

Agilent 1260 Infinity 二元梯度 LC

系统用户指南



Agilent Technologies

注意

© 安捷伦科技有限公司 2006, 2008-2011, 2013

根据美国和国际版权法，未经安捷伦公司书面许可，本书内容不得以任何形式复制（包括电子存储修改或翻译）。

手册部件号

G1312-97303

版本

02/2013

Germany 印刷

Agilent Technologies
Hewlett-Packard-Strasse 8
76337 Waldbronn

如果体外诊断系统已在相关权威机构注册并符合相关法规，本产品可用作其组件之一。否则只可用于常规实验室。

软件版本

本指南适用于 Agilent OpenLAB CDS 的 A.01.04 版。

Windows® 是美国微软公司的注册商标。

声明

本书内容如有改变，恕不另行通知。安捷伦科技公司对本材料，及由此引出的任何商务和特种用途不承担责任。安捷伦科技公司对本手册中可能有的错误或与装置、性能及材料使用有关内容而带来的意外伤害和问题不负任何责任。如果安捷伦与用户对本书中的警告术语有不同的书面协议，这些术语与本书中的警告术语冲突，则以协议中的警告术语为准。

技术许可

本书对硬件和/或软件的介绍已获得特许，未经许可，不得使用或复制。

权力限制说明

如果软件用于某一美国政府基本合同或次级合同，软件的使用将作为下列情况之一被许可：按照法案 DFAR 252.227-7014（1995年6月）确定的“商业计算机软件”；或者按照法案 FAR 2.101 (a) 确定的“商业条款”；或者按照法案 FAR 52.227-19（1987年6月）确定的“限制计算机软件”；或者任何相当机构法规或合同条款。软件的使用，复制或解密受安捷伦科技标准商业许可条款的管理，美国政府的非 DOD 部门和机构将获得不比法案 FAR 52.227-19 (c) (1-2)（1987年6月）大的权利。美国政府的用户将获得不比法案 FAR 52.227-14 (c) (1-2)（1987年6月）或 DFAR 252.227-7015 (b) (2)（1995年11月）确定的限制权利大的权利，这一原则适用于任何技术数据。

安全警告

小心

小心提示表示危险。提醒您 在操作过程中注意，如果执行不当，将影响产品或丢失重要数据。不要忽视小心提示。

警告

警告提示表示危险。提醒您 在操作过程中注意，如果执行不当，将导致人身伤害或死亡。不要忽视警告提示。

内容提要...

本手册介绍有关 Agilent 1260 Infinity 二元梯度 LC 的信息。

1 Agilent 1260 Infinity 二元梯度 LC - 产品说明

本章讨论 1260 Infinity 的功能二元梯度 LC。

2 简介

本章介绍 Agilent 1260 Infinity 二元梯度 LC 及其基本概念。

3 Agilent 1260 Infinity 的优化 二元梯度 LC

本章介绍如何应用 LC 系统的理论和使用其功能进行更好的分离。

4 系统设置和安装

本章介绍有关软件安装、模块安装和准备系统进行操作的信息。

5 快速入门指南

本章介绍有关 1260 Infinity 二元梯度 LC 的数据采集和数据分析的信息。

6 附录

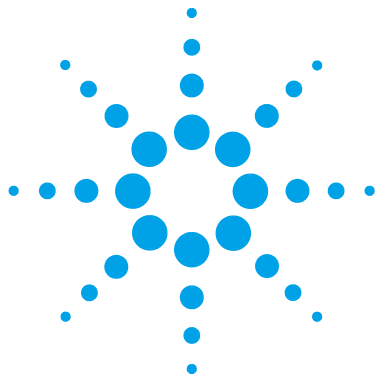
本章介绍有关安全、法规和网络以及设置方法的其他信息。

目录

1	Agilent 1260 Infinity 二元梯度 LC - 产品说明	7
	Agilent 1260 Infinity 的特性 二元梯度 LC	8
	系统组件	10
	指标	22
2	简介	27
	在液相色谱中使用更小颗粒的理论	28
	小粒径色谱柱的优点	34
	摩擦热	37
3	Agilent 1260 Infinity 的优化 二元梯度 LC	39
	如何配置最佳延迟体积	40
	如何获得更大的进样体积	47
	如何获得更短的循环时间	48
	如何获得最低残留量	51
	如何获得更高的分离度	53
	如何获得更高的灵敏度	60
	如何防止色谱柱堵塞	65
4	系统设置和安装	67
	安装软件	68
	安装模块	70
5	快速入门指南	81
	关于快速入门指南	82
	准备系统	83
	“方法和运行控制”视图中的数据采集	88
	数据分析	96
6	附录	101
	安全信息	102

溶剂信息	105
Agilent Technologies 网站	109
使用编辑整个方法设置方法	110

目录



1

Agilent 1260 Infinity 二元梯度 LC - 产品说明

Agilent 1260 Infinity 的特性 二元梯度 LC	8
系统组件	10
1260 Infinity 二元泵 (G1312B)	11
1260 Infinity 高性能脱气机 (G4225A)	14
1260 Infinity 高性能自动进样器 (G1367E)	15
1290 Infinity 柱温箱 (G1316C)	17
1260 Infinity 二极管阵列检测器 (G4212B)	19
1200 Infinity 系列便捷式切换阀	21
指标	22

本章讨论 1260 Infinity 的功能二元梯度 LC。



Agilent 1260 Infinity 的特性 二元梯度 LC

1260 Infinity 二元梯度 LC 的设计理念是提供具有超快和超高分辨率的分离功能的液相色谱，同时保留标准 HPLC 应用的完整功能。因此，它对已建立的 HPLC 和 UHPLC 方法提供完整的向后兼容性。亚两微米 (STM) 粒子的使用意味着对于高流速或长色谱柱，需要更多压力才能使流动相通过色谱柱。1260 Infinity 二元梯度 LC 的流路经过了优化，可产生最低背压，而且 ZORBAX RRHT 色谱柱的工程粒度分布所产生的背压比其他 STM 色谱柱低得多。

Agilent 1260 Infinity 二元梯度 LC 的设计特性和优势包括：

- 1260 Infinity 二元泵的可配置延迟体积低至 120 μL ，其流速范围从 0.05 至 5 mL/min（在最高压力为 600 bar 的条件下），可提供从窄孔（内径为 2.1 mm）到标准孔（内径为 4.6 mm）的普遍适用性，能够满足 LC 和 LC/MS 的需求。
- 1260 Infinity 二元泵的标准延迟体积配置不但允许运行 UHPLC，而且还允许运行传统的 HPLC 方法，同时不会影响性能或改变色谱性能。
- 1260 Infinity 高性能自动进样器的新一代流通设计可在各种进样量范围内（从 0.1 高达 100 μL ）获得最高精度，无需改变样品定量管。它旨在提供高样品通量、低残留量和快速进样循环。
- 某些色谱柱上高达 100 $^{\circ}\text{C}$ 的温度可使选择更灵活，并降低溶剂粘度，使分离更快速。
- 在 1290 Infinity 柱温箱中，可安装用于低柱外体积的不同的加热器（1.6 μL ）和冷却件（1.5 μL ）。温度的可调节范围是从 10 $^{\circ}\text{C}$ 以下到最高 100 $^{\circ}\text{C}$ 。
- 1290 Infinity 柱温箱中新的拉出阀驱动设计和用户可更换的快速更换阀实现了可用性，为实现超高通量、多种方法和自动方法开发解决方案铺平了道路。
- 低扩散组件和低容量流通池将窄孔色谱柱的峰扩散水平降至最低。
- 借助 1260 Infinity 二极管阵列检测器的新光学设计，可使数据采集速率高达 80 Hz，并获得基线稳定性和快速质谱采集。
- 提供用于内径为 2.1、3.0 和 4.6 mm 的色谱柱的不同 UV 检测器，包括具有 60 mm 光程的革命性的 Agilent 最大光强流通池（典型的噪声为： $<\pm 0.6 \mu\text{AU/cm}$ ），在检测时可获得超高灵敏度。

可以从 1100 系列或 1200 系列逐步升级到 Agilent 1260 Infinity 二元梯度 LC；例如，可以将 1100 系列检测器或 1200 系列色谱柱箱与 1260 Infinity 二元泵结合使用。

系统组件

1260 Infinity 二元梯度 LC 的各种系统配置是为了满足各种应用需求而定制的。本手册详细介绍了其中一些配置（请参阅“第 67 页的系统设置和安装”）。在后面各节中介绍的模块是 1260 Infinity 二元梯度 LC 的典型组件。除了这些核心组件外，还提供了具体应用的各种解决方案（在“优化”一章中介绍了其中一些解决方案）。

1260 Infinity 二元泵 (G1312B)

二元泵包含两个相同的泵头，这两个泵头集成在一个腔体内。通过高压混合实现二元梯度。在低流速或需要最小瞬时体积时，可旁路脉动阻尼器和混合器。典型的应用是高通量方法，即在高分离度 2.1 mm 柱上进行快速梯度洗脱。泵的流速范围在 0.1 - 5 mL/min 到最高 600 bar。通过溶剂选择阀（可选），可利用分别位于两个通道中的两种溶剂之一形成二元混合物（等度或梯度）。当使用高浓度的缓冲液时可使用主动密封圈冲洗（可选）。

工作原理

二元泵基于双通道、双活塞串联设计，包括了溶剂传输系统必须实现的所有基本功能。两个可以产生最高 600 bar 压力的泵组件把计量的溶剂送到高压端。

每个通道都包括一套泵装置，其中包括泵驱动器、泵头、带有可更换滤芯的入口主动阀和出口阀。两个通道在一个低容积混合腔中连接，混合腔通过限流毛细管线圈连接到阻尼器和混合器上。压力传感器会检测泵压力。集成有 PTFE 过滤芯的冲洗阀装在泵的出口处，便于向泵系统灌注流体。

1 Agilent 1260 Infinity 二元梯度 LC - 产品说明

系统组件

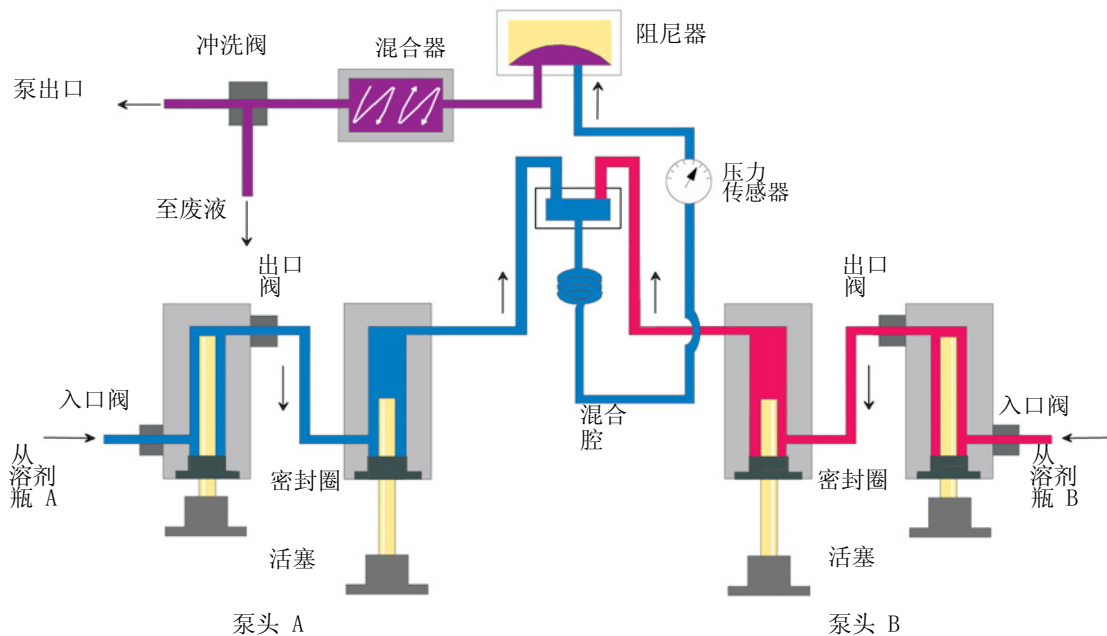


图 1 带有阻尼器和混合器的二元泵的流路系统

为使二元泵的延迟体积最小，可绕过阻尼器和混合器。该配置推荐用于低流速、梯度变化急剧的情况。

“第 13 页的图 2” 显示了在低延迟体积模式下的流路。有关如何在两种配置之间切换的说明，请参阅《G1312B 二元泵用户手册》。

注意

并不支持仅绕过混合器而将阻尼器保留在流路中的配置，这种配置可能会导致二元泵的异常行为。

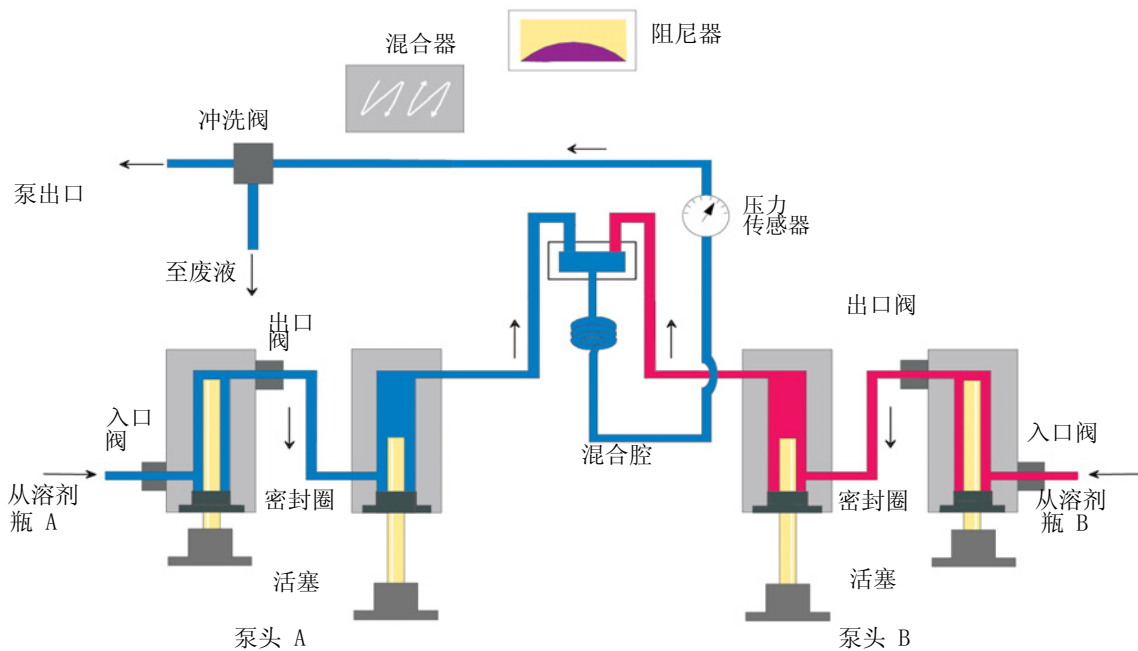


图 2 绕过阻尼器和混合器的二元泵的流路系统

1260 Infinity 高性能脱气机 (G4225A)

Agilent 1260 Infinity 高性能脱气机 G4225A 型号，由四个单独的真空腔以及半渗透性管、真空泵和控制组件组成。打开真空脱气机的电源开关后，控制组件就会开启真空泵，真空泵可使真空腔内产生低压。其压力由压力传感器测定。通过控制空气入口过滤器漏率和使用压力传感器调节真空泵，真空脱气机可以保持低压状态。

溶剂瓶中的溶剂在 LC 泵的抽动下流过真空腔内的半渗透性管。当溶剂流过真空腔时，溶剂中溶解的气体将渗过这些管，进入真空腔。当溶剂离开真空脱气机的出口时，就已经完成了脱气。

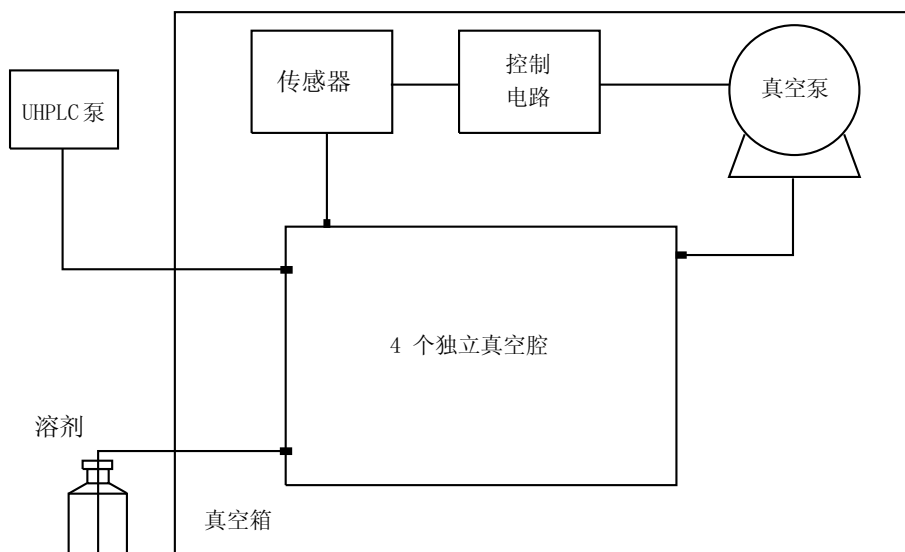


图 3 概述 (只显示四个溶剂通道中的一个)

1260 Infinity 高性能自动进样器 (G1367E)

性能

1260 Infinity 高性能自动进样器具有更高的压力范围（高达 600 bar），支持 Agilent 1260 Infinity 二元梯度 LC 使用最新的色谱柱技术（亚两微米窄孔柱）。通过优化的新部件提高了耐用性；通过流路贯通设计最大程度地减少残留量，提高了速度；为取得高样品分析通量提高了样品进样速度；通过使用重叠进样模式提高了工作效率；可灵活方便地处理不同类型的样品容器中的样品，如样品瓶和多孔板。使用 384 多孔板可以在无人看管的情况下自动处理多达 768 个的样品。

自动进样器原理

自动进样器处理器在采样序列过程中连续地监控其元件的运动状态。处理器为每一次运动都定义了特定的时间窗口和机械运动范围。如果采样序列的某一特定步骤未能成功完成，就会生成故障信息。在采样序列过程中，进样阀可使溶剂绕过自动进样器。进样针移动到所需的样品位置，且会被降低进入到样品中的样品溶液中，以便使计量装置通过回移其推杆一定的距离来抽取所需体积。然后进样针再次升起，并移动到针座从而使样品定量管密封。采样序列结束后进样阀返回到主流路位置时，样品就已注入到色谱柱中。

标准采样序列按如下顺序进行：

- 1 进样阀切换到旁路位置。
- 2 计量装置的推杆移动到起始位置。
- 3 进样针锁定向上移动。
- 4 进样针移动到所需样品瓶（或多孔板）位置。
- 5 进样针降低进入样品瓶（或多孔板）中。
- 6 计量设备抽取预设的样品体积。
- 7 进样针从样品瓶（或多孔板）提出。
- 8 然后进样针移动到针座以密封样品定量管。
- 9 进样针锁定向下移动。
- 10 进样阀切换到主流路位置后，进样周期完成。

如果需要进样针清洗，这一步骤将在步骤 7 和 8 之间进行。

进样序列

在开始进样序列之前以及在分析过程中，进样阀处于主流路位置。在此位置上，流动相将流过自动进样器计量装置、样品定量管和进样针，以保证所有与样品接触的部件都在运行过程中进行了冲洗，从而把残留量降到最低。

采样序列开始时，阀单元切换到旁路位置。来自泵的溶剂进入端口 1 处的进样阀单元，并通过端口 6 直接流到色谱柱。

采样序列的最后一步是进样和运行步骤。六通进样阀切换到主流路位置，并将流路引回样品定量管，该管现包含了一定量的样品。溶剂流将样品传送到色谱柱中，并开始分离。这就是一次分析的运行开始。在该阶段，溶剂流会对所有影响性能的主要硬件进行内部冲洗。对于标准应用，无需其他冲洗过程。

冲洗进样针

在进样前，为实现高灵敏度分析而减少残留量，可在位于采样单元进样器接口后面的冲洗接口中清洗进样针的外部。进样针位于冲洗接口后，蠕动泵会立即在设定的时间内输送溶剂以便清洁进样针外部。在该过程结束后，进样针返回到进样接口。

1290 Infinity 柱温箱 (G1316C)

Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (TCC) 控制环境温度以下 10 °C 到 100 °C (在 2.5 ml/min 时) 和 80 °C (在最高为 5 ml/min 时) 的温度。温度稳定性指标为 ± 0.05 °C, 准确度指标为 ± 0.5 °C (校正后)¹。这些指标是通过以下三方面的结合而实现的: 与恒温器叶片接触的传导、色谱柱环境中的静止空气温度, 以及在流动相进入色谱柱之前将其输送通过热交换器进行预热 (或冷却), 最后一点最为重要。每一 TCC 中有两个相互独立的温度区, 这两个温度区可协同工作用于长达 300 mm 的长色谱柱, 也可为 100 mm 或更短的短色谱柱提供不同的工作温度。

此模块随附 1.6 μ l 低扩散热交换器, 每一阀工具包都有适用于每个色谱柱的附加低扩散热交换器。低扩散热交换器最多有 4 个, 可在 TCC 内灵活安装。对于传统的 HPLC 操作, 也可使用 3 μ l 和 6 μ l 内置热交换器。

每个 TCC 都可使用一个内部阀驱动器, 便于进行从两个色谱柱之间的简单切换到交替柱再生、样品分离或色谱柱反冲的阀切换应用。每个阀头都以完整工具包的方式提供, 该工具包内包含所有需要的毛细管、附加的低扩散热交换器和其他零件。

在对阀进行连接操作时, 使用切换阀可实现极佳的方便性和灵活性: 将其下压时, 便捷式切换阀的驱动部分会向前滑出以便轻松进行维护 (参见“第 18 页的图 4”的左图)。用户可以针对不同的应用在驱动机械装置上互换备用阀头 (参见“第 18 页的图 4”的右图)。请注意阀头顶部的 RFID 标识。

¹ 对于环境温度 25 °C 下、设定值为 40 °C 且流速从 0.2 到 5 ml/min 的蒸馏水, 所有性能指标均有效。

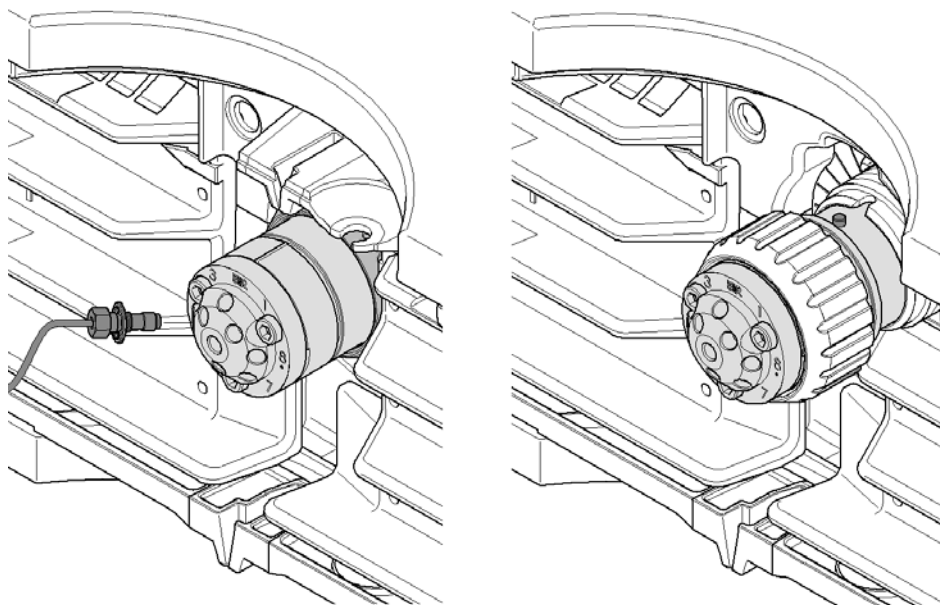


图 4 TCC 中的快换阀

最多可以“组合”三个 TCC 以进行高级别的应用，如为了进行自动方法开发在八个色谱柱之间切换，或者为了进行不同应用使用更多色谱柱。因此，所用的色谱柱成为了一个简单的方法参数。这需要两个 8 位置 /9 端口阀头，两个 TCC 中各一个。为了方便操作，组合 TCC 在软件中显示为带一个界面的一个单元。

与之前的设计相比，进一步改进包括更好的绝热性能、更佳的毛细导管和“开门式”传感器，因此，方法可以定义门必须关闭，这对于低温或高温方法特别有用。

1260 Infinity 二极管阵列检测器 (G4212B)

1260 Infinity 二极管阵列检测器 (DAD) 使用基于光流波导技术的流通池进行了全新的光学设计，具有高灵敏度和低散射度的特点，可提供较宽的线性范围和非常稳定的基线水平，适用于标准或超快 LC 应用。Agilent 最大光强流通池利用全内反射原理，以及所采用的不含涂层熔融石英毛细管，极大地促进了光的传播，消除了流通池体积散射效应导致的分辨率降低，从而使灵敏度达到了一个新的水平。这一设计将折光指数或热效应导致的基线扰动降低到了最低水平，从而能够得到更可靠的峰面积积分。

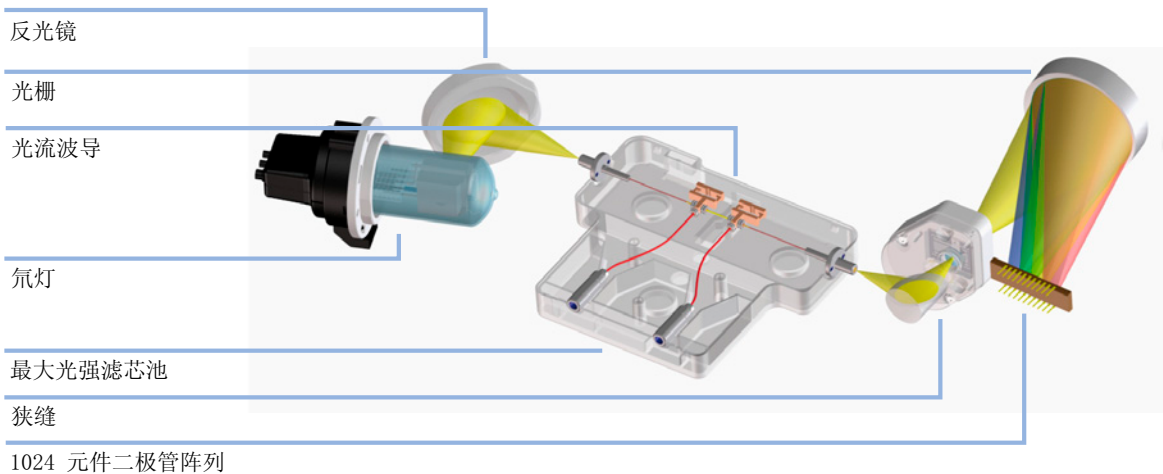


图 5 通过 DAD 的光程

该模块还可进行电子温度控制，进一步提升补偿室温效应的水平。尽管最大光强流通池的液容很小，但光程是标准的 10 mm。不过，为了实现更高的灵敏度，还提供了备用的 Agilent 最大光强高灵敏度流通池，该流通池池长为 60 mm。流通池的更换很简单，从其支架上滑入滑出即可，流通池会在光具座上自动校准。DAD 光源是氙灯，操作波长范围为 190 到 640 nm。这是通过由 1024 个二极管组成的二极管阵列检测得出的结果。色谱仪的入射是通过 4 nm 的固定光狭缝实现的。

1 Agilent 1260 Infinity 二元梯度 LC - 产品说明

系统组件

光谱信号是从此模块固件中的二极管阵列数据中提取的。可以设置多达 8 个单独的信号。每一信号由一个信号波长、一个二极管聚束带宽以及参考波长和带宽（如需要）组成。信号可以按照 80 Hz（80 数据点 / 秒）的频率输出，以实现最快（最窄）色谱峰的准确记录。同时，此模块还能以同样的 80 Hz 频率输出全范围光谱至数据系统。

对于受法规约束的实验室，务必记录所有的方法参数。1260 Infinity DAD 不仅可记录仪器设定值，而且在灯和流通池滤芯中添加了 RFID 标记（射频识别标记），因此这些重要组件的名称和变量也都会被系统记录下来。

1200 Infinity 系列便捷式切换阀

Agilent 1200 Infinity 便捷式切换阀支持各种具有挑战性的阀应用。每个阀头都以完整工具包的方式提供，该工具包内包含所有需要的毛细管、附加的低扩散热交换器和其他零件。

便捷式切换阀的一些典型应用包括：

- 双柱选择
- 样品富集
- 样品净化
- 交替柱再生
- 特殊应用，如方法开发或 2D-LC

有关这些应用的详细说明，请参阅《阀解决方案用户指南》。

指标

1260 Infinity 二元梯度 LC 的模块化设计允许配置完全符合各种个人应用要求的系统。这种个人配置与本《系统用户指南》中介绍的标准配置不同。

1260 Infinity 二元泵的物理和性能指标显示如下。系统中其他模块的指标信息可在相应的模块用户手册中找到。

1260 Infinity 二元泵 (G1312B) 的物理指标

表 1 物理规格

类型	规格	注释
重量	15.5 千克 (34 磅)	
尺寸 (高 × 宽 × 长)	180 x 345 x 435 毫米 (7 x 13.5 x 17 英寸)	
线路电压	100 - 240 VAC, ± 10 %	适用范围宽
线路频率	50 或 60 Hz, ± 5 %	
耗电量	220 VA, 74 W / 253 BTU	最大
操作环境温度	4 - 55 ° C (39 - 131 ° F)	
非操作环境温度	-40 - 70 ° C (-40 - 158 ° F)	
湿度	< 95 % (温度为 40 ° C (104 ° F) 时)	非冷凝
操作海拔高度	最高 2000 m (6562 ft)	
非操作海拔高度	最高 4600 m (15091 ft)	存放模块
安全标准: IEC, CSA, UL	安装类别 II, 污染程度 2	仅限室内使用。

性能指标

表 2 Agilent 1260 Infinity 二元泵 (G1312B) 性能指标

类型	指标	注释
液压系统	串联泵的两个双活塞具有伺服控制可变冲程驱动，通过齿轮和滚珠螺杆传输电力，浮动活塞	
可设置流速范围	设定值 0.001 - 5 mL/min，增量为 0.001 mL/min	
流速范围	0.05 - 5.0 mL/min	
流量精度	$\leq 0.07\%$ RSD 或 ≤ 0.02 min SD，取较大值	其依据为恒定室温下的保留时间
流量准确度	$\pm 1\%$ 或 10 μ L/min，取较大值	在 10 MPa (100 bar) 压力下，抽取脱气过的 H ₂ O 进行测定
压力操作范围	操作范围 0 - 60 MPa (0 - 600 bar, 0 - 8700 psi) 流量可达 5 mL/min	
压力脉动	小于 2% 振幅 (通常小于 1.3%)，或小于 0.3 MPa (3 bar)，取较大值，在异丙醇流速 1 mL/min 的环境下，在所有大于 1 MPa (10 bar, 147 psi) 的压力下 低延迟体积配置: 小于 5% 振幅 (通常小于 2%)	
压缩性补偿	根据流动相压缩系数可预定义	
建议的 pH 值范围	1.0 - 12.5，pH < 2.3 的溶剂不能含有会腐蚀不锈钢的酸	
梯度形成	高压二元混合	

表 2 Agilent 1260 Infinity 二元泵 (G1312B) 性能指标

类型	指标	注释
延迟体积	标准延迟体积配置: 600 - 800 μ L, (包括 400 μ L 混合器), 取决于背压 低延迟体积配置: 120 μ L	在水的流速为 1 mL/min 时测得 (水 / 咖啡因示踪物)
组分范围	可设置范围: 0 - 100 % 建议范围: 1 - 99 % 或每通道 5 μ L/min, 取较大值	
组分精度	< 0.15 % RSD 或 < 0.04 min SD, 取较大值	在 0.2 和 1 mL/min 的 流速下测定; 其依据为 恒定室温下的保留时间
组分准确度	\pm 0.35 % 的绝对值, 在流速为 2 mL/min, 压力为 10 MPa (100 bar) 的条件下测得	(水 / 咖啡因示踪物)
控制	Agilent 控制软件 (例如, 化学 工作站、EZChrom、OL、 MassHunter 等)	
本地控制	Agilent Instant Pilot	B. 02.00 或更高版本
模拟输出	对压力监测, 1.33 mV/bar, 一个 输出	
通讯	控制器 - 局域网络 (CAN)、 RS-232C、APG 遥控: 就绪, 启 动, 停机和关机信号, LAN (可 选)	
安全和维修	Instant Pilot、Agilent Lab Advisor 和色谱数据系统提供故 障排除和维护的广泛支持。与安 全相关的功能有泄漏检测、安全 泄漏处理、用于关闭泵系统的泄 漏输出信号以及主要维护区域中 的低电压。	

1 Agilent 1260 Infinity 二元梯度 LC - 产品说明 指标

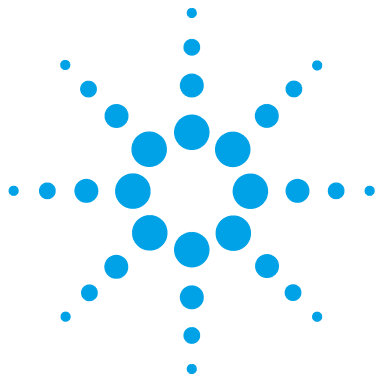
表 2 Agilent 1260 Infinity 二元泵 (G1312B) 性能指标

类型	指标	注释
GLP 特性	维护信息预报 (EMF) 用于连续跟踪仪器在密封圈磨损、泵送的流动相的体积 (上限已预定义, 且用户可对其进行设置) 等方面的使用, 并反馈信息。维护和故障状况的电子记录	
外壳	所有材料都可回收利用	

注意

流速低于 500 μ l/min, 或在没有阻尼器和混合器的情况下, 需要使用真空脱气机。

所有指标测定均使用脱气溶剂。



2 简介

在液相色谱中使用更小颗粒的理论	28
小粒径色谱柱的优点	34
摩擦热	37

本章介绍 Agilent 1260 Infinity 二元梯度 LC 及其基本概念。



2 简介

在液相色谱中使用更小颗粒的理论

在液相色谱中使用更小颗粒的理论

简介

2003 年, Agilent 推出了第一款填料粒径为 1.8 μm 的市售完全多孔硅胶色谱柱。

在与 Agilent 1260 Infinity 二元梯度 LC 结合使用时, 这些亚两微米 (1.8 μm) 填料色谱柱可用于实现两大目标:

1 更快生成色谱

亚两微米粒径填料短色谱柱可以通过提高流速而不影响分离性能, 大幅缩短分析时间。

2 更高分离度

亚两微米粒径填料长色谱柱具有更高的效率, 因而可实现更高的分离度, 这是分离复杂样品所必需的。

由于可通过提高流速实现更快分离, 所以促使溶剂通过包含 STM (亚两微米) 颗粒色谱柱所需的压力也会快速提高, 而且为了实现更高的分离度可延长色谱柱的长度, 这种情况下压力的提升甚至会更快。因此人们对于 STM 色谱柱的接受与 UHPLC 系统的发展密切相关, 这是因为 HPLC 系统可提供比标准 400 bar 更高的压力, 在 HPLC 推出的早期, 这一压力仍在使用的。

目前, Agilent 推出了 1290 Infinity LC, 可在最高压力为 1200 bar 的条件下满足最高 UHPLC 要求。

理论

HPLC 的分离效率可通过范第姆特方程式（“第 29 页的图 6”）进行说明。这是从塔板型计算出来的结果，塔板高度模型用于衡量分析物沿色谱柱向下移动时的扩散度。H 是理论等板高度（有时称为 HETP）， d_p 是色谱柱填料的粒径， u_0 是流动相的线速度，A、B 和 C 是与各种扩散力相关的常数。A 项与通过色谱柱的涡流扩散或多个流动路径相关；B 与沿色谱柱轴（纵向）流动的分子扩散率相关；C 与流动相和固定相之间的分析物的传质相关。H 最小时，分离的效率最高。每一项的作用和总的方程式显示在“第 29 页的图 6”中，其中塔板高度是相对于通过色谱柱的线性速率绘制的。这种类型的图形称为“范第姆特曲线”，用于为实现色谱柱的最佳分离效率而确定最佳流速（曲线中的最低点）。

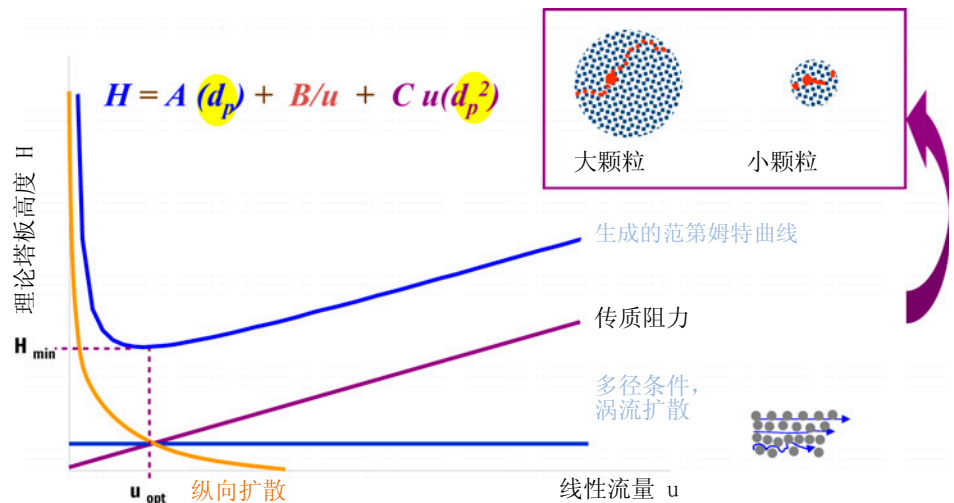


图 6 假设的范第姆特曲线

2 简介

在液相色谱中使用更小颗粒的理论

“第 30 页的图 7”中的范第姆特图形显示，减小粒径可以提高效率。将常用的 3.5 μm 和 5.0 μm 粒径改为 1.8 μm 可显著提高性能。1.8 μm 粒径的填料可将塔板高度值降低两到三倍，并相应提高效率。这样，在使用较短的色谱柱时不会影响分离度，还可因此将分析时间缩短两至三倍。效率的提高很大程度上是通过减少多个流动路径实现的，而后者则是通过使用更小粒径填料实现的。这样可以使 A 项（涡流扩散度）减小。另外，更小的粒径可缩短传质时间，减小 C 项，总体来看的效果就是，随着流速的上升，效率损失大大降低（线的倾斜度下降）。这样便说明在使用较小粒子时，可以通过提高流速来进一步提高分离度，而且这样不会显著降低效率。

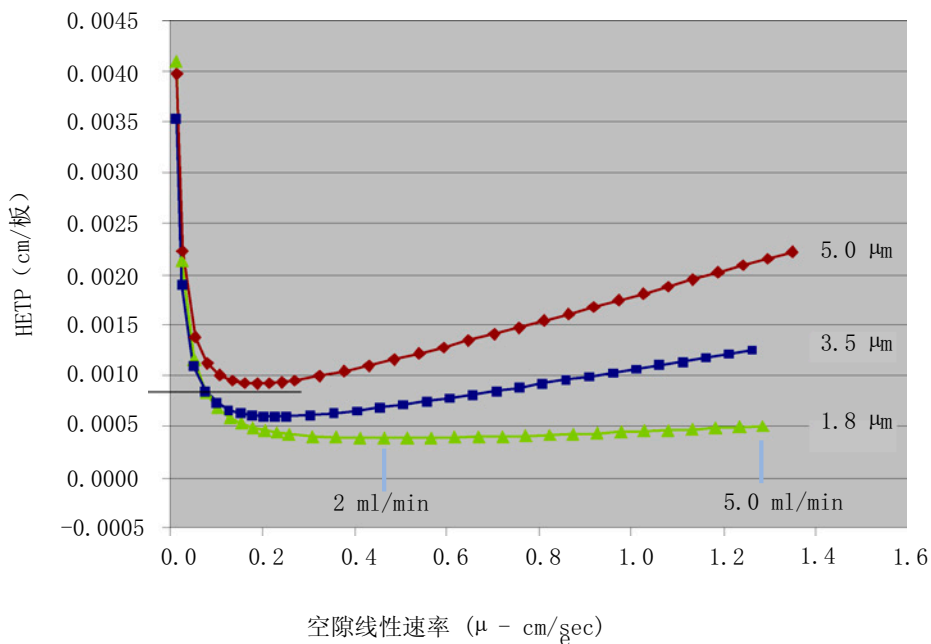


图 7 针对不同粒径的范第姆特曲线

可以基于 HPLC 色谱柱的物理参数优化色谱分离度，这些参数包括粒径、孔径、颗粒的形态、色谱柱的长度和直径、溶剂线速度以及温度。另外，为了实现最短的保留时间和最高的选择性，可以考虑分离时的热力学因素，并控制溶质、固定相和流动相的特性（有机溶剂的百分比、离子强度和 pH）。

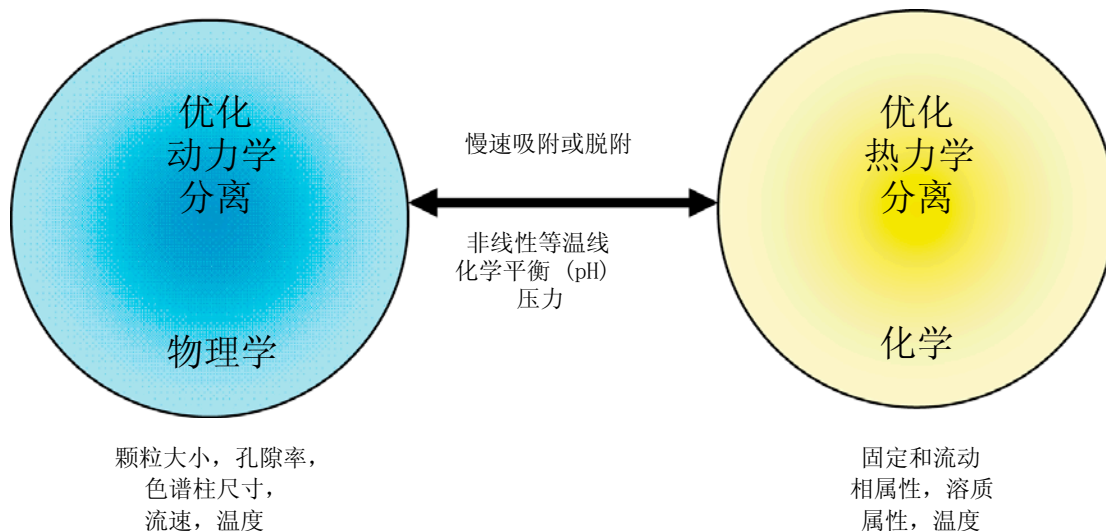


图 8 为 HPLC 选择最佳的条件

2 简介

在液相色谱中使用更小颗粒的理论

分离度可以描绘为具有以下三个参数的函数：

- 色谱柱效率或理论塔板数 (N)，
- 选择性 (α)，
- 保留因子 (k)。

从分离度方程式（“第 32 页的图 9”）可以看出，选择性对分离度（“第 32 页的图 10”）的影响最大。这表明，选择合适的流动相和固定相特性以及温度对成功实现分离至关重要。

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \left[\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right] \cdot \left[\frac{k_2}{k_2 + 1} \right]$$

图 9 分离度方程式

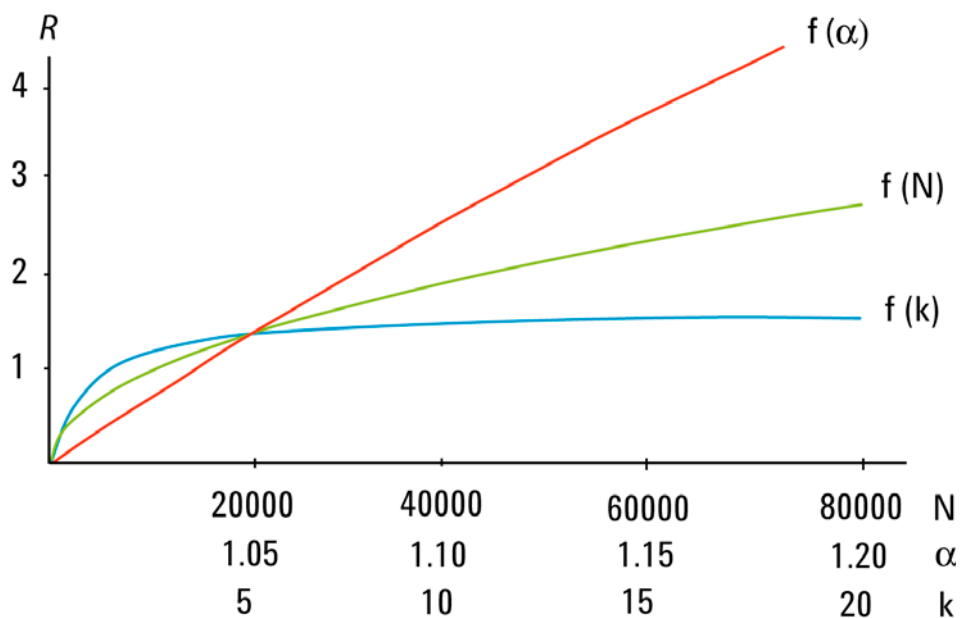


图 10 塔板数、分离因子和保留因子对 R 的影响

不论是新开发的 UHPLC 分离方法，还是直接根据现有传统方法转移的分离方法，在色谱柱规格范围内有较多固定相化学成分可选无疑是非常有利的。

Agilent 推出了 140 多种 ZORBAX 1.8 μm 快速分离高通量 (RRHT) 色谱柱 (14 种选择性可选；长 15 到 150 mm；内径 2.1、3.0 和 4.6 mm)。

除了 ZORBAX 色谱柱外，还推出了具有 9 中选择性的 PoroShell 色谱柱，适用于 Agilent 1260 Infinity 二元梯度 LC。

这样，用户便可选择最佳的固定相，从而最大限度确保了选择性。由于可以通过选择合适的色谱柱长度和直径来优化分离度、流速和分析时间，因而较长 STM 色谱柱的接受度比以前有所提高。

PoroShell 色谱柱也称为表面多孔颗粒 (SPP) 色谱柱。与完全多孔硅胶色谱柱相比，这些 SPP 色谱柱有一个实心的核 (内径 1.7 μm)，其周围有一个多孔硅胶层 (厚度 0.5 μm)。PoroShell 色谱柱的速度和分离度可与亚两微米色谱柱相媲美，但其背压比之低 50 %。PoroShell 色谱柱的较小粒径的复苏能力比以前的”薄膜型“粒子色谱柱强。此技术目前的优势是由重新引入更小粒径来驱动的，如亚三微米粒径，通常用于小分子反相分离中。

很多实验室都需要通过广泛的筛选流程来为其分离作业选择固定相、流动相和温度的最佳组合。Agilent 1200 Infinity 系列多方法开发解决方案使这个耗时的选择过程实现了完全自动化，使方法开发和方法转移任务变得简单可靠。

ZORBAX 1.8 μm RRHT 色谱柱使用和 3.5 和 5 μm 粒子填料 ZORBAX 色谱柱相同的化学成分。因此，对于任何特定的 ZORBAX 相，5.0、3.5 和 1.8 μm 颗粒均可提供相同的选择性，这样便可在传统 LC 和 UHPLC 之间实现方便、快捷且可靠的双向方法转移。

2 简介

小粒径色谱柱的优点

小粒径色谱柱的优点

更快生成色谱

缩短运行时间具有多个优点。现在，高通量实验室的生产量已有所提高，可以在更短的时间内分析更多的样品。在更短的时间内分析更多的样品还意味着可以实现更低的成本。例如，将每个样品的分析时间从 20 min 缩短至 5 min，个样品的成品就可以降低 79 %（“第 34 页的表 3”）。

表 3 700 次运行所需的时间和节约的成本

循环时间	循环 20 分钟	循环 5 分钟
运行次数	700	700
大致成本 / 分析 ¹	\$ 10.58	\$ 2.24
大致成本 / 运行 700 次 ¹	\$ 7400	\$ 1570
节约的成本	-	\$ 5830
时间 ²	10 天	2.5 天

¹ 溶剂 = \$ 27/l，废物处置 = \$ 2/l，人工 = \$ 30/小时

² 24 小时 / 天

使用 Agilent 成本计算器，您可轻松算出将传统 HPLC 改为使用 1.8 μm 粒径填料色谱柱的 UHPLC 可实现的成本节省额。您可在 Agilent Technologies 网站上获取此计算器，该网站上还提供了方法转换器 - www.chem.agilent.com。结果将以图形和表格方式提供。

运行时间更短还可实现更快的应答。这一点对于流程控制和快速签发测试是非常重要的。以前签发一个批次药物的结果就需要等候数小时，现在所有系统适用性、校准和样品分析都可在不到一个小时的时间内完成。对于使用开放式 LC/MS 系统进行化合物确认和反应控制的有机合成研究员来说，快速应答也非常重要。较短的运行时间还可大大加快方法开发流程。

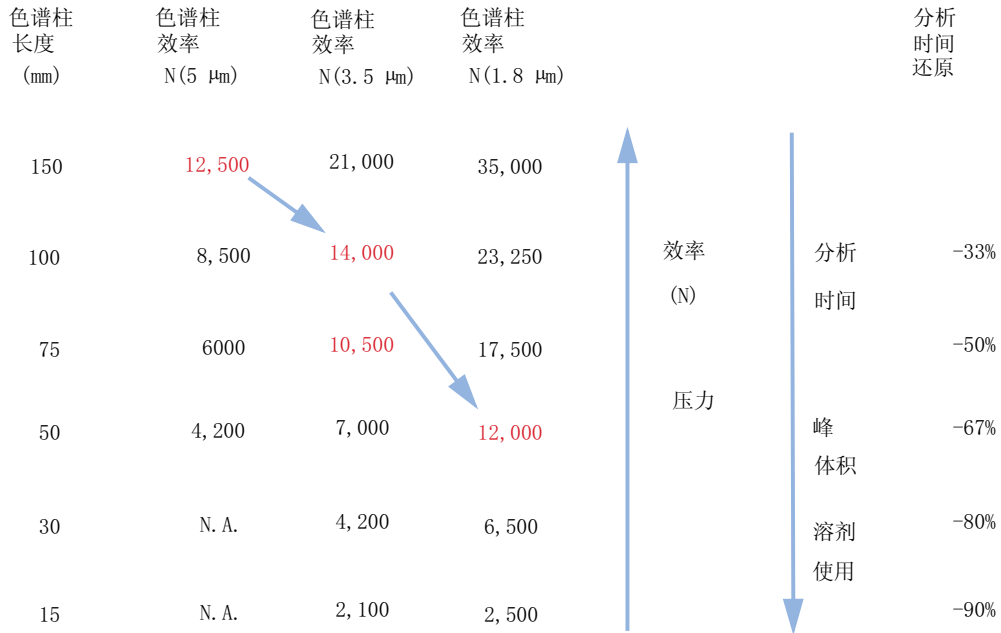


图 11 粒径、效率和分析时间之间的关系

通过优化粒径和压力，还可以缩短分析时间，而不会以牺牲色谱柱效率为代价。

2 简介

小粒径色谱柱的优点

更高分离度

使用更小颗粒填料的长色谱柱可以实现更高的效率和更高的分离度。对于代谢组学或蛋白组学中的复杂样品分析，这一点非常重要。另外，更高的分离能力对于杂质谱之类的应用也很有裨益。甚至针对生物流体中药物的 LC/MS 分析也可受益于较高的峰容量，因为这样可以减少离子抑制的干扰。总的来说，分离能力越高，分析结果的置信度便越高。

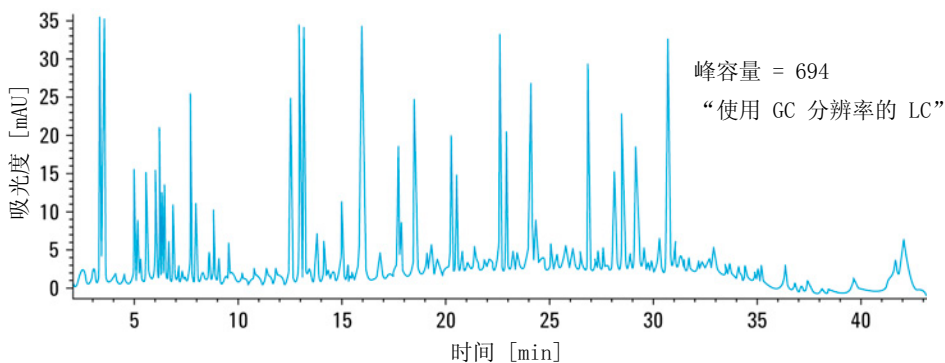


图 12 在使用 ZORBAX RRHT SB-C18 色谱柱 (2.1 x 150 mm, 1.8 μ m) 分析 BSA 的胰蛋白酶水解物时，可以达到超过 700 的峰容量

摩擦热

强迫流动相以高压力和高流速通过色谱柱时会产生热量。由此导致的温度梯度（径向和纵向）会对色谱柱的效率产生影响。

$$Power = F * p$$

其中 F 是流速，p 是压力。

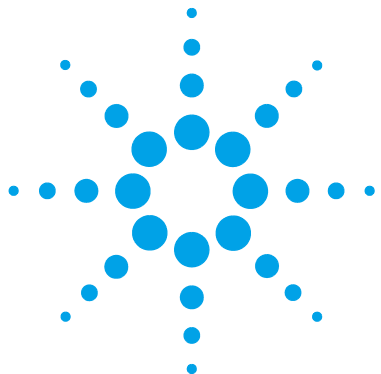
大功率的色谱柱恒温方法（如使用水浴）可产生较高的径向温度梯度，从而导致色谱柱效率大幅降低。静止空气色谱柱恒温方法可减小径向温度梯度，从而减少效率损失，但是用户必须接受较高的色谱柱出口温度。此温度升高可能会对选择性带来影响。在背压较低时，因为摩擦热导致的性能损失可以降低到最低限度，因此与相应的 2.1 mm 内径色谱柱相比，4.6 或 3 mm 内径亚两微米粒径填料色谱柱仍可实现更佳效率。

总的来说，使用亚两微米粒径填料可实现更高的效率和分离度以及更快的分离。

Agilent 1260 Infinity 二元梯度 LC 的功能将在《产品说明》一章中探讨。《优化》一章的主要内容是讨论如何应用这一理论和使用这些功能实现更好的分离。

2 简介

摩擦热



3

Agilent 1260 Infinity 的优化 二元梯度 LC

如何配置最佳延迟体积	40
延迟体积和柱外体积	40
Agilent 1260 Infinity 中的延迟体积 二元梯度 LC	42
内径为 2.1 mm 的色谱柱的最佳仪器色谱柱	43
内径为 3 和 4.6 mm 的色谱柱的最佳仪器色谱柱	45
如何获得更大的进样体积	47
如何获得更短的循环时间	48
如何获得高通量	50
如何获得最低残留量	51
如何获得更高的分离度	53
获得高分离度的最佳仪器配置	56
如何获得更高的灵敏度	60
获得高灵敏度的最佳仪器配置	61
选择流通池	63
如何防止色谱柱堵塞	65

本章介绍如何应用 LC 系统的理论和使用其功能进行更好的分离。



如何配置最佳延迟体积

延迟体积和柱外体积

延迟体积 定义为泵中混合点和色谱柱顶部之间的系统体积。

柱外体积 定义为进样点与检测点之间的体积，不包括色谱柱的体积。

延迟体积

在梯度分离中，此体积会引起泵中的混合变化和到达色谱柱的变化之间的延迟。延迟取决于系统的流速和延迟体积。实际上，这意味着在每个 HPLC 系统中，在每次运行开始时梯度轮廓图中都有一个额外的单元段。通常，根据泵的混合设置报告梯度轮廓图，并且不引用延迟体积，即使该体积将影响色谱也是如此。这种影响在流速低和柱体积小变得更为明显，并可能对梯度方法的可转移性产生较大影响。因此，快速梯度分离拥有小延迟体积很重要，尤其是经常用于质谱检测的窄孔色谱柱（如内径为 2.1 mm）。

例如，在使用 5 μm 填充材料的 HPLC 方法中，流速 1 ml/min 通常用于内径 4.6 mm 的色谱柱，约为 0.2 ml/min 用于内径 2.1 mm 的色谱柱（色谱柱中线速度相同）。在具有典型延迟体积 1000 μl 和使用 2.1 mm 色谱柱的系统中，将有初始隐藏的等度段 5 min，而在具有 600 μl 延迟体积的系统中，延迟将达到 3 min。这些延迟体积对于一或两分钟的运行时间来说太大。通过亚两微米填充，最优流速（来自范第姆特曲线）略有提高，因此快速色谱可以使用三至五倍于此的流速来产生大约一分钟的延迟时间。但是，必须减少延迟体积才能使延迟时间仅占预期运行时间的一小部分。由于泵流路的低延迟体积和自动进样器内部流路的低体积，因此可以利用 Agilent 1260 Infinity 二元梯度 LC 实现这一点。

柱外体积

柱外体积是可减少分离度的峰扩散源，因此，应将其降到最小。色谱柱的直径越小，所需的柱外体积也会相应地减小，从而确保峰扩散最小。

在液相色谱中，柱外体积取决于自动进样器、色谱柱和检测器之间的连接管以及检测器中流通池的体积。如果采用窄孔（内径为 0.12 mm）管，并且在检测器中柱温箱和最大光强流通池中采用体积较小的换热器，则可以将 Agilent 1260 Infinity 二元梯度 LC 的柱外体积降到最小。

Agilent 1260 Infinity 中的延迟体积 二元梯度 LC

“第 42 页的表 4”和“第 42 页的表 5”是构成 Agilent 1260 Infinity 二元梯度 LC 系统的系统延迟体积的组件体积的示意图。

表 4 1260 Infinity 二元梯度 LC 模块的延迟体积

组件	延迟体积 (?l)
二元泵 ¹	120
二元泵 ²	600 - 800
小体积混合器	200
混合器	400
自动进样器	270
低扩散换热器	1.6
内置换热器	3 和 6

¹ 在绕过阻尼器和混合器的低延迟体积配置下

² 在标准延迟体积配置下

表 5 1260 Infinity 二元梯度 LC 配置的延迟体积

系统配置	延迟体积 (?l)
低延迟体积配置	泵: 120 自动进样器:
中延迟体积配置	泵: 320
标准延迟体积配置	泵: 600 - 800

可使用两种方式在配置之间切换:

- 手动地断开和重新连接毛细管
- 自动, 使用 600 bar 2PS/6PT 阀 (可选)

内径为 2.1 mm 的色谱柱的最佳仪器色谱柱

低延迟体积配置可在进行超快速梯度分离时实现最短的梯度延迟

在 Agilent 1260 Infinity 二元泵的低延迟体积配置下，将绕过阻尼器和混合器，使泵延迟体积减少到约 120 μL 。“第 43 页的图 13”显示此配置的流路连接。这使超快速梯度分离的梯度延迟达到最短。为了充分利用代替了物理体积阻尼的电子阻尼控制的优势，必须在泵菜单的辅助显示屏上选择相应的“Enhanced Solvent Compressibility”功能。

要使峰扩散达到最低程度，必须安装低扩散组件（低扩散工具包 (G1316-68744)）。该套件包括内径为 0.12 mm 的短毛细管和用于柱温箱的低扩散换热器（1.6 μL 和 1.5 μL ）。要在 UV 检测器中保持分离度，应使用低体积流通池。请参阅“第 63 页的选择流通池”以了解流通池建议。

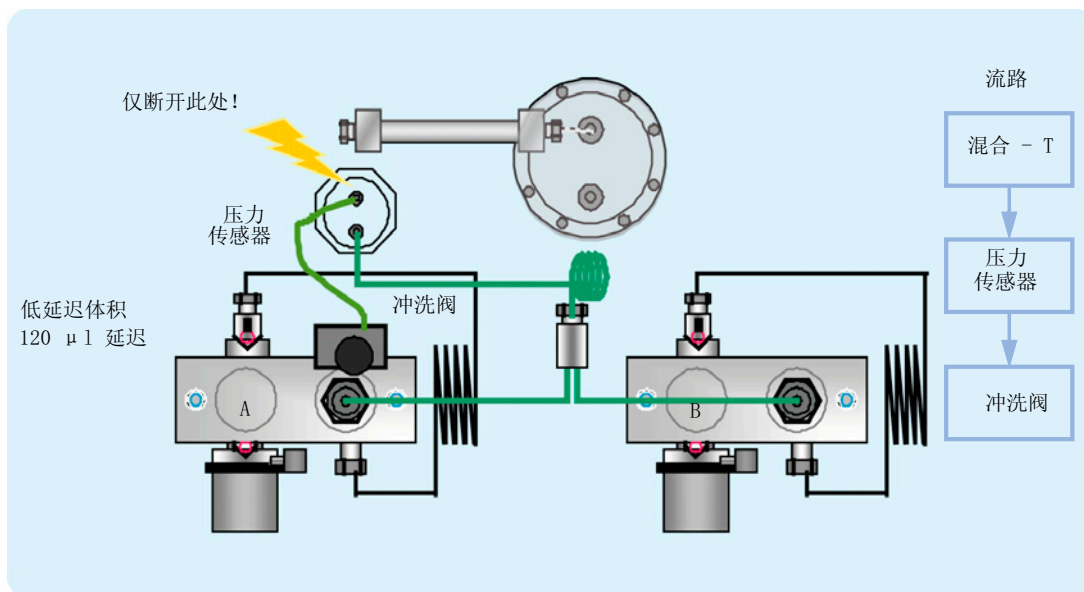


图 13 低延迟配置为内径为 2.1 mm 的色谱柱优化

必须在泵辅助显示屏中设置正确的参数，这很重要。这可确保正确的压缩值始终适用于所用的流动相。校正曲线可用于最常用的溶剂。

3 Agilent 1260 Infinity 的优化 二元梯度 LC 如何配置最佳延迟体积

中延迟体积配置为获得最高 UV 灵敏度优化

对于高灵敏度 UV 应用，可安装另一个 200 μL 混合器（低体积混合（200 μL ）（5067-1565））以降低任何残留的混合噪声。这个小混合器可在极端梯度条件下提供最低 UV 基线噪声。请参阅“第 44 页的图 14”。

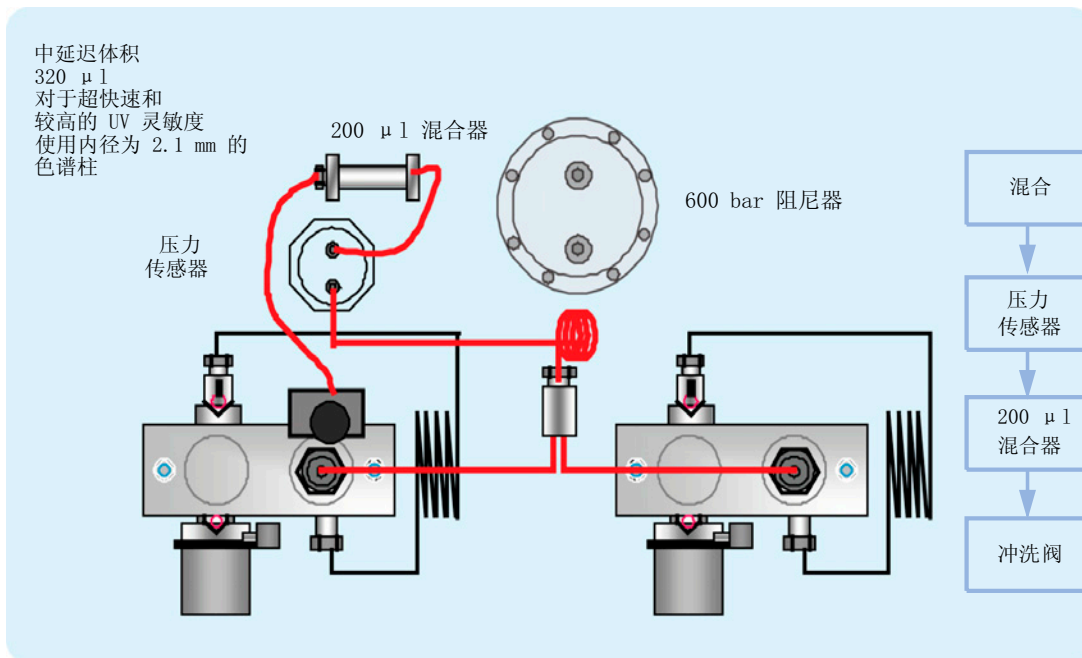


图 14 内径为 2.1 mm 的色谱柱、最高 UV 灵敏度的中延迟体积配置

内径为 3 和 4.6 mm 的色谱柱的最佳仪器色谱柱

标准延迟体积为实现最高 UV 灵敏度和直接方法可转移而优化

内径为 3 mm 和 4.6 mm 的色谱柱的相对色谱柱体积分别是长度相同的内径为 2.1 mm 的色谱柱的大约两倍和五倍，所使用的流速也较高。因此，二元泵的标准延迟体积不会造成明显较高的梯度延迟。

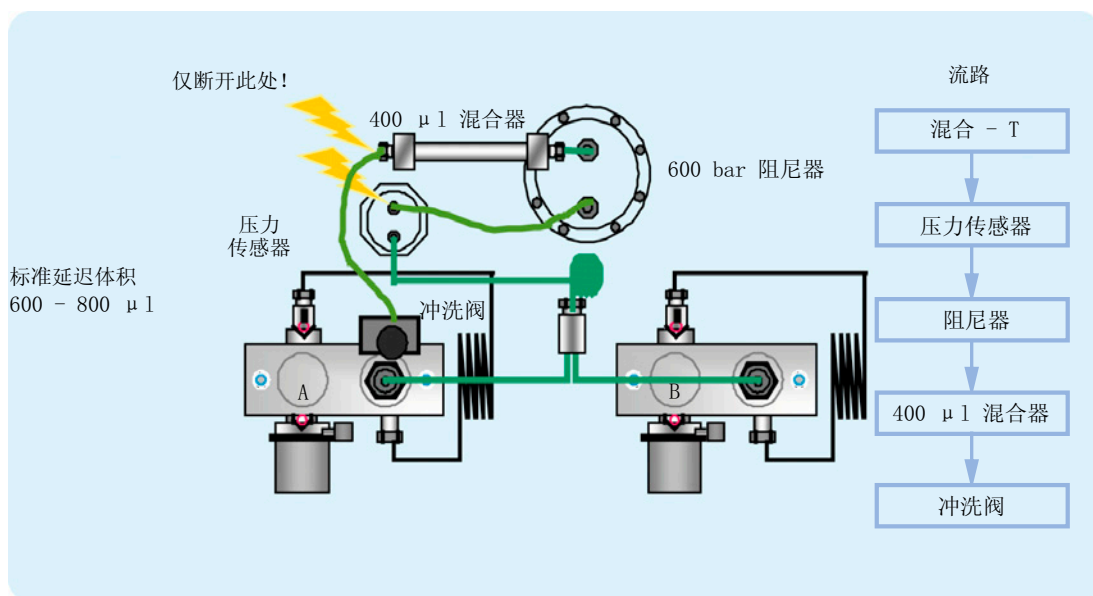


图 15 内径为 3 和 4.6 mm 的色谱柱、最高 UV 灵敏度的标准延迟体积配置

3 Agilent 1260 Infinity 的优化 二元梯度 LC

如何配置最佳延迟体积

标准延迟体积配置还可以提供从 Agilent 1100 和 1200 系列 LC 系统到 1260 Infinity 二元梯度 LC 的直接方法转换，反之亦然。图“第 46 页的图 16”显示用于分析对乙酰氨基酚和相关杂质的方法的两个叠加色谱图。该方法是从 Agilent 1200 系列 LC 系统转移到 Agilent 1260 Infinity 二元梯度 LC 的，其中色谱条件（色谱柱、流动相、泵设置、进样体积、色谱柱温度、检测器设置）保持不变。由此可见，无缝方法转移是完全可能的。

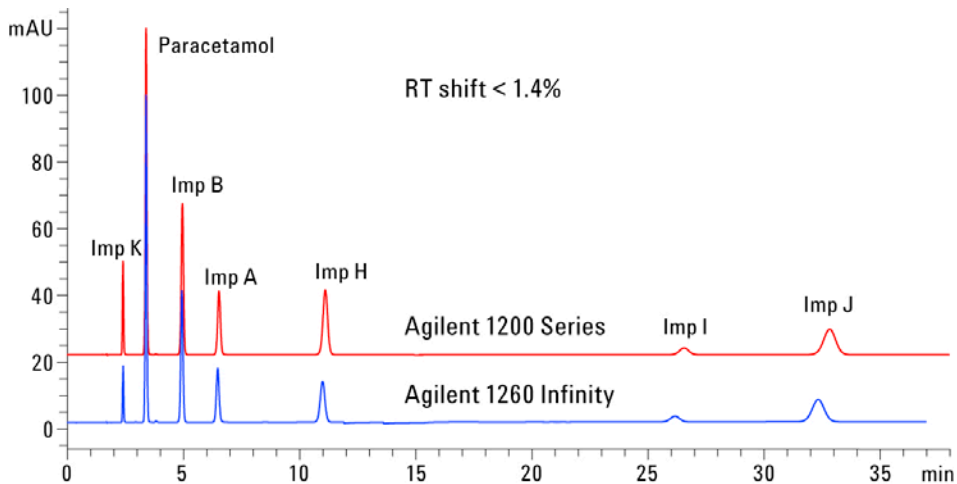


图 16 在相同配置下比较 Agilent 1200 系列和 Agilent 1260 Infinity LC 系统

如何获得更大的进样体积

在 Agilent 1260 Infinity 自动进样器的标准配置下，标准定量毛细管可注入最大体积 100 μL 。要增加进样体积，可安装 多次抽样升级工具包 (G1313-68711)。借助该组件，可以使进样器的进样体积最多增加 400 μL 或 1400 μL 。对于带 100 μL 分析头的 1260 Infinity 自动进样器，总体积就是 500 μL 或 1500 μL 。请注意，如果使用多次抽样组件中的延长针座毛细管，自动进样器的延迟体积也会增加。在计算自动进样器的延迟体积时，必须将延长毛细管的体积加倍。由自动进样器所致的系统延迟体积将相应增加。

只要方法从较大的色谱柱缩减为较小的色谱柱，方法转换就允许根据与色谱柱体积的比例来减少进样体积，以维护方法的性能。这是为了使进样体积与色谱柱体积的比例保持固定。如果进样溶剂强于（更易洗脱）起始流动相，并且任何增长都将影响分离，尤其是早期运行的峰（低保留因子），保持比例就尤其重要。某些情况下，这是峰畸变的原因，大体原则是保持进样溶剂与起始梯度组成相比相同或较弱。这对是否可以增加进样体积，或增加多少有很大影响，用户应检查增加扩散的信号（更宽或更斜的峰以及降低的峰分离度）以尝试增加进样量。如果在弱溶剂中进行进样，则可以进一步增加体积，因为结果会在梯度开始时将分析物浓缩到柱头。反之，如果进样是在比起始流动相强的溶剂中，则增加的进样体积会在梯度之前将分析物带区传到色谱柱，导致峰扩散和分离度减小。

在确定进样体积时可能主要考虑色谱柱的直径，因为这会对峰扩散产生重要影响。窄孔色谱柱峰高可以高于具有宽孔色谱柱较大进样体积的峰高，因为峰扩散更小。使用内径为 2.1 mm 的柱典型进样体积可能将范围扩大到 5 至 10 μL ，但取决于上述分析物的化学成分和流动相。在梯度分离中，维护最佳分离度和峰扩散时，可能获得约为色谱柱体积的 5 % 的进样体积。

如何获得更短的循环时间

选择灵敏度较高的短色谱柱可使循环时间变短。所使用的检测系统还决定了色谱柱尺寸。对于 UV 检测，内径为 3.0 mm 的色谱柱是理想选择，因为此时的线速度最高。如果使用内径为 4.6 mm 的色谱柱，也可获得较高的线速度，但最大流速限制为 5 mL/min。

对于内径为 4.6 mm 和 3.0 mm 的色谱柱，应在标准延迟体积配置中使用泵（请参阅“第 43 页的图 13”）。对于内径为 2.1 mm 的色谱柱，应使用低延迟体积配置。此外，在使用内径为 2.1 mm 的色谱柱时，应安装低扩散组件以提供最低的柱外体积。要获得最高 UV 灵敏度，建议使用短混合器（低体积混合（200 μ L）（5067-1565））。

色谱条件非常依赖于将要分析的化合物，但可使用某些经验来获得较短的运行时间：

- 流速应尽可能高，这取决于所需的分离度、背压和所使用的检测系统。
- 应使用较陡的梯度。
- 建议使用高色谱柱温度，这样可以使用高流速，并进一步缩短运行时间。可在最高 90 °C，低 pH 条件下使用 Zorbax SB 色谱柱。

交替柱再生

将柱再生阀和再生泵结合使用，可获得更短的循环时间。如果使用此设置，可在第二个色谱柱上进行分析时对先前使用的色谱柱进行再生。这可以极大缩短循环时间。

使用两个色谱柱、两个泵和一个 2 位 10 端口阀可以在这些色谱柱之间切换，使进样到进样的循环时间达到最短。通常，化学成分相同、批次相同的色谱柱提供的保留时间精度允许使用相同的校正表进行数据处理。

有关交替柱再生的更多详细说明，请参阅《阀系统用户指南》。

自动减少延迟体积 (ADVR)

Agilent 1260 Infinity 高性能自动进样器可以执行重叠进样 (OI) 和 / 或自动延迟体积减少 (ADVR)。这意味着在样品达到色谱柱顶端后, 进样阀将从流路中切换出去。这样可明显减少延迟体积, 请参阅“第 49 页的图 17”。

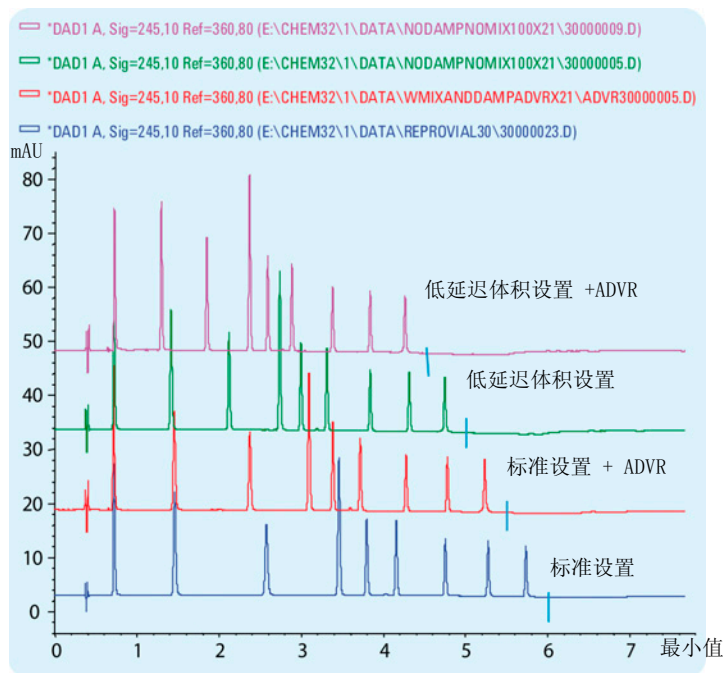


图 17 减少延迟体积

流速越低, 延迟体积的负面影响就越大。在“第 49 页的图 17”中, 在流速为 0.6 mL/min 的条件下使用内径为 2.1 mm 的色谱柱。延迟体积从位置最低的图到位置最高的图逐步减少。对总运行时间的影响, 尤其是对第一个峰的峰宽和峰高的影响很明显。

重叠进样和自动减少延迟体积的缺点是自动进样器在整个运行时间内不在流路中。对于粘性很大的化合物, 这会导致较高的残留量和 / 或化合物歧视。

残留量是保留在仪器部件中能够接触到样品并且不会被冲洗到色谱柱上以进行分析的化合物的百分比。这也意味着在定量测量中将失去此百分比; 它将被歧视。可通过在样品运行完成后注入纯溶剂来测量残留量。如果分析物化合物是非极性的, 并且梯度的开始部分包含高比例的水, 歧视和残留量将变得非常重要。在最

3 Agilent 1260 Infinity 的优化 二元梯度 LC 如何获得更短的循环时间

差情况下，非极性化合物将在接触面沉淀。在样品塞前后加入溶剂段，如二甲亚砜，有助于减少此问题。

对于重叠进样或自动减少延迟体积，可使用冲洗因子将进样阀切换到绕过模式之前的时间增加到 20。这将延长使用流动相冲洗自动进样器延迟体积的时间。

如何获得高通量

可对进样进行优化以提高速度，但要记住，抽取样品过快可能会降低重现性。此时将获得微小的收益，因为所使用的样品体积在任何情况下都趋向于体积范围较小的一侧。大部分进样时间用在进样针往返于样品瓶以及移到冲洗端口中。这些操作可在前一次分离运行时执行。这种进样模式称为“重叠进样”，通过化学工作站控制软件的自动进样器设置屏幕，可方便地开启此进样模式。可以通知自动进样器在完成进样之后，将经过自动进样器的流体切换到旁路，然后（举例来说）在 3 分钟之后启动一个 4 分钟的运行，以开始吸入下一个样品并准备进样。这样，每次进样通常可节省 0.5 至 1 分钟。

如何获得最低残留量

当来自先前的进样样品的残峰出现在后面的空白溶剂进样中时将测量残留量。进样之间如果存在残留物，这会导致一错误结果。残留量的级别报告为空白溶液中峰的面积，所占先前进样中峰面积的百分比。通过对流路进行精心设计，以及使用能够将样品吸附率降至最低的材料，可对 Agilent 1260 Infinity 自动进样器进行优化，使残留量降至最低。即使使用三重四极杆质谱仪作为检测器，残留量也会达到 0.002 %。用户可使用自动进样器的操作设置来设置适当的参数，对于包含易于粘到系统中的化合物的应用，也可将残留物降至最低。

可使用自动进样器的以下功能将残留量降至最低：

- 内部洗针
- 外部洗针
- 针座反冲
- 进样阀清洗

流路（包括针内部）将在正常操作期间持续冲洗，在大多数情况下，这可以有效地去除残留物。自动减少延迟体积（ADVR）将会减少延迟体积，但同时也会减少自动进样器的冲洗，因此，不应用于会产生残留物的分析物。

要确保残留量达到最低级别，应考虑以下建议：

- 始终将自动进样器的进样阀处于主流路位置。
- 使用冲洗口，使用适当的溶剂冲洗针外部。冲洗时间最少为 10 s。
- 如果可能，将抽取速度降至 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。
- 使用 Agilent 带盖的 2 mL 样品瓶（螺旋盖样品瓶，2 mL (5182-0556)）。
- 如果针座被污染，可使用适当的针座冲洗过程。
- 使用能够溶解样品化合物的冲洗溶剂。
- 对碱性化合物使用酸性流动相。

3 Agilent 1260 Infinity 的优化 二元梯度 LC 如何获得最低残留量

冲洗和清洗自动进样器以使残留量接近零

在进样过程中，样品定量管、针内部、针座毛细管和进样阀的主要通道都在流路中，并在整个运行期间保持在该位置中。这意味着在整个分析期间，将使用流动相持续冲洗这些部件。只有在注入样品期间，进样阀才会切换出流路。在该位置中，泵流出物被直接导入色谱柱中。在进样前，使用新鲜溶剂清洗针的外表面。可使用自动进样器的冲洗口进行此操作，这样可避免污染针座。可通过在自动进样器中的蠕动泵使用新鲜溶剂重新加入自动进样器的冲洗口。冲洗口的体积约为 680 μL ，泵的流速为 6 mL/min。将清洗时间设置为 10 s，这意味着使用新鲜溶剂多次重新加入冲洗口体积，在大多数情况下，这对清洗针外部来说已足够了。

如何获得更高的分离度

分离中增大分离度将改善定性和定量数据分析，以便分离更多峰，或进一步提高分离速度。本节介绍如何通过检查以下几个要点来提高分离度：

- 优化选择性
- 较小的粒径填料
- 较长的色谱柱
- 较浅的梯度，较快的流速
- 最小柱外体积
- 优化进样溶剂和体积
- 足够快的数据采集速率

两个峰之间的分离度由分离度方程式描述：

$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} \frac{(\alpha - 1)(k_2 + 1)}{\alpha k_2}$$

其中

- R_s = 分离度，
- N = 塔板数（色谱柱效率的度量），
- α = 选择性（两个峰之间），
- k_2 = 第二个峰的保留因子（以前称为容量因子）。

对分离度的影响最显著的项是选择性 α ，实际上，改变此项将涉及更改固定相（C18、C8、苯基、腈等）的类型、流动相以及温度，这样才能使要分离的溶质之间的选择性差别最大化。这是一项繁重的工作，最好由自动方法开发系统来完成，该系统可以按一定的筛选顺序来评估不同色谱柱和流动相的各种条件。本节讨论如何使用任何选定的固定相和流动相来获得更高分离度。如果决定使用了自动方法开发系统，则在方法开发中可能使用短色谱柱来进行快速分析。

分离度方程式显示的第二个有影响显著的项是塔板数或效率 N ，可使用多种方法对其进行优化。 N 与粒径成反比，与色谱柱长度成正比，所以，较小粒径和较长色谱柱将获得较高的塔板数。压力与粒径平方成反比，与色谱柱长度成正比。分离度随着 N 的平方根的增大而增大，所以，将色谱柱长度加倍将使分离度增加 1.4 倍。所获得的结果取决于流动相的粘度，因为这与压力直接相关。甲醇混

3 Agilent 1260 Infinity 的优化 二元梯度 LC

如何获得更高的分离度

合物产生的背压比乙腈混合物高。通常使用乙腈，因为峰形更好，峰更窄，并且粘度较低，但甲醇通常能够产生更好的选择性（对于小于约 500 Da 的小分子确实是这样）。可通过提高温度来减小粘度，但应注意，这会改变分离度的选择性。试验将表明这会导致选择性增大还是减小。随着流速和压力的增大，要注意的是，色谱柱内部的摩擦热也会增加。这会导致扩散轻微增加，以及选择性发生细微变化，这两个情况可通过分离度下降看出来。对于后一种情况，可通过将柱温箱的温度降低几度来进行补偿，试验将再次表明结果。

范第姆特曲线表明通过 STM 柱的最佳流速比较大粒子高，随着流速的增大，曲线将变得很平。通常，STM 柱的接近最佳状态的流速是：对于内径为 4.6 mm 的色谱柱是 2 ml/min；对于内径为 2.1 mm 的色谱柱是 0.4 ml/min。

在等度分离中，增大保留因子 k 可获得更好的分离度，因为溶质保留的时间更长。在梯度分离中，保留因子由下列方程式中的 k^* 表示：

$$k^* = \frac{t_G}{\Delta\%B} \cdot \frac{F}{V_m} \cdot \frac{100}{S}$$

其中：

- $k^* = k$ 均值，
- t_G = 梯度（或梯度短）的时间长度（min）。
- F = 流速（ml/min），
- V_m = 色谱柱延迟体积，
- $D\%B$ = 在梯度变化期间溶剂 B 的变化率，
- S = 常数（对于小分子约为 4-5）。

这表明，使用较浅的梯度（原则上从 2 变为 5 %/min）、较高的流速和体积较小的色谱柱可增大 K ，从而增大分离度。此方程式还表明如何提高现有梯度的速度 - 如果流速加倍，但梯度时间减半， k^* 将保持恒定，分离度看上去是相同的，但发生时间减半了。

柱外体积的减少将会减少扩散，使分离度更高。在安装了窄孔（内径为 0.12 mm）毛细管（检查以确保在色谱柱和检测器之间使用最短长度）和最大光强流通池的 1260 Infinity 二元梯度 LC 中已进行了优化。

最后，必须使用足够快的数据收集速率来准确绘制窄峰的轮廓图，从而保持较高的分离度。

总之，在提高分离度时应考虑以下步骤：

- 提高分离度的第一步始终是测试不同的固定相，以选择具有最佳分离度的色谱柱。这是对分离度最重要的参数。
- 第二步是使用长色谱柱或甚至联用柱来增加塔板数。
- 第三步是将峰移到较高的保留因子。如果 k 值为 5 至 10，影响将很明显。 k 值越高，对分离度影响 65 效果就越低。

实际上，这意味着使用具有适当选择性的较长色谱柱将会获得更高分离度。

获得高分离度的最佳仪器配置

柱温箱

可对内径为 4.6 mm 的色谱柱使用柱温箱的标准配置。如果流速超过 2 mL/min，温度超过 60 °C，可通过使用柱温箱中的 1.5 μ L 冷却器 / 加热器将色谱柱流出液体冷却到检测器的温度。这可确保 UV 检测器的噪声级别达到最低，即使是在 5 mL/min 和 80 °C 条件下（请参阅“第 56 页的图 18”）。

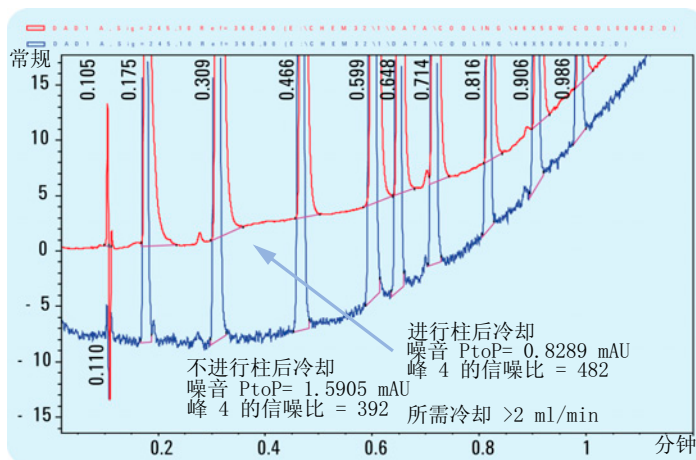


图 18 柱后冷却 (PCC) 对基线噪声的影响

如果在低流速条件下使用内径为 2.1 mm 的色谱柱，应使用小加热装置来获得最低柱外体积。

柱外体积

要保持在色谱柱上获得的高分离度，柱外体积（尤其是柱后）应尽可能低。

- 对于内径为 4.6 mm 的色谱柱，应对泵使用标准延迟配置，请参阅“第 45 页的图 15”。
- 对于内径为 2.1 mm 的色谱柱，应对泵使用低延迟配置，并在柱温箱中安装低扩散组件。要获得最高 UV 灵敏度，还建议使用短混合器。请参阅“第 43 页的图 13”和“第 44 页的图 14”。
- 进样体积也很重要，尤其是在样品能够在有机溶剂中溶解时。在这种情况下，梯度应从低百分比的有机相开始，以聚焦柱头的化合物。这可以避免由于进样造成的峰扩散。
- 10 mm 最大光强流通池的扩散体积较低（s 体积 1.0 μL ），不需要进一步优化体积。
- 在备用 60 mm 最大光强高灵敏度池用于获取更高灵敏度的情况下，优化流通池体积以将其用于内径为 3 mm 和 4.6 mm 的色谱柱。

3 Agilent 1260 Infinity 的优化 二元梯度 LC 如何获得更高的分离度

数据采集速率

必须选择适当的 UV 检测器的数据采集速率设置。如果选择的数据采集速率太低，则会导致峰宽增大，分离度降低，请参阅“第 58 页的图 19”。

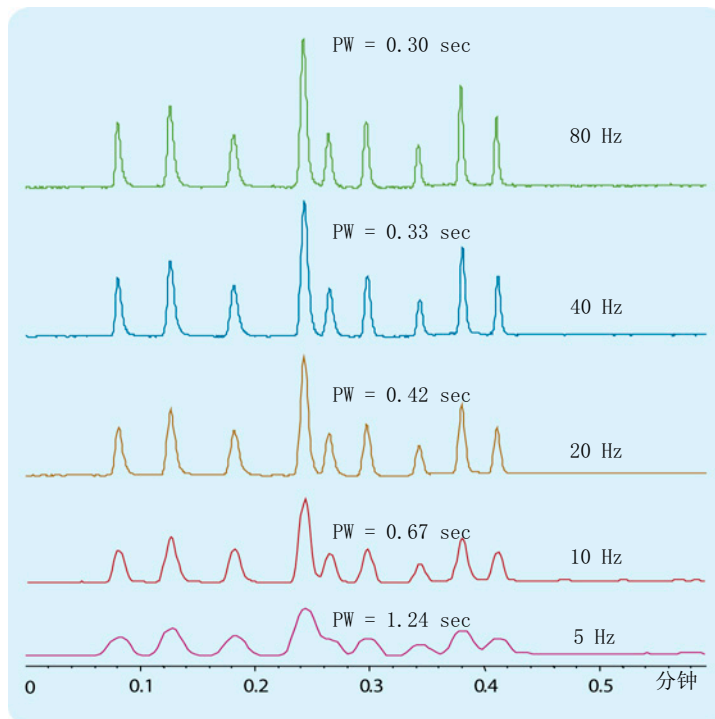


图 19 峰宽与 UV 数据采集速率的关系

“第 59 页的表 6”显示峰宽、分离度和峰容量和数据采集速率的相互关系。对于快速和超快速 LC，需要较高的数据采集速率；否则，在色谱柱上获得的分离度将在检测器中被破坏。

表 6 数据采集速率与色谱性能之间的关系

数据采集速率	峰宽	分离度	峰容量
80 Hz	0.300	2.25	60
40 Hz	0.329	2.05	55
20 Hz	0.416	1.71	45
10 Hz	0.666	1.17	29
5 Hz	1.236	0.67	16

与数据采集速率 20 Hz 相比，数据采集速率 80 Hz 将产生以下改进：

- 峰宽：
 - 30 %
- 分离度：
 - + 30 %
- 峰容量：
 - + 40 %
- 明显的柱效：
 - + 70 %

色谱条件

如以前提到的，色谱条件取决于要分析的化合物。但也存在某些经验。

- 应使用中等流速，但最新试验表明，提高的流速也可获得提高的分离度。对于填充了亚两微米粒子的内径为 4.6 mm 的色谱柱，建议使用 2 mL/min 作为起始值。对于内径为 2.1 mm 的亚两微米色谱柱，0.4 mL/min 是一个良好的起点。
- 应使用中等梯度，例如，每分钟梯度变化 2 - 5 %。
- 色谱柱温度是进行优化的另一个参数。温度会影响分离度，不能忽视。

3 Agilent 1260 Infinity 的优化 二元梯度 LC 如何获得更高的灵敏度

如何获得更高的灵敏度

分离方法的灵敏度与固定相和流动相的选择相关，因为需要具有窄峰的较高分离度，以及噪声最小的稳定基线。仪器配置的选择有一定的影响，主要影响是检测器的设置。

获得高灵敏度的最佳仪器配置

一般条件

- 要获得最低基线噪声，建议对 1260 Infinity 二元泵使用标准延迟体积配置。
- 此外，进样体积和溶解样品的溶剂也很重要。必须注意，为了避免进样引起峰扩散，应使化合物聚集在色谱柱的顶部，否则会导致峰高下降。为了达到这个目的，样品应溶解在洗脱强度比流动相低的溶剂组分中。
- 色谱柱温度不能太低，以避免峰在色谱柱上保留过长。这也会造成峰扩散和峰高下降。
- 应根据实际峰宽选择 UV 检测器的数据采集速率。避免使数据采集速率高于所需的速率，因为这会造成噪声级别升高。
- 可用的 UV 检测器是 Agilent 1260 Infinity 二极管阵列检测器 (G4212B) 和 Agilent 1260 Infinity 可变波长检测器 (G1314F)，数据采集速率为 80 Hz，噪声和漂移级别明显降低。
- “第 63 页的选择流通池” 显示可用于 G4212B DAD 的流通池概况。有关适用于 G1314F VWD 的流通池的信息，请参阅《Agilent 1260 Infinity 可变波长检测器用户手册》。

色谱条件

要获得最佳信噪比，最好是峰能够快速洗脱。

- 应使用提高的流速，以便在 k' 值较低的情况下洗脱峰。
- 应使用快速梯度，以便在 k' 值较低的情况下洗脱峰。

3 Agilent 1260 Infinity 的优化 二元梯度 LC 如何获得更高的灵敏度

色谱柱

灵敏度指定为信噪比 (S/N)，因此需要使峰高最大化，使基线噪声最小化。降低峰扩散有助于保持峰高，因此应使用短的窄内径连接毛细管并正确安装接头，以将柱外体积减至最小。使用内径较小的色谱柱会使峰高变高，因此，对于样品量有限的应用，这是理想的色谱柱。如果在内径更小的色谱柱中注入相同的样品量，则由于色谱柱直径导致的稀释将会降低，灵敏度将会提高。例如，如果将色谱柱内径从 4.6 mm 减小到 2.1 mm，由于色谱柱中的稀释降低了，从理论上说，峰高将增加 4.7 times。对于质谱仪检测器，窄色谱柱的流速降低，会导致电离效率提高，从而使灵敏度提高。

检测器设置

检测器有许多可用于优化性能的参数。以下各节介绍检测器参数如何影响性能特性：

- 流通池影响灵敏度，
- 波长和带宽影响灵敏度、选择性和线性，
- 狭缝宽度影响灵敏度、光谱分辨率和线性，
- 峰宽影响灵敏度和分离度。

选择流通池

多款最大光强滤芯流通池可用，请参阅（“第 63 页的表 7”）。

表 7 最大光强滤芯流通池的指标

滤芯池	<ul style="list-style-type: none"> • 最大光强滤芯池（10 mm, V(s) 1.0 μL）(G4212-60008) • 最大光强滤芯池生物惰性（10 mm, V(s) 1.0 μL）(G5615-60018) • 最大光强滤芯池（60 mm, V(s) 4.0 μL）(G4212-60007) • 最大光强滤芯池生物惰性（60 mm, V(s) 4.0 μL）(G5615-60017) • HDR 最大光强滤芯池（3.7 mm, V(s) 0.4 μL）(G4212-60032) • ULD 最大光强滤芯池（10 mm, V(s) 0.6 μL）(G4212-60038) • 最大光强滤芯测试池（G4212-60011）
最大压力	70 bar (1015 psi) 最大操作压力 (MOP) ¹ 150 bar (2175 psi) 最大偶然压力 (MIP) ²
pH 值范围	1.0-12.5（具体取决于溶剂）

¹ 最大操作压力 (MOP)：在普通条件下，系统能够连续操作的最大压力。

² 最大偶然压力 (MIP)：系统在短时间里能够承受的最大压力。

一般应用

最大光强滤芯池（10 mm, V(s) 1.0 μL）(G4212-60008) 应用范围很广：

- 所有色谱柱的直径最小为 2.1 mm ID 甚至更小
- 应用峰扩散（峰宽 x 流量）下至 ~2 μL [例如：峰宽 = 0.04 min 流量 = 0.1 mL/min 提供峰扩散 0.04 min x 0.1 mL/min = 0.004 mL = 4 μL]

高灵敏度

如果需要高灵敏度，可以使用 最大光强滤芯池（60 mm, V(s) 4.0 μL）(G4212-60007)。此池通过降低检测极限 (LOD) 约 3 倍（具体取决于应用情况）来提高检测器的性能。

3 Agilent 1260 Infinity 的优化 二元梯度 LC

如何获得更高的灵敏度

超低扩散

最大光强滤芯 ULD 池可与 G4212A DAD 和 G4212B DAD 结合使用。超低扩散组件解决方案需要该池，该解决方案当前作为 1290 Infinity 超低扩散组件 (5067-5189) 存在。该池必须是超低扩散解决方案的一部分。

高动态范围

最大光强滤芯 HDR 池可与 G4212A DAD 和 G4212B DAD 结合使用。高动态范围 (HDR) 解决方案需要该池，该解决方案将于 2013 年 3/4 月引入。

注意

要避免流通池超压（如在具有 LC/MS 的系统中），可安装 内置压力安全阀工具包 (G4212-68001)，请参阅《Agilent 1200 Infinity 系列二极管阵列检测器》手册。

如何防止色谱柱堵塞

亚两微米粒径填料色谱柱也需要使用小孔径过滤芯，以防止填料被冲洗掉。这将直接导致这些过滤芯被以下三个来源中的微粒堵塞的危险增加：样品、流动相和 / 或仪器自身。要保护色谱柱，可在色谱柱前部使用小过滤器（“第 66 页的图 20”）。还建议对样品进行彻底过滤和 / 或离心处理，并避免流动相中有任何类型的颗粒物。

为了实现最佳的结果，请遵循这些简单的使用原则：

- 1 必须按色谱柱上标明的流动方向安装和运行色谱柱。
- 2 仅使用高质量、色谱级的溶剂。
- 3 在所有缓冲液和所有样品使用之前，都使用相应的 0.2 μm 过滤器过滤。
- 4 每 24 - 48 h 更换一次流动相缓冲液瓶 — 不要向瓶中添加流动相；始终使用新瓶。
- 5 不要将高浓度缓冲盐流动相 (> 50 mM) 与高浓度乙腈一起使用，因为可能出现沉淀。
- 6 建议使用在线过滤器滤除微粒，延长色谱柱使用寿命。对色谱柱使用合适的 1260 Infinity 在线过滤器：1260 Infinity LC 在线过滤器，2.1 mm，0.2 μm 孔径过滤器，最大 600 bar，连接毛细管 70 x 0.12 mm SS (5067-1551) 用于内径为 2.1 mm 的色谱柱，1260 Infinity LC 在线过滤器，4.6 mm，0.2 μm 孔径过滤器，最大 600 bar，连接毛细管 90 x 0.17 mm SS (5067-1553) 用于内径为 4.6 mm 或 3.0 mm 的色谱柱。压力增加 10 % 时更换过滤器。
- 7 冲洗泵中（直至色谱柱处的线路）任何包含流动相的缓冲液，在色谱柱连接到仪器之前使用 5 mL 的溶剂冲洗。
- 8 使用兼容的流动相冲洗色谱柱，开始时速度要慢，对于内径为 2.1 mm 的色谱柱，流速为 0.1 mL/min，对于内径为 3.0 mm 的色谱柱，流速为 0.2 mL/min，对于内径为 4.6 mm 的色谱柱，流速为 0.4 mL/min。在 5 分钟后提高流速以达到理想的流量。
- 9 压力稳定之后，将色谱柱连接到检测器。
- 10 在使用色谱柱和检测器之前使用 10 个色谱柱体积的流动相使此二者达到平衡。（1 - 5 mL，取决于色谱柱大小。）
- 11 避免压力过高。在开始任何序列之前，检查梯度的压力范围，该范围可能是 100 - 130 bar 或以上。

3 Agilent 1260 Infinity 的优化 二元梯度 LC 如何防止色谱柱堵塞

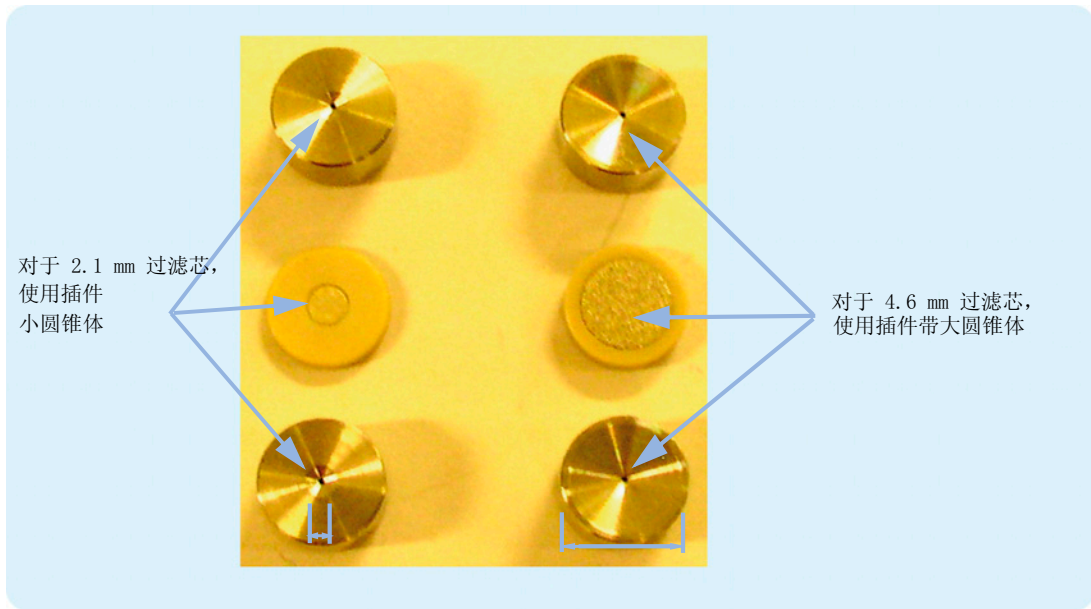
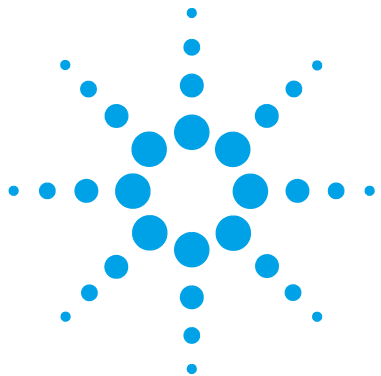


图 20 内径为 4.6 和 2.1 mm 的色谱柱的保护，填充了 $1.8 \mu\text{m}$ 粒子，进样口过滤芯孔径为 $0.2 \mu\text{m}$



4 系统设置和安装

安装软件	68
安装模块	70
安装系统模块	70
集成到网络	70
流路中的毛细管和管线连接	71
灌注系统	76

本章介绍有关软件安装、模块安装和准备系统进行操作的信息。



安装软件

安装软件控制器和数据系统

有关软件安装程序的详细信息，请参阅检测器手册和软件手册。

安装 Agilent 实验室监控与诊断软件

有关 Agilent 实验室监控与诊断软件安装程序的详细信息，请参阅 Lab Advisor DVD 上的软件文档。

Agilent 实验室监控与诊断软件取代并拓展了之前仅在化学工作站软件上提供的诊断功能。

Agilent 实验室监控与诊断软件是基于 Windows 的应用程序，可以持续、实时地监视实验室中的仪器，并通过使用高级计数器来自动通知维护和保养需要，从而可提高实验室的生产率。这样便可在问题影响到结果之前就将其解决。该软件包括一个内有用户信息和文档的全面套件，一组计算器和可帮助设置、校正和维护仪器的工具，以及用于验证性能是否正常的测试和诊断程序。Agilent 实验室监控与诊断软件还可为任何可能发生的仪器错误提供反馈和解决方案。该软件可不配和 Agilent 数据系统均可。

该软件可监测：

- LC 模块的状态
- 早期维护反馈（确定是否需要升级或更换）

另外，此软件还可：

- 自动进行有用测试，
- 尝试识别已打开电源且连接至 PC 或实验室网络中的基于 LAN 的支持仪器，
- 为一些常见仪器问题自动建议零件更换和故障排除任务。

安装模块

安装系统模块

有关模块安装程序的详细信息，请参见各模块的手册。这些手册还包含有关规格、维护和零件的信息。

集成到网络

有关系统的网络集成，请参见相应模块的用户手册（《LAN 配置》一章）。

流路中的毛细管和管线连接

根据系统配置，可使用长度和直径不同的毛细管。下文介绍了这些毛细管。
有关模块内部毛细管和管线的连接，请参阅模块手册。

4 系统设置和安装

安装模块

标准延迟体积配置的连接

“第 72 页的图 21”显示 1260 Infinity 二元梯度 LC 的标准延迟体积配置的流路中毛细管和管线的连接。

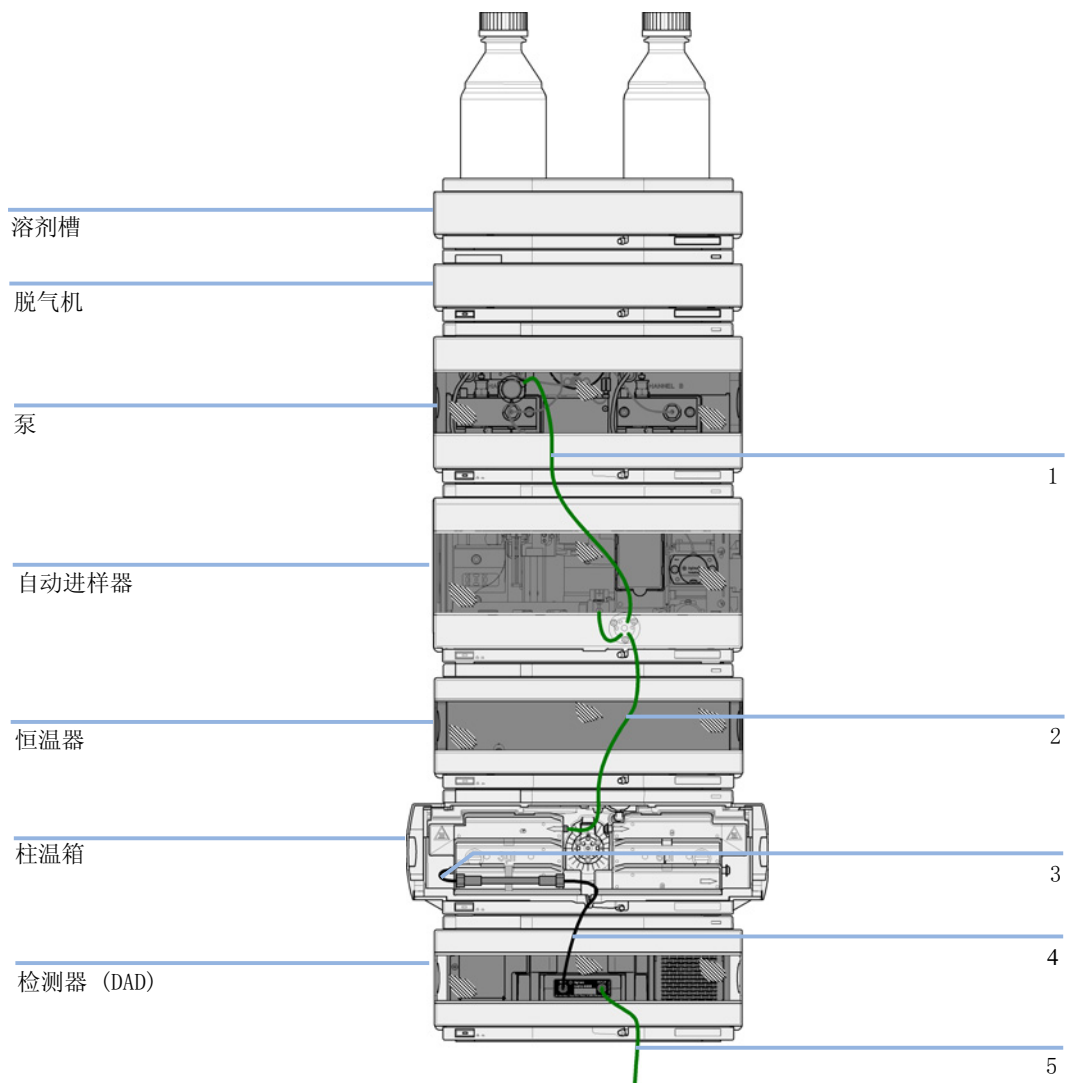


图 21 流路中的毛细管和管线连接（标准延迟体积配置）

Item	部件号	说明
1	G1312-87303	毛细管 ST 0.17 mm x 400 mm S/S (泵连接至自动进样器)
1	G1312-87304	毛细管 ST 0.17 mm x 700 mm S/S (泵连接至冷却的自动进样器)
2	G1367-87304	毛细管 ST 0.17 mm x 250 mm S/S (自动进样器连接至 TCC)
2	01090-87306	毛细管 ST 0.17 mm x 380 mm S/S (冷却的自动进样器连接至 TCC)
3	G1316-87300	毛细管 ST 0.17 x 90 mm S/S (TCC 连接至色谱柱)
4	G1315-87311	毛细管 ST 0.17 mm x 380 mm S/S (色谱柱连接至 DAD)
5	5062-2462	管 PTFE 0.8 mm x 2 m, 再订购 5 m (DAD 连接至废液瓶)
5	5062-8535	废液附件工具箱 (VWD 连接至废液瓶)

4 系统设置和安装

安装模块

中和低延迟体积配置的连接

“第 74 页的图 22”显示 1260 Infinity 二元梯度 LC 的中和低延迟体积配置的流路中毛细管和管线的连接。

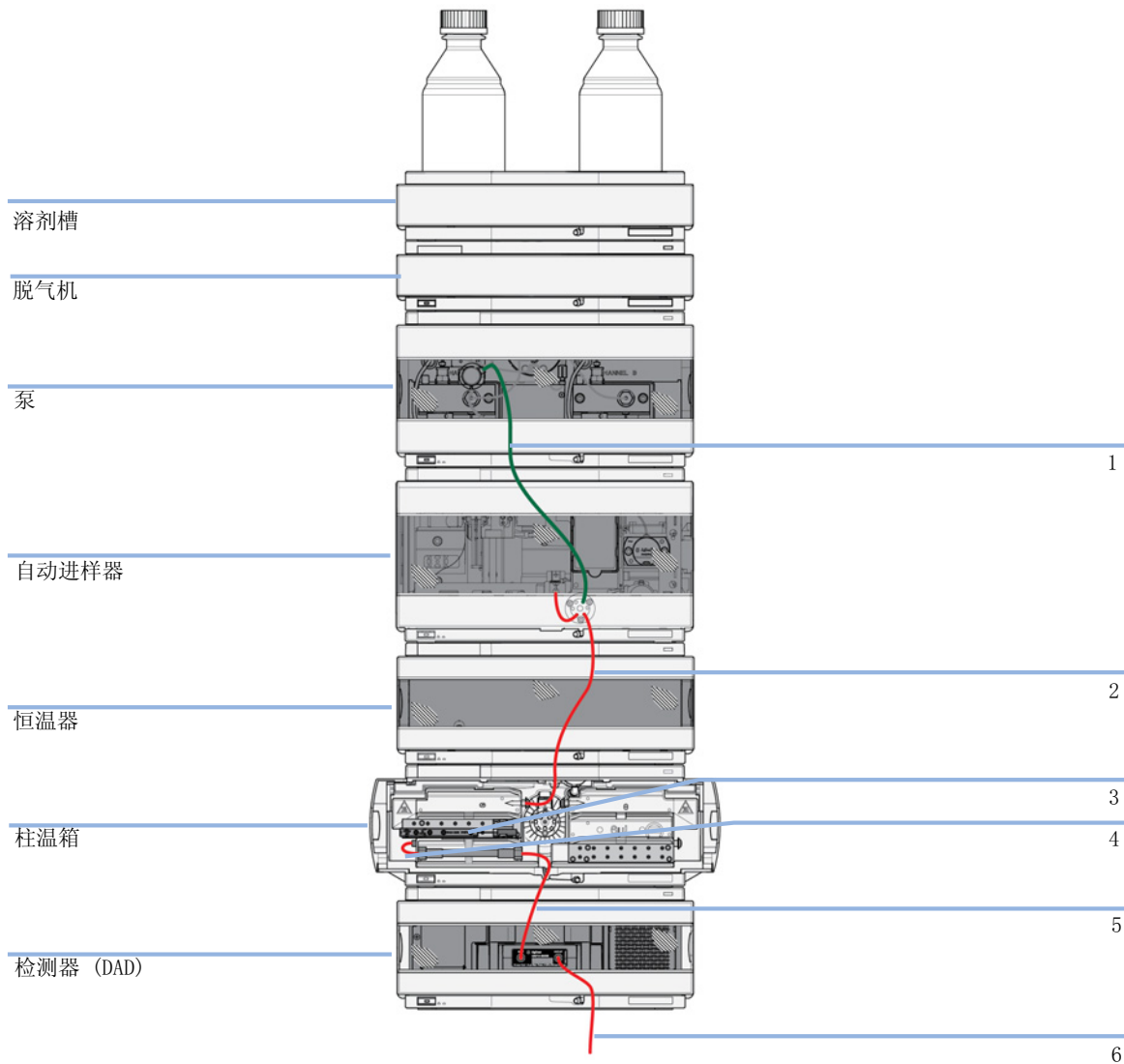


图 22 流路中的毛细管和管线连接（中和低延迟体积配置）

Item	部件号	说明
1	G1312-87303	毛细管 ST 0.17 mm x 400 mm S/S (泵连接至自动进样器)
1	G1312-87304	毛细管 ST 0.17 mm x 700 mm S/S (泵连接至冷却的自动进样器)
2	G1313-87304	毛细管 ST 0.12 mm x 180 mm S/S (自动进样器连接至 TCC)
2	01090-87610	毛细管 ST 0.12 mm x 280 mm S/S (冷却的自动进样器连接至 TCC 或第 3 项, 如果已安装)
3	G1316-80002	加热器前 (0.12 mm 内径, 1.6 µL 内部体积)
3	G1316-80003	长型下方加热器 (内径 0.12 mm, 内部体积 1.6 µL)
4	01090-87611	毛细管 ST 0.12 mm x 105 mm S/S (TCC 连接至色谱柱, 如果安装了第 3 项, 则不需要)
5	G1315-87312	毛细管 ST 0.12 mm x 150 mm S/S (色谱柱连接至 DAD)
6	5062-2462	管 PTFE 0.8 mm x 2 m, 再订购 5 m (DAD 连接至废液瓶)

灌注系统

初始灌注

当： 在使用脱气机或溶剂管之前，必须灌注系统。建议使用异丙醇作为灌注溶剂，因为它可与几乎所有 HPLC 溶剂互混合并且具有极佳的湿润性。

所需的部件：

编号	说明
1	异丙醇

所需的准备： 按照相应部件手册中所述的步骤以液流方式连接所有部件。
将 100 mL 异丙醇注入每个溶剂瓶
启动系统

警告

打开毛细管或管接头时，溶剂可能会泄漏出来。

操作有毒和有害的溶剂和试剂可能会危害健康。

→ 处理时，尤其是处理有毒或有害溶剂时，请严格遵循溶剂供销商所提供的资料和安全规程（如，戴上护目镜，安全手套，穿上防护衣）进行处理。

注意

实验室监控与诊断软件的冲洗工具可用于对泵进行自动冲洗。

注意

如果泵不能从瓶中抽取溶剂，则可以使用进样针手动移动溶剂使其通过流路管线和脱气机。

注意

使用进样针灌注真空脱气机时，溶剂将很快流过脱气机管线。这样，溶剂在到达真空脱气机出口时，并未经过彻底脱气。开始分析之前，请先按照所需的流速将泵运行大约 10 分钟。此操作使真空脱气机能够对脱气管子中的溶剂进行充分脱气。

- 1 打开泵的冲洗阀
- 2 将流量设置为 5 mL/min。
- 3 选择通道 A1
- 4 打开流路
- 5 观察通道 A1 的管中的溶剂是否正朝着泵流动。如果没有，请断开溶剂管与溶剂选择阀的连接，并将注射器接头安在注射器上，然后抽取液体使其通过脱气机。将管重新连接到溶剂选择阀。
- 6 泵取 30 mL 异丙醇以排除残留的气泡。
- 7 切换到下一个溶剂通道，并重复步骤 5 和 6，直到冲洗完所有通道。
- 8 关闭流路，然后关闭冲洗阀。

定期灌注

当： 泵系统关闭一定时间（例如一整夜）后，空气将重新扩散到真空脱气机和泵之间的溶剂通道中。如果含有挥发性成分的溶剂留在脱气机中但长时间不流动，那么溶剂将会因此有微量减少。

所需的准备： 启动系统

注意

实验室监控与诊断软件的冲洗工具可用于对泵进行自动冲洗。

- 1 通过逆时针转动泵的冲洗阀打开此阀，并将流速设置为 5mL/min。
- 2 用至少 10 mL 溶剂冲洗真空脱气机和所有管线。
- 3 对于泵的其他通道，重复步骤 1 和 2。
- 4 设置应用所需的溶剂组份和流速，然后关闭冲洗阀。
- 5 开始应用之前，请先将泵运行大约 10 分钟。

更换溶剂

当： 如果要用与当前通道溶剂不相容的溶剂（溶剂间不相同，或一种溶剂含有缓冲盐）进行替换时，必须遵循如下步骤以防止在系统部件中因盐沉淀或残留液滴的存在而造成泵堵塞。

所需的部件：	编号	部件号	说明
	1		冲洗溶剂，请参见“第 80 页的表 8”
	1	5022-2184	接头 ZDV

所需的准备： 卸下色谱柱，用一个 ZDV 接头进行替换
准备好装有适当中间溶剂的瓶子（请参阅“第 80 页的表 8”）

- 1 如果通道未含有缓冲盐，直接执行步骤 4。
- 2 将溶剂吸液过滤器放入水瓶中。
- 3 以适用于安装管道的流速对通道进行冲洗（通常为 3 - 5 mL/min），持续 5 min。
- 4 根据应用的需要，对系统的流路进行修改。

小心

水性缓冲液中的缓冲盐可能会在残留的异丙醇中析出。
析出的盐可能会堵塞毛细管和过滤器。

- 在使用有机溶剂前，先用水对含有高浓度盐的溶剂管道进行冲洗。
- 对于以水性缓冲液作为溶剂的通道，切勿执行步骤 5-7。

- 5 用异丙醇瓶更换溶剂瓶。
- 6 以适用于安装管道的流速对通道进行冲洗（通常为 3 - 5 mL/min），持续 5 min。
- 7 针对您的应用，用相应溶剂瓶交换异丙醇瓶。
- 8 对于泵的其他通道，重复步骤 1 到 7。
- 9 安装所需的柱子，设置应用所需的组份和流速，并在开始运行样品之前平衡系统大约 10 分钟。

4 系统设置和安装

安装模块

表 8 选择用于不同用途的灌注溶剂

活动	溶剂	注释
安装后 在反相和正相之间切换 时（两次）	异丙醇 异丙醇	排除系统中空气的最好 溶剂 与几乎所有溶剂互混
安装后	乙醇或甲醇	如果没有异丙醇，可让 其作为异丙醇的备选溶 剂（第二种选择）
使用缓冲液后清洗系统 更换水性溶剂后	HPLC 级水 HPLC 级水	再溶解缓冲液晶体的最 好溶剂 再溶解缓冲液晶体的最 好溶剂
安装正相密封垫后（PE 密封垫（每包 2 个） （0905-1420））	己烷 + 5 % 异丙醇	润湿效果好



5 快速入门指南

关于快速入门指南	82
准备系统	83
启动系统	83
调用缺省方法	84
配置在线图谱	85
冲洗泵	87
“方法和运行控制”视图中的数据	88
使用等度样品的方法参数进行系统检验	88
设置方法	92
对单次进样运行方法	94
数据分析	96
“数据分析”视图	97
对信号进行积分	98
指定报告	99

本章介绍有关 1260 Infinity 二元梯度 LC 的数据采集和数据分析的信息。



关于快速入门指南

本章介绍有关运行 Agilent 1260 Infinity 二元梯度 LC 的信息。此指南可用于指导您在安装后快速运行首次分析，您既可把它当作教程示例，也可用来对系统的总体功能进行检查。此指南中还包括有关方法参数的更多详细信息。

此示例演示了如何使用 Agilent 1260 Infinity 二元梯度 LC 附带的色谱柱和校验样品设置和运行分析。此示例引用的是 OpenLAB CDS ChemStation Edition 中的菜单和命令，但是其他控制选件（如 OpenLAB CDS EZChrom Edition 和 MassHunter 软件）也提供了相同的功能。

在下文中，术语化学工作站和 EZChrom 分别指 Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition 和 Agilent OpenLAB CDS EZChrom Edition。

注意

在开始时假定系统已经安装、打开并进行了首次灌注（请参阅“第 76 页的初始灌注”）。在开始任何定量工作之前，应将紫外灯打开至少 30 分钟。

准备系统

启动系统

如果系统尚未完全启动，软件还在显示“就绪”状态，请执行以下步骤：


- 1 启动计算机系统，等待 Windows 桌面显示出来。
- 2 使用每一 LC 模块左下方的按钮打开这些模块的电源。
在按钮中心处将可以看到绿色的电源指示灯。
- 3 在计算机上单击该控制软件的图标（如果已配置）启动该软件。也可以选择“Start” > “All Programs” > “Agilent Technologies” > “OpenLAB” > “OpenLAB Control Panel”。选择“Instruments”下方导航窗格中的相关仪器，然后单击“Launch online”。
化学工作站软件即在“Method and Run Control”视图中打开。模块最初都会处于“待机”模式和“未就绪”状态，只有自动进样器除外，它会立即初始化并变为“就绪”状态。
- 4 要单独打开每一模块，右键单击相应的图标，然后从上下文菜单中选择“Switch [module name] on”。
也可同时打开系统中的所有模块，单击系统图右下方的“System On/Off”按钮即可。在较短时间的延迟后，随着设定值的获得，系统状态将由未就绪（黄色指示灯）变为就绪（绿色指示灯）。

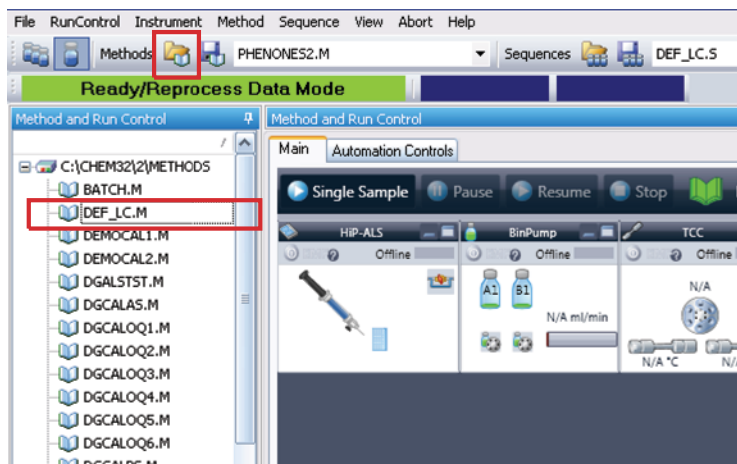
调用缺省方法

化学工作站的缺省方法名称为“DEF_LC.M”，在首次执行或者请求新的空白方法模板时会调用该方法。该方法中包含所有模块的缺省设置。

在此程序中，您将调用方法“DEF_LC.M”。您可以使用此方法将所有参数设定为缺省设置，或者将其用来在设置新方法之前获取空白方法模板。

- 1 转到化学工作站中的“Method and Run Control”视图。
- 2 在菜单栏中，选择“方法” > “新建方法...”，然后从上下文菜单中选择“DEF_LC.M”。

另外，您可以使用菜单栏下的“Load Method”图标 ，或者在导航窗格的“方法”选项卡中双击方法名“DEF_LC.M”。



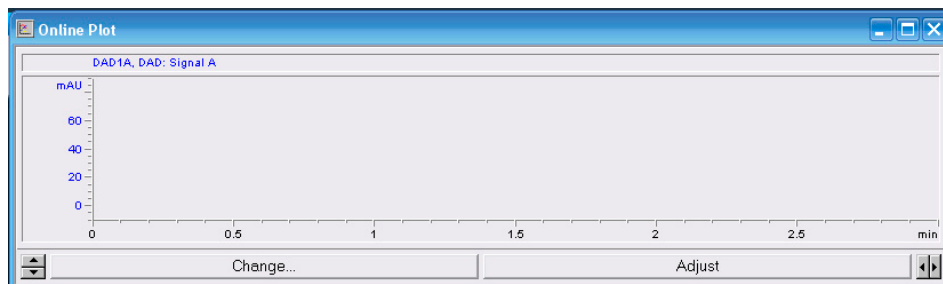
缺省方法（“DEF_LC.M”）有一组缺省参数，您可修改这些参数以创建新方法。例如，流速已设置为零，“Method Information”和“Method History”保留空白。

注意

请注意，无法用新的参数重写此方法。因此，单击“Save”会重定向至“Save As...”功能，这样您就必须输入新的方法名称。

配置在线图谱

- 1 如果“Online Plot”窗口未显示，单击“视图” > “在线信号” > “信号窗口 1” 便可显示该窗口。



- 2 要配置“Online Plot”窗口中的特定信号，请单击“Change...”。
“Edit Signal Plot”设置页面将打开。

Available Signals

- PMP1B, BinPump: Pressure
- PMP1C, BinPump: Flow
- PMP1D, BinPump: Solvent Ratio A
- PMP1E, BinPump: Solvent Ratio B
- THM1A, TCC: Left Temperature
- THM1B, TCC: Right Temperature
- DAD1B, DAD: Signal B
- DAD1C, DAD: Signal C

Selected Signals

- DAD1A, DAD: Signal A

Window

x-axis: 3 min

draw zero line

DAD1A, DAD: Signal A

Type: acquired y-axis range: 100 mAU

auto y-adjust Offset: 10 %

Fraction Collector

Show fraction collection ticks

Method Settings

Use method settings Apply to Method

OK Cancel Help

- 3 在“Available Signals”框中，高亮显示所需的信号，然后单击“Add”将这些信号移动到“Selected Signals”框。
- 4 要配置每一信号的单独设置，在“Selected Signal”框中高亮显示相应的信号，然后在该页面的下半部分设定所需的值。

注意

除了检测器信号，还可绘制参数谱图，如温度和压力。使用“Apply to Method”，可将此页中的设置存储到方法中。

“Online Plot”窗口与电子图纸类似，用于持续记录检测器的输出和其他输出参数。信号绘制在窗口的右侧，向左侧移动。最多可以访问最近 90 min 的数据。这对于检查基线水平和查看之前的进样颇为有用。X 和 Y 轴比例可使用每个轴上的向上和向下按钮直接调整。

“Online Plot”窗口中的“Adjust”按钮会将选定信号的当前点移到起点线。选定信号由 Y 轴标签的颜色指示。可以通过单击相应信号或者单击图谱上方相应的信号说明选定特定信号。

按下“Balance”按钮时会将所有检测器归零。

注意

在“Online Plot”页中所做的任何更改都不会对已存储到单独数据文件中的数据带来影响。

冲洗泵

在以下情况时需冲洗泵：

- 在第一次灌注泵后。
- 在使用系统前须用新鲜溶剂冲洗泵，或者要更换溶剂时。
- 泵已经有几小时或更长时间处于空闲状态（空气可能已经扩散到溶剂管线中，建议进行冲洗）。
- 重新加注了溶剂瓶，需要对泵进行冲洗以此为系统加注新鲜溶剂。如果要使用新的溶剂，需确保新的溶剂可与之前的溶剂混溶，如有必要应使用与前后两种溶剂都能混溶的溶剂作为中间步骤（异丙醇通常是较好的选择，请查看溶剂混溶性表）。

有关冲洗程序的详细信息，请参阅“[第 78 页的定期灌注](#)”。

“方法和运行控制”视图中的数据采集

使用等度样品的方法参数进行系统检验

要检验 1260 Infinity 二元梯度 LC，可在已订购并随系统一起提供的色谱柱上使用等度测试混合物（Agilent 单元泵校验样品（01080-68704））进行测试运行。

Agilent 单元泵校验样品（01080-68704）包含在甲醇中溶解的以下组分：

- 邻苯二甲酸二甲酯
- 邻苯二甲酸二乙酯
- 三联苯
- 邻三联苯

对于标准延迟体积配置，在“第 89 页的表 9”中汇总了用于分离此测试混合物的方法参数，对于低延迟体积配置，在“第 90 页的表 10”中进行了汇总。

表 9 第一次分离运行的方法参数 - 标准延迟体积配置

模块	参数	设置
泵	溶剂 A	水
	溶剂 B	乙腈
	流速	4.0 mL/min
	溶剂组分	40 % A, 60 % B
	停止时间	1 min (1 min 后运行时间)
自动进样器	进样	1 µL
柱温箱	色谱柱	<ul style="list-style-type: none"> • 色谱柱 Eclipse Plus C18, 4.6 x 100 mm, 3.5 µm (959961-902) • 色谱柱 Poroshell 120 EC-C18, 3.0 x 50 mm, 2.7 µm (699975-302) • 色谱柱 Poroshell 120 EC-C18, 4.6 x 50 mm, 2.7 µm (699975-902)
	温度	40 ° C
检测器	信号 A	波长: 250 nm, 带宽: 4 nm 参比波长: 360 nm, 参比带宽: 100 nm

5 快速入门指南

“方法和运行控制”视图中的数据收集

表 10 第一次分离运行的方法参数 - 低延迟体积配置

模块	参数	设置
泵	溶剂 A	水
	溶剂 B	乙腈
	流速	0.75 mL/min
	溶剂组分	40 % A, 60 % B
	停止时间	1.2 min (1 min 后运行时间)
自动进样器	进样	1 µL
柱温箱	色谱柱	柱: SB-C18, 4.6x 50 mm, 1.8 µm, 600 bar (827975-902)
	温度	40 ° C
检测器	信号	波长: 250 nm, 带宽: 4 nm 参比波长: 360 nm, 参比带宽: 100 nm

校验指标:

- 色谱图中有四个峰可见
- “Intensity Test” - 通过
- “Wavelength Calibration” ±1 nm

检验准备

- 1 使用 HPLC 级水灌入溶剂瓶 A。使用 HPLC 级乙腈灌入溶剂瓶 B。
- 2 如果已安装，使用提供的进样针冲洗线上脱气机的每个通道。
- 3 打开泵的冲洗阀，以 5 mL/min 流速冲洗每个通道。
这应该足以排出系统中的空气了。
- 4 将提供的色谱柱安装到柱温箱中。
- 5 使用 HPLC 级水冲洗流通池 5 min。
- 6 根据情况运行波长校正和强度测试。
- 7 使系统在“第 89 页的表 9”和“第 90 页的表 10”中列出的检验条件下平衡 10 min。
- 8 准备等度检验样品的样品瓶。

设置方法

本节介绍如何为分析快速设置方法条件。

先决条件

已调用缺省方法“DEF_LC.M”，可以开始准备新方法。现在可以编辑主要参数来创建新方法。



- 1 要快速访问每个模块的“Method”页，请右键单击对应模块的系统视图，然后从上下文菜单中选择“Method...”。
将按此方式设置每个模块。
- 2 右键单击泵区域，然后在上下文菜单中选择“Method...”。
 - a 在“1260 Infinity Binary Pump”的“Method”页中，输入以下参数：
 - 流速：4.0 ml/min
 - 溶剂 A：从压缩因子下拉列表中选择“Water”。
 - 溶剂 B：选中对应的复选框，使溶剂 B 处于活动状态。
 - 将 %B 的值设置为 60 %
 - 停止时间：1 min
 - 后运行时间：1 min
 - b 其他参数可以保留为缺省设置。单击“OK”退出该窗口。
这些更改将发送到泵模块。
- 3 右键单击自动进样器区域，然后在上下文菜单中选择“Method...”。
 - a 在“1260 Infinity Autosampler”的“Method”页中，输入以下参数：
 - 进样量：1.0 μ l
 - 洗针进样
 - 模式冲洗口，时间：6 s
 - b 其他参数可以保留为缺省设置。单击“OK”退出该窗口。
这些更改将发送到自动进样器模块。
- 4 右键单击“柱温箱 (TCC)”区域，然后在上下文菜单中选择“Method...”。
 - a 在“1290 Infinity TCC”的“Method”页中，输入以下参数：
 - 左侧温度 40 °C
 - 右侧温度为组合

对单次进样运行方法

本节介绍如何使用上一节中输入的条件运行等度检验样品的单次进样。

可以在两种模式下运行化学工作站上的分析：

- “Run Method” — 单次进样，例如在交互式方法开发中使用当前的参数设置；
- “Run Sequence” — 来自多个样品瓶的一系列自动进样，可能使用多个方法。有关更多详细信息，请参阅化学工作站手册。

- 1 单击“Select Run Method Task”图标 。
- 2 如果当前未调用所需的方法条件，请选择“Method” > “Load Method”或菜单栏下的  图标以调用它们。

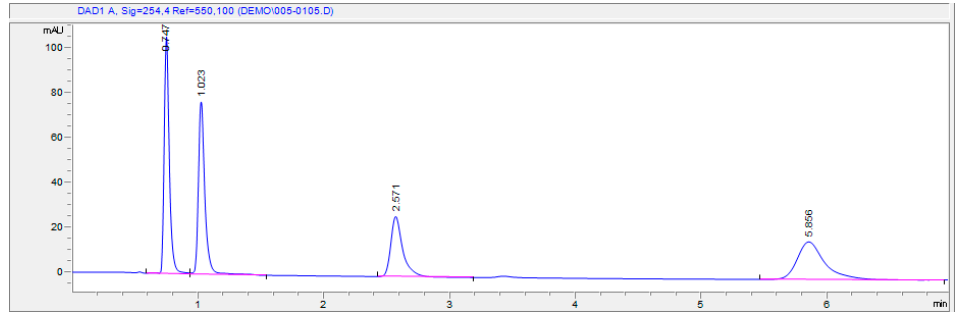
注意

如果已对调用的方法进行更改且尚未保存，则这会由方法状态图标上的黄色星号指示。在先不保存这些参数更改的情况下可以进行进样。化学工作站始终将数据文件中的采集参数副本存储为 ACQ.TXT，以确保保留原始方法参数。

- 3 将样品瓶放在位置 1 — 这是样品盘右侧的 10 x 2 ml 样品瓶位置的前面位置。
- 4 选择“Run Control” > “Sample Info”，并输入所需的样品参数。
例如：
 - “Subdirectory”（可选）
 - “Name Pattern”
 - “Vial/Location”
 - “Sample name”
 - “Comment”
- 5 如果系统已平衡且基线稳定，请单击“Sample Info”页中的“Run Method”开始进样。或者，单击“OK”，准备就绪后，选择“Run Control” > “Run Method”。该项将添加到“Run Queue”，然后自动从此处开始。

- 6 将进行进样，且会在“Online Plot”中显示色谱图。在达到“Stop Time”时数据采集将停止。

色谱图与下面的图类似：



数据分析

化学工作站中的方法包含用于数据采集（控制系统）和数据分析（处理数据以获得定量和定性结果）的所有参数。本节简要介绍数据分析中的积分和报告，以便可以对本章先前生成的分离进行积分和打印。有关数据分析（包括使用校正进行定量）的更详细信息，请参阅化学工作站手册。

方法源

导航表

积分任务

光谱任务

导航面板

Time	Integration Events	Value
0.000	Start	0.000
0.000	End	0.000
0.000	Area	0.000
0.000	Height	0.000
0.000	Width	0.000

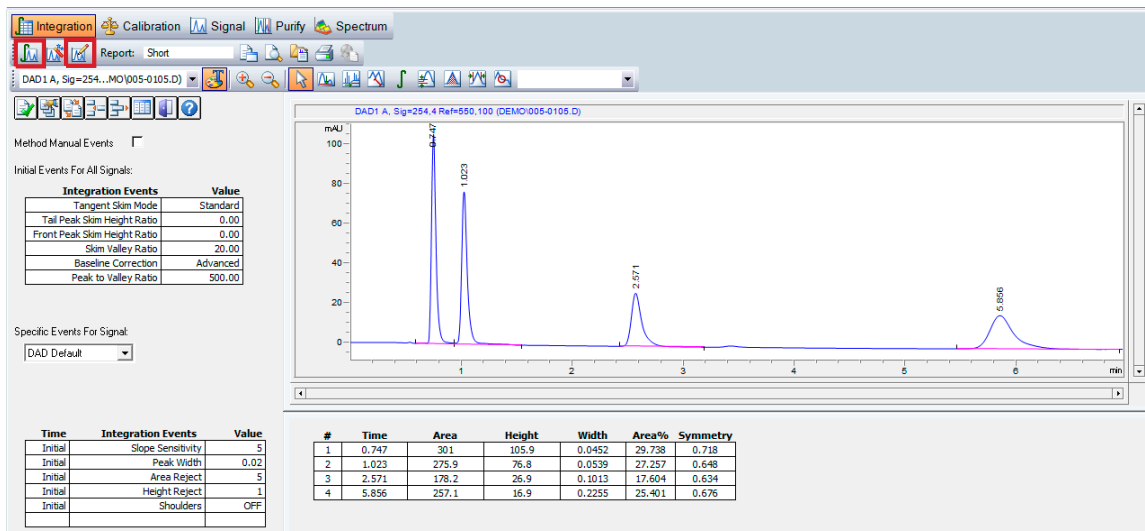
“数据分析”视图




在“Data Analysis”视图中打开色谱图：

- 1 启动离线化学工作站。
- 2 单击屏幕左下方的“Data Analysis”。
- 3 在导航面板中，找到包含数据文件的数据目录。所有单次进样数据均表示为称为“Single Runs”的子集。双击“Single Runs”将这些数据文件调入导航表中。
- 4 在导航表中选择一个文件，然后双击该文件将色谱图调入查看器。

对信号进行积分

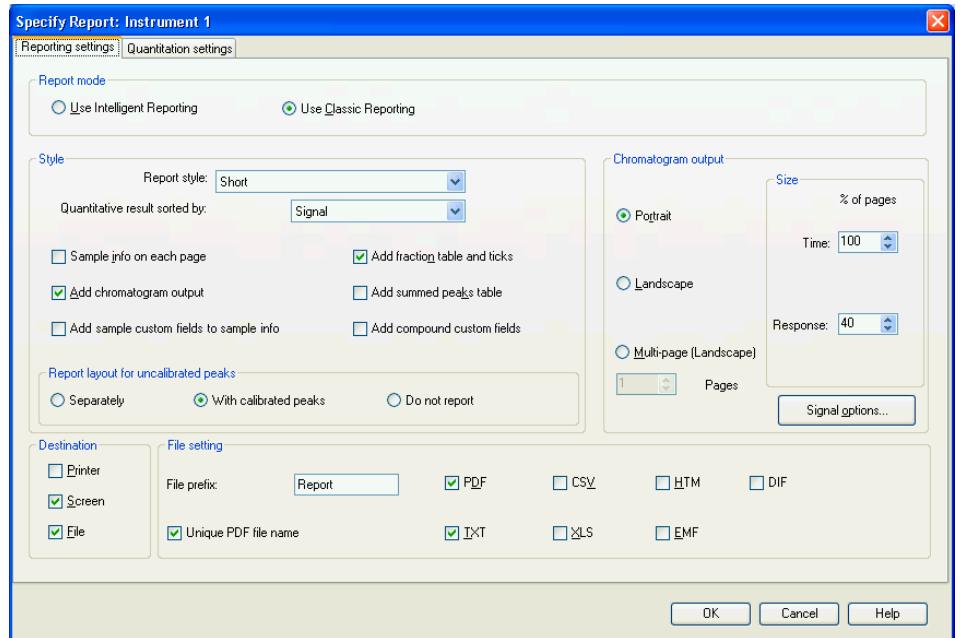
- 1 选择积分任务工具（请参阅下图）。在下面所示的图中突出显示了“Integrate”图标和“Set Integration Events Table”图标。

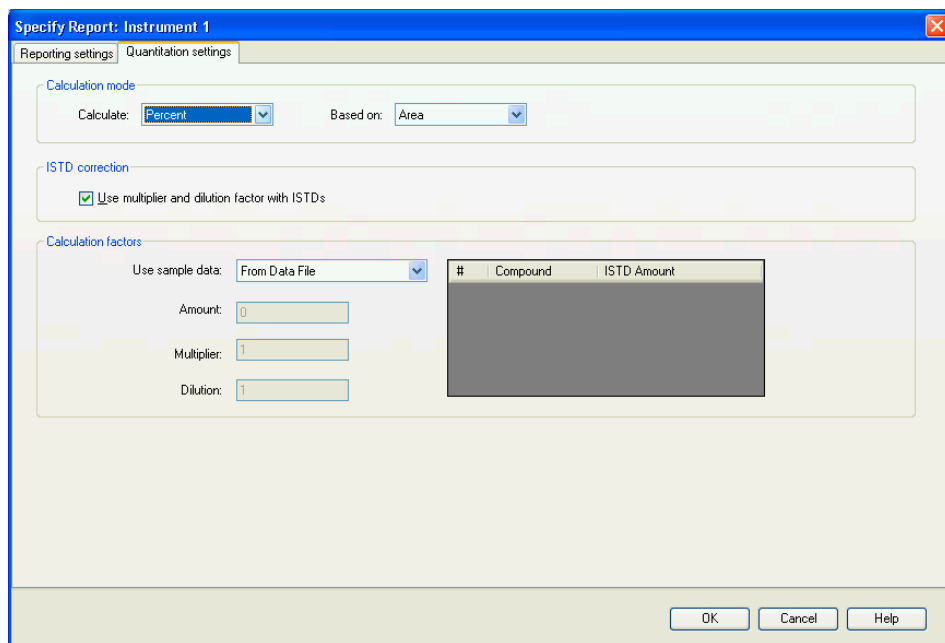


- 2 单击“Set Integration Events Table”图标  打开如下所示的表。
- 3 针对梯度运行将“Baseline Correction”设置为“Advanced”。
- 4 将“Slope Sensitivity”设置为 5。
更高的数字将对陡度更高的峰进行积分且将忽略陡度较低的峰。
- 5 将“Peak Width”值设置为最窄的目标峰，在此情况下大约为 0.02。
- 6 “Area Reject”和“Height Reject”可以设置为去除最小峰。
- 7 单击“Integrate”图标  以使用这些新设置更新结果。
- 8 使用绿色对号图标  从“Integration Events”表中退出。

指定报告

- 1 在菜单栏上单击“Report” > “Specify Report”以显示下图中所示的窗口。

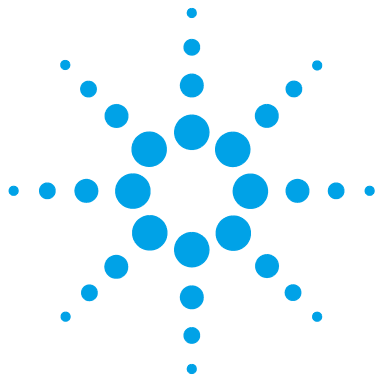




- 2 使用上图中显示的示例设置可以在屏幕上生成面积百分比报告。
- 3 在“Destination”部分中，为纸质副本选择“Printer”，然后选择“File”和“PDF”以获取一个有用的存储在数据文件中的 PDF 报告文件（带有 .D 后缀的数据文件实际上是目录。可以使用标准的 Windows 文件资源管理器在化学工作站中直接查看报告文件，也可以在目录中找到它）。
- 4 再次保存该方法，确存储报告设置以备该方法将来使用。

再次使用该方法时，这些积分事件和报告设置将用于生成报告。

对使用化学工作站软件的数据分析部分的简要介绍到此结束。请查阅化学工作站手册和在线帮助系统，了解有关化学工作站的强大功能的更多详细信息。



6 附录

安全信息	102
溶剂信息	105
材料信息	105
Agilent Technologies 网站	109
使用编辑整个方法设置方法	110
方法信息	112
仪器 / 采集	113
数据分析	127
运行时选项表	134

本章介绍有关安全、法规和网络以及设置方法的其他信息。



安全信息

一般安全信息

在仪器操作、维护和维修的各个阶段都必须遵循下列一般安全事项。不遵循这些安全事项或本手册中其他位置的特殊警告事项，将违反此仪器设计、制造和使用的安全标准。安捷伦科技对用户不遵守这些要求所造成的损失不承担任何责任。

警告

确保正确保用仪器。

设备提供的保护可能会损害。

→ 建议此仪器的操作员按照本手册中指定的方式使用仪器。

安全标准

本仪器为 I 级安全设备（即提供保护接地端），并按国际安全标准制造与检测。

操作

通电前，应符合安装部分的要求。另外，还应遵循下列事项。

操作时不得卸下仪器盖。启动仪器前，所有接地保护端、外接线、自耦变压器及所连接的设备都必须经接地插座进行保护接地。任何干扰保护接地的因素都将导致潜在的电击危险，可能引起严重的人身伤害。保护设施可能受到损害时，必须停止仪器操作，并将仪器保护起来以防有意地使用。

确保只能用能够承受所要求的额定电流、并且为特定类型（正常烧断、时间延迟等）的保险丝进行更换。必须避免使用维修过的保险丝，同时要避免保险丝盒短路。

本手册中所述的一些调节是在仪器通电时和仪器的保护盖卸下时进行的。许多位置带电，一旦接触就可能造成人身伤害。

在仪器打开后，尽可能避免在通电时做调整、维护和维修。若必须进行上述活动，则应该由能意识到危险的技术人员进行。当现场不能提供紧急救护时，不要试图进行内部维护和调整。在电源电缆接通后，不要更换元件。

在有易燃气体或蒸气存在时，不要操作仪器。在这种环境下操作任何电气仪器都肯定会有危险。

不要在仪器上安装替换零件或对仪器进行未经授权的改造。

即使仪器已经断电，仪器内部电容仍有可能带电。本仪器内部有能造成严重人身伤害的危险电压。在处理、测试和调整仪器时应特别小心。

处理溶剂，尤其是处理有毒或有害溶剂时，请严格遵循溶剂供应商所提供的材料处理和安全数据表中相关的安全规程（例如戴上护目镜、安全手套，穿上防护服）。

安全标志

表 11 安全标志

标志	说明
	对于标有此标志的设备，用户应参阅说明手册，以免对操作员造成伤害及仪器受到损坏。
	表示危险电压。
	表示受保护的接地端。
	表示用肉眼直接观察用于本产品的氙灯时，它所产生的光可能会损坏眼睛。
	如果存在较热表面，并且用户不应在加热后接触该表面，则仪器上会标有此标志。

警告

警告

关于可能造成人身伤害或死亡的情况警告您。

- 除非您已充分理解并满足了指定的条件，否则请勿超越警告范围进行工作。

小心

注意

就可能导致数据丢失或损害设备的情况对您发出警告。

- 仅当完全明白这些情况并满足指示的条件后，才能够越过警告，继续操作。

溶剂信息

使用溶剂时，请遵循以下建议。

- 遵循阻止藻类生长的建议，具体参见泵手册。
- 小颗粒可能会永久堵塞毛细管和阀。因此，始终通过 0.4 μm 过滤器过滤溶剂。
- 避免或尽量减少可腐蚀流路部件的溶剂。考虑模块的不同材料所能耐受的不同 pH 范围，如流通池和阀的材料。具体会在后续章节里面建议。

材料信息

流路中的材料都是根据安捷伦数十年来开发用于 HPLC 分析的最高质量仪器的经验而细心挑选的。这些材料在典型的 HPLC 条件下显示了极高的耐用性。对于其他特殊条件，请参见“材料信息”章节或联系安捷伦。

免责声明

随后的数据是从外部资源中收集的，仅供参考。对于此类信息，安捷伦不保证其正确性和完整性。数据是基于兼容库的，它们并非适用于在 UHPLC 系统、溶剂、溶剂混合物和样本的高度可变条件下估计长期寿命的特定数据。由于杂质（如金属离子、配位剂、氧气等）的催化效应，我们也无法概括信息。除纯化学腐蚀外，还需要考虑到像电化腐蚀、静电电荷（尤其是对于非导电有机溶液）、聚合物部分膨胀这样的其他效应。大多数数据适用于室温（通常为 20 - 25 °C，68 - 77 °F）。如果出现腐蚀，通常在更高的温度下腐蚀会加快。如果有疑问，请参考与材料化学兼容性相关的技术文献。

PEEK

PEEK（聚醚醚酮）综合了与抗化学腐蚀、机械和热稳定性相关的极佳属性。它在 pH 值为 1 到 12.5 时稳定，在许多普通溶液中呈惰性。与化学品（如氯仿、二氯甲烷、THF、浓度大于 1 % 的 DMSO、强酸（浓度大于 10 % 的硝酸、浓度大于 10 % 的硫酸、三氯乙酸、磺酸）、卤化物或卤素的水溶液、苯酚及其衍生物（甲酚、水杨酸等））有着一些已知的不相容性。当使用温度高于室温时，PEEK 对碱和多种有机溶剂敏感，可能会导致其膨胀。

聚酰亚胺

安捷伦在阀中的转子密封垫和自动进样器中的针底座上使用了半晶状的聚酰亚胺。DuPont 是一家聚酰亚胺供应商，其聚酰亚胺产品的商标为 Vespel，安捷伦也使用他们的产品。

聚酰亚胺在 pH 值为 1 至 10 的环境及大多数有机溶剂中稳定。它与浓无机酸（如硫酸）、冰醋酸、DMSO 和 THF 不相容。它在像氨（如基本状态下的铵盐）这样的亲核物质或醋酸铵中性能会下降。

聚乙烯（PE）

安捷伦将 UHMW（超高分子量聚乙烯）-PE/PTFE 混合物用于黄色活塞和冲洗密封垫（用于 1290 Infinity 泵和 1260 Infinity 泵中的正相应用）。

对于大多数普通无机溶剂（包括 pH 范围在 1 到 12.5 之间的酸和酸碱），聚乙烯有着良好的稳定性。它与许多在色谱系统中使用的有机溶剂（如甲醇、乙腈和异丙醇）相容。它与脂肪类、芳香类和卤化碳氢类、THF、苯酚及其衍生物、浓酸和浓酸碱有着有限的稳定性。对于正相应用，最大压力应限制为 200 bar。

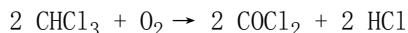
钽（Ta）

钽对于大多数的普通 HPLC 溶剂和几乎所有酸（除氟酸和带有自由三氧化硫的酸）呈惰性。它会被强碱腐蚀（如浓度大于 10 % 的氢氧化物溶液、二乙胺）。不建议将钽与氟酸和氟化物一起使用。

不锈钢 (SST)

不锈钢对多数常见溶剂呈惰性。它在 pH 值范围为 1 到 12.5 的酸和碱中呈稳定状态。它可以被 pH 小于 2.3 的酸腐蚀。它也可以被以下溶剂腐蚀：

- 碱金属卤化物及其酸溶液（如碘化锂、氯化钾等）及卤素的水溶液。
- 高浓度无机酸，如硝酸、硫酸和有机溶剂，尤其是在高温下（如果色谱方法中确实需要，则使用对不锈钢腐蚀性弱的磷酸和磷酸盐缓冲液代替）。
- 能形成自由基和 / 或酸的含卤溶剂或混合物，如：



在这个反应中，不锈钢可能作为催化剂；一旦在干燥中除去了稳定剂醇，则遇到干燥氯仿后，上述反应将很快发生。

- 可能含有过氧化物的色谱纯醚（例如 THF、二氧六环、二丙基乙醚）。这些醚类应通过干燥氧化铝过滤以除去过氧化物。
- 有机溶剂中的有机酸溶液（乙酸、甲酸等）。例如，甲醇中的 1 % 乙酸溶剂可腐蚀钢铁。
- 含强配位剂的溶液（如 EDTA、乙二胺四乙酸）。
- 四氯化碳与 2-丙醇或 THF 的混合物。

类金刚石 (DLC)

类金刚石在几乎所有的普通酸、碱和溶剂中呈惰性。对于 HPLC 应用，无已知的不相容性。

熔融石英和石英 (SiO₂)

熔融石英用于 1290 Infinity 的流通池和毛细管。石英用于传统的流通池窗口。它对于所有普通溶剂和酸（除氢氟酸和含氟化物的酸性溶剂）呈惰性。它会被强碱腐蚀，室温下不能用于 pH 值高于 12 的碱中。流通池窗口的腐蚀会对测量结果产生负面影响。对于 pH 值大于 12 的溶剂，建议使用带有蓝宝石窗口的流通池。

金

金对于所有 HPLC 溶剂、特定 pH 范围内的酸、碱均呈惰性。它会被强配位氰化物和像王水这样的浓酸腐蚀。

氧化锆 (ZrO_2)

氧化锆对几乎所有的普通酸、碱和溶剂呈惰性。对于 HPLC 应用，无已知的不相容性。

铂 / 铱

铂 / 铱对几乎所有的普通酸、碱和溶剂呈惰性。对于 HPLC 应用，无已知的不相容性。

氟化高聚物 (PTFE、PFA、FEP、FFKM)

氟化高聚物（如 PTFE（聚四氟乙烯）、PFA（四氟乙烯）和 FEP（氟化乙烯丙烯））对几乎所有的普通酸、碱和溶剂呈惰性。FFKM 是全氟化橡胶，耐受大多数化学品。作为一种弹性体，它在某些有机溶剂（如卤代烃）中可能会膨胀。

用于所有 Agilent 脱气机（除 G1322A）的 TFE/PDD 共聚物管不与氟化溶剂（如氟利昂、全氟三丁胺或聚酰亚胺）相容。它们在六氟异丙醇（HFIP）中寿命有限。要确保在 HFIP 中拥有尽可能长的寿命，最好为此溶剂提供一个独立腔，不要在该腔中使用其他溶剂，也不要烘干该腔。若要优化压力传感器的寿命，切勿在装置关闭后将 HFIP 留在腔内。

蓝宝石、红宝石和基于 Al_2O_3 的陶瓷

蓝宝石、红宝石和基于氧化铝 (Al_2O_3) 的陶瓷对几乎所有的普通酸、碱和溶剂呈惰性。对于 HPLC 应用，无已知的不相容性。

Agilent Technologies 网站

有关产品和服务的最新信息，请访问我们在 Internet 上的网站：

<http://www.agilent.com>

使用编辑整个方法设置方法

化学工作站中的方法包含用于数据采集（控制系统）和数据分析（处理数据以获得定量和定性结果）的所有参数。这些参数可通过一系列屏幕进行访问，每个屏幕分别对应一个模块或功能。这些屏幕可通过单击图形用户界面（GUI）上的图标或通过包含其下拉菜单的菜单栏进行访问。新方法可以通过调用和编辑现有的方法创建，或者可以通过调用和编辑空白模板方法“DEF_LC.M”创建。

要仅更改部分参数，您可以直接转到相关设置以更改对应参数。经验较少的用户可能会发现使用“编辑整个方法”功能更容易，因为这会自动地逐步完成各个页面。该功能通过“方法”>“编辑整个方法”菜单进行访问，且将打开“Check Method Sections to Edit”对话框：

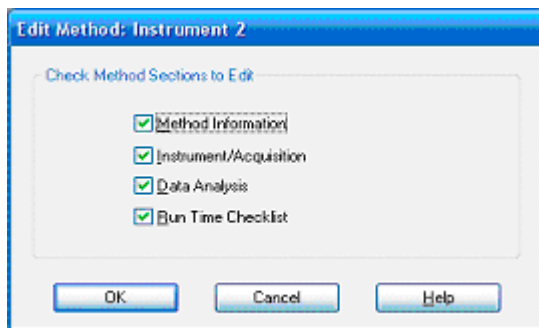


图 23 检查要编辑的方法部分

此对话框汇总了将查看的部分，且可以通过取消选中特定部分绕过它们。

根据选择的部分，该功能将按顺序显示以下几个屏幕：

- “Method Information” 包含有关方法的文本说明。
- “Instrument/Acquisition” 包含：
 - 进样器参数，
 - 泵参数，
 - 柱温箱参数，
 - 检测器参数以及
 - 仪器曲线。
- “Data Analysis” 包含：
 - 信号详细信息，
 - 积分参数以及
 - 报告参数。
- “Run Time Checklist” 包含将执行的方法部分。

注意

在“Edit Entire Method”过程中，单击“OK”将关闭当前输入屏幕并移到下一屏幕。这是一个单向过程。

如果在进行所有输入前，您无意按下“OK”，则使用“Cancel”，然后重新启动“Edit Entire Method”。或者继续进行，然后在结束时返回到未完成的屏幕。单击“Cancel”可提供一个用于“Skip”剩余屏幕的按钮。

方法信息

“Method Information” 屏幕也可以通过 “方法” > “方法信息” 菜单或通过右键单击图形用户界面直接访问。

使用此框可以输入有关方法的信息。无论此方法何时调入并驻留在内存中，“Method and Run Control” 屏幕上的系统视图上方都将显示此信息。

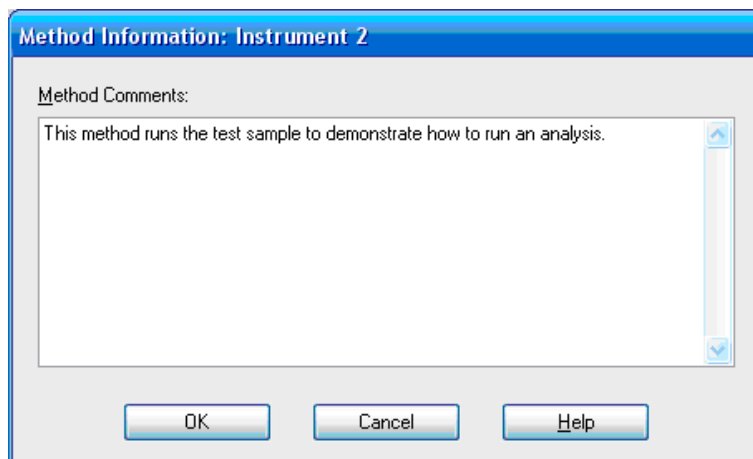


图 24 方法信息

仪器 / 采集

设置仪器方法

“Setup Method”屏幕可以通过“仪器” > “设置仪器方法...”菜单，或通过右键单击图形用户界面上的任何模块图标，然后在上下文菜单中选择“Method...”直接访问。“Edit Entire Method”的下一阶段是“Setup Method”屏幕，其中包含六个针对不同模块或功能的分隔选项卡。

这些选项卡有：

- 高性能自动进样器（“HiP-ALS”）
- “HiP-ALS Injector Program”
- 二进制泵（“BinPump”）
- 柱温箱（“TCC”）
- 二极管阵列检测器（“DAD”）
- “Instrument Curves”

要在选项卡之间移动，请单击屏幕顶部的选项卡名称。在输入参数更改后，这些参数更改可通过单击“Apply”立即发送到仪器，或者在完成所有选项卡后，单击“OK”会将所有参数发送到模块、关闭屏幕并移到下一阶段。

由于仪器模块的常用 RC.Net 驱动程序的安捷伦概念，参数输入选项卡在所有控制程序（ChemStation、EZChrom、MassHunter et al.）中看起来相似。

与大多数方法一样，要运行分离示例，不需要更改每个可用参数，但为了完整性，在以下几节中对这些可用参数进行了说明。

“自动进样器”选项卡

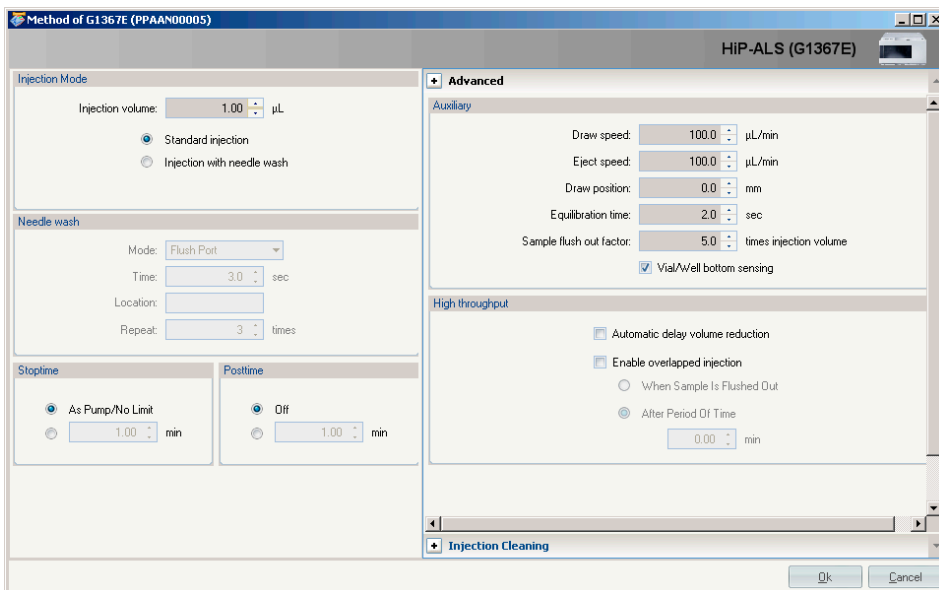


图 25 “设置方法”屏幕 - “高性能自动进样器”选项卡

- “Injection Mode”
 - “Injection volume” 设置要进样的体积（示例 1 μL ），
 - “Standard injection” 指示不进行外部洗针，
 - “Injection with needle wash” 用于减少潜在的残留物。建议使用此选项，并且将在接下来的输入中对其进行配置。
- “Needle Wash” - 如果在上面已选择。
 - “Mode” 确定将如何冲洗针的外部：在“Flush Port”中主动进行或通过浸入指定的“Wash Vial”进行。
 - 连接到冲洗口的蠕动泵将泵注冲洗溶剂的“Time”（以秒为单位）。然后蠕动泵将另外泵注 15 s 以清洗冲洗口。
 - “Location” 用于确定在已选择“Wash Vial”的情况下将使用的样品瓶或多孔板。

注意

样品瓶不应有隔垫，也就是说样品瓶应打开以避免隔垫上的残留物质转移。

- “Repeat” 用于确定在已选择清洗瓶的情况下针浸入样品瓶的次数（缺省值为 3，最大值为 5）。
- “Stop Time / Post Time” 设置为 “No Limit / Off” 且在泵选项卡中将注意这些值。
- “Advanced - Auxiliary”
 - “Draw speed” 是将样品吸入针的速度。缺省值为 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ 。对于粘稠样品或为在较小样品体积 ($<2 \mu\text{L}$) 的情况下提高精度，应减慢抽取速度。
 - “Eject speed” 是将样品排出针的速度。
 - “Draw position” 是与高于样品瓶底部 10 mm 的标称进样位置的垂直偏移量。这大约在一个 2 ml 样品瓶一半的位置，因此应给出负偏移量以从靠近样品瓶底部的位置获取样品，例如值 -7 mm 会将针尖放在高于样品瓶底部 3 mm 处。
 - “Equilibration time” 是抽取样品和移动针之间的延迟时间。
 - “Sample flush out factor” 确定在进样后、使阀转到旁路前自动进样器将等待的时间。这可确保样品区已从针、针座和进样阀中清除。缺省值为 5。
 - “Vial/Well bottom sensing” 是使用抽取位置偏移量的备选项。针将慢慢地向下移动，直至其接触样品瓶或孔的底部，然后提升 1 mm。这是一种确保针靠近样品瓶底部的通用方式，但完成进样所需的时间稍长，如果在样品瓶的底部存在可能会阻塞针的微粒，则不应使用。

- “Advanced – High Throughput”
 - “Automatic delay volume reduction” (ADVR) 会在已进行进样以及由样品冲洗因子定义的体积已吹扫进样器后，将进样阀从主路切换到旁路。这会将系统的延迟体积减少约 70 μl 且使梯度更改能够更快地到达色谱柱。
 - “Enable overlapped injection” 也会在样品已冲洗出进样器后或在运行中稍后某一指定的时间进行进样之后，将进样阀从主路切换到旁路。然后进样器将注入下一个样品，准备下一次进样，从而减少总周期时间并增加样品通量。
- “Injection Valve Cleaning”
 - “Injector Cleaning” 允许使用溶剂冲洗进样系统。
 - “Injection Valve Cleaning” 允许运行过程中在设定值切换阀以便在进样有问题的化合物时减少残留。

“高性能自动进样器 (HiP-ALS 进样器程序)” 选项卡

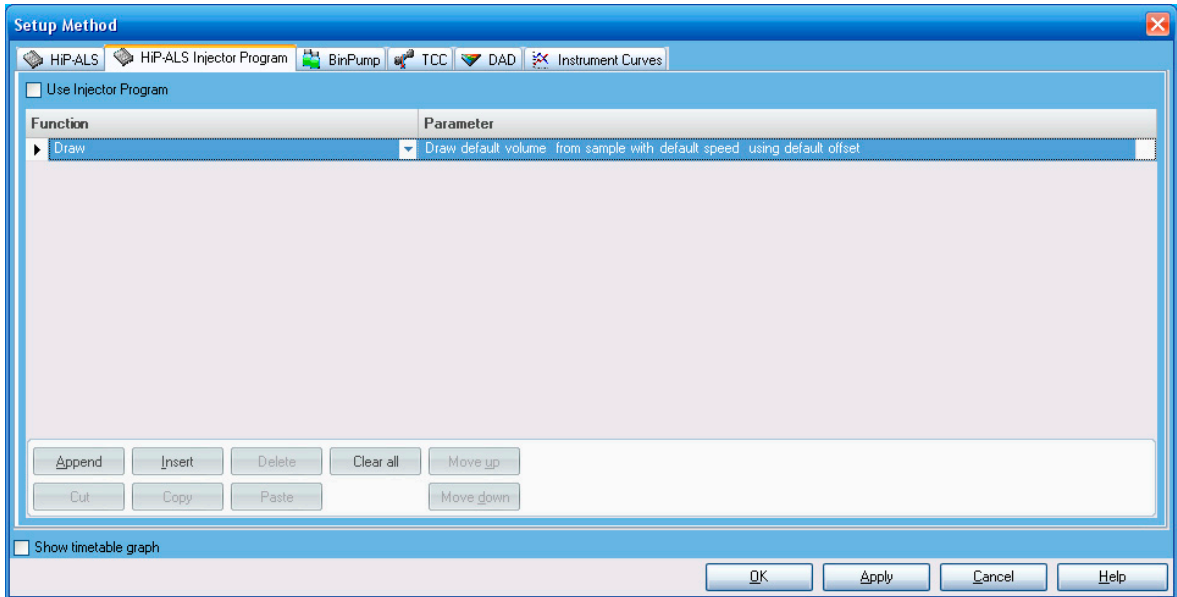


图 26 “设置方法” 屏幕 - “HiP 自动进样器程序” 选项卡

使用此选项卡可以构建特定的进样过程，这些过程涉及处理多个样品瓶中一定量的样品，例如在色谱柱前衍生过程中。试剂化学品会与样品自动混合以增强可检测性或灵敏度。常用的示例是将氨基酸与 OPA 和 FMOC 试剂衍生。有关详细信息，请参阅《《Agilent 1260 Infinity 高性能自动进样器手册》》。

“二元泵”选项卡

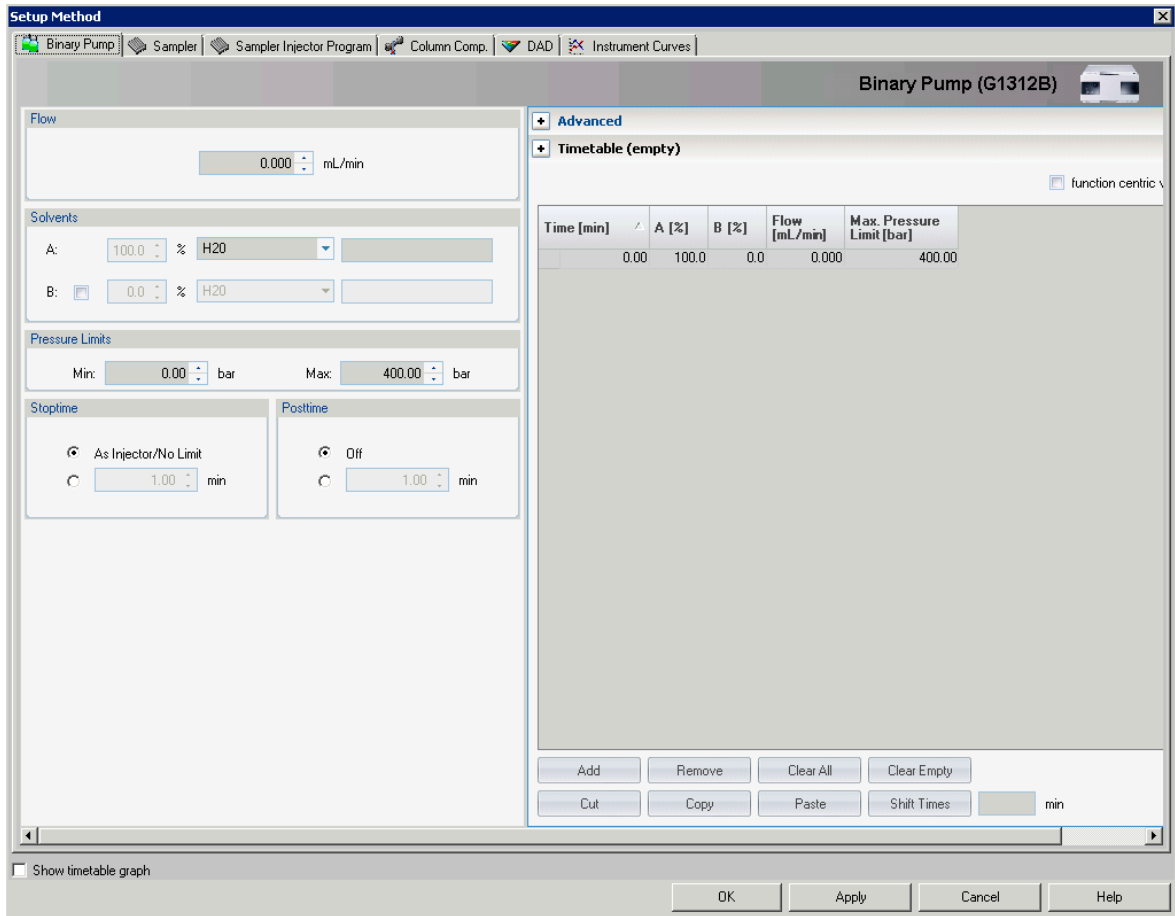


图 27 “设置方法”屏幕 - “二元泵”选项卡

- “Flow” 设置最高达 5 mL/min 的流速。对于此分离示例，使用 4 mL/min。如果背压暂时达到最大压力设置，则减少流量几秒钟以降低压力。如果继续以此方式限制压力，则将产生错误条件且流量将停止。
- “Solvents” 定义可用的流动相以及在两个通道（A 和 B）中泵入的百分比比例。对于每个通道，使用下拉框可以从列表中选择溶剂，以便泵控制使用最佳的压缩因子设置。如“第 43 页的内径为 2.1 mm 的色谱柱的最佳仪器色谱柱”中所述这将优化流量特性。使用第二个文本框可以输入流动相的说明。如果在泵中已安装溶剂选择阀，则每个通道均有两个溶剂选项，且通过溶

剂说明左侧的单选按钮选择用于对应方法的正确选项。泵将形成选定的 A 和 B 通道的二元混合物，例如 A2 和 B1；无法混合 A1 和 A2 或 B1 和 B2。针对 A 和 B 的比例输入的值定义等度方法的成分，或定义梯度方法的开始条件以及梯度运行之间的平衡条件。仅输入 B 的值，A 随后在移动光标时将更新，显示 100 % 减去 B 得到的值。对于此分离示例，将 A 设置为水，将 B 以 60 % 设置为乙腈。A 将为 40 %。

- “**Timetable**” 详细说明在运行过程中应对流动相中的 A 和 B 的成分百分比进行的更改，或如果需要应对流速和允许的最大压力进行的更改。时间表对给定的设定值之间的参数进行线性更改。在此屏幕上的其他位置进行的设置用作初始条件，且只有在时间表中建立条目时这些设置才会更改。例如，如果在运行过程中流量恒定，则不需要在时间表中建立有关流量的条目。要在时间表中建立一个条目，请单击 “**Add**” 按钮向时间表添加一行；输入设定值的时间，从下拉列表中选择该条目的类型（组分、流量、压力），然后单击 “**Parameter**” 框以显示该值的输入框。如果未按逻辑顺序建立时间表条目，则这些条目会自动按时间顺序重新排序。可以直接编辑时间表行，且可以使用 “**Cut**”、“**Paste**” 和 “**Remove**” 按钮来添加和删除行。可以添加多行以提供一系列线性梯度段，从而创建任何梯度轮廓图。要设置简单梯度，首先使用 “**Clear all**” 按钮清除时间表（如果该表不是空的），然后添加行，输入所需的时间和溶剂组分。如果需要步进梯度，则可以通过 0.01 min 分开的 “**步进前**” 和 “**步进后**” 设置建立两个条目来形成步进梯度。这通常用于在运行快要结束时快速洗脱色谱柱中强保留的峰，方法是在步进梯度中增加较强的溶剂和 / 或流速，例如 % B 可能会从 75 % 增加到 95 %。不需要在时间表中针对时间 0.00 min 输入设置，这些值可从此屏幕上的其他设定值获得。但是，一些用户希望在时间表中看到 “**完整的**” 列表并针对 0.00 min 建立条目。这样做没有问题，但如果曾经更改过初始条件，则必须同时在时间表和该屏幕的 “**Solvents**” 部分的设定值中输入新设置。
- “**Show timetable graph**” 会在标记该框时以图形方式显示时间表更改。
- “**Stop Time**” 定义分离或运行的总时间，有时某些用户将其称为 “**运行时间**”。这是（自进行进样以来）运行结束的时间（以分钟计数），这意味着数据采集将停止，流量、成分以及其他系统设置将恢复为对应方法的初始值，且系统将可以进行下一次进样。该时间应始终至少与时间表中的最后一个条目对应的时间相同，否则在时间表事件完成前运行将停止且恢复为开始条件。“**Stop Time**” 可以设置为 “**No Limit**”，在此情况下用户必须手动停止运行。虽然所有系统模块都有 “**Stop Time**” 参数，但泵的 “**Stop Time**” 视为主停止时间，且其他模块通常将设置为遵循此值。
- “**Post Time**” 定义运行结束后的倒计时时段，在该时段内会阻止下一次进样。它使系统有时间在梯度运行后重新平衡。对于等度方法，可以将该时间设置为 “**Off**”。对于梯度方法，可以根据实验通过观察基线行为确定该值，但

通常需要将时间用于系统的延迟体积以及通过系统至少冲洗三到五次色谱柱体积。

- **“Pressure Limits”** 控制泵有关压力的行为。1260 Infinity 二元泵的最大压力为 600 bar，但某些色谱柱只能承受低压，通过在此设置该值，色谱柱将受到保护。如果超过此压力，则泵将产生错误条件。任何正在进行的运行将停止且泵将切换到没有流量的待机模式。色谱柱附带了有关特定色谱柱的最大压力的信息。Agilent ZORBAX RRHT 色谱柱适合于在 600 bar 时运行。在该值为零时低压限制为“关闭”，但在任何其他值时，如果在运行过程中压力低于该值，则泵将生成错误。在色谱柱不在带有泄漏传感器的模块内部时，或者，如果在干燥情况下泵注系统，则这可用作备用保护方法。通常对最小压力限制使用值 10 到 20 bar。

“柱温箱（“TCC”）选项卡

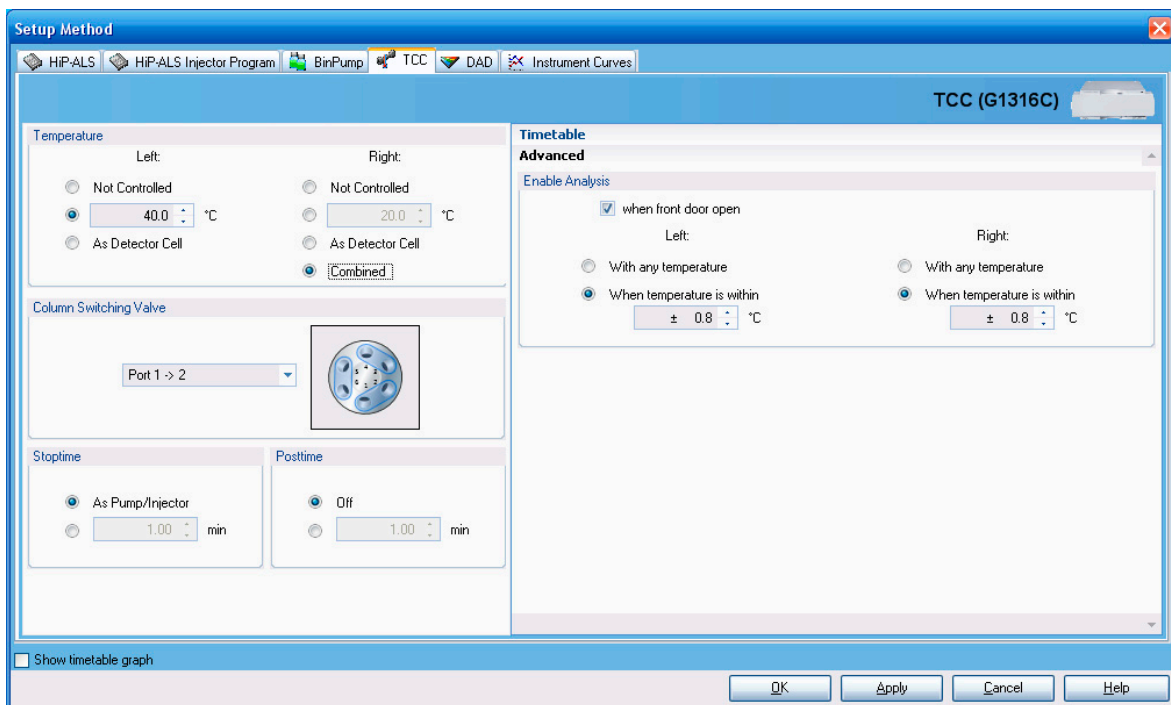


图 28 “设置方法”屏幕 - “柱温箱”选项卡

- “Temperature”定义左右两侧的色谱柱支架的温度，该温度可以独立控制，或者可以通过单击“Combined”单选按钮连接在一起。组合时，左侧的设置会控制两个部分，在色谱柱的长度超过 15 cm 且需要由两个部分支撑时，这一定是必需的。如果需要使两个色谱柱在不同温度下运行，则两侧可以单独操作，这在同时安装了色谱柱切换阀以在两个色谱柱之间切换时可以实现。独立温度区的另一用途是一侧的色谱柱在高温下（例如高于 60 °C）操作时，另一侧的热交换器用于在洗脱液进入检测器之前冷却洗脱液，从而减少由于流通池中的热效应而产生的噪音。选择“As Detector Cell”选项将自动从检测器的池中读取温度。

每个区的温度可以设置为 -5 °C 到 100 °C，且用户应检查对应色谱柱是否适合于在该温度下运行。（在该范围的较高温度时可以使用 Agilent ZORBAX RRHT StableBond 相）。尽管应注意非常少的应用在低于 12-15 °C 的温度下运行，但该温度控制在低于环境温度 ± 0.15 °C 到 10 °C。在这种湿空气中出现水冷凝的低温情况下避免使用 TCC，因为这将触发泄漏传感器。

6 附录

使用编辑整个方法设置方法

- 只有在色谱柱支架之间安装了阀的情况下“Column Switching Valve”才是一个处于活动状态的选项。可以使用以下三种类型的阀：
 - 2 位 6 端口 - 用于在 2 个色谱柱之间切换
 - 2 位 10 端口 - 用于交替色谱柱再生
 - 8 位 9 端口 - 用于在 MDS 中选择多个色谱柱

“二极管阵列检测器”选项卡

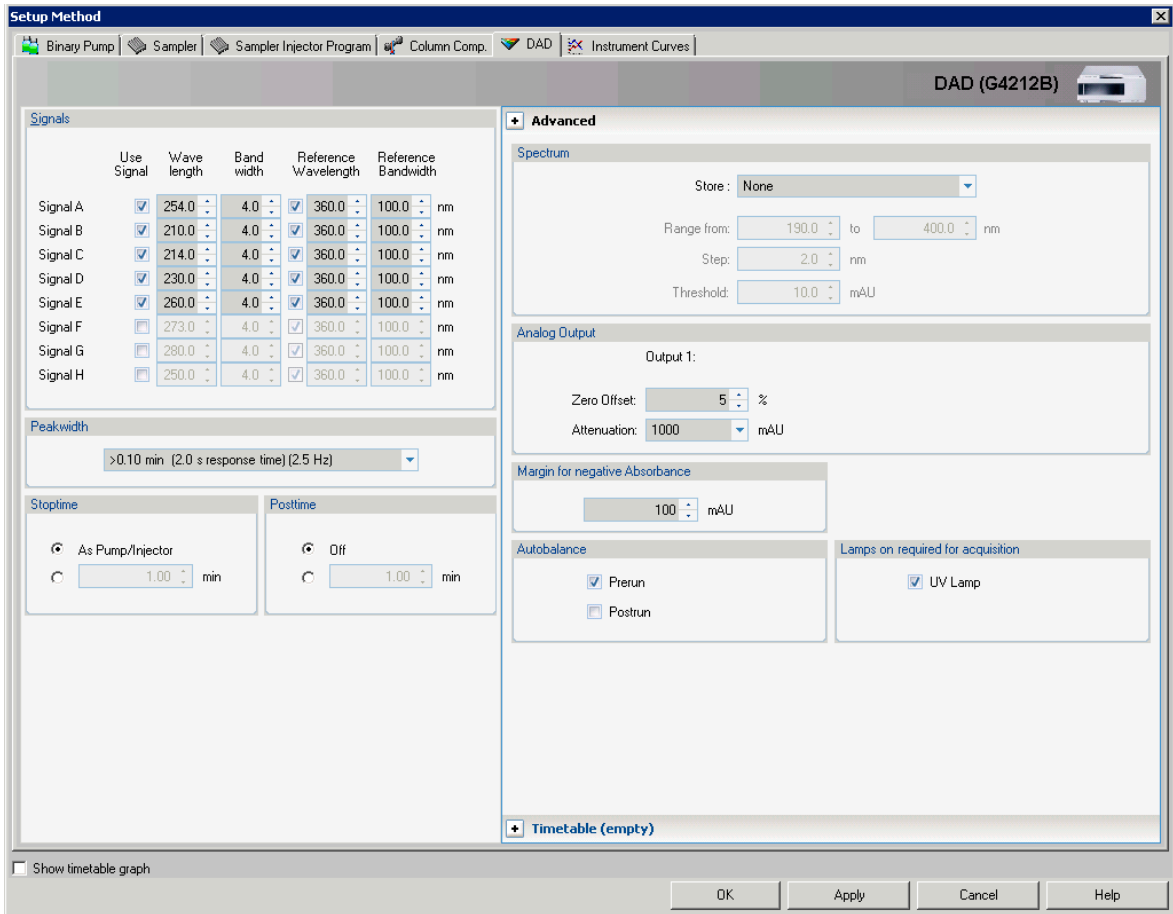


图 29 “设置方法”屏幕 - “二极管阵列检测器”选项卡

- “Signals”：最多可以记录八个独立的信号（色谱图）。要为收集标记某个信号，针对该信号选中“Use Signal”框，定义波长和带宽，且如果需要参比信号，也要选中并定义该框。
 - “Wavelength” 设置信号的中心波长（nm），
 - “Bandwidth” 设置信号的宽度（nm），
 - “Reference Wavelength” 设置从分析信号中扣除的参比带的中心波长（nm），

- “Reference Bandwidth” 设置参比带的宽度 (nm)。
- “Peakwidth” 设置数据收集速率和信号过滤。
- “Stoptime” / “Posttime” 设置为 “As Pump/Injector” 和 “Off”，通常在 “Pump” 选项卡中注意这些值。但是，如果需要在运行结束（已在泵中定义）之前停止数据分析，则可以设置与泵停止时间不同的检测器停止时间。这可能是在梯度结束时设置了梯度平衡阶升的情况。例如，%B 可能会在 10 min 时上升到 95 %，且预计所有峰已从色谱柱中洗脱。运行基本上结束，但将添加一个额外的梯度段，该梯度段会在两分钟内将 %B 恢复为初始值，以逐步开始色谱柱的重新平衡。在此向下阶升过程中未预计任何有用数据，因此检测器停止时间设置为 10 min 且数据收集停止，而泵停止时间为 12 min 以使向下阶升完成。这与用户的选择有关，某些用户认为色谱图的最后几分钟不能包含有用数据，但仍应记录以避免检测器的停止时间不同而引起的不便。检测器停止时间不会覆盖泵，且会导致运行结束，这与任何其他模块中较早的停止时间一样，因此将停止时间设置为 “As Pump/Injector” 会很方便。
- “Timetable” 以与其他模块相同的方式进行操作，即添加行、选择要更改的功能并为该功能输入新值。对检测器的更改将在指定的时间立即进行。在运行过程中可以更改以下功能：
 - “Balance”
 - “Change Signal”
 - “Change Threshold”
 - “Change Peak - detector Peakwidth”
 - “Change Spectra Acquisition Mode”
 - “Change Contacts”
- “Advanced - Spectrum”

在运行过程中可以连续或根据峰控制保存光谱（这适用于化学工作站软件）。某些软件包（例如 EZChrom）仅支持连续收集所有光谱，且不会显示峰控制的选项。光谱收集和信号收集是由检测器固件执行的独立操作，且不依赖于从 3D 数据矩阵提取数据的计算机软件。获取光谱的速率由 “Peakwidth” 设置确定，且在 “Peakwidth” 中指定的时间内会获取八条光谱。固件仅对信号 A 进行峰检测，以确定应何时保存峰控制的光谱。对于多个信号，可能需要将信号 A 设置为宽带检测器以确保峰光谱可用于所有不同的波长信号。

- “Store” 通过以下选项控制光谱收集模式：
 - “None” - 不存储光谱，
 - “Apex+Baselines” - 在峰起点、顶点和终点获取 3 条光谱，

“Apex+Slopes+Baselines” - 在峰起点、上坡、顶点、下坡和终点获取 5 条光谱，

“All in Peak” - 存储峰中的所有可用光谱，

“All” - 存储整个运行过程中的所有光谱，

“Every 2nd Spectrum” - 仅存储在运行过程中采集的交替出现的光谱。

- “Range” - 可以在检测器的全部范围（190 nm 到 640 nm）内或根据需
要由用户选择的任何减小的范围内保存光谱。（这还会减少要存储的数据的
数量。）
- “Step” - 控制光谱中存储的数据的间隔（nm），因此会影响看到的光谱
分辨率。对于大多数应用来说缺省值为 2 nm 是很好的选择。
- “Threshold” - 确定不对低于此值（mAU）的峰高存储光谱。

• “Advanced - Analog Output”

1260 Infinity DAD 有一个模拟信号输出连接器，用于不接受数字输入的数据
系统。可以设置以下选项：

- “Zero Offset” 将零级别置于输出信号设定的百分比，因此允许一些范围
用于向下漂移，
- “Attenuation” 将设定的吸光度缩放为完全输出。

• “Advanced - Margin for Negative Absorbance”

缺省值为 100 mAU，这意味着检测器具有足够的动态范围（同时考虑已设置
零级别的位置）以向下测量至该值。要测量更大的负峰或按照具有强向下漂
移的基线进行，需要向下调整该值以防止在范围的极限出现信号直线。但是，
在没有正常原因的情况下不应更改该值，因为使该值更低将增加基线噪音且会
减小可用于测量正峰的范围。

- “Advanced - Autobalance” 在所有波长都将吸光度级别设置为零（即，将
光谱上的所有点都平衡为零），因此也会将基线信号设置为零。选择
“Prerun” 以正好在运行开始之前平衡，这是正常情况。有时或者选择
“Postrun” 以在运行结束时、后运行时间已到后平衡。例如，如果信号始终
显示向下漂移且用户希望运行在零吸光度时结束，则这将为随后的运行设置
正确的零级别。将不会向后更改在其结束时执行平衡的运行。
- “Advanced - Lamps on required for acquisition”：1260 Infinity DAD
有一个紫外灯，在分析时需要打开，因此应选中此框。

“Instrument Curves” 选项卡

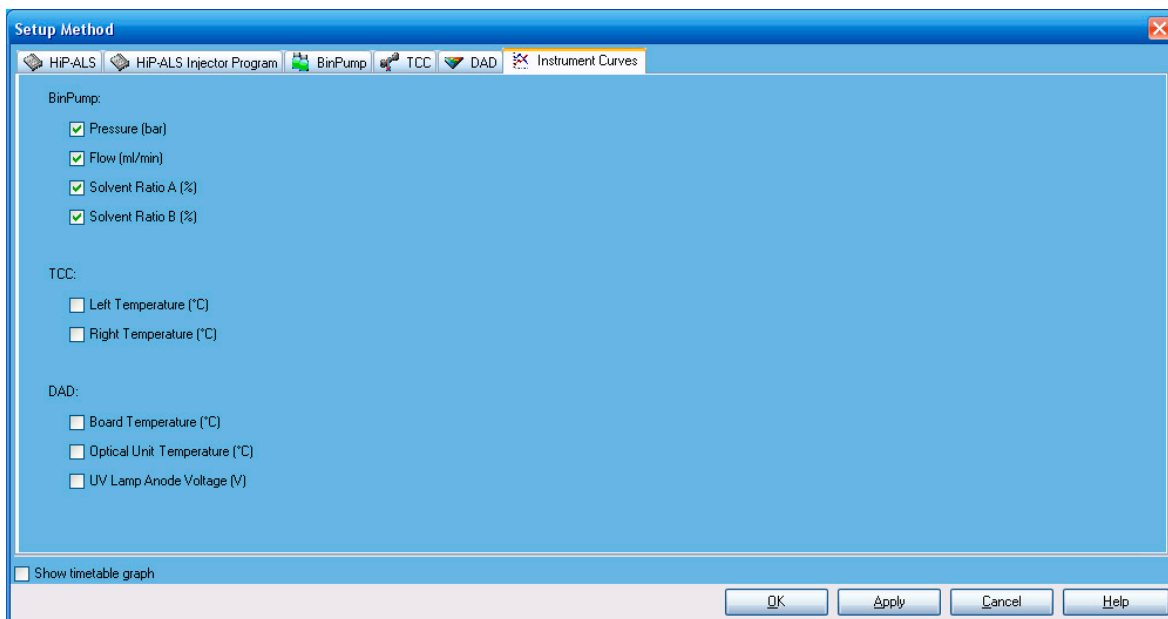


图 30 “设置方法” 屏幕 - “仪器曲线” 选项卡

使用仪器曲线选项卡可以通过选中相关框将监视的数据流（除检测器信号外）与数据一起存储。这些选项主要用于诊断。选项有：

- 泵：
 - 压力
 - 流量
 - A/B 成分 — 可用于重叠色谱图上的梯度轮廓图。
- 柱温箱：
 - 左侧 / 右侧温度
- 检测器：
 - 板温度
 - 光学设备温度
 - 紫外灯阳极电压

数据分析

信号详细信息

“Signal Details”屏幕也可以在“Method and Run Control”视图中直接访问：右键单击图形用户界面上的“Calibration”图标，然后在上下文菜单中选择“Signal Details”。在“数据分析”视图中，可以通过“校正”>“信号详细信息”菜单访问。

“Signal Details”屏幕是“Edit Entire Method”的下一步，该屏幕会通知数据分析要处理哪些采集的信号。该下拉框列出可用信号，包括在检测器设置中定义的分析信号以及记录的参数（例如温度、流量、成分、压力和诊断谱图）。选择一个信号，然后单击“Add to Method”将其传输到屏幕的下半部分显示的“Signal Details”表。您可以选择任何或全部采集的检测器信号进行处理。如果未选择信号，则该表为空；在此情况下，化学工作站将缺省为处理所有采集的检测器信号。

有时用户可能会编辑现有的方法来创建一个新方法，在尝试运行该方法时会遇到“Parameter Mismatch”错误。出现的情况是在旧方法中“Signal Details”已包含一个指定的信号（例如波长为 250 nm，带宽为 8 nm），在新方法中该信号更改（例如更改为 254 nm/12 nm）。“Signal Details”表仍包含原始详细信息，且会通知该表处理不再采集的信号。在该表中突出显示旧信号并使用“Delete Row”按钮将纠正此问题。

如果系统使用多个检测器（例如二极管阵列检测器和质谱仪），则使用“Signal Description”行可以输入下游检测器的延迟时间，以便软件可以校准来自不同检测器的峰。

6 附录

使用编辑整个方法设置方法

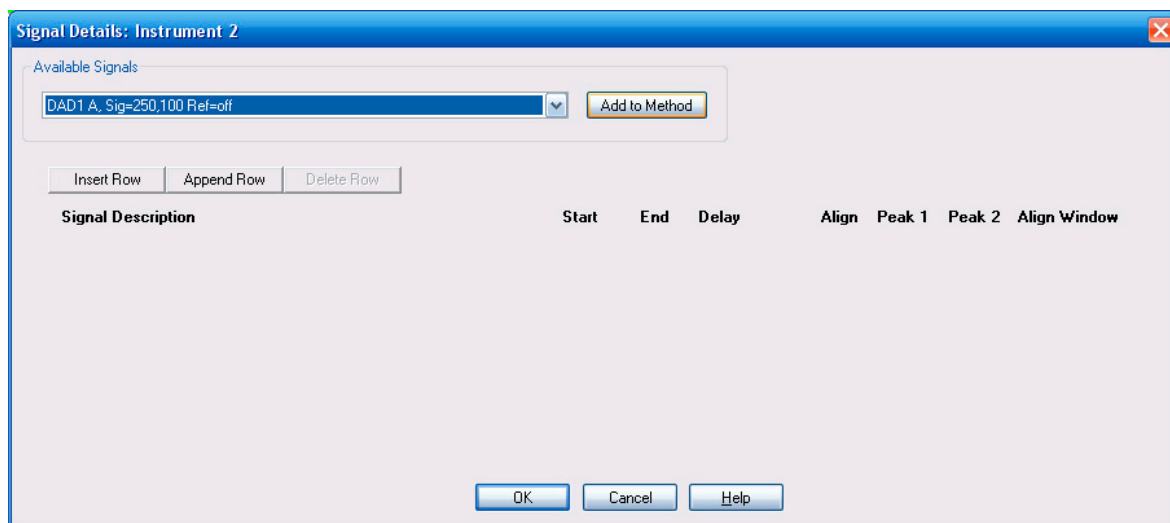


图 31 信号详细信息

编辑积分事件

“Edit Integration Events” 屏幕也可以在“Method and Run Control” 视图中通过右键单击图形用户界面上的“积分事件”图标，然后在上下文菜单中单击“Edit Integration Events”直接访问。在“Data Analysis” 视图中，可以通过“Integration” > “Integration Events...” 菜单或“Edit Integration Events” 任务图标访问。

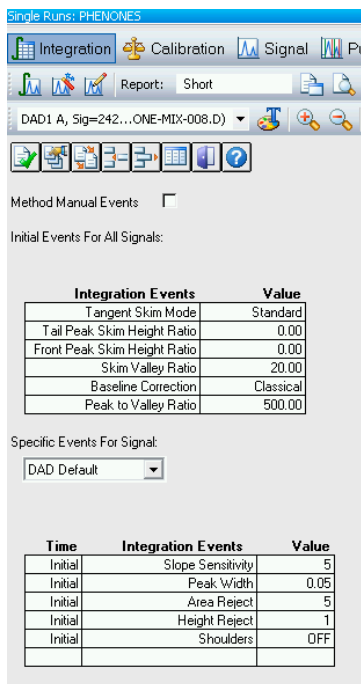


图 32 “编辑积分事件” 屏幕

积分、校正和报告属于方法的数据分析部分。在已采集数据且在“数据分析” 视图中检查数据后，更易于设置积分参数和校正表。此时可以优化积分事件且节省设置通常用于初始采集运行。

6 附录

使用编辑整个方法设置方法

“Edit Integration Events” 屏幕中包含两个表：

- “Initial Events For All Signals” 包含适用于通过方法采集的所有信号的事件（积分参数），
- “Specific Events For Signal” 包含特定于一种类型的检测器或特定于同一检测器中的不同信号的事件。

该表中的主要参数有：

- “Slope Sensitivity” 表示标记峰的起点和终点所需的基线的斜率及曲率；
- “Peak Width”：应输入最窄目标峰的半高处的宽度。这有助于积分器区分噪音与非常小的峰；
- “Area Reject / Height Reject” 值，用于控制从其面积或高度低于这些值的峰结果的去除；
- “Integration OFF/ON” 在设定的限值之间禁止积分。基本上始终用于在进样到溶剂前峰标记或未保留的峰标记的区域中阻止积分。

诸如 “Integration OFF/ON” 之类的行将使用窗口顶部的图标添加到表中。

单击 “OK” 退出，然后 “编辑整个方法” 过程中的下一屏幕将打开。

指定报告

“Specify Report” 屏幕也可以在 “Method and Run Control” 视图中通过右键单击图形用户界面上的 “报告” 图标，然后在上下文菜单中选择 “Specify Report” 直接访问。在 “Data Analysis” 视图中，可以通过 “Report” > “Specify Report” 菜单或 “指定报告” 任务图标访问。

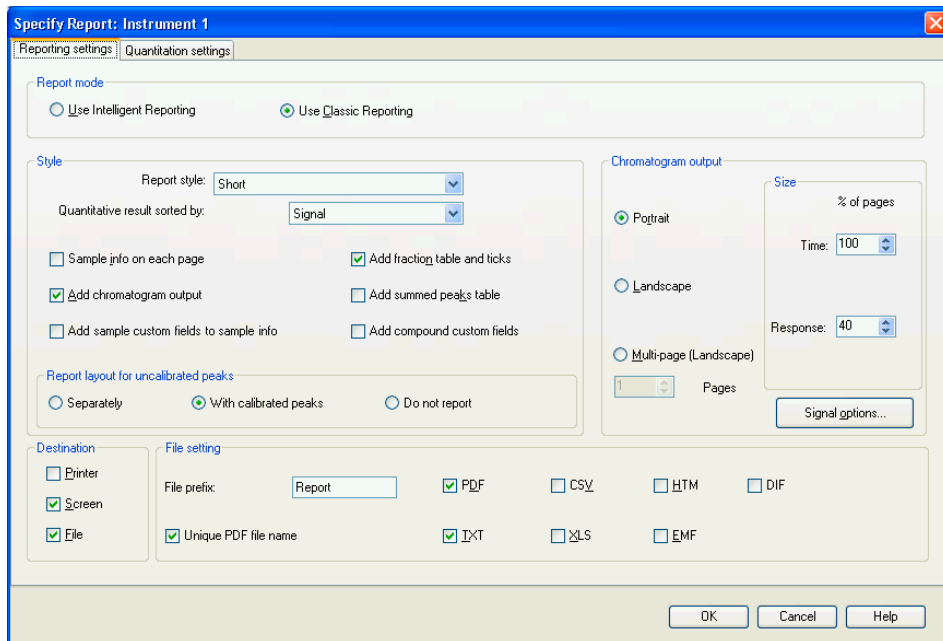


图 33 “指定报告” 屏幕

要设置一个简单的打印至打印机和 PDF 文件的包含经典报告的面积百分比报告，在 “指定报告” 屏幕下面的部分中输入以下设置：

在 “Reporting settings” 选项卡中：

- “Report mode”：使用经典报告
- “Style”
 - “Report Style”：简短
 - “Quantitative results sorted by”：信号
 - “Add Chromatogram Output”：选中
- “Chromatogram Output”：纵向

6 附录

使用编辑整个方法设置方法

- “Size” :
 - “Time” 轴, 页的 100 %
 - “Response” 轴, 页的 40 %
- “Destination”
 - “Printer” : 选中
 - “Screen” : 未选中
 - “File” : 选中
- “File Setting” :
 - “PDF” : 选中
 - “Unique PDF file name” : 选中

在 “Quantitation settings” 选项卡中:

- “Calculation mode”
 - “Calculate” : 百分比
 - “Based on” : 面积

单击 “OK” 退出, 然后 “编辑整个方法” 过程中的下一屏幕将打开。

仪器曲线

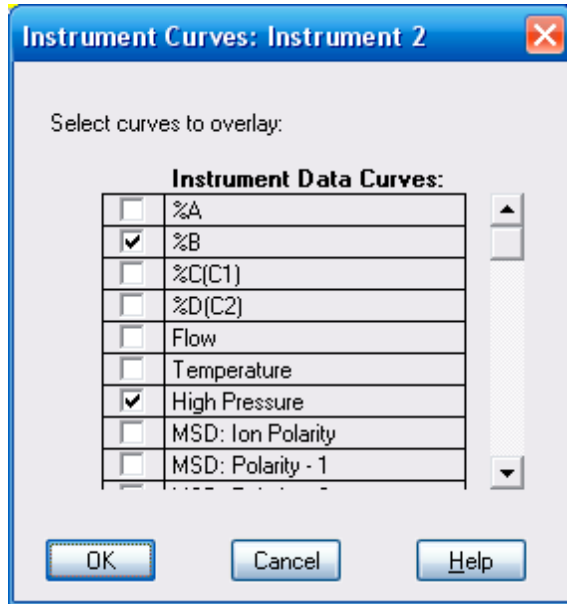


图 34 “仪器曲线” 屏幕

使用 “Instrument Curves” 复选框可以将这些记录的参数重叠为色谱图上的图形。

运行时选项表

“Run Time Checklist”也可以通过“方法” > “运行时选项表...”菜单或通过单击屏幕右上方的“Run Time Checklist”图标直接访问。

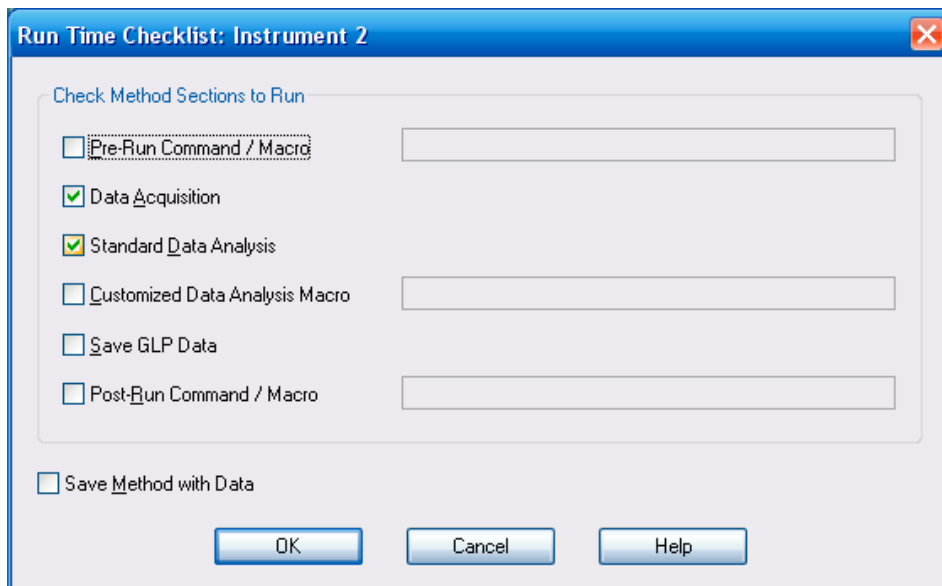


图 35 “运行时选项表”屏幕

“Run Time Checklist”用于选择方法是否应同时运行数据采集和数据分析，且还可以在各个点将宏命令或程序链接到工作流程中。在大多数情况下，选中“Data Acquisition”和“Standard Data Analysis”复选框。如果不需要数据分析（例如在一系列方法开发运行中），则可以取消选中“Standard Data Analysis”，以便不会生成报告且以后在“Data Analysis”视图中可以以可视方式访问数据。

要在访问点之一链入某个宏程序，则选中相关框并在右侧的文本框中键入该宏的名称。软件将在 C:\Chem32\Core 目录中查找该宏；如果该宏位于其他位置，则应包括路径。

方法的工作流程中的访问点有：

- “Pre-Run Command / Macro”
- “Customized Data Analysis Macro”
- “Post-Run Command / Macro”

“Save Method with Data”会将方法的副本保存在数据文件中并将其命名为 RUN.M。如果化学工作站在常规配置中运行，则不需要此选项，因为软件会始终将方法保存在数据文件中（自 B.02.01 起的所有版本）。只有在已配置化学工作站以使“Unique Sequence Folder Creation”关闭，从而未将方法按常规复制到数据文件中的情况下，该选项才相关。

因为这是该过程中的最后一个屏幕，因此单击“OK”将从“Run Time Checklist”和“Edit Entire Method”过程中退出。现在应使用“文件”>“另存为”>“方法”或“方法菜单”>“另存方法为”将方法保存到主方法目录中，缺省情况下为 C:\Chem32\1\Methods。

用户界面词汇

1

- 1260 Infinity Autosampler**
1260 Infinity 自动进样器
- 1260 Infinity Binary Pump**
1260 Infinity 二元泵

A

- Add**
添加
- Add Chromatogram Output**
添加色谱图输出
- Add to Method**
添加到方法
- Adjust**
调整
- Advanced**
高级
- Advanced - Analog Output**
高级 - 模拟输出
- Advanced - Autobalance**
高级 - 自动平衡
- Advanced - Auxiliary**
高级 - 辅助功能
- Advanced - High Throughput**
高级 - 高通量
- Advanced - Lamps on required for acquisition**
高级 - 采集时需要灯打开
- Advanced - Margin for Negative Absorbance**
高级 - 负吸光度极限
- Advanced - Spectrum**
高级 - 光谱

- All**
全部
 - All in Peak**
峰中的全部
 - All Programs**
所有程序
 - Apex+Baselines**
顶点 + 基线
 - Apex+Slopes+Baselines**
顶点 + 斜坡 + 基线
 - Apply**
应用
 - Apply to Method**
应用于方法
 - Area Reject**
最小峰面积
 - Area Reject / Height Reject**
最小峰面积 / 最小峰高
 - As Detector Cell**
与检测器池一致
 - As Pump/Injector**
与泵 / 进样器一致
 - Attenuation**
衰减
 - Automatic delay volume reduction**
自动减少延迟体积
 - Available Signals**
可选信号
- ### B
- Balance**
平衡
 - Bandwidth**
带宽

- Based on**
依据
- Baseline Correction**
基线修正

C

- Calculate**
计算
- Calculation mode**
计算模式
- Calibration**
校正
- Cancel**
取消
- Change Contacts**
更改接点
- Change Peak - detector Peakwidth**
更改峰 - 检测器峰宽
- Change Signal**
更改信号
- Change Spectra Acquisition Mode**
更改光谱采集模式
- Change Threshold**
更改阈值
- Change...**
更改 ...
- Check Method Sections to Edit**
检查要编辑的方法部分
- Chromatogram Output**
色谱图输出
- Clear all**
全部清除

Column Switching Valve

色谱柱切换阀

Combined

组合

Comment

注释

Customized Data Analysis Macro

自定义数据分析宏

Cut

剪切

D**Data Acquisition**

数据采集

Data Analysis

数据分析

Delete Row

删除行

Destination

输出方式

Draw position

抽取位置

Draw speed

抽取速度

E**Edit Entire Method**

编辑整个方法

Edit Integration Events

编辑积分事件

Edit Signal Plot

编辑信号图谱

Eject speed

排出速度

Enable overlapped injection

启用重叠进样

Enhanced Solvent**Compressibility**

增强的溶剂可压缩性

Equilibration time

平衡时间

Every 2nd Spectrum

每隔一条光谱

F**File**

文件

File Setting

文件设置

Flow

流量

Flush Port

冲洗口

H**Height Reject**

最小峰高度

HiP-ALS Injector Program

HiP-ALS 进样器程序

I**Initial Events For All Signals**

所有信号的初始事件

Injection Mode

进样模式

Injection Valve Cleaning

进样阀清洗

Injection volume

进样体积

Injection with needle wash

洗针进样

Injector Cleaning

进样器清洗

Instrument Curves

仪器曲线

Instrument/Acquisition

仪器 / 采集

Instruments

仪器

Integrate

积分

Integration

积分

Integration Events

积分事件

Integration Events...

积分事件...

Integration OFF/ON

积分关闭 / 打开

Intensity Test

强度测试

L**Launch online**

在线启动

Load Method

调用方法

Location

位置

M**Method**

方法

Method and Run Control

方法和运行控制

Method History

方法历史

Method Information

方法信息

Method...

方法...

Mode

模式

用户界面词汇

N

Name Pattern
名称模式
Needle Wash
洗针
No Limit
无限制
No Limit / Off
无限制 / 关闭
None
无

O

Off
关闭
OK
确定
Online Plot
在线图谱
OpenLAB Control Panel
OpenLAB 控制面板

P

Parameter
参数
Parameter Mismatch
参数不匹配
Paste
粘贴
Peak Width
峰宽
Peakwidth
峰宽
Post Time
后运行时间
Postrun
后运行
Post-Run Command / Macro
后运行命令 / 宏

Posttime
后运行时间
Prerun
预运行
Pre-Run Command / Macro
运行前命令 / 宏
Pressure Limits
压力限值
Printer
打印机
Pump
泵

Q

Quantitation settings
定量设置
Quantitative results sorted by
定量结果排序依据

R

Range
范围
Reference Bandwidth
参比带宽
Reference Wavelength
参比波长
Remove
删除
Repeat
重复
Report
报告
Report mode
报告模式
Report Style
报告样式
Reporting settings
报告设置

Response
响应
Run Control
运行控制
Run Method
运行方法
Run Queue
运行队列
Run Sequence
运行序列
Run Time Checklist
运行时选项表

S

Sample flush out factor
样品冲洗因子
Sample Info
样品信息
Sample name
样品名称
Save
保存
Save As...
另存为...
Save Method As...
另存方法为...
Save Method with Data
将方法与数据一起保存
Screen
屏幕
Select Run Method Task
选择运行方法任务
Selected Signal
选定的信号
Selected Signals
选定的信号
Set Integration Events Table
设置积分事件表

Setup Method
设置方法

Show timetable graph
显示时间表图形

Signal A
信号 A

Signal Description
信号说明

Signal Details
信号详细信息

Signals
信号

Single Runs
单次运行

Size
大小

Skip
跳过

Slope Sensitivity
斜率灵敏度

Solvents
溶剂

Specific Events For Signal
信号的特定事件

Specify Report
指定报告

Spectrum Store
光谱存储

Standard Data Analysis
标准数据分析

Standard injection
标准进样

Start
开始

Step
步进

Stop Time
停止时间

Stop Time / Post Time
停止时间 / 后运行时间

Stoptime
停止时间

Store
存储

Style
样式

Subdirectory
子目录

Switch [module name] on
打开 [模块名称]

System On/Off
系统开启 / 关闭

T

Temperature
温度

Threshold
阈值

Time
时间

Timetable
时间表

U

Unique PDF file name
唯一 PDF 文件名

Unique Sequence Folder Creation
唯一序列文件夹创建

Use Signal
使用信号

V

Vial/Location
样品瓶 / 位置

Vial/Well bottom sensing
样品瓶 / 孔底感应

W

Wash Vial
清洗瓶

Water
水

Wavelength
波长

Wavelength Calibration
波长校正

Z

Zero Offset
零偏移量

索引

- A**
- 主动密封圈冲洗 11
 - ADVR 49
 - 交替柱再生 48
 - 模拟信号输出 25
 - 分析
 - 数据 96
 - 安捷伦
 - 网站 109
 - 安全
 - 标志 104
 - 一般信息 102
 - 自动减少延迟体积 49
- B**
- 二元泵 11
 - 缓冲液 11
- C**
- 计算器
 - 成本 34
 - 操作海拔高度 23
 - 操作环境温度 23
 - 操作温度 23
 - 残留量 49, 51
 - 更换溶剂 79
 - 尺寸 23
 - 色谱柱堵塞
 - 防止 65
 - 色谱柱
 - 亚两微米粒子 34
 - 温度 37
 - 恒温调节 37
 - 补偿, 压缩性 24
 - 组分准确度 25
 - 组分精度 25
 - 组分范围 25
 - 压缩性补偿 24
 - 配置
 - 低延迟体积 43
 - 中延迟体积 44
 - 标准延迟体积 45
 - 控制和数据评估 25
 - 循环时间
 - 仪器配置 48
- D**
- 数据评估和控制 25
 - 数据
 - 分析 96
 - DEF_LC. M 110
 - 延迟体积
 - 自动切换 42
 - 说明 40
 - 示例 40
 - 设计 11
 - 检测器
 - 获得更高的灵敏度 62
 - 电压范围 23
 - 二极管阵列检测器
 - 说明 19
 - 双活塞串联设计 11
- E**
- 柱外体积
 - 说明 41
- F**
- 非操作海拔高度 23
 - 非操作环境温度 23
 - 非操作温度 23
 - 流量准确度 24
 - 流通池 63
 - 流量精度 24
 - 流速范围 11
 - 可操作 24
 - 可设置 24
 - 摩擦热 37
- G**
- 工作原理 14
 - 梯度形成 24
 - 规格
 - 物理 23
- H**
- 耗电量 23
 - 高压混合 11
 - 液压系统 24
- I**
- 进样体积
 - 获得更大体积 47
 - 安装

- 数据系统 68
- 实验室监控与诊断 69
- 软件控制器 68
- 积分事件表 98
- 积分 98
- Internet 109
- K**
- 控制组件 14
- L**
- 低延迟体积配置 43
- M**
- 中延迟体积配置 44
- 方法
 - 设置 92
 - 单次进样 94
- 混合器 11
- O**
- 优化
 - 获得更高的分离度 53
 - 获得更高的灵敏度 60
 - 色谱分离度 31
 - 色谱柱使用 62
 - HPLC 的条件 31
 - 检测器灵敏度 62
 - 进样体积 47
- 优化配置
 - 内径为 2.1 mm 的色谱柱 43
 - 内径为 3 和 4 mm 的色谱柱 45
- 优化分离度
 - 色谱条件 59
 - 柱温箱 56
- 数据采集速率 58
- 柱外体积 57
- 优化
 - 流通池 63
 - 重叠进样 49
- P**
- 建议的 pH 值范围 24
- 频率范围 23
- 压力
 - 操作范围 24
 - 脉动 24
- 灌注
 - 使用泵 78
- 冲洗 87
- Q**
- 快速入门指南
 - 简介 82
- R**
- 建议的 pH 值范围 24
- 报告
 - 指标 99
- 分离度
 - 增大 53
 - 优化 53
- 保留因子 32
- S**
- 灵敏度
 - 仪器配置 61
 - 优化 60
- 可设置流速范围 24
- 湿度 23
- 溶剂选择阀 11
- 溶剂, 更换 79
- 指标
 - 模拟信号输出 25
 - 通讯 25
 - 控制和数据评估 25
- 标准延迟体积配置 45
- 亚两微米粒子 34
- 系统组件
 - 二极管阵列检测器 19
 - 柱温箱 17
- T**
- 理论塔板数 32
- 柱温箱
 - 说明 17
- 脱气机简介 14
- V**
- 范第姆特方程式 29
- W**
- 物理规格 23
- X**
- 线路电压 23
- 线路频率 23
- 性能
 - 指标 24
- Y**
- 压力传感器 14
- 延迟体积 40
- Z**
- 真空泵 14
- 真空脱气机 26

索引

指标
 性能 24
重量 23
柱外体积 40

安

安全
 标准 23
安全级别 I 102

调

调用
 缺省 84

方

方法
 编辑整个方法 110
 缺省 110
方法信息 111, 112

配

配置
 在线图谱 85

设

设置仪器方法 113

数

数据分析 111

网

网络集成 70

系

系统设置与安装
 网络集成 70

系统
 启动 83

仪

仪器 / 采集 111

运

运行时选项表 111

在

在线图谱
 配置 85

www.agilent.com

内容提要

本手册包含有关 Agilent 1260 Infinity 二元梯度 LC 的信息。

本手册将介绍以下内容：

- 产品说明，
- 简介，
- 性能指标，
- 系统优化，
- 系统设置和安装，
- 快速入门指南。

© Agilent Technologies 2006, 2008-2011, 2013

Printed in Germany
02/2013



G1312-97303