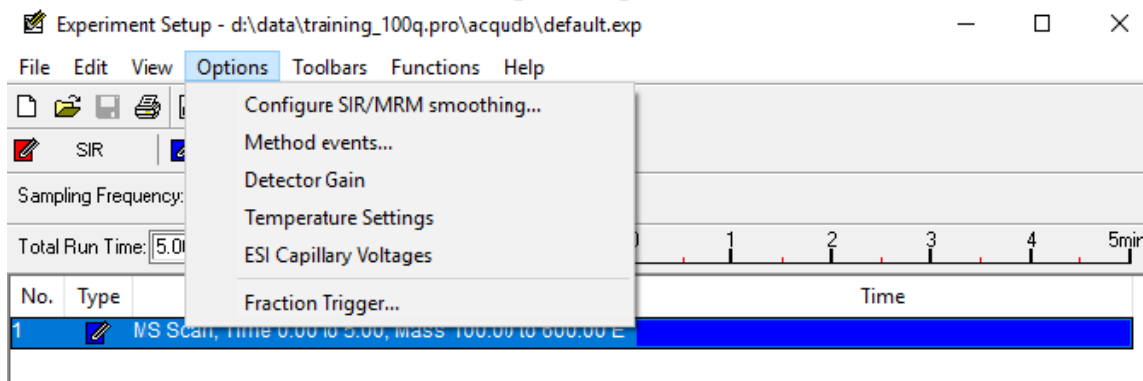


图 6-17

(6) 保存方法

File-save.文件命名方式: 用户_样品名_日期_离子模式

如 Lisi_pep_20200806_Pos_MS 或 Lisi_pep_20200806_Pos_SIR

6.4.6 新建 Inlet File 文件 (即 SFC 洗脱文件)

Step1. 选中 Inlet File 的小框, 右键-Edit, 弹出 Inlet Method 方法编辑窗口

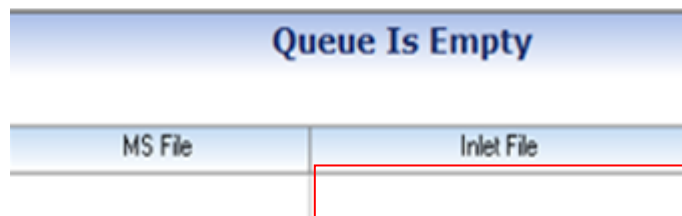


图 6-18

Step2. Inlet File设置

- 在Inlet Method方法编辑窗口（图6-19），点击Inlet选项，弹出Modify Instrument Method窗口

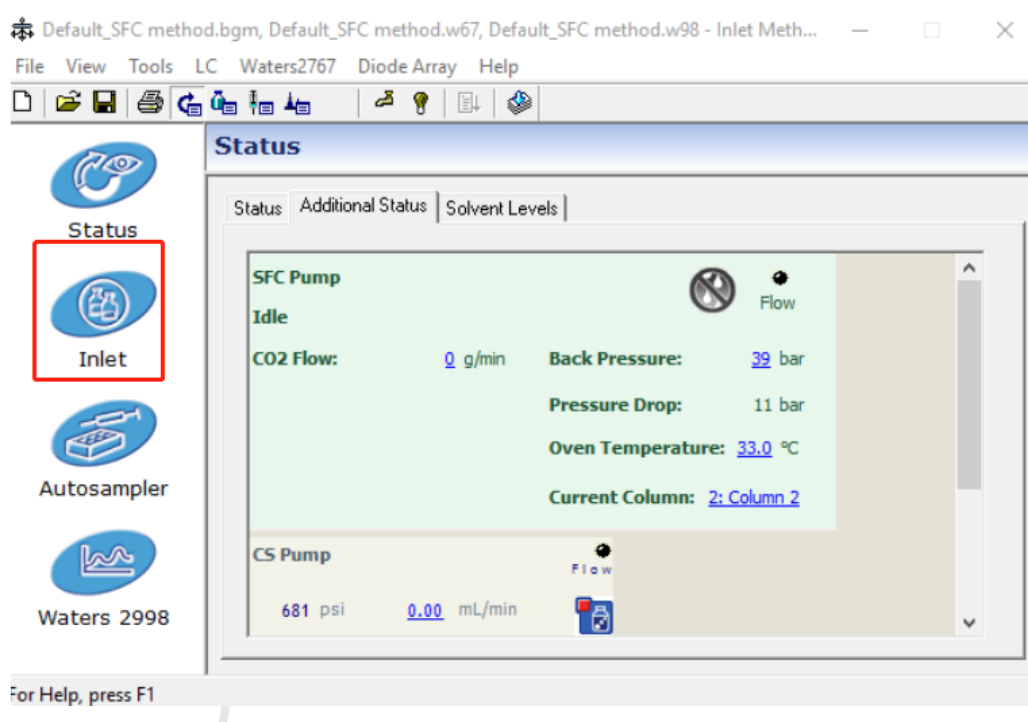


图 6-19

- 图6-20，在Chromatography pump栏，设置液相运行总时间Run time
- 洗脱模式可以选择等梯度洗脱（Run Isocratic）或梯度洗脱（Run Gradient）
 - ① 等梯度洗脱（Run Isocratic）：选择Run Isocratic，设置Total Flow, Co-Solvent Percent (<40%), Minimum GLS Flow Rate (25-30 ml/min)以及MS Makeup Flow Rate (0.6-1ml/min) (图6-20)；点击OK

注： Minimum GLS Flow Rate; 25-30 ml/min; MS makeup flow rate: 0.6-1.0 ml/min

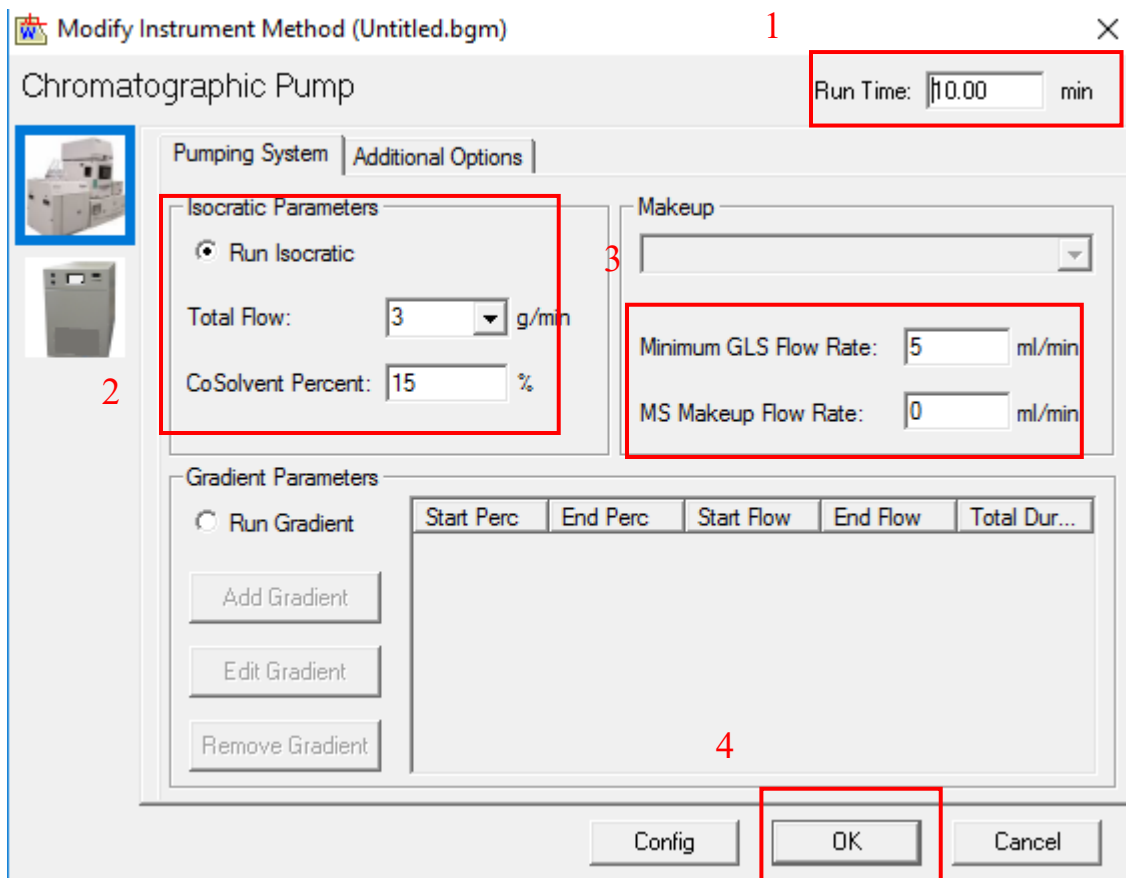


图6-20

② 梯度洗脱 (Run Gradient): 选择 Run Gradient, 点击 Add Gradient, 弹出 Pumping Gradient Entry 对话框 (图6-22); 输入 Start/End Flow, Start/End Prec, Total Gradient Duration, 点击 OK, 根据需要进行点击 Add Gradient 增加洗脱程序。设置完成点击 OK。

注: Start Flow 与 End Flow 通常一致, Start Prec. 与 End Prec. 一致, 有机相百分比需控制在 40% 以内, Total Gradient Duration 时间为单个梯度的持续时间。

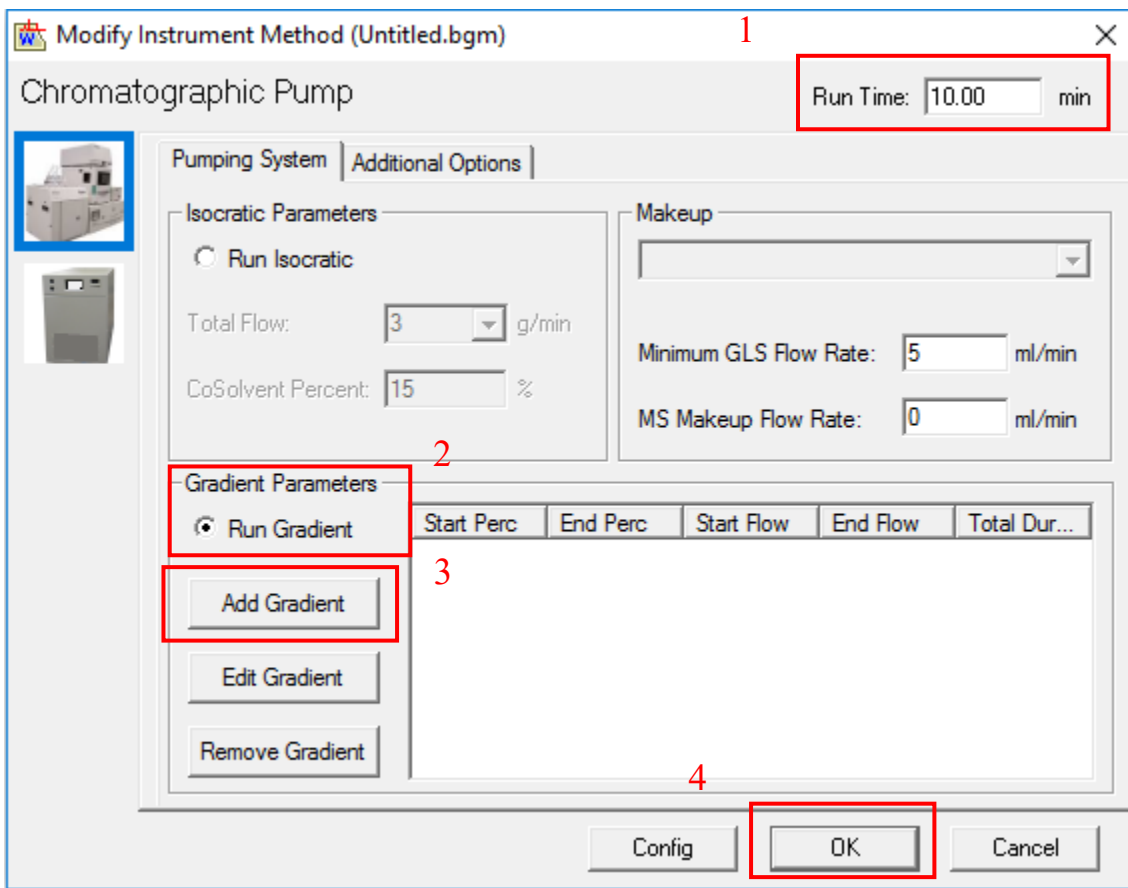


图6-21

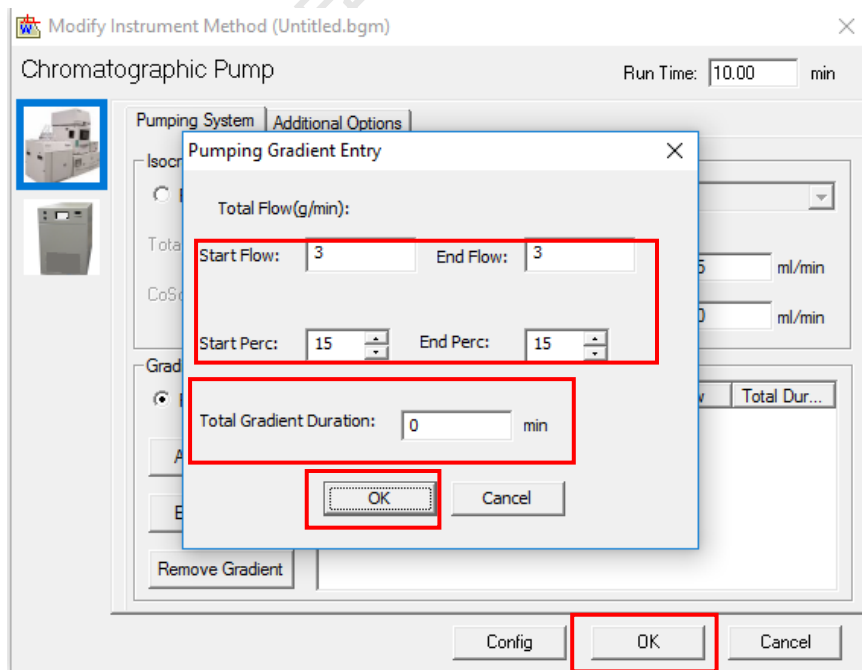


图6-22

- 设置CS Pump: 输入Run Time (与Chromatographic Pump设置的梯度时间一致)、Flow无需设置: 选择A/B/C/D溶剂 (100%), 点击OK(图6-23)。

注: 有机溶剂主要作为添加剂, 增加流动相极性, 通常选择甲醇、乙醇、异丙醇。SFC切勿使用水, 其他溶剂需根据色谱柱是耐受性和洗脱需要综合考虑。

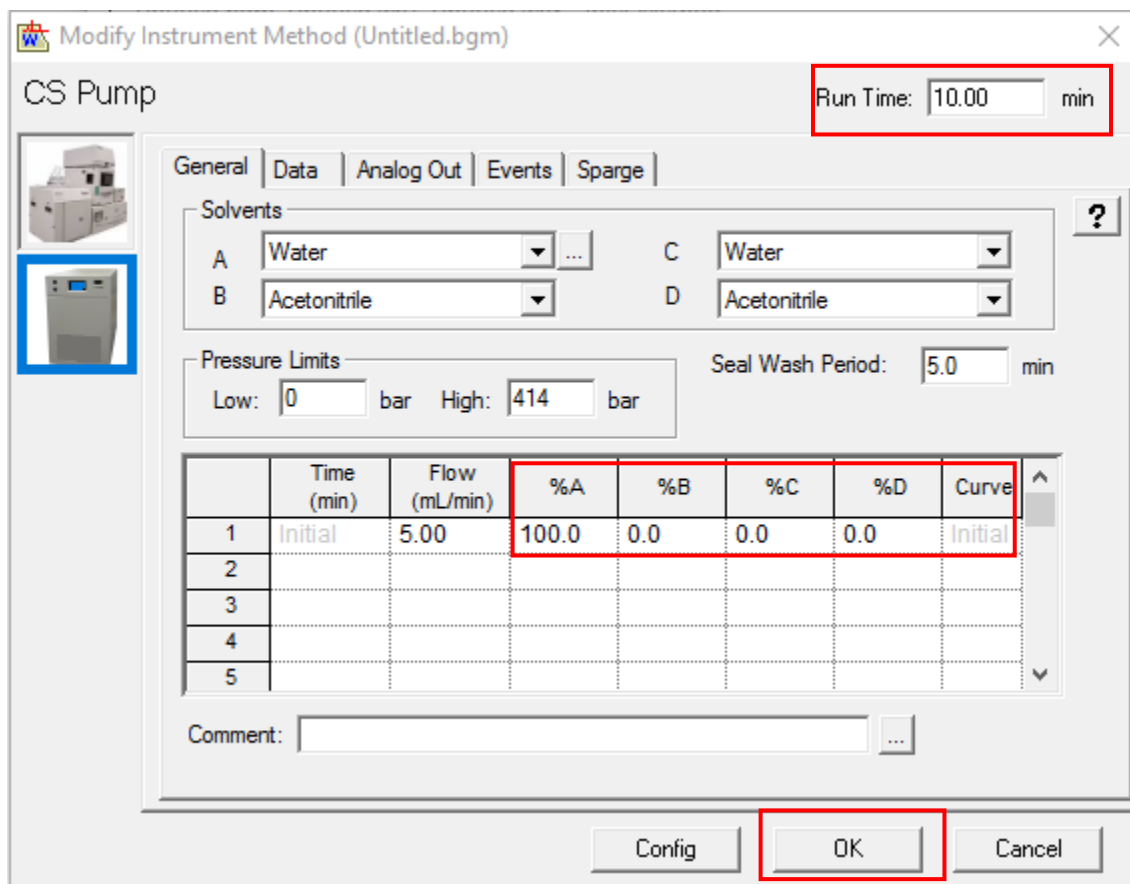


图6-23

Step3. Autosampler 设置

- 在Inlet Method方法编辑窗口, 点击Autosampler选项, 弹出Waters 2767 Autosampler 窗口 (图6-25)
- 设置 Injecton Parameters: 选择Right 1000-除去Center in loop-Partial Loop-Aspiration/Dispense Speed 20-40, 且一致; Air Gaps: Pre-Sample & Post-Sample 3ul.



图6-24

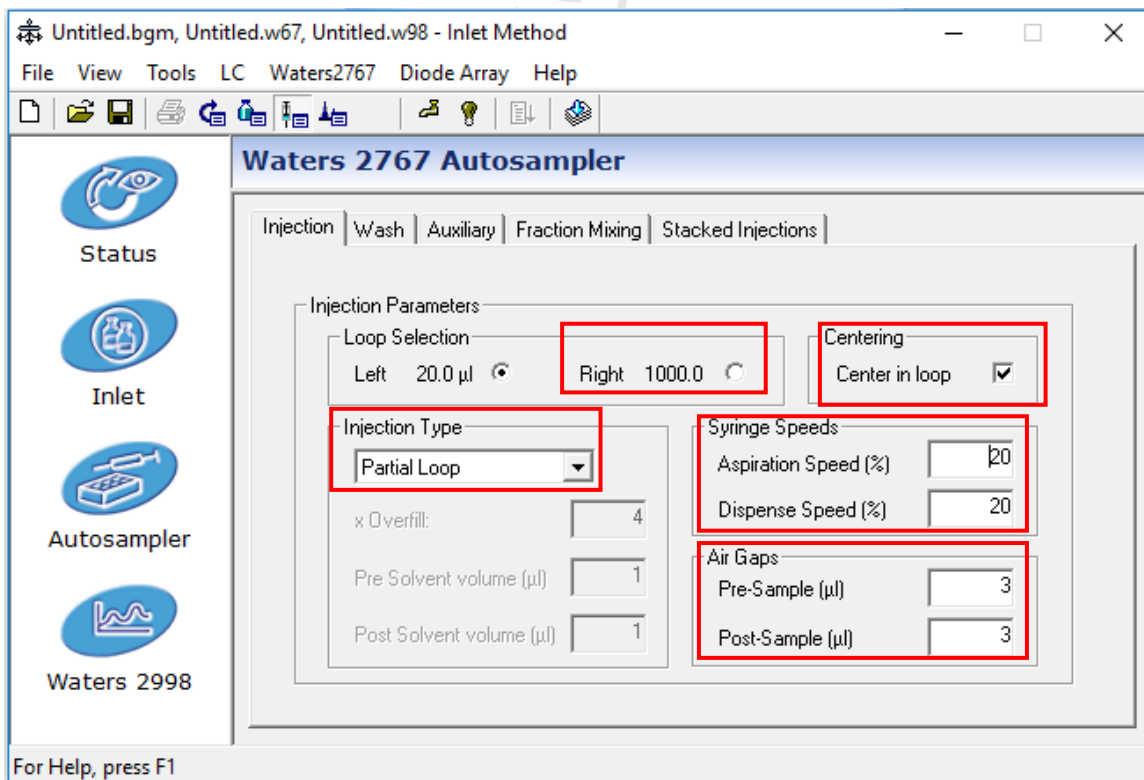


图6-25

Step4. Waters 2998设置

- 在Inlet Method方法编辑窗口，点击Waters 2998选项，弹出Modify 2998 PDA Detector Instrument Method窗口（图6-26）
- 设置Run Time (与Chromatographic Pump设置的梯度时间一致);
- General栏：选择Lamp On,设置波长范围（190 nm-800 nm），Resolution :4.8 nm
- 2D Channels: 最多设置8个单波长通道，波长范围需在190-800 nm范围内。

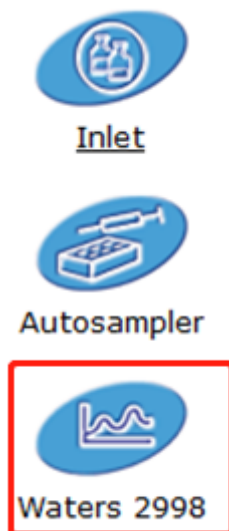


图6-26

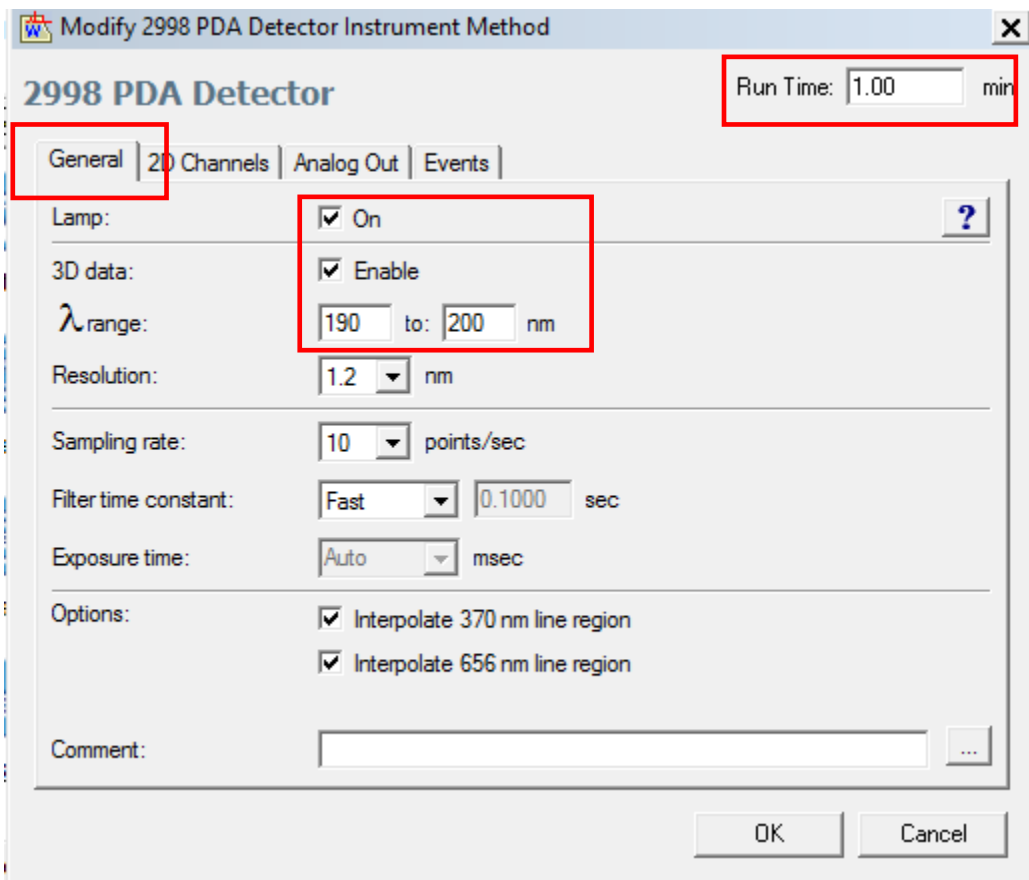


图6-27

接下来请看一个典型的方法显示：图6-28及图6-29分别显示Chromatographic Pump及CS Pump设置。

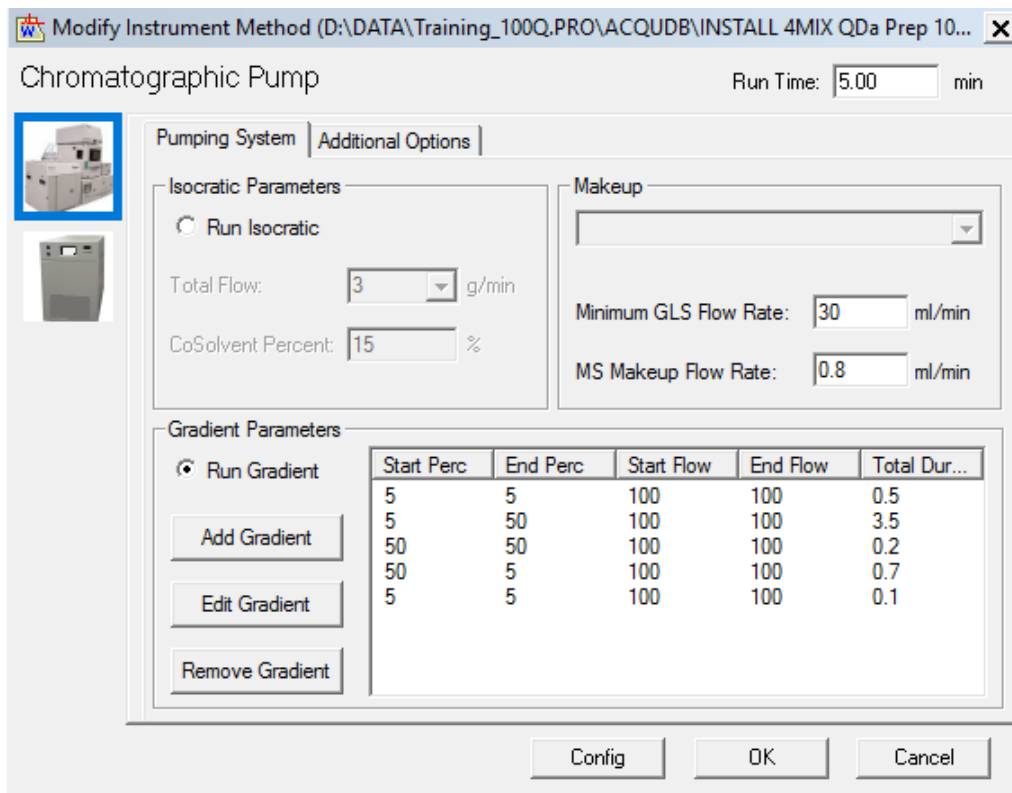


图6-28

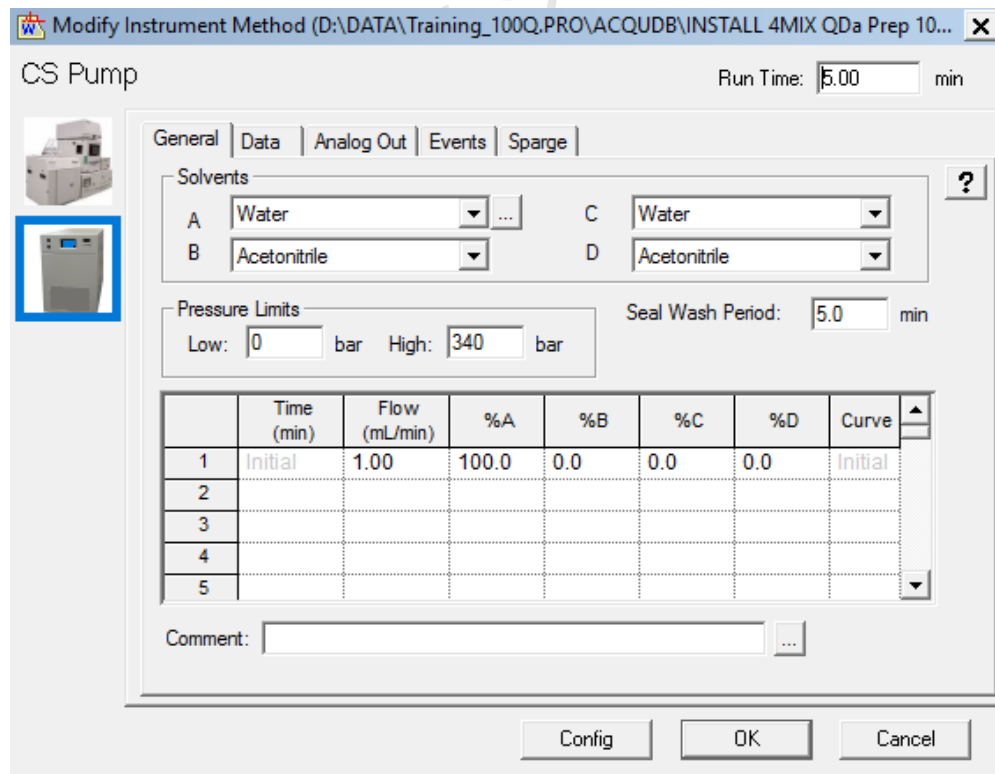


图6-29

6.4.7 设置 Bottle 位置

➤ 认识回收/进样盘类型

在Inlet Method页面，点击Waters 2766-Bey Layout...，可以查看回收盘和进样盘类型，当前Bay 类型为4 25mm collect 1 13mm inject，体积为100mm（参见图6-31和图6-32）

解释：2767自动进样上含4个回收盘和1个进样盘，编号自左向右分别为1, 2, 3, 4, 5;其中回收盘适合放入直径25mm的试管，高度为100mm；进样盘适合放入13mm, 高度为100mm的试管。

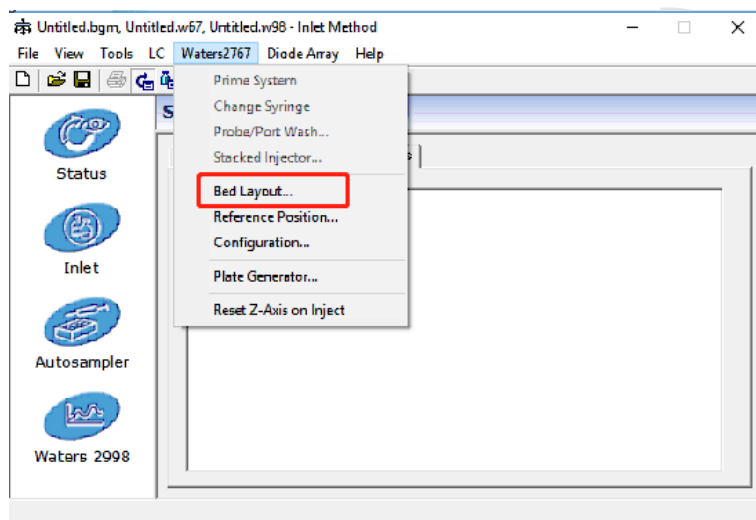


图6-30

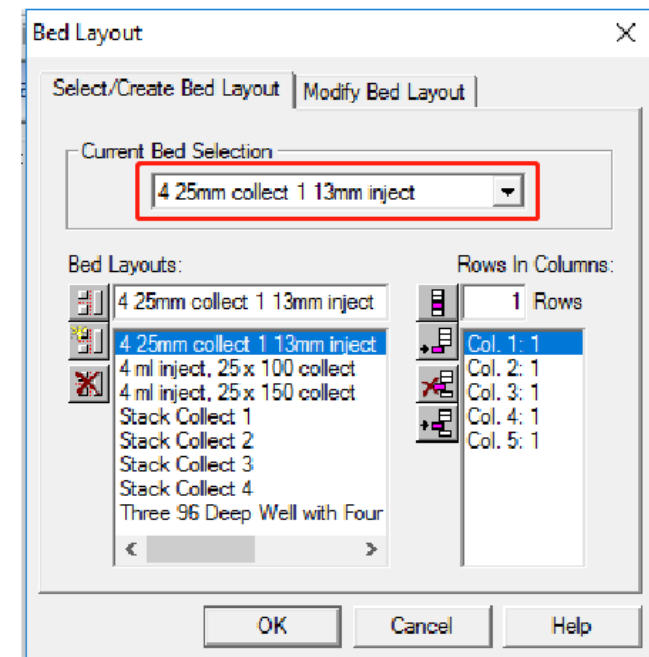


图6-31

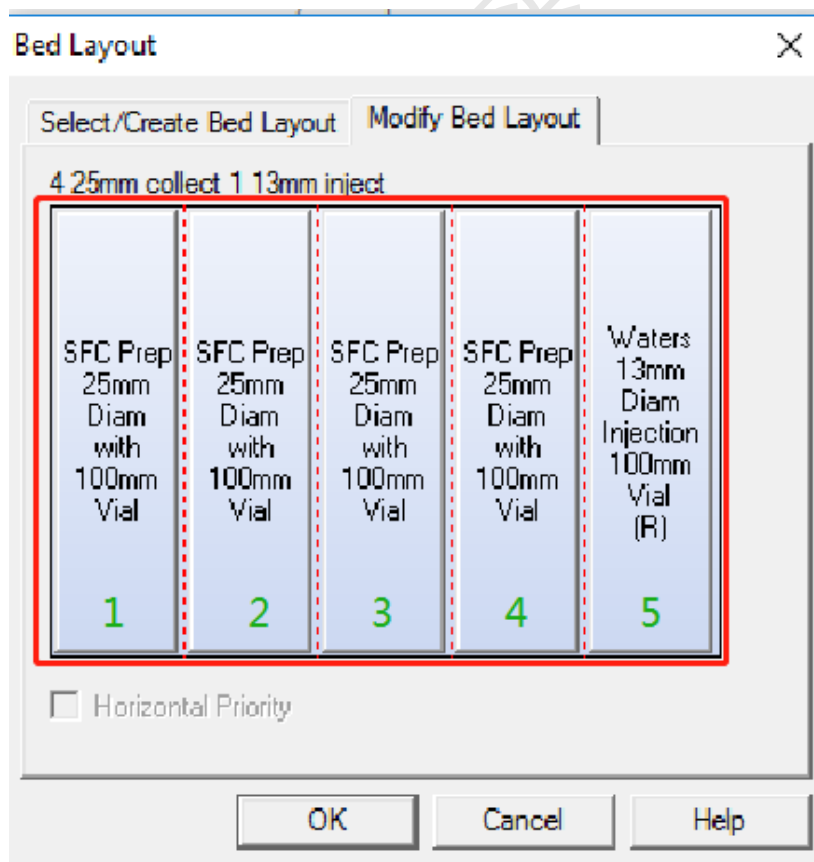
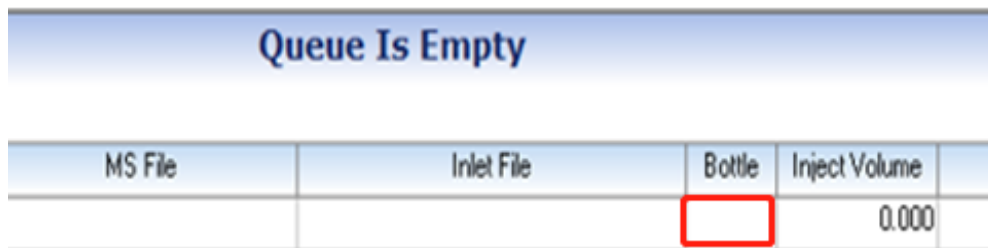


图6-32

- 设置Bottle位置（进样位置）：选中空白进样序列，Bottle下小框-右键-Bay Layout, 弹出AutoSample Bay Layout选择窗口



Queue Is Empty			
MS File	Inlet File	Bottle	Inject Volume
			0.000

图6-32

- 在图-33中，①确认盘类型4 25mm collect 1 13mm inject②选中Plate: 5,1 (代表5号盘，第1行，本进样器有且只有1行样品盘，位置为5，所有Plate: 5, 1是固定不变的) ③选中进样盘中样品管位置（S型位置排序）④点击右上角insert按钮⑤关闭小窗。

例如：样品在15vial位置，则Bottle位置为 5,1:15,前面5,1永远不变。也可以根据需要快速手动输入。

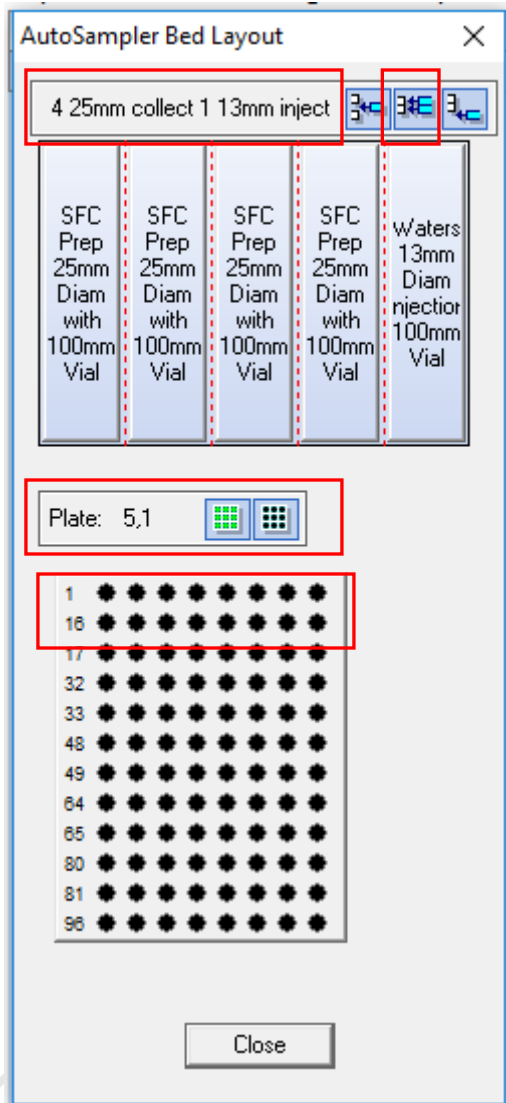


图6-33

6.4.8 设置 Inject volume 进样体积:

请根据色谱分离质量合理选择。一般方法摸索阶段, 建议20-30 ul。制备样品逐渐增大进样量, 进样环最大体积为1.0 ml.

6.4.9 设置 Fraction File (重要,样品回收的触发条件)

Step1: 进入方式: 选中空白进样序列 Fraction File 下小框 - 右键 - Edit, 弹出 FractionLynx Method 窗口

Queue Is Empty				
MS File	Inlet File	Bottle	Inject Volume	Fraction File
			0.000	

图6-34

Step2 设置General栏，Fraction Collection:On; Peak Type: preparative; Minimum Fraction Width: 5s; Span:默认值（图6-35）

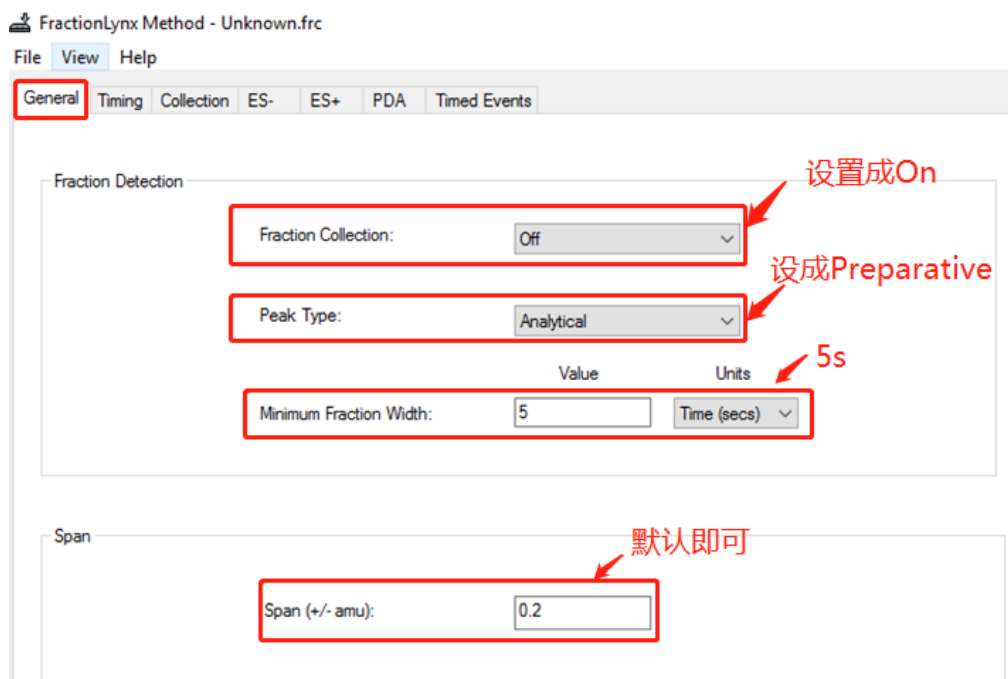


图6-35

Step3 设置Timing:

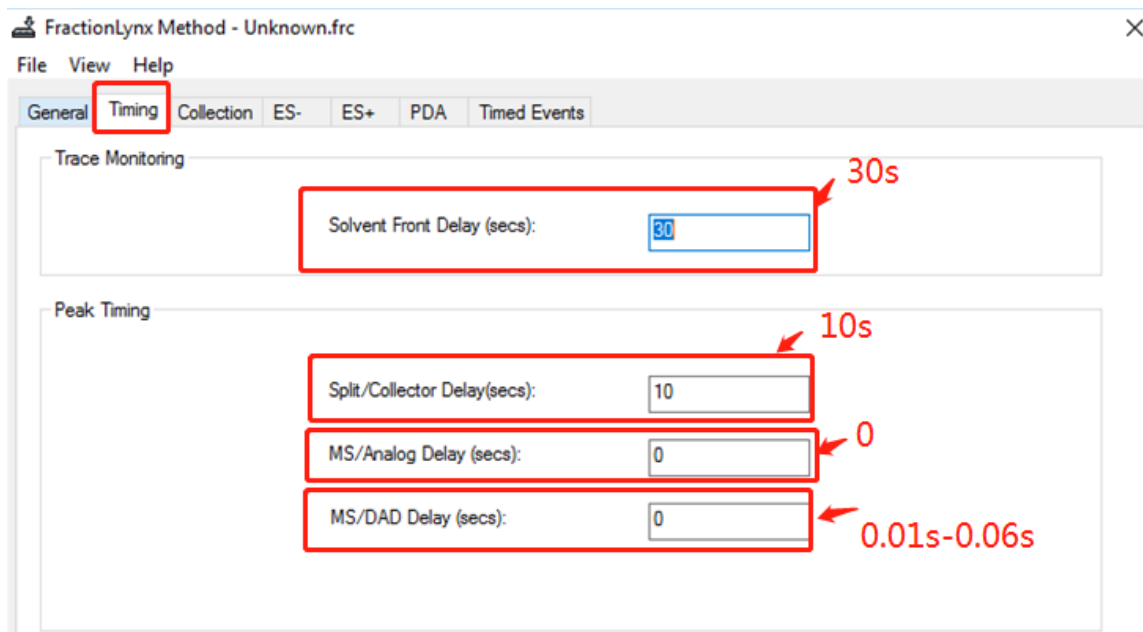


图6-36

Step4 设置Collection:

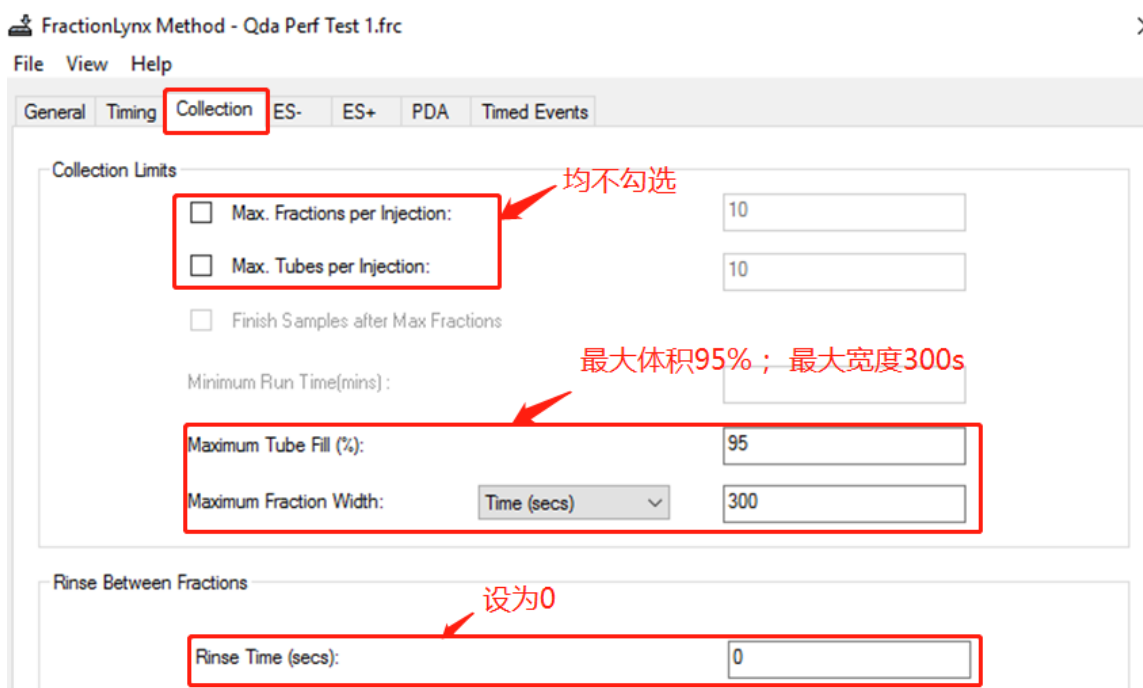


图6-37

Step5 设置ES-

注：对于QDa检测器，质谱通常使用正离子模式，负离子可以不设置。如果设置，请参考如下步骤：



图6-38

质谱Min. Intensity Threshold (MIT)设置方法:

- 在MassLynx主界面, 选中运行的样品行, 点击Chromatogram, 默认显示全离子流色谱图 (TIC), 点击目标产物出现的色谱峰位置 (如2.56min), 弹出保留时间在2.56min的质谱图这 (图6-40);

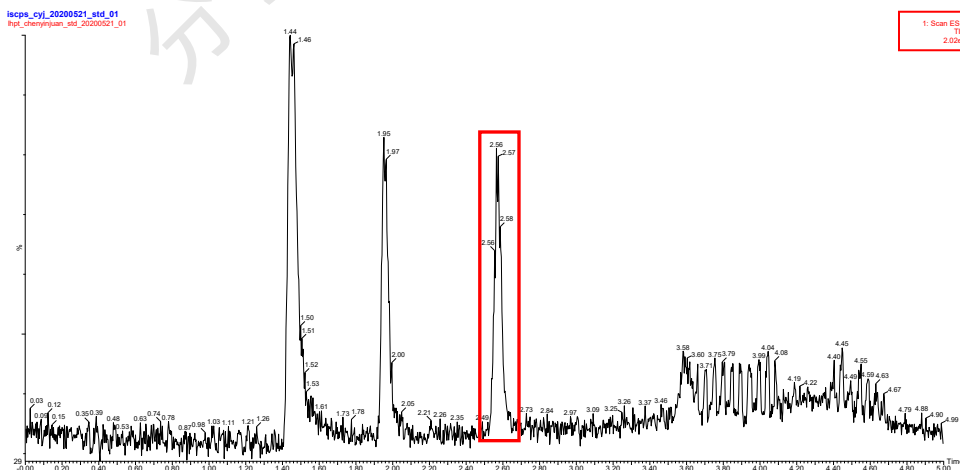


图6-39

- 在图6-40中, 双击目标离子的质谱峰 (如 $m/z=579$), 出现 $m/z=579$ 离子出现的提取离子色谱图 (图6-41);

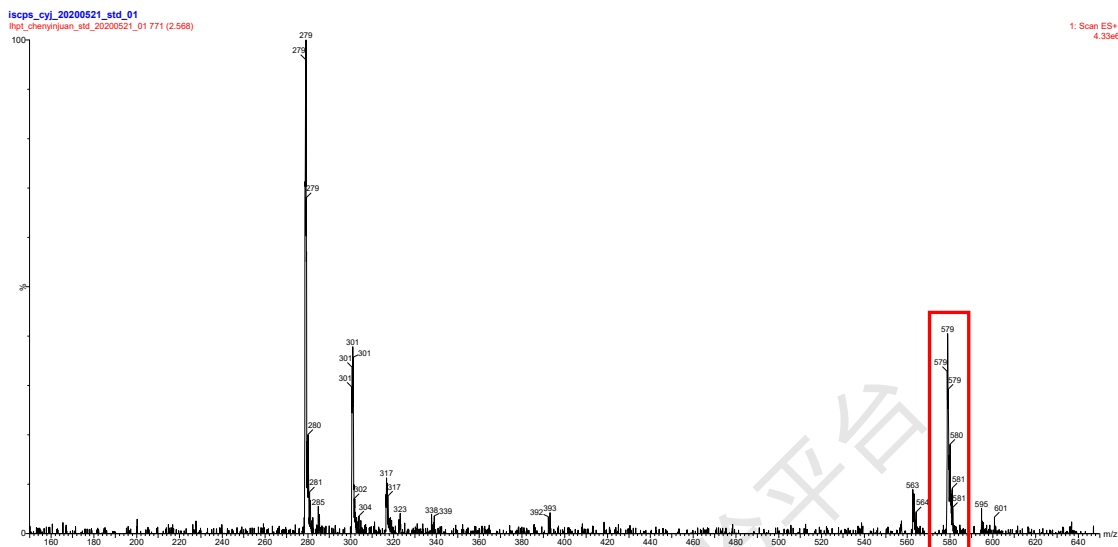


图6-40

- 在图6-41中, $m/z=579$ 离子出现的提取离子色谱图, 右上角显示目标离子的强度值。

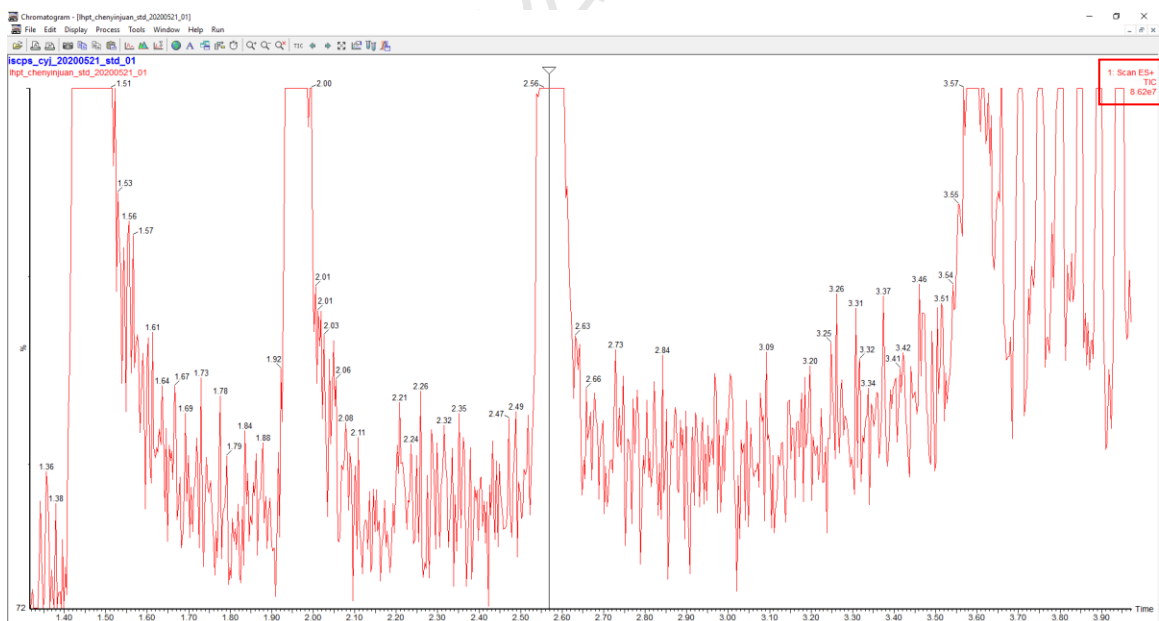


图6-41

Step6 设置ES+: 参见图6-42, MIT最低阈值设定方法, 参加Step4图39-41。

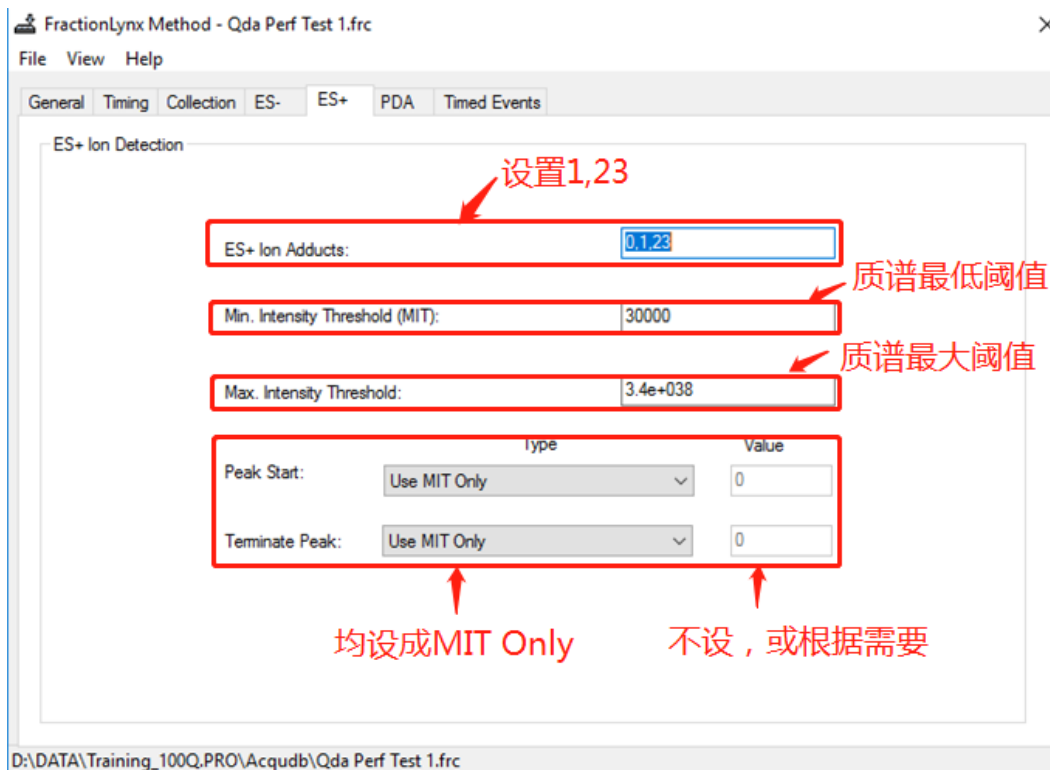


图6-42

Step7 设置PDA: 参见图6-43, MIT最低阈值设定方法, 选择PDA通道, 参加Step4图39-41。

PDA: $e^{-2}=10000$

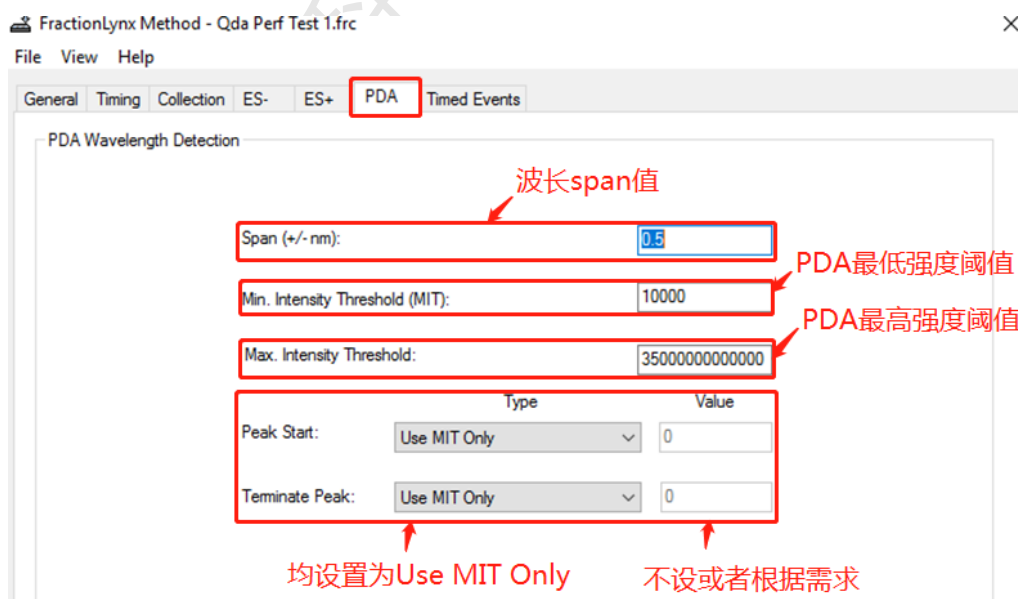


图6-43

Step8 设置Timed Events (时间事件)

用于在不同时间, 不同检测通道, 按不局限于Step4-6的MIT强度进行回收触发。

- 点击添加按钮;
- 设置时间、Event(Disable Collect/Enable Collect/PDA MIT/MS MIT)、Parameter (强度参数)
- 勾选Use external events table

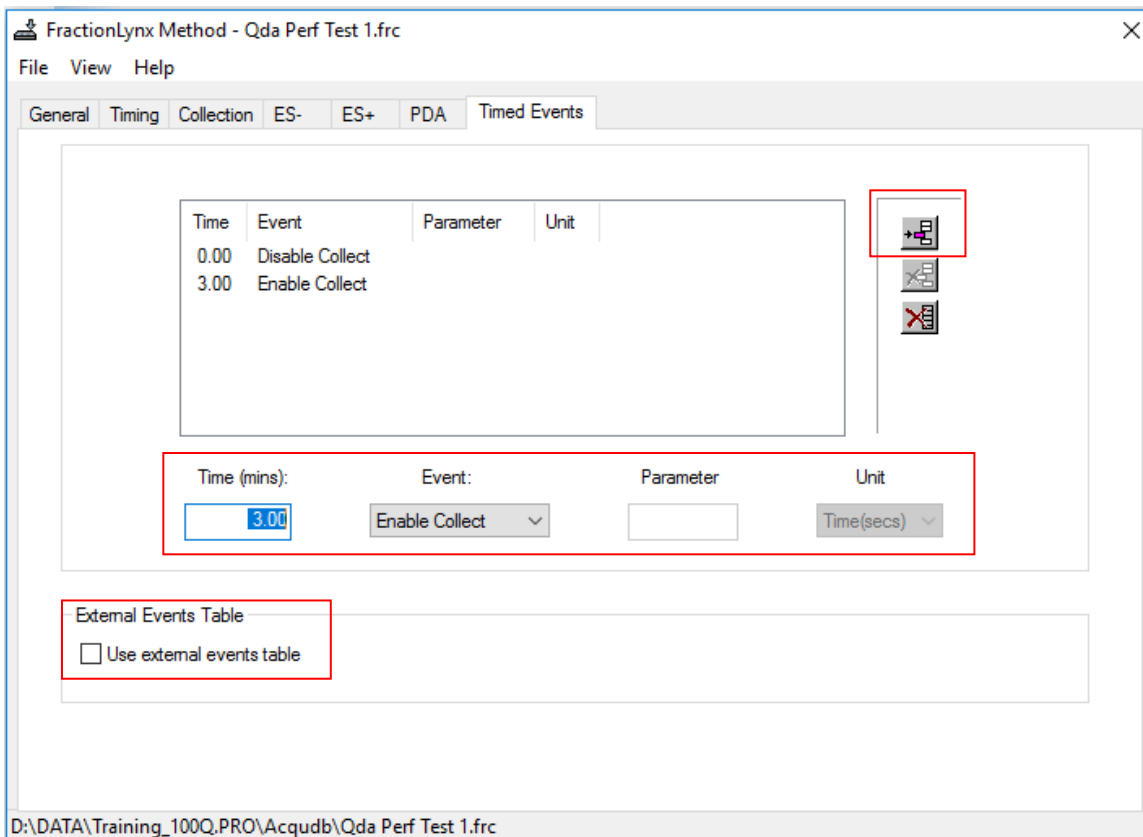


图6-44

Step9 保存Fraction File文件

File-Save.文件命名方式: 用户_样品名_日期_FF1

如 Lisi_pep_20200806_FF1;重新编辑方法保存, 则命名为 Lisi_pep_20200806_FF2, 类推。

6.4.10 设置 Fraction Trigger 1

Step1. 选中Fraction Trigger1的小框, 右键-Browse, 弹出Fraction Triggers编辑窗口

Queue Is Empty						
MS File	Inlet File	Bottle	Inject Volume	Fraction File	Fraction Trigger 1	Fraction Trigg..
			0.000			

图6-45

Step2. Mass触发: 默认为Mass, 选择Mass TIC或Mass A-R等, 通常设置Mass A-R, 即按目标化合物的质荷比进行设置。结合6.4.8 Fraction File设置, ES+, 设置1,23, 如果目标化合物分子量为270, 则Mass A: 271 (+H⁺), Mass B: 293 (+Na⁺), 一种样品有不同化合物, 则依次进行设置即可;

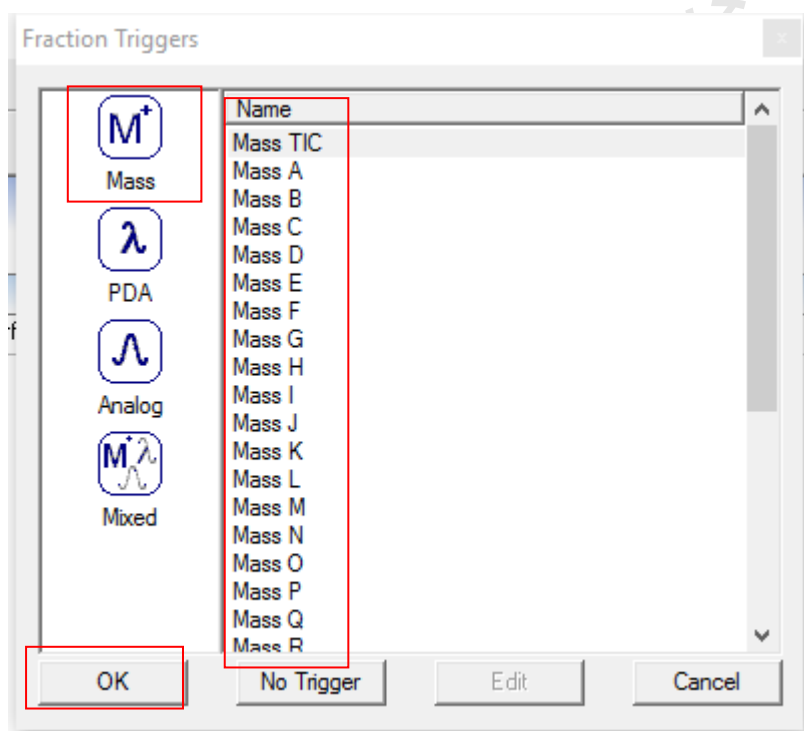


图6-46

Step3. PDA触发: 默认为Wavelength A, 选择PDA TIC或Wavelength A-J等, 通常设置Wavelength A-J, 即单波长影响进行设置。

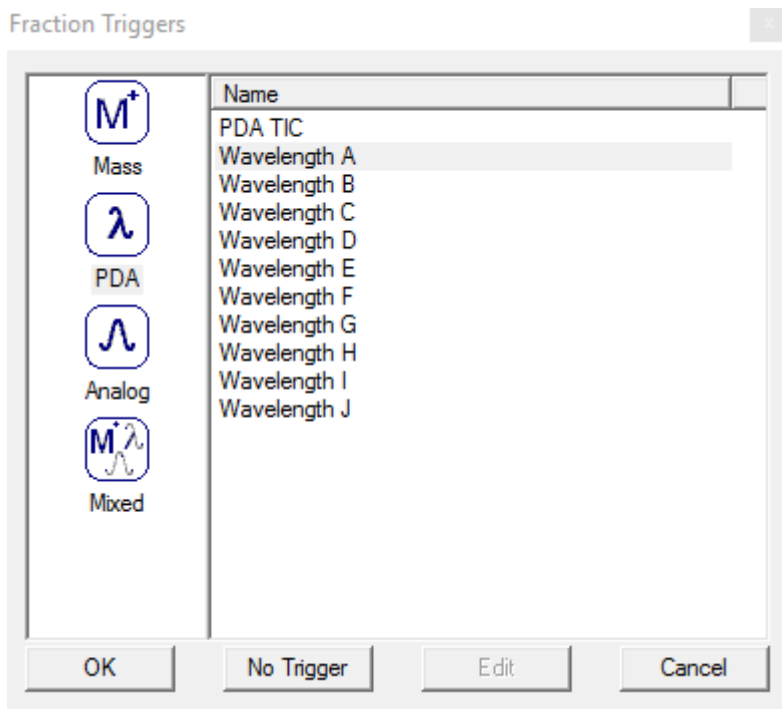


图6-47

Step4. Analog触发：不使用。

Step5.Mixed触发：

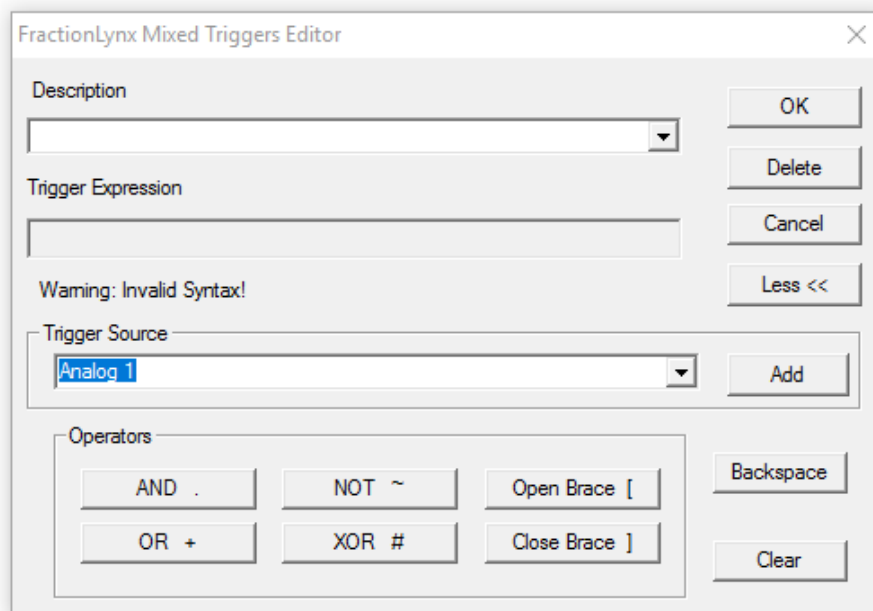


图6-48

6.4.11 仪器状态或其他方法参数查看

- SFC Status Panel: 同6.4.6, 选中Inlet File小框-右键-Edit,弹出Inlet Method方法编辑窗口;
- Additional Status: 右键-SFC Status Panel 并点击SFC Status Panel (图6-49),弹出6-50SFC状态栏;

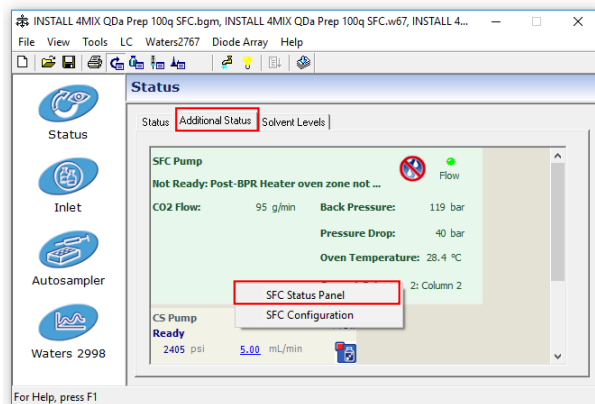


图6-49

- 在图6-50中, 可查看CO2流速, ABPR压力, 及系统是否Ready

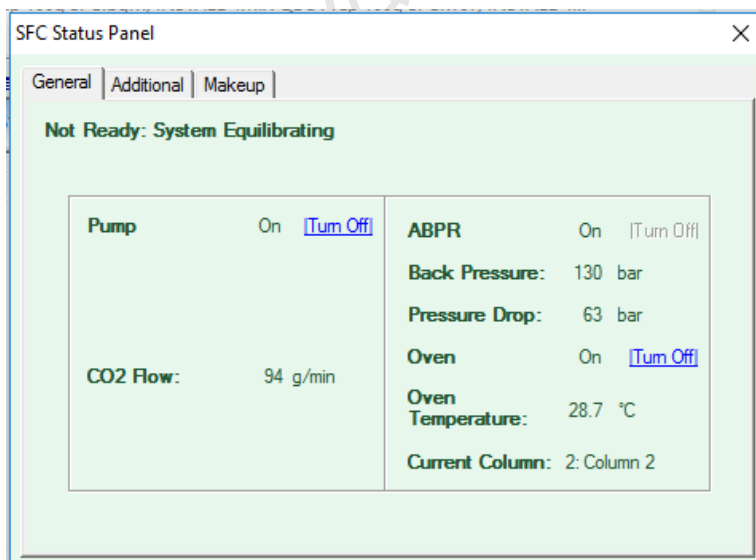


图6-50

6.4.12 系统背压、色谱柱及柱温设置

- 类似于6.4.5, 在Modify Instrument Method-Additional Options, 可根据色谱柱使用要求, 设置System Back Pressure (系统背压), System Back Pressure Alarm (系统

报警背压), Column(色谱柱), Column Oven Temperature (柱温箱温度) 等

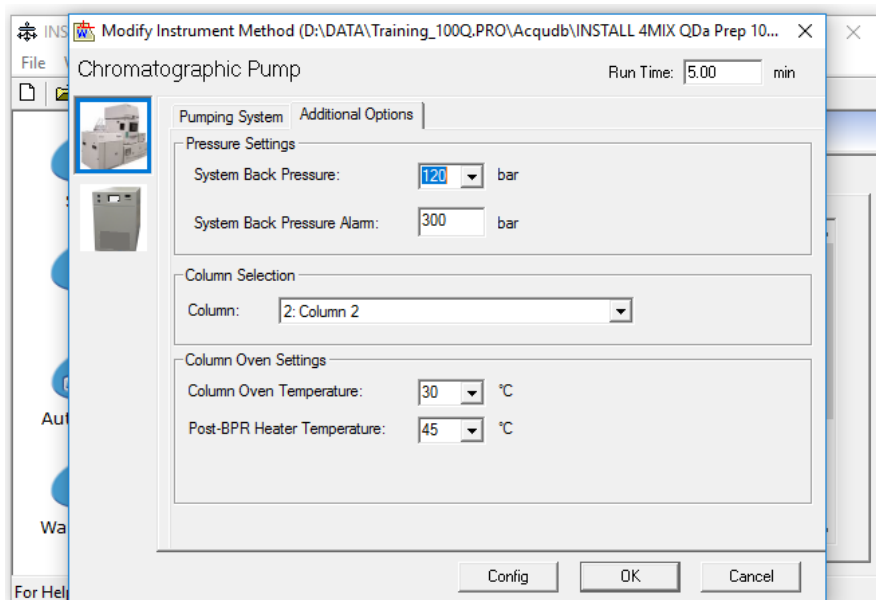


图6-51

6.4.13 收集器重置

- MassLynx主界面, short cut-Fraction Lynx-Collection Control (图6-52), 点击 Collection Control, 弹出Collection Control 小窗 (图6-53)

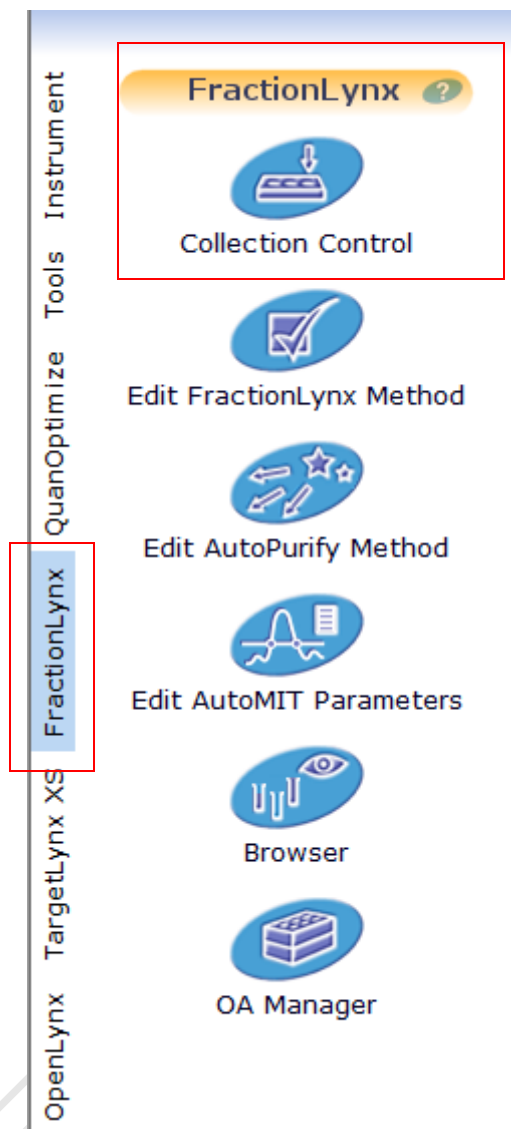


图6-52

- 激活进样器：选择System，点击Activate（图6-53），则2767自动进样器被激活，激活成活显示如图6-54，在system图标右下角出现对勾符号；

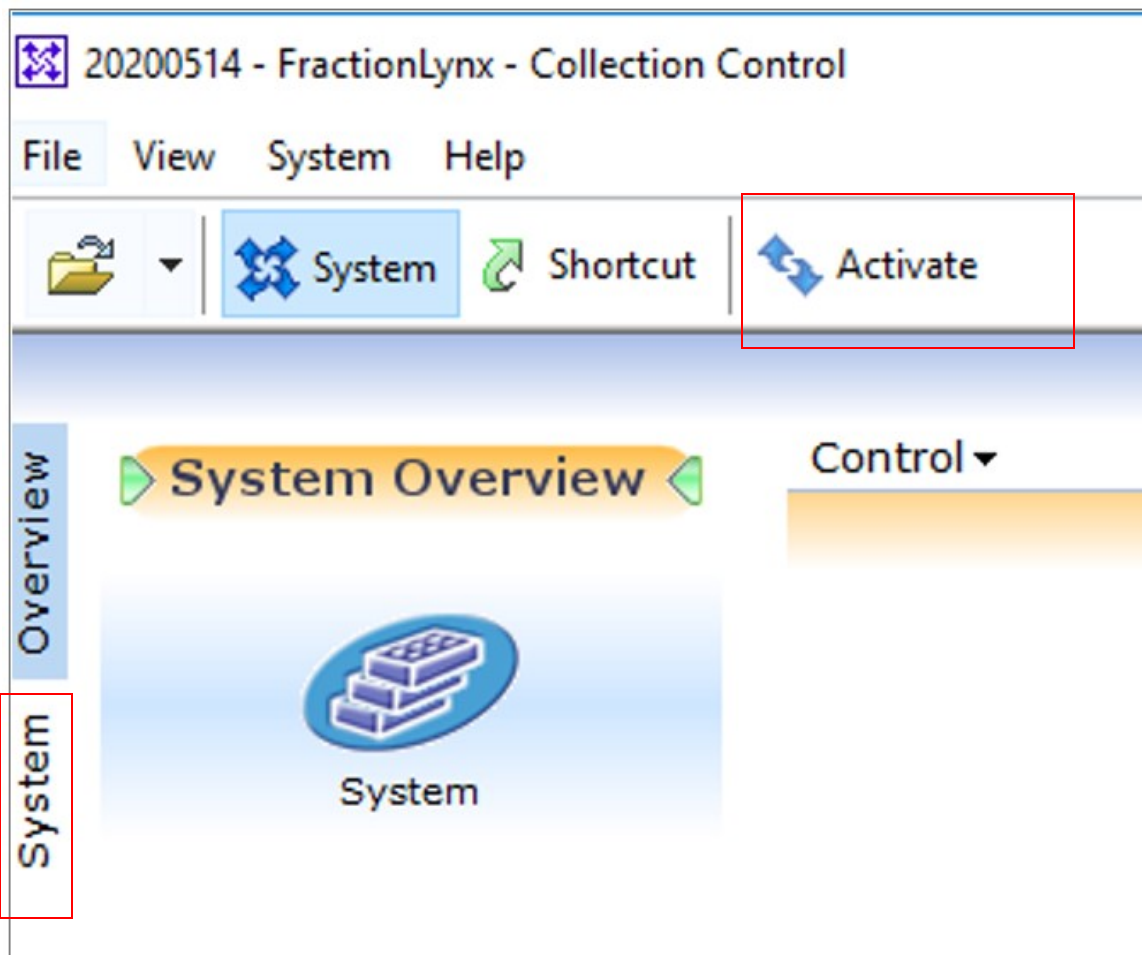


图6-53

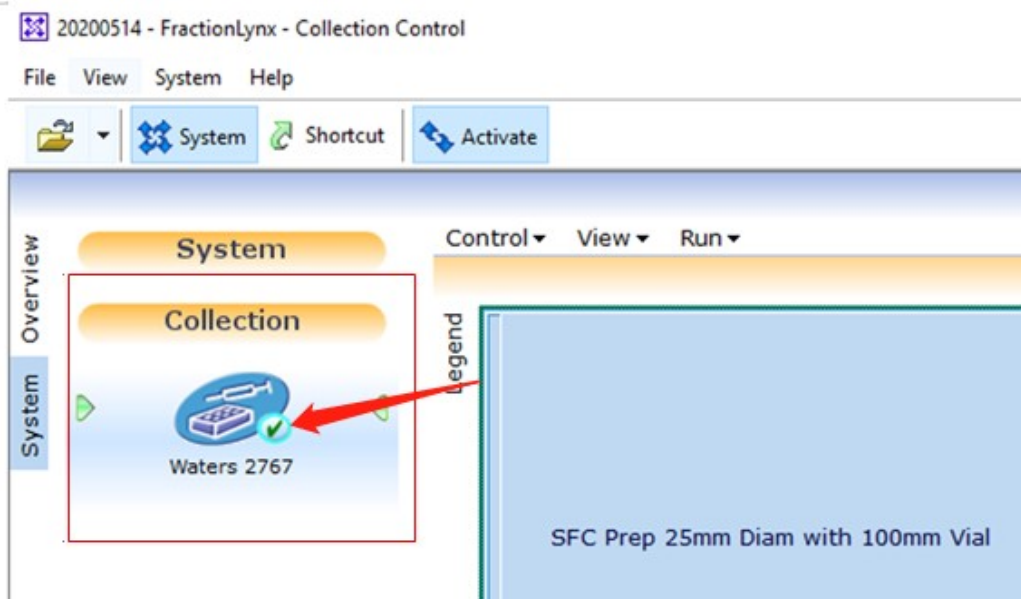


图6-54

- 激活之后，窗口显示如图6-55，显示已用的回收管和当前回收管位置，注意回收管为S型路径进行样品回收；

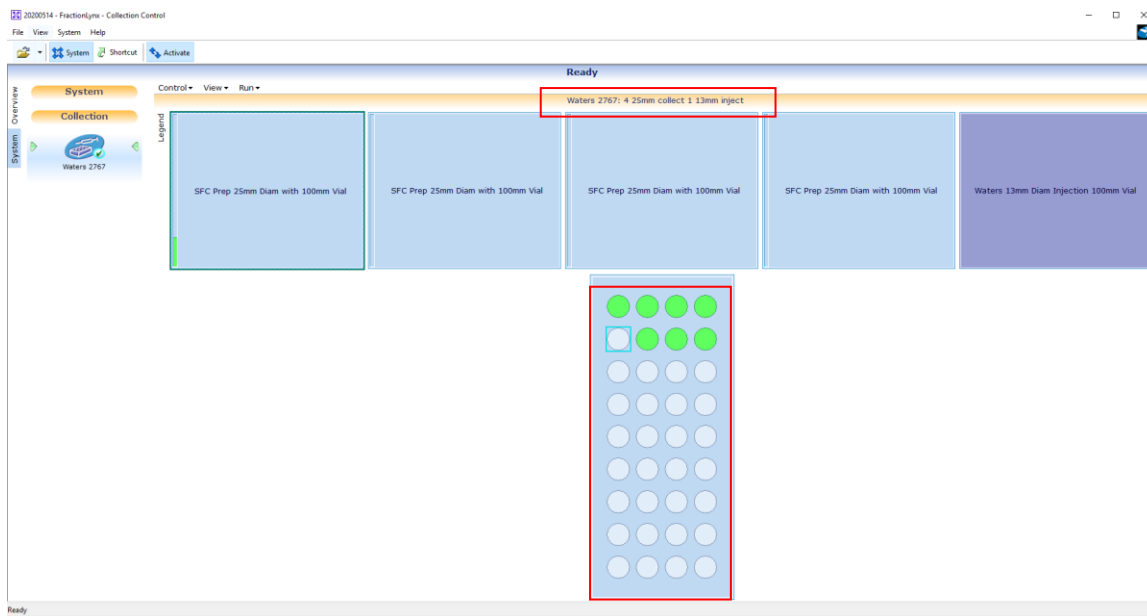


图6-55

- 重置：Contro-Reset Beds，则重置回收管（图6-56），重置成功，回收管回到1号盘， tube1位置，如图6-57

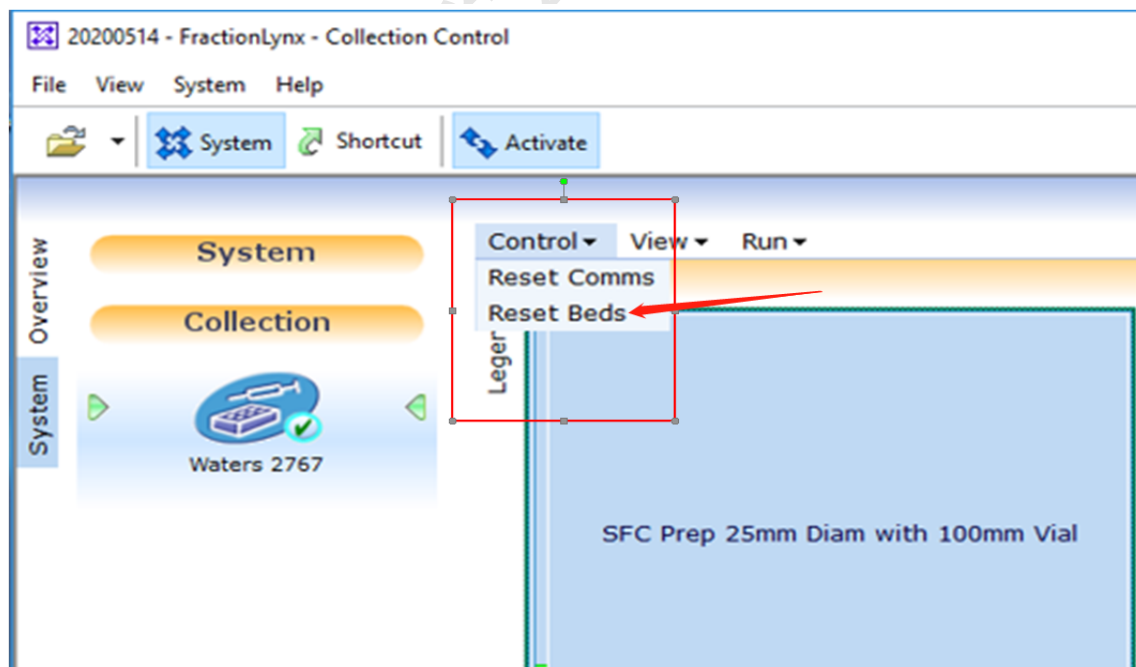


图6-56

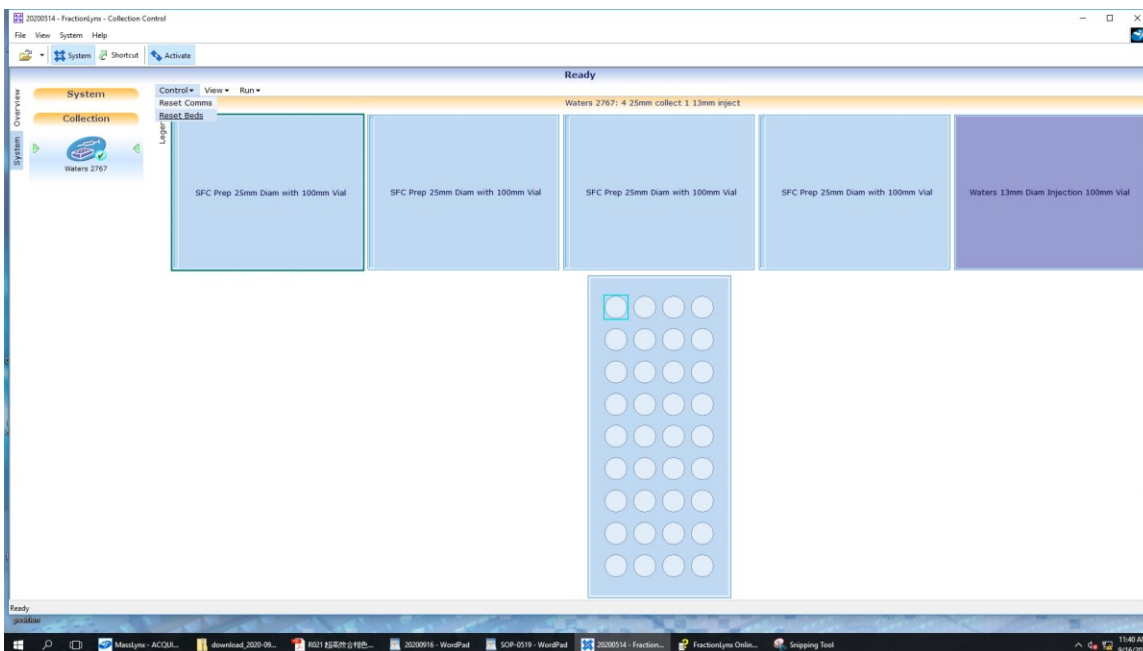


图6-57

6.4.14 Sample list 显示

31	QDa Prep 100 Collection Test Optimization	Collect Fluorescen	ESI+ 9Hz 15V Cont 5m	INSTALL 4MX QDa Prep 100q SFC 5:1:2	500 000 Qda Perf Test 1	Mass A		220.000	0.000 333	
32	QDa Prep 100 Collection Test Optimization01	Collect Fluorescen	ESI+ 9Hz 15V Cont 5m	INSTALL 4MX QDa Prep 100q SFC 5:1:2	500 000 Qda Perf Test 1	Mass A		220.000	0.000 333	
33	QDa Prep 100 Collection Test	Collect Fluorescen	ESI+ 9Hz 15V Cont 5m	INSTALL 4MX QDa Prep 100q SFC 5:1:2	500 000 Qda Perf Test 1	Wavelength A		220.000	0.000 333	
34	Re-Injection Test	Collect Fluorescen	ESI+ 9Hz 15V Cont 5m	INSTALL 4MX QDa Prep 100q SFC 5:1:4	500 000 Qda Perf Test 1	Mass A		220.000	0.000 333	

图6-58

6.4.15 运行样品列表

- (1)核对仪器各部件参数及设置;
- (2)核对进样样品种类、样品管位置及回收管数量;
- (3)核对所有方法文件, 并保存样品组列表;
- (4) 打开515泵及SSI泵(图6-59)



图6-59

(4)加载液相方法: Load method

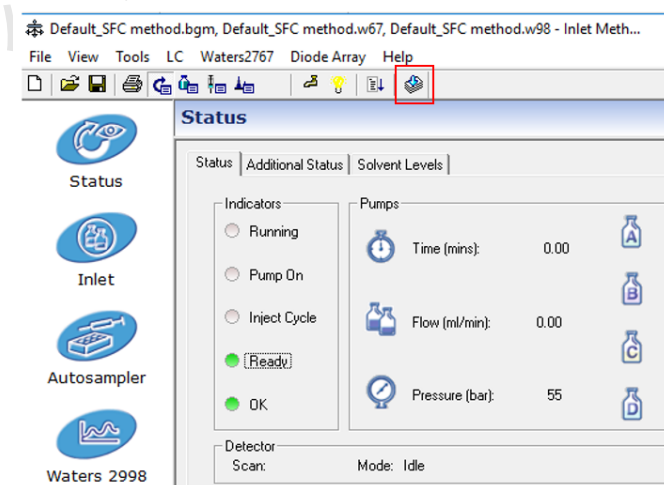


图6-60

(5) 洗针

当 Ready 和 OK 项目均为绿色，可进行 2767 自动进样器进样针清洗操作。

Waters2766-右键-Prime System

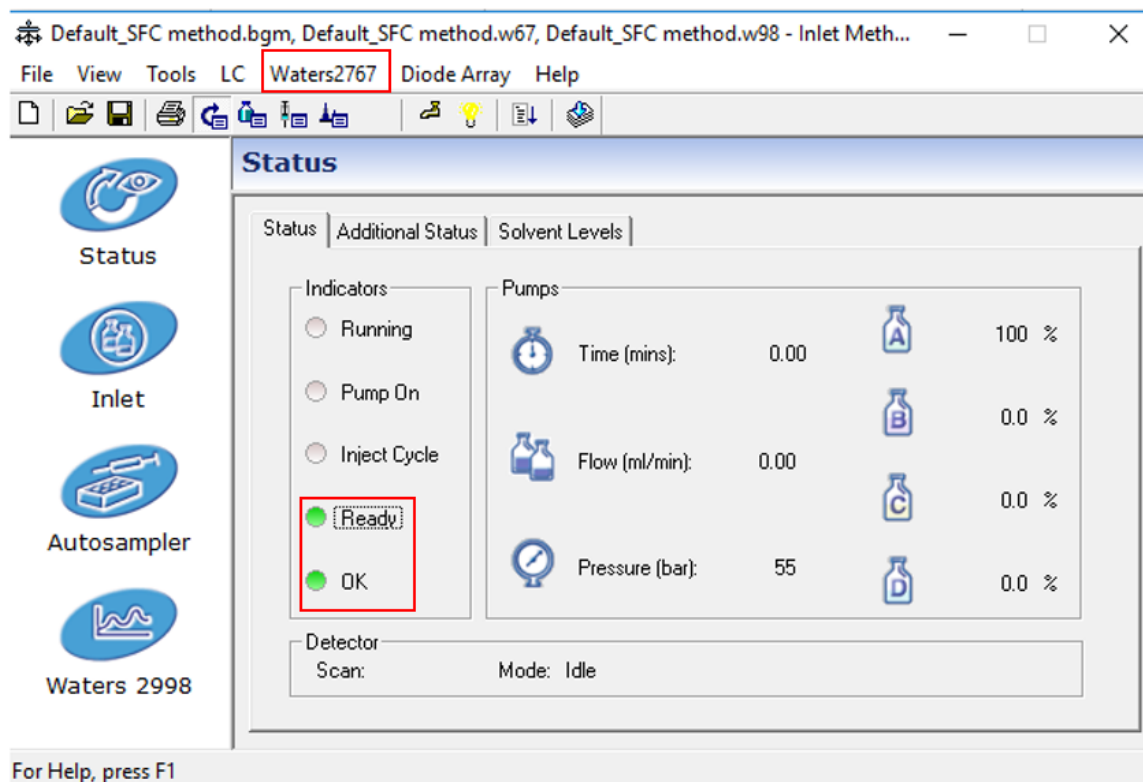


图 6-61

(6)运行样品：仪器状态稳定，系统压力差小于30psi；选中样品行，点击运行按钮



图6-62

点击 Start run，弹出 Start sample list run，显示要运行的序列编号范围，确认无误，

点击 OK。此时序列开始运行，当前运行的序列，有绿色进度显示。运行结束，绿色进度状态消失。

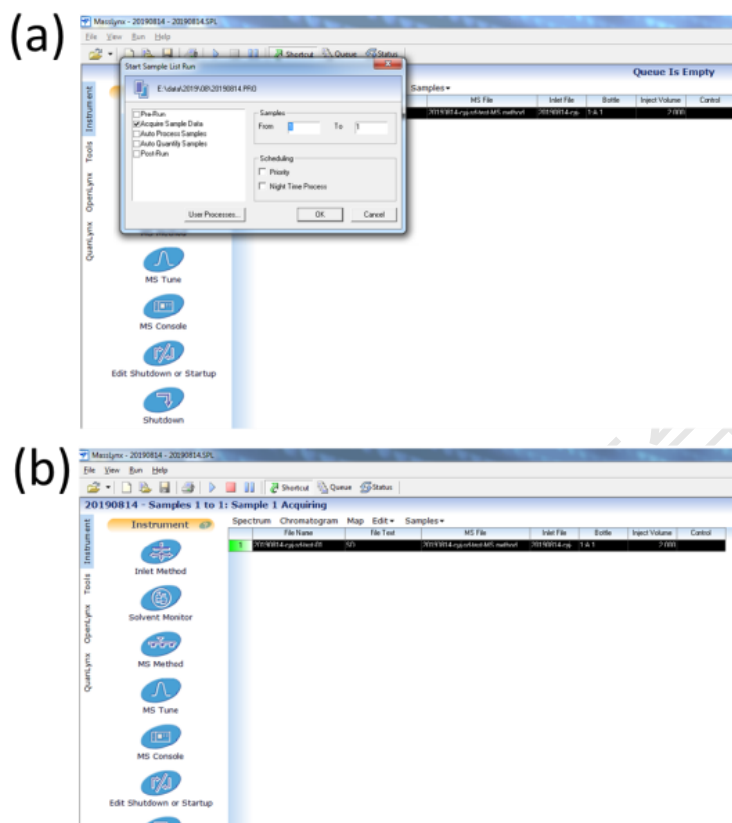
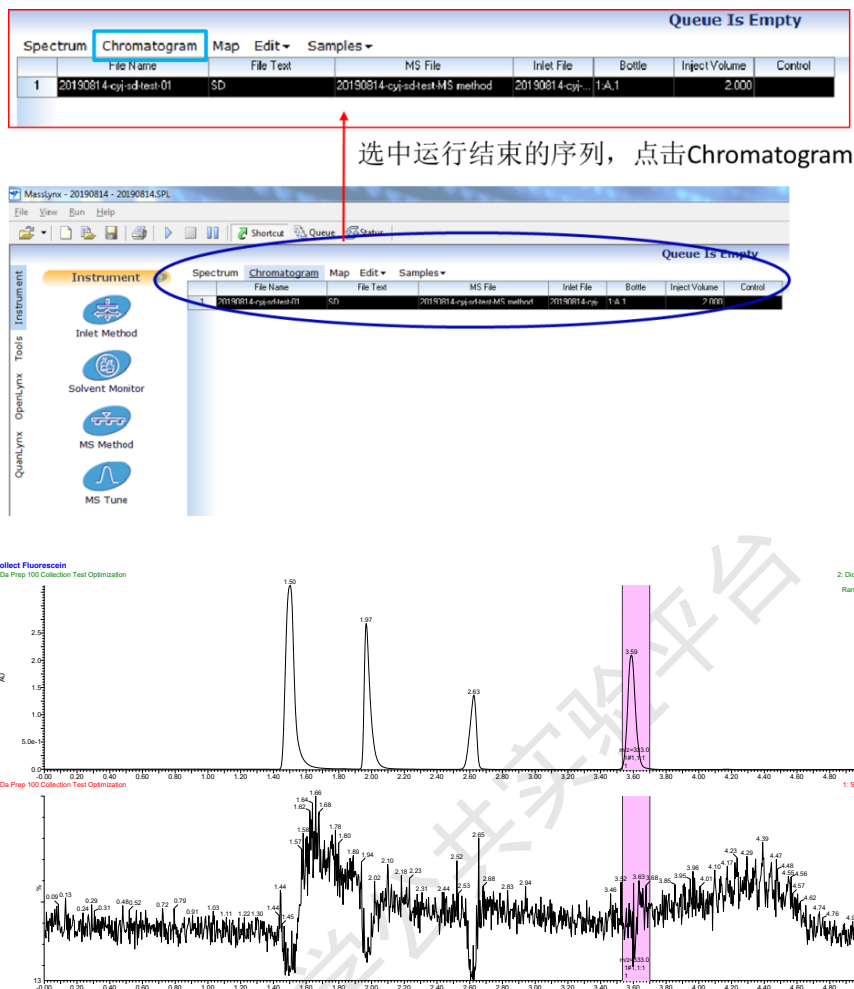


图6-63

6.5 数据查看

6.5.1 查看色谱图

选中运行结束的序列，点击Chromatogram，显示如图6-64所示，回收组分，标记为有色阴影显示；



选中运行结束的序列, 点击Chromatogram

图6-64

6.5.2 捕获图谱

点击照相机, 复制质谱图, 打开电脑中的Paint画图, 粘贴并另存;

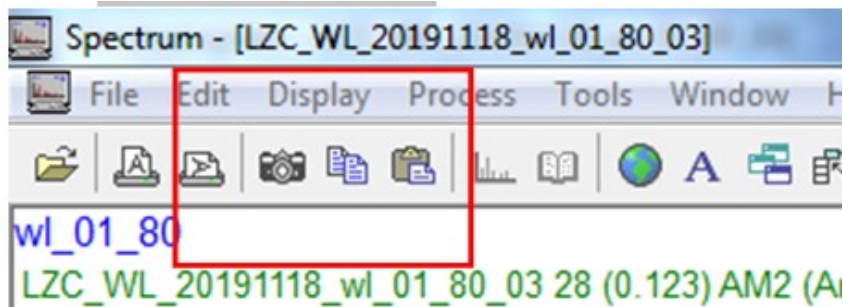


图6-65

6.5.3 获取原始数据

选择Edit - Copy spectrum lists复制质谱原始二维数据, 新建Text document文本文件进行粘贴即可。该txt文本可以进一步用Origin进行处理。

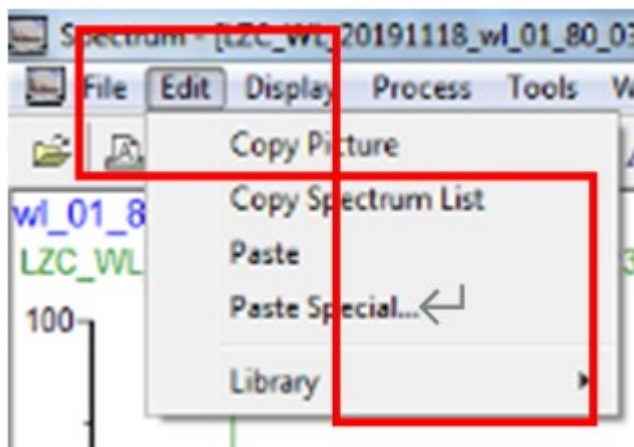


图6-66

6.5.4 回收模拟

- 打开分析样品的色谱图, 选择所需的PDA通道或者MS TIC通道 (选中的图谱左侧出现有点点好, 以示标记), 点击模拟图标 ; 弹出图6-68对话框;

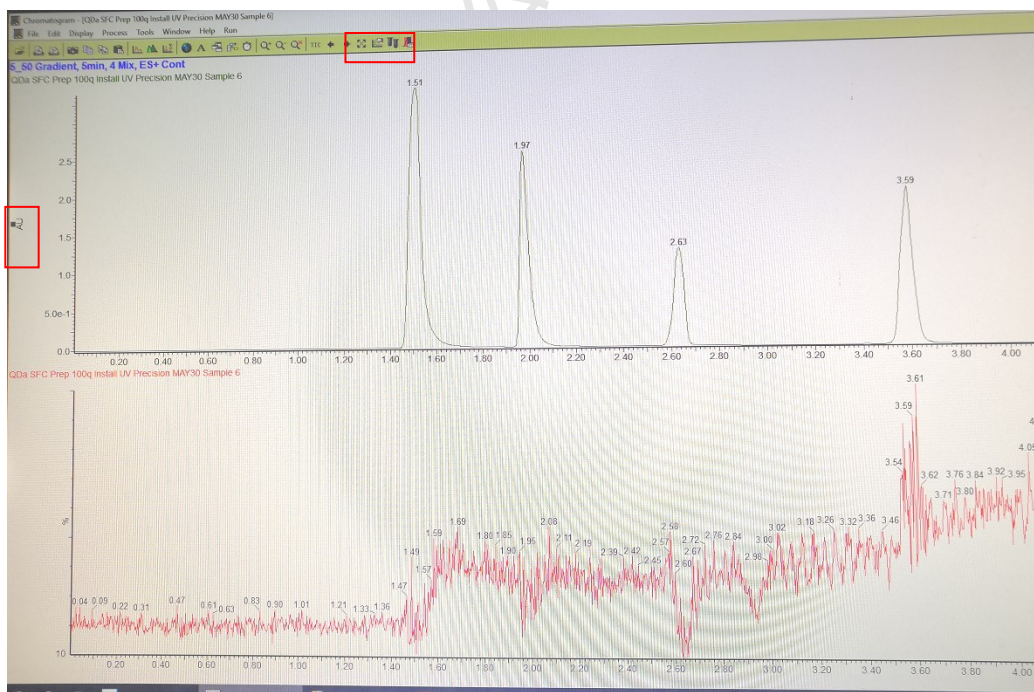


图6-67

- 设置: General Parameters: Peak type: Preparative; solvent Front Delay (secs):30s;
Minimum Fraction Width (secs):5; Maximum Fraction Width (secs): 300s;
Peak Detect Parameters: Min. Intensity Threshold (MIT): 可查看图谱, 进行
设置, 方式参见6.4.8 step 5和step 6; Max Intensity Threshold: 设高值默认即可。
Peak start: Use MIT Only; Terminate Peak: Trailing valley (%): 斜率设置为-300,
点击OK, 即显示模拟回收图。

注: 该项只是模拟, 可任意更改参数, 并查看模拟效果。

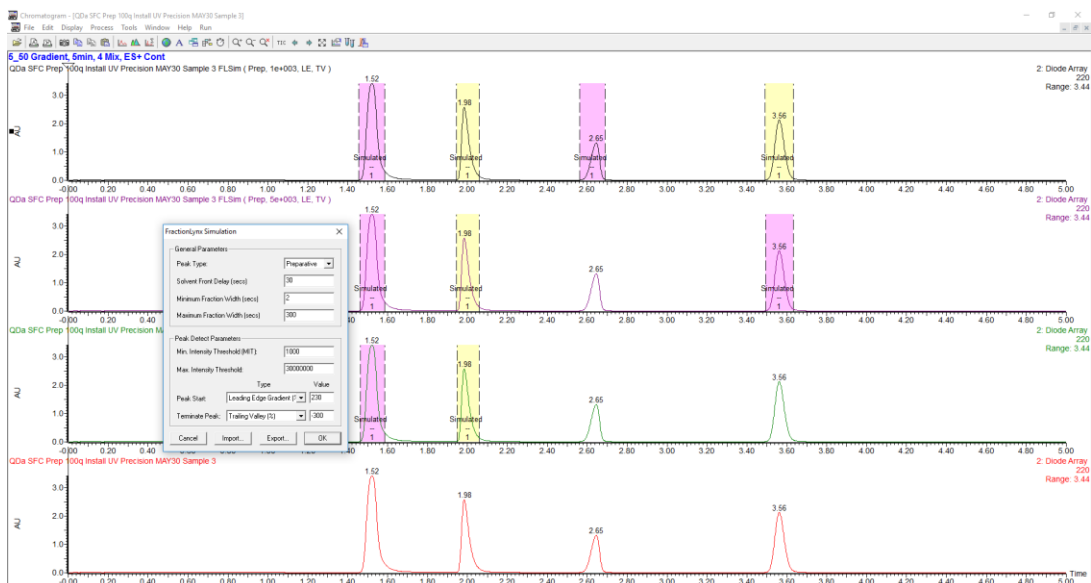


图6-68

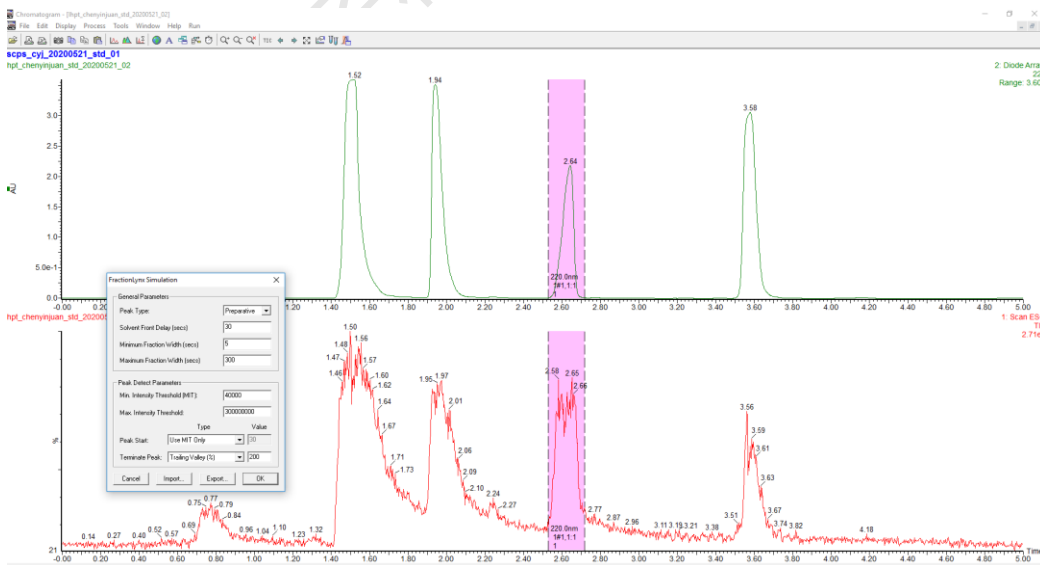


图6-69

7.4 实验结束操作

6.6.1 冲洗色谱柱: 用样品制备梯度, 进空白样一针, 如有机相中有酸、碱类添加剂, 请替换为纯有机溶剂和 CO₂ 冲洗;

6.6.2 根据色谱柱须知, 用 100%CO₂ 冲洗 10 min;

6.6.3 流动相流速设为 0 ml/min, 色谱柱切换到 bypass 位置;

6.6.4 柱温箱温度设为 off;

6.6.5 关闭 PDA 紫外灯: Inlet Method Editor 界面, 点击小灯泡

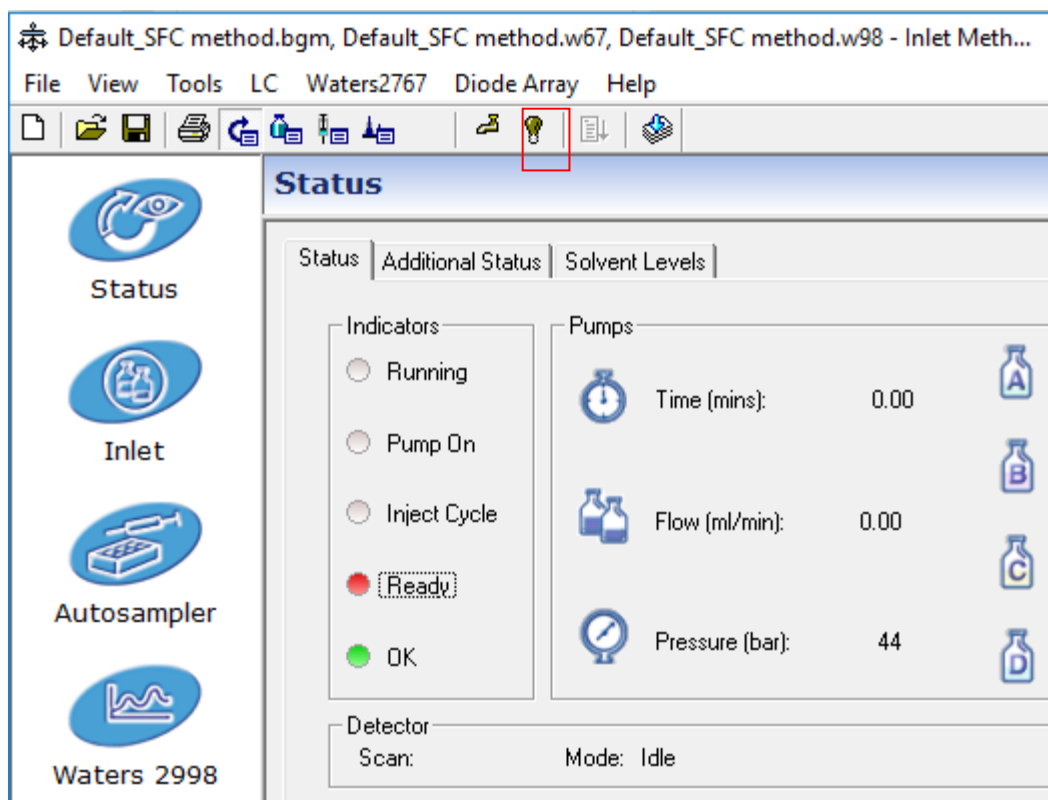


图6-70

6.6.6 关液相方法: Inlet Method Editor 界面, 点击水龙头

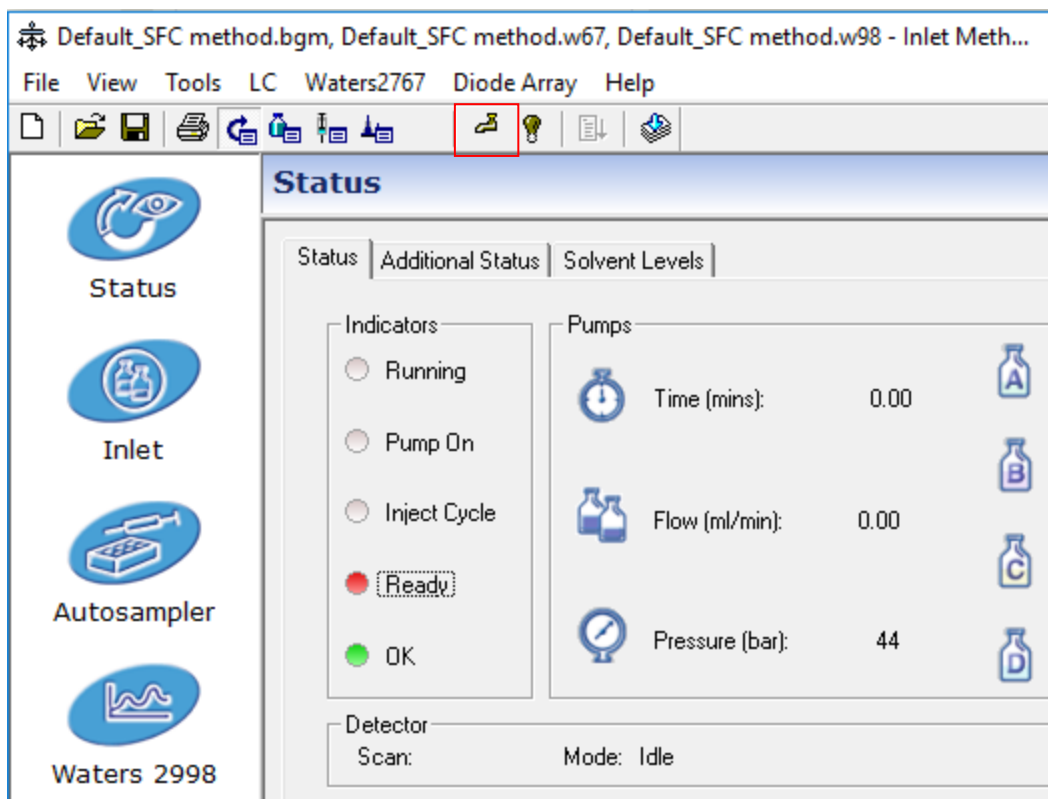


图6-71

6.6.7 关闭质谱电源： Console 界面-选中左侧 QDa Detector-点击右侧 Operate，变为红色 QDa operate 指示；

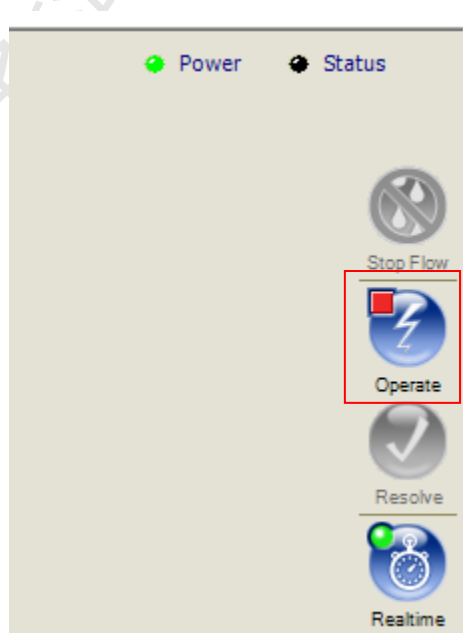


图6-72

6.6.8 关气瓶, 并排空管路中的 CO₂

6.6.9 等系统压力卸载, 关闭循环冷却器

长按回车-OFF, O-关闭

6.6.10 核对仪器各部件关机状态, 登出基理系统

注: 请勿退出软件。

6.6.11 实验登记

6.6.12 回收样品及馏分, 整理桌面, 离开实验室。

7. 相关/支撑性文件

Q/WU FLHR001 文件编写规范。

8. 记录

超临界流体制备色谱仪 Waters Prep-100q 使用记录登记表。

分子科学公共实验平台

超临界流体制备色谱仪使用登记表

日期			使用人			导师		
时间	开始时间 (hh:mm)			结束时间 (hh:mm)			总计 (hh:mm)	
样品 信息	检测方式	自主上机 <input type="checkbox"/>	样品名称或代号					
		送样测试 <input type="checkbox"/>						
	样品数(个)			进样次数(次)				
	文件名 (见备注)							
毒性及防护 说明								
测试 信息	使用溶剂	CO ₂ (A)/甲醇 <input type="checkbox"/> /乙醇 <input type="checkbox"/> /异丙醇 <input type="checkbox"/> /其他:						
	检测器	PDA 检测器 <input type="checkbox"/> 质谱检测器 <input type="checkbox"/>						
	色谱柱	来源: ①平台 <input type="checkbox"/> ; ②自备 <input type="checkbox"/>						
型号: 类别: ①手性 <input type="checkbox"/> ; ②非手性 <input type="checkbox"/>								
耗材 使用 登记	溶剂	自备 <input type="checkbox"/>	品牌: 规格:					
		平台提供 <input type="checkbox"/>						
	进样(个)		馏分回收管	自备 <input type="checkbox"/>				
				平台 <input type="checkbox"/>	数目(个)			
其他 说明								

备注(1)PI_使用人_样品_日期_编号; ZS_SFC_20191218_P1_01

(2)**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。

分子科学公共实验平台