

Pickering 柱后衍生系统

简易操作手册

安捷伦科技有限公司

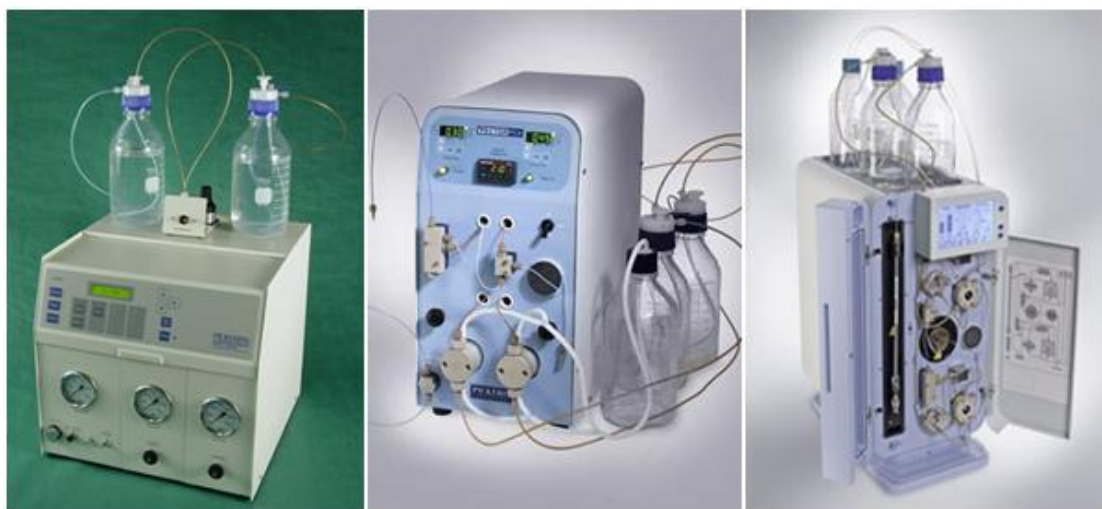
生命科学与化学分析仪器部

一.培训目的:

- ❖ 了解 Pickering 柱后衍生装置 PCX 5200, Vector PCX, Pinnacle PCX 三种型号的硬件操作。
- ❖ 了解两种典型应用分析的基本原理。
- ❖ 掌握 Pickering 柱后衍生装置的开机, 关机以及柱后衍生分析的注意事项。

二.仪器配置:

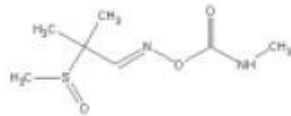
- ❖ 在线脱气机(推荐使用)
- ❖ 二元泵或四元泵
- ❖ 自动进样器或手动进样器
- ❖ 柱温箱(可选)
- ❖ 荧光检测器
- ❖ 紫外检测器
- ❖ 化学工作站
- ❖ Pickering 柱后反应仪
- ❖ Pickering 氨基甲酸酯分析套包或氨基酸分析套包



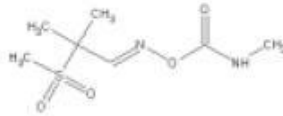
三.典型应用的分析方法

❖ 氨基甲酸酯分析

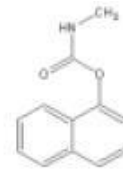
- 氨基甲酸酯类农药的结构中均含有下N-甲基氨基甲酰基，在USEPA方法531.1中列出了十种分析物的结构式如下图（包含1-萘酚和内标BDMC）。它们按照在C18柱上的流出顺序列出。除了1-萘酚外，它们均含有N-甲基氨基甲酰基部分（用OR表示），甲萘威carbaryl (9)在柱后反应器中也水解产生1-萘酚，注意从甲萘威carbaryl (9)水解产生的1-萘酚与标样中的1-萘酚的保留时间不同，这对故障排除非常有用。氨基甲酸酯的分离可通过Pickering 5u 25cm C18或C8柱在42℃或37℃下分离。



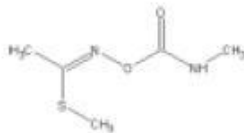
Aldicarb Sulfoxide



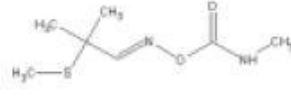
Aldicarb sulfone



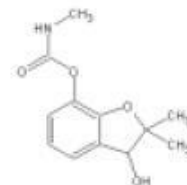
Carbaryl



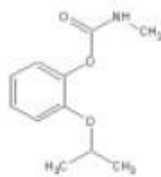
Methomyl



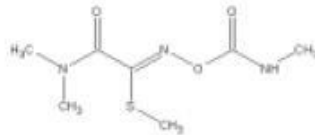
Aldicarb



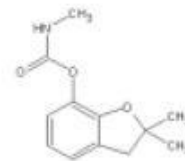
3-Hydroxy carbofuran



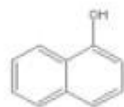
Propoxur



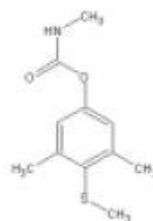
Oxamyl



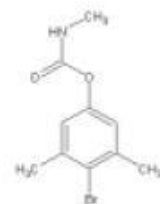
Carbofuran



1-Naphthol

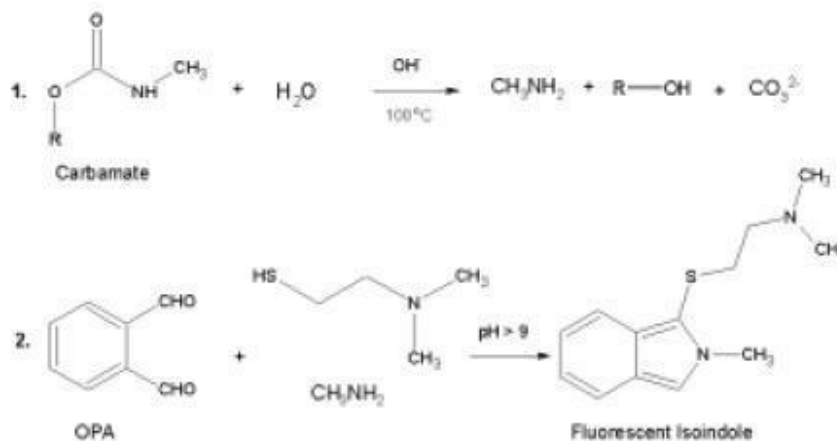


Methiocarb



4-Bromo-3,5-dimethylphenyl-N-methylcarbamate (BDMC)

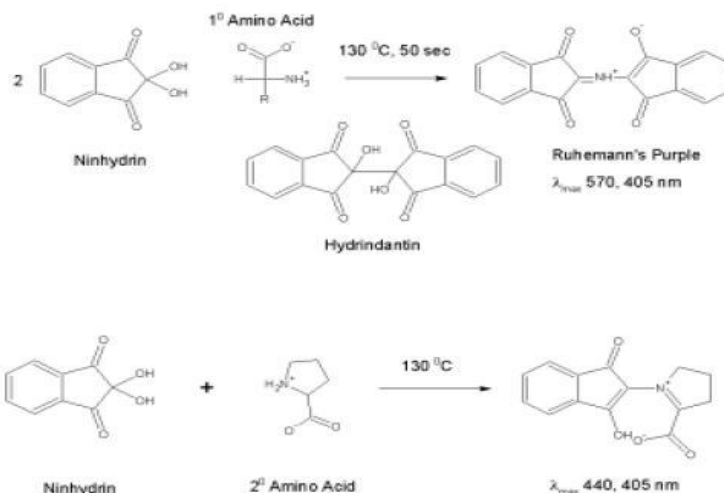
- 分离后的氨基甲酸酯农药首先在100℃下在NaOH作用下水解释放出醇，碳酸盐和甲胺。在第二个柱后反应中甲胺与邻苯二甲醛（OPA和2-巯基乙醇反应生成有强荧光吸收的1-甲基-2-咪唑类化合物，被荧光检测器检测且具有很低的检测限，满足EPA方法的要求。



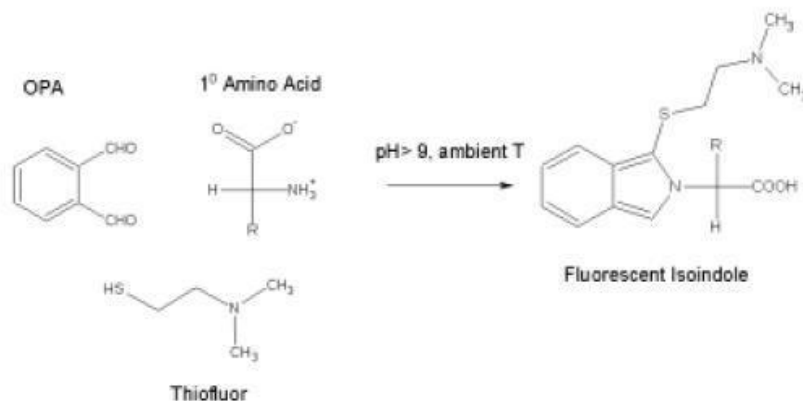
- 氨基甲酸酯分析的柱后条件：
 - 衍生试剂1：水解衍生试剂CB 130
 - 衍生试剂2：100mg OPA, 2g Thiofluor溶解于950mL CB 910
 - 反应器1：100℃，0.5mL
 - 反应器2：环境温度
 - 衍生试剂流速：0.3mL/min
- 检测：
 - 荧光检测器： λ_{ex} 330nm , λ_{em} 465nm
 - 氨基甲酸酯分离柱0846250 (4.6×250mm) , C18, 5 μ m

❖ 氨基酸分析

- 氨基酸的衍生化有两种方法。第一种是茚三酮（Ninhydrin）衍生化，茚三酮与一级氨基酸反应产生深蓝色或紫色，称为罗曼紫，吸收波长570nm；茚三酮与二级氨基酸反应产生一种黄色物质，吸收波长440nm。这个反应需要130℃高温和500 μ l反应器。



第二种是邻苯二甲醛（OPA）衍生化，可以用于一级氨基酸的高灵敏度检测。一级氨基酸与邻苯二甲醛和N,N-二甲基-2-巯基乙胺在弱碱性条件下反应生成一种有荧光响应的异吲哚衍生物。二级氨基酸不能发生此反应，必须通过先氧化经两步反应检测二级氨基酸，这是该法的缺点。这个反应需要150u1反应器和45°C反应温度。



可以看出氨基酸分析只需要配置单泵衍生系统，如使用双泵衍生系统，可以关闭第二个试剂泵，加热反应器出口管线可以绕过第二个混合器和常温反应器，直接连接检测器。

氨基酸分析可以使用Pickering分析套包中的离子交换柱分离，流动相体系和再生试剂均包含在分析套包内，是一种低速高分辨率的方法，可以分离生物体液或组织提取物等复杂混合物中的46种氨基酸。

➤ 氨基酸柱后衍生分析对于LC的要求：

1. 四元梯度泵，最好配备柱塞清洗组件；
2. 进样器要使用Tefzel或者PEEK材料的转子，否则不能承受再生试剂高达12+的pH；
3. 不要使用不锈钢溶剂过滤头，洗脱试剂中的锂盐或者钠盐在暴露于空气中的情况下会轻度腐蚀不锈钢；

4. 彻底冲洗LC管路，该衍生反应对于污染物非常灵敏；
5. 连接离子交换柱之前，LC到柱后衍生系统所有管路中的有机溶剂必须用水彻底冲干净，否则会造成柱床溶胀；
6. LC泵的阻尼器和PCX-5200的压力传感器一端必须堵死以最小化延迟体积（详情请见下页图），保证梯度的准确性，因为流动相pH值的微小变化对于分离效果的影响非常显著。

➤ 氨基酸分析的柱后条件：

PCX5200订货号1152-1221或1152-1222（茚三酮衍生化分析包）

衍生化试剂：茚三酮(订货号T100或T200)

衍生试剂流速：0.30mL/min

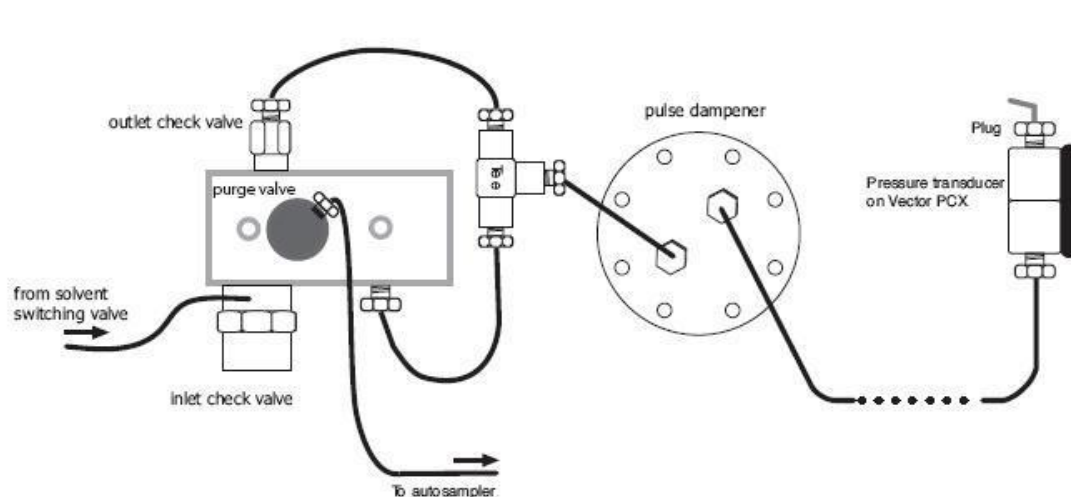
反应器：500 μ L, 130 $^{\circ}$ C

PCX5200订货号01152-1111或1152-1112（邻苯二甲醛衍生化分析包）

衍生化试剂：OPA(订货号0120)，Thiofluor™(订货号3700-2000)，pH 10.4 硼酸缓冲液(订货号OD104)+30mL Brij35®

衍生试剂流速：0.30mL/min

反应器：150 μ L, 45 $^{\circ}$ C



➤ 检测：

茚三酮法-紫外检测器： λ_1 570nm, λ_2 440nm (λ_{ref} 700nm)

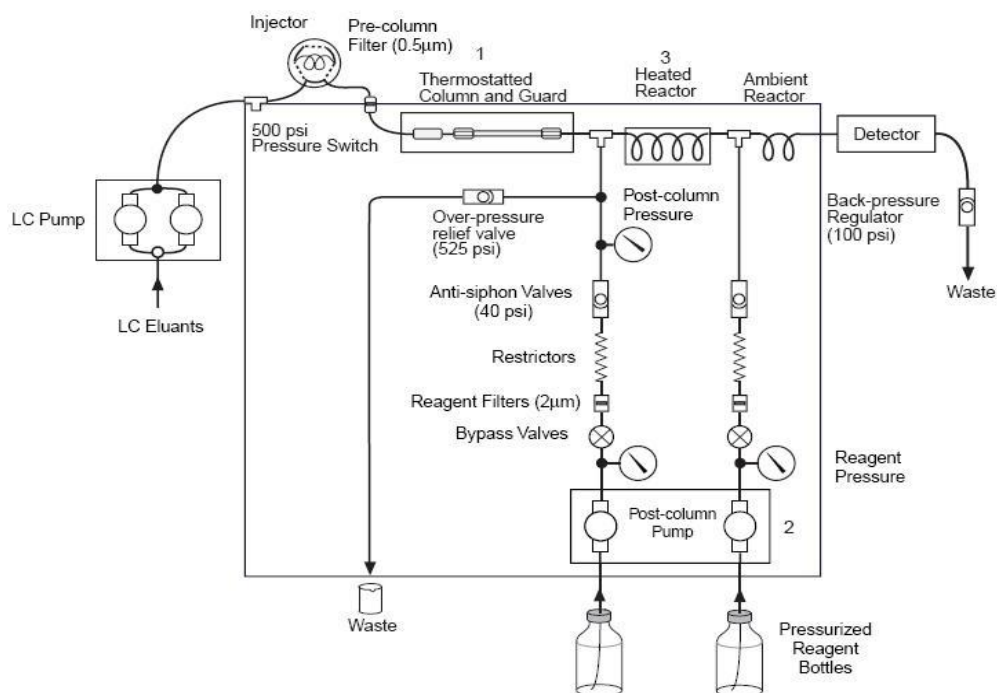
OPA法-荧光检测器： λ_{ex} 330nm, λ_{em} 465nm

离子交换柱：钠盐1193250, 3.0x250mm或锂盐0353150, 3.0x150mm

四.硬件原理与安装:

❖ 硬件原理：

柱后反应装置的最低要求是含有一个无脉冲的试剂泵，一个用于混合反应试剂和流动相的混合器以及一个反应器。要完成氨基甲酸酯分析需要两个柱后反应系统串联。如下图所示：在Pickering的设计中，压力表和其后的阻尼用于减少压力脉冲。为保证反应快速还需要对水解过程进行控温，高温又需要一个背压调节器以避免流动相在加热的反应器中沸腾，Pickering 的设计还含有一个压力表来监测第一个混合器的压力。加压的试剂瓶可以保证泵在较低的流速下更加精确，同时提供一个惰性气氛以阻止试剂氧化。安全系统也整合到系统中从而避免两个柱后反应系统的隐患：1-过压导致柱后反应器爆裂，2-强碱试剂返流损坏色谱柱，第一个隐患是通过一个525psi的卸压阀来完成，第二个隐患是在系统中增加了一个500psi的安全开关，只有在分析柱上游达到500psi的压力下才允许柱后反应系统操作。单向阀在泵关闭状态时防止试剂虹吸。

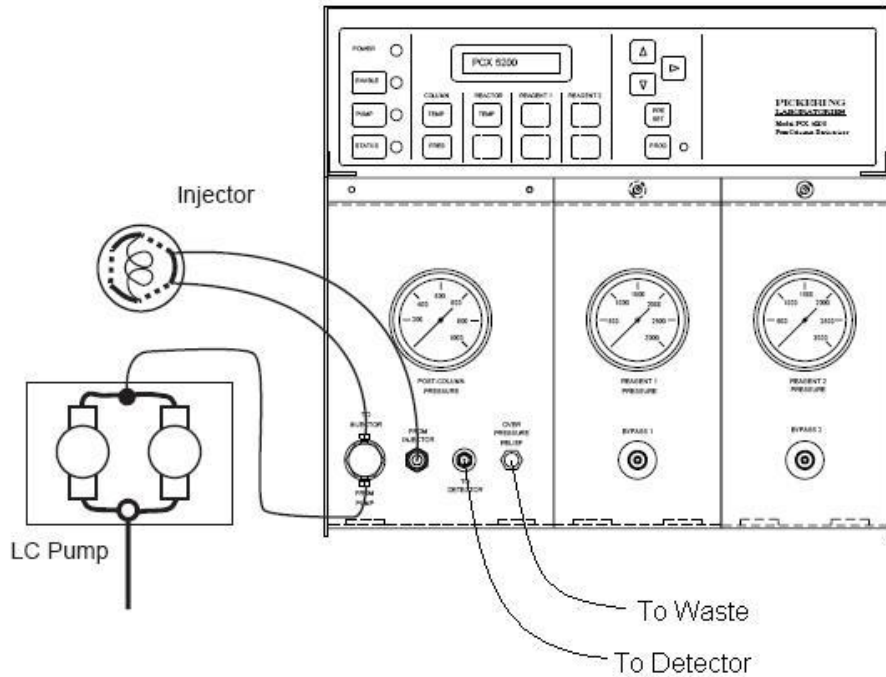


❖ 硬件连接

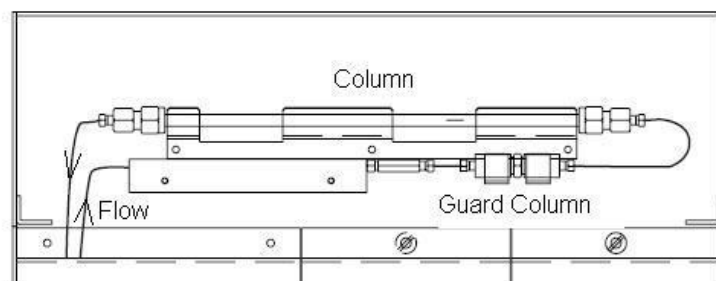
➤ PCX5200:

请按照下图所示连接仪器管线(管线材料及接头要求参见本段末附表):

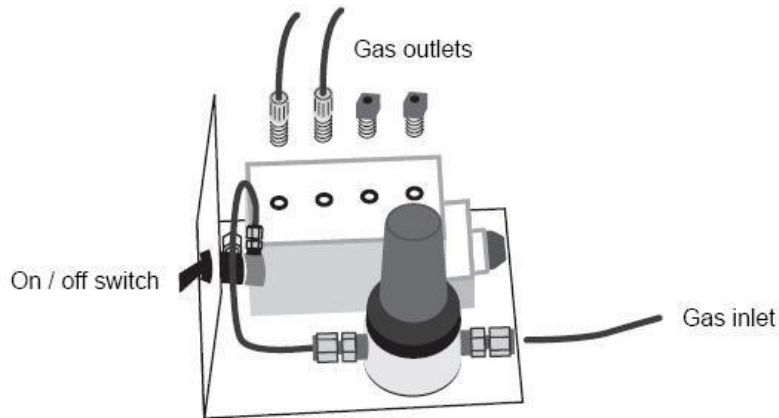
1. 从泵出口连接1/16不锈钢或PEEK管线到PCX 5200的“From Pump”处。



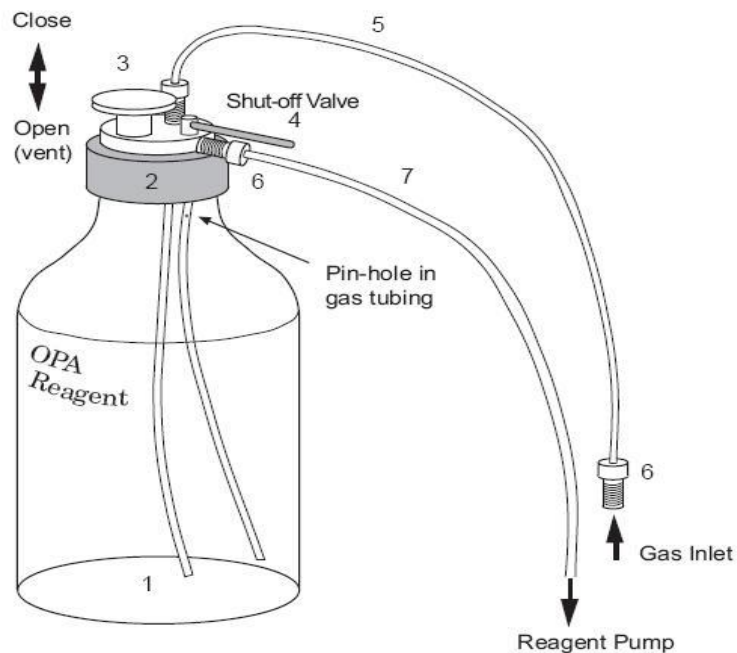
2. 从PCX 5200的“To Injector”处连接1/16英寸不锈钢或PEEK管线到1100自动进样器进样阀入口。
3. 从1100自动进样器进样阀出口连接0.01英寸内径左右的PEEK管线到PCX 5200的“From Injector”处(注意在PCX 5200仪器上此接头含有一个可更换的0.5μ过滤器，因此此处接头必须使用PEEK接头)。
4. 从PCX 5200的“To Detector”处连接0.01英寸内径左右的不锈钢或PEEK管线到1100荧光检测器流通池入口。
5. 从1100荧光检测器流通池出口连接0.02英寸内径的PTFE管线到100Psi背压调节器入口(注意100psi背压调节器的目的是防止温度较高的流动相在流通池内爆沸或产生气泡，但也要注意FLD流通池的最高耐压只有20Bar)。
6. 用随机的0.02英寸内径的PTFE管线连接100Psi背压调节器出口到废液瓶。
7. 打开PCX 5200的柱温箱，按照下图所示连接保护柱和分析柱。



8. 准备一瓶高纯N₂，连接1/8英寸的铜质或SARAN管线到高压钢瓶的减压表上，将管线的另一端连接到气路控制组件(Gas Manifold)的入口，如下图所示：



- a. 用1/4-28螺母和反向压环以及棕色的SARAN管线连接Gas Manifold的出口到OPA加压试剂瓶的入口，对于NaOH水解试剂可以使用PTFE管线进行连接。
- b. 用1/4-28螺母和反向压环连接PCX 5200仪器后侧的SARAN管线到OPA加压试剂瓶Shut-off阀的下面接口。同样连接仪器后侧的白色PTFE管线到水解试剂加压瓶的Shut-off阀的下面。见下图：



- c. 打开钢瓶减压表，调节出口压力为3-5Bar，打开Gas Manifold的ON/OFF开关和加压试剂瓶的Vent阀，用惰性气体Purge气体管线和试剂瓶。

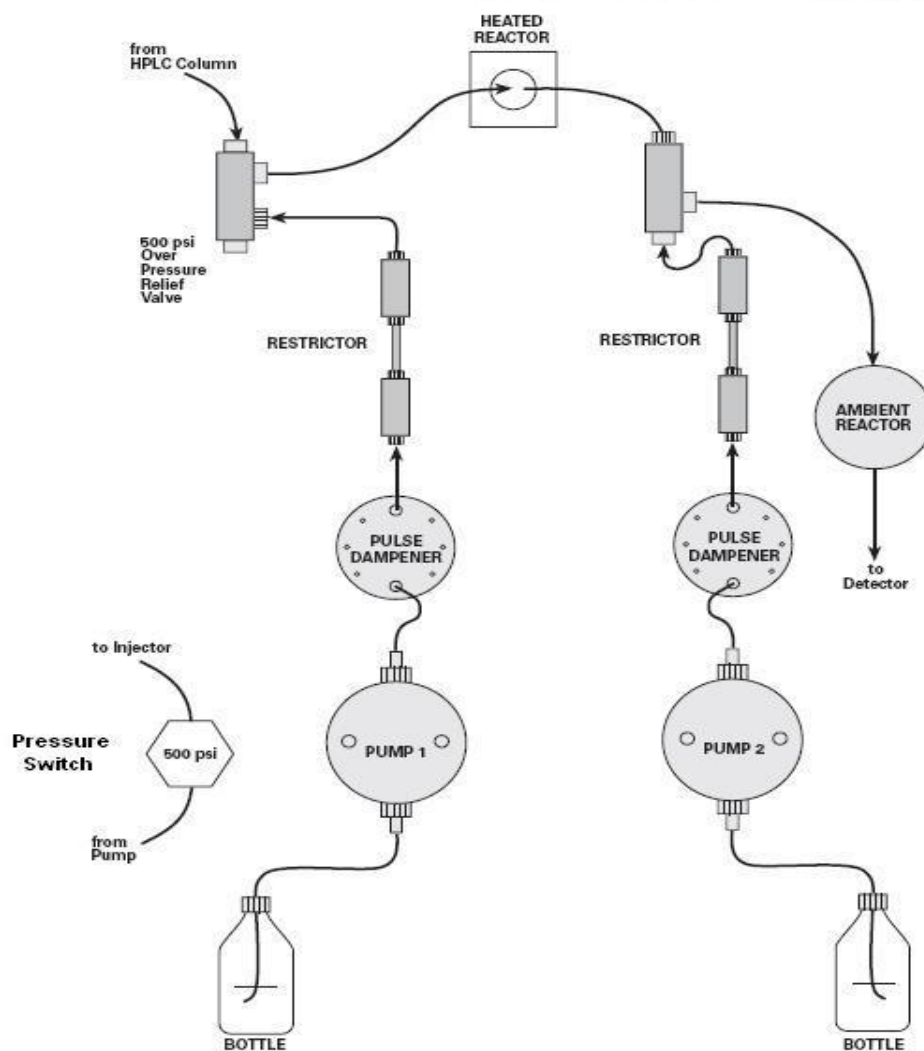
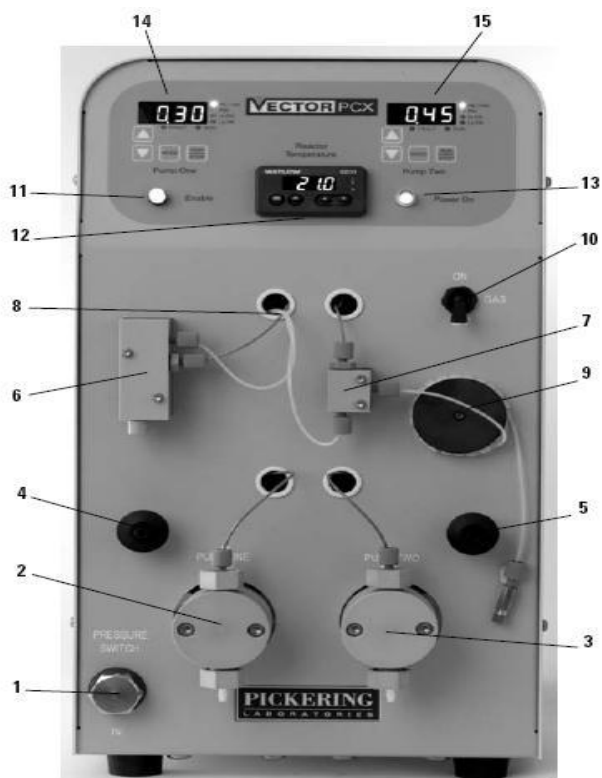
位置	类型	内径(英寸)	外径(英寸)	接头
泵到PCX “From Pump”	PEEK或不 锈钢	0.25	1/ 16	Upchurch
PCX “To Injector” 到	PEEK或不 锈钢	0.25	1/ 16	Upchurch

自动进样器				
自动进样器到PCX “From Injector”	PEEK	0.01	1/ 16	“From Injector”处必须PEEK
预柱过滤器到保护柱	PEEK	0.007	1/ 16	PEEK Upchurch
PCX To Detector	PEEK或不锈钢	0.01	1/ 16	Upchurch
检测器出口到100Psi背压调节器	Teflon或PEEK	0.25	1/ 16	带1/4-28螺母的反向压环
100Psi背压调节器到废液	Teflon或PEEK	0.25	1/ 16	带1/4-28螺母的反向压环
超压阀出口（允许滴到台面，有液体意味有故障）	Teflon		1/ 16	带1/4-28螺母的反向压环
气体连接	SARAN		1/ 8	带1/4-28螺母的反向压环用于气体控制模块，铜螺母用于钢瓶
试剂管线（从反应试剂瓶到PCX泵）	SARAN管用于OPA, Teflon用于其它		1/ 8	带1/4-28螺母的反向压环

➤ Vector PCX:

下页图所示为Vector PCX型号柱后衍生装置的前面板，由于本身不带柱温箱，因此色谱柱的连接与PCX 5200有不同，其他连接方式如泵出口到Vector PCX的Pressure Switch再到自动进样器以及反应器出口到检测器，都与以上所述PCX 5200基本相同，请参照前面板示意图后面的流路示意图。

1. Pressure Switch
2. Pump 1
3. Pump 2
4. Prime/Purge Valve 1
5. Prime/Purge Valve 2
6. Mixing Manifold 1
 - Reagent Filter
 - Analytical Column Outlet
 - Heated Reactor Inlet
 - Over pressure Relief Valve
7. Mixing Manifold 2
 - Reagent Filter
 - Heated Reactor Outlet
 - Ambient Reactor Inlet
8. Heated Reactor
9. Ambient Reactor
10. Gas manifold
11. Enable Button
12. Heated Reactor Controller
13. Power Indicator
14. Pump 1 Control Pad
15. Pump 2 Control Pad



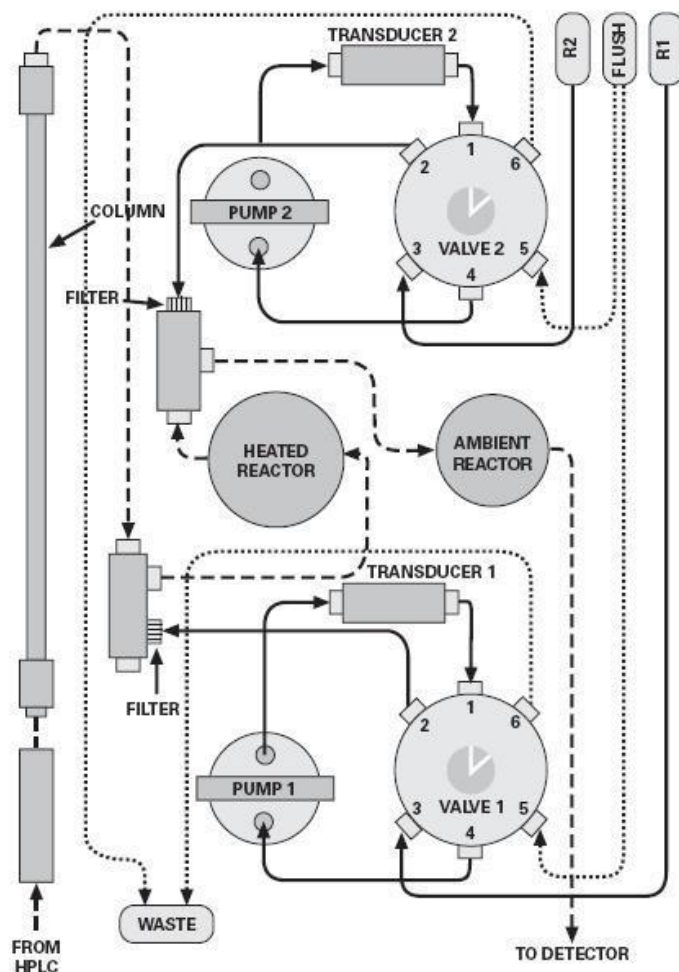
此外，Vector PCX的气路控制组件已经整合到后面板内，气体开关则处于前面板方便操作，气路控制组件的入口和出口的连接则与前述PCX 5200相同。

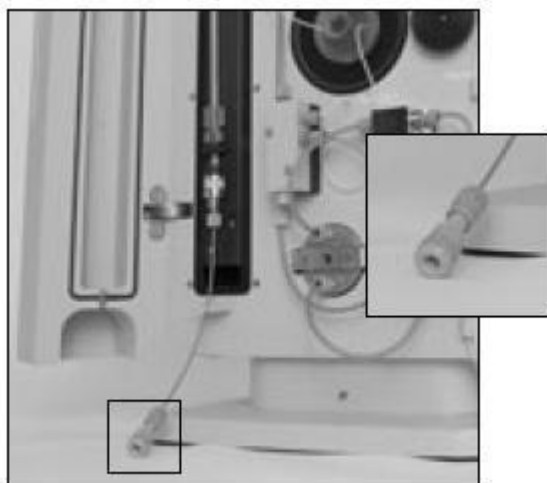
Vector PCX与PCX 5200的另一个主要差别还在于，Vector型号的试剂泵流速和压力，反应器温度等都为电子显示，并且可通过功能键连续可调，不过Vector比5200少一个柱后压力显示。（注：PCX 5200如需改变试剂泵流速，必须手动调节泵体背后的螺杆并自行测量流速，其默认流速为0.3mL/min。）

➤ Pinnacle PCX:

Pinnacle PCX是目前最新的型号，本身带柱温箱，与Vector PCX一样，试剂泵流速以及柱温和反应器温度均可以数字显示，但是没有功能键，只能由软件控制。由于该软件可以读取安捷伦工作站中泵压以及运行状态等信息，因此省略了PCX 5200和Vector PCX两者均具备的Pressure Switch。只有当安捷伦工作站已经启动泵并且柱压超过500psi，Pinnacle工作软件才会激活启动试剂泵的菜单，从而避免衍生试剂反灌导致损坏色谱柱。另外这一变化也让LC与Pinnacle之间的流路连接更加简洁。

如右图所示，色谱柱入口前需安装附件中提供的柱前过滤芯和单向阀（细节见下页图所示），只需将LC自动进样器出口管线连接至该过滤芯，色谱柱出口连接至混合器1，常温反应器出口连接至检测器，如果必要另外在检测器出口安装背压调节器，流路系统安装即告完成。此外，气路控制组件与Vector相同，处于后面板，气路开关则在前面板。

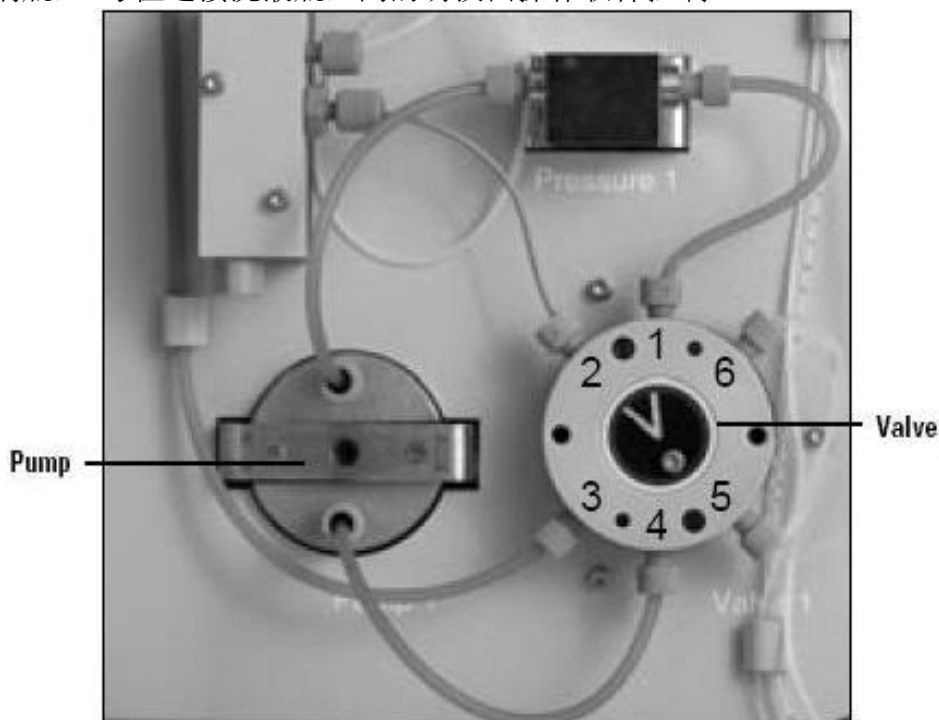




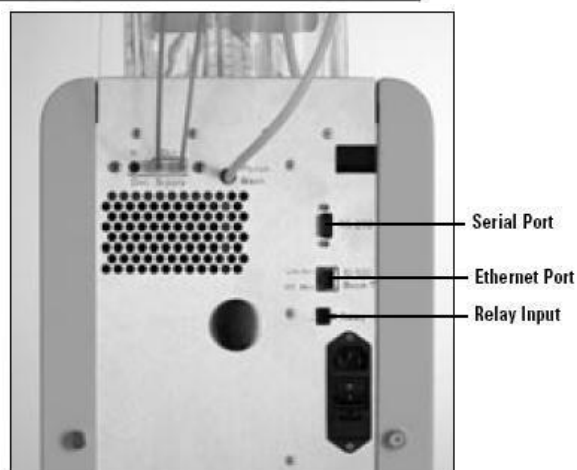
右图即为前述柱前过滤芯，并且具有单向阀功能，也可以为色谱柱提供保护，避免衍生试剂反灌入色谱柱。

另外，Pinnacle与前面两种型号最大的差别在于：前面两种型号的试剂泵是活塞往复复式，而Pinnacle的试剂泵是注射泵，并且泵配有多位选择阀，以实现抽液，冲洗，推液，排空等动作的自动切换。

仪器上方设有溶剂柜，除了可以放置两个试剂瓶以外，还可以放洗液瓶和废液瓶。如下图所示，阀的1号位连接泵出口，2号位连接混合器，6号位连接废液瓶，4号位连接泵入口，3号位连接衍生试剂瓶，5号位连接洗液瓶，阀的切换由操作软件控制。



如右图所示，Pinnacle背后有三个端口，分别为串口，网口和遥控端口。串口和网口可选其一，安装操作软件后需相应配置，随机附有RS-232连接线，使用串口与电脑相连较为方便。如果使用安捷伦液相色谱，可以不连接遥控信号线，因为操作软件可以自动识别安捷伦化学工作站的各种开始和中止的信号。

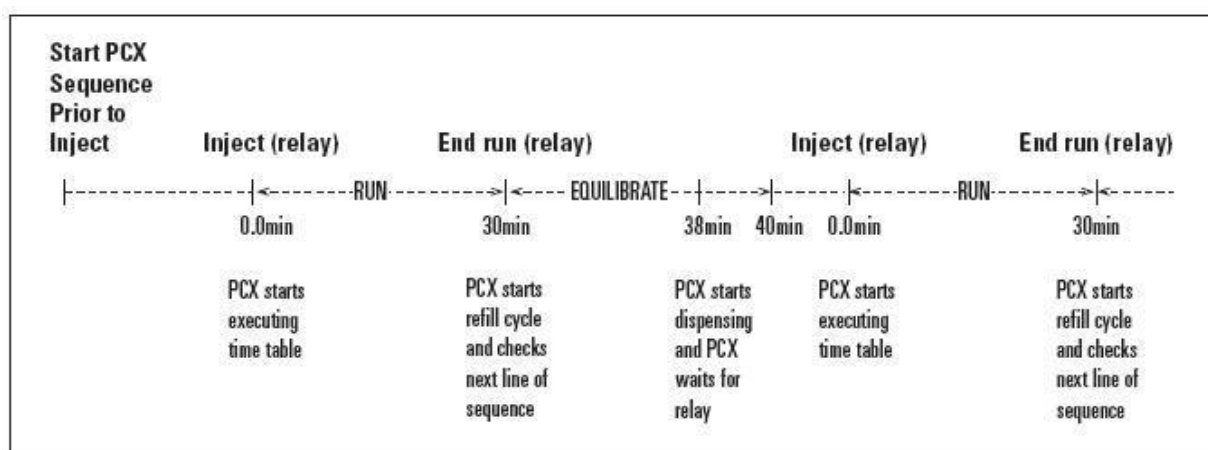


Pinnacle控制软件可安装于Windows 2000或XP操作系统，实现与Pinnacle衍生装置的通讯，可以编辑方法与序列从而实现与LC联机完成自动分析。这是一个简单易用的软件，总的菜单结构如下图所示：

Menu	File	Control	Method	Sequence	Instrument	Stop/Reset	Help
- Drop down choices	- Print Method - Print Sequence - Exit	- Enable - Refill the pump(s) - Flush the pump(s) - Pump(s) on/off (grayed out until enable is hit) - Empty Pump	- Edit/Delete - Print	- Edit/Delete - Start the sequence - Stop the sequence - Resume the sequence - Pause Sequence - Load sequence - Print	- Configure - Maintenance - Flush instrument - Seal Change - Pressure test - Calibration - Reactor temperature - Column temperature	- Stops the instrument, resets when pressed again	- Send the log to support - Find (Index)

如前所述，只有当液相系统开启并且柱压超过500psi，Control菜单下的Enable选项才被激活，按下该选项后才可以执行Pump on/off的操作。当通讯出现中断后，必须通过Reset恢复通讯后重新执行以上操作才能恢复运行状态。Method菜单下可以编辑方法设定衍生试剂流速，柱温，反应器温度等参数，Sequence菜单下可以编辑，保存，调用和运行序列，实现连续自动运行。Instrument菜单下设置通讯选项等参数，以及执行清洗和维护等功能。

由于Pinnacle使用的是注射泵，调用序列后操作软件会自动计算完成序列所需要的衍生试剂体积，在开始运行序列之前必须执行Refill the pump抽取所需要的衍生试剂，而在序列完成以后应该执行Flush the pump和Empty Pump。安捷伦化学工作站中设定的序列与Pinnacle操作软件中设定的序列在样品数量和运行时间上必须匹配。



如上图所示，当从Pinnacle软件中开始序列时，Pinnacle会等待来自化学工作站的预运行信号并检查两个序列样品运行数目是否匹配；当收到预运行信号时，Pinnacle注射泵开始往外推衍生试剂；进样动作完成，计时器归零并开始计时；单个样品运行结束时如果注射泵内所

剩衍生试剂不够，Pinnacle将会自动Refill，这个过程需要一个平衡时间（方法中规定），在平衡时间结束前两分钟注射泵开始往外推液，并等待下一个进样信号。Pinnacle软件会自动计算已运行样品数和剩余样品数，即使在序列开始后执行了添加或者删除样品操作。

注意！液相方法中应该设定后运行时间与Pinnacle方法中的平衡时间匹配。

五.系统开机和运行样品:

以下以PCX5200系统为例，Vector PCX与Pinnacle PCX系统程序上类似，涉及柱后衍生装置具体操作上的差异参照上一章节的描述。

❖ 氨基甲酸酯分析:

➤ 1100 开机

1. 在试剂瓶B中放入HPLC级甲醇。
2. 在试剂瓶A中放入HPLC级水。
3. 开启1100各模块，打开Purge阀，开启液相泵Purge系统。
4. 设定甲醇流量1mL/min，关闭Purge阀。以甲醇冲洗色谱柱和整个柱后反应系统。然后按照色谱柱所附条件设定梯度或按照下表设定：
以0840250色谱柱和甲醇溶解的样品为例：

步骤	时间(分钟)	间隔	% Water	% MeOH	注释
平衡			88	12	0.8mL/min
0	0-2	2	88	12	进样10uL甲醇样品
1	2-42	40	34	66	线性梯度
2	42-46	4	34	66	等梯度
3	46.1	0.1	0	100	梯度改变
4	46.1-49	3.9	0	100	洗柱
5	49	10-13	88	12	重新平衡

5. 氨基甲酸酯分析所用的衍生试剂为水解试剂NaOH和邻苯二甲醛（OPA），注意：在第一次安装时，试剂瓶，管线和泵应该用甲醇冲洗以减少可能的荧光背景。
6. 设定好FLD的操作条件，激发波长330nm，发射波长465nm。

➤ 反应试剂的准备

1. 水解试剂

- a. 关闭惰性气源。
- b. 用甲醇彻底清洗两个反应试剂瓶，并用甲醇清洗浸在反应试剂中的管线。
- c. 水解试剂不需要制备，直接将水解试剂 (CB 930) 倒入到标有水解试剂标签的反应试剂瓶中（水解试剂瓶盖上带有白色 PTFE 管线）。盖上盖子，关闭 Vent 阀。

注！ 水解试剂不建议自己制备，因为很难得到足够纯度的 NaOH 。

2. OPA试剂

- a. 倒入945mL OPA稀释剂 (CB 910) 到反应试剂瓶中（留下5mL 备用）。
- b. 盖上瓶盖，打开Vent 阀，打开气源，用惰性气体鼓泡至少10 分钟。
- c. 溶解100mg OPA到大约10mL HPLC级甲醇中。
- d. 关闭气源，移走瓶盖，加入OPA溶液到已经脱氧的OPA稀释剂 瓶中。

注意！ 如果没有Thiofluor，移取1mL 2-巯基乙醇。处理2-巯基乙醇应该在通风橱内进行，因其易挥发和不愉快的臭味。最好使用 Thiofluor (N,N-二甲基-2-巯基乙胺盐酸盐，一个不挥发硫醇的盐)。

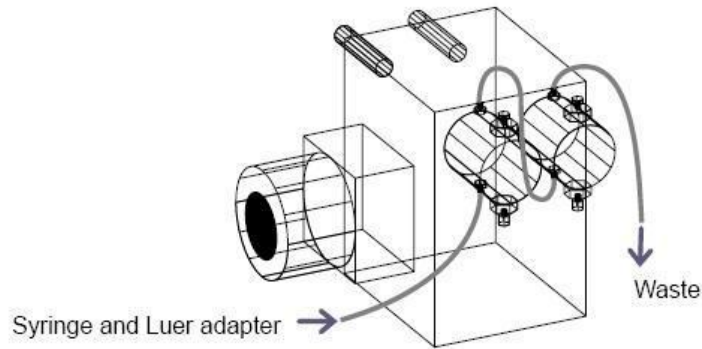
- e. 溶解2g Thiofluor (Cat. No. 3700-2000) 到刚才剩下的5mL OPA稀释剂中，然后加入到反应试剂中。
- f. 盖上瓶盖并打开气源，连续鼓泡1min。关闭Vent 阀。轻摇试剂瓶直到完全混合。

注意！ 不推荐用户自己制备OPA稀释剂，因为硼酸钠（任何级别）含有过量的重金属和不溶物，这些杂质最终会沉淀在反应器和流通池内。而这些试剂造成的损坏不在保修之内。

注意！ 水解试剂比较稳定，而OPA试剂易于氧化且一直降解。PCX 5200系统设计减少这种氧化，从而使得因氧化而造成的OPA损失很少，在惰性气体体密封下，OPA试剂可以维持两周而没有明显的活性降低。

➤ 柱塞清洗

1. 每次PCX 5200开机前，在烧杯中配制水/甲醇（80/20）溶液为柱塞清洗液。
2. 按照下图在仪器后侧，将柱塞清洗管线的一端浸入烧杯中，另一端连接到注射器上并抽吸注射器，保证每次有4mL液体流出，每天两次。



➤ Prime试剂泵

1. 确认试剂管线和气体管线已经连接到仪器右侧合适的接头上。
2. 连接20mL一次性注射器到prime/purge阀中间的Luer接头上。
3. 逆时针打开prime/purge阀1/2-1圈让液体流进注射器。
4. 为了purge来自试剂管线，泵头或试剂压力表中的气泡，用注射器吸取是必要的，吸液直到液体中没有气泡为止。
5. 关闭Purge阀，移走注射器，用少量水冲洗Luer接头。
6. 对另一个阀重复此步骤。注意：Purge不完全，含有气泡可能会导致压力表没有摆动。

➤ PCX 5200开机

1. 打开HPLC泵并设定好操作条件直到压力达到500psi (35Bar) 以上。
2. 打开PCX 5200电源。
3. 输入温度各参数（如柱温42℃，第一个反应器温度100℃）。
4. 在HPLC流量0.8mL/min情况下按Enable键，启动PCX 5200泵和加热系统，直到所有条件达到。
5. 检漏。

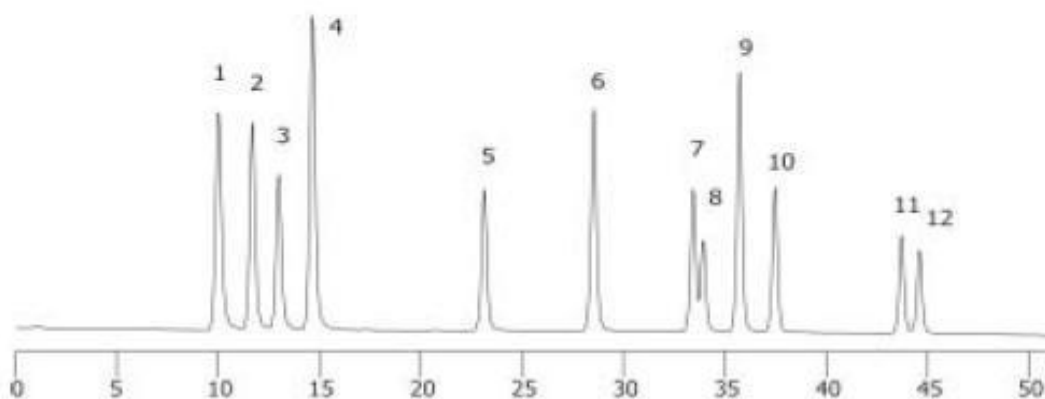
➤ 进样

1. 柱子平衡后，确认PCX 5200温度均达到条件且两个试剂泵工作正常后，启动自动进样器活扳动手动进样罚进样。典型的色谱图如下：

0840250 column (4.0 mm ID x 250 mm) with methanolic samples

Peak Identification

- | | | |
|-----------------------|-------------------------|----------------------------|
| 1. Aldicarb sulfoxide | 5. 3-Hydroxy carbofuran | 9. Carbaryl |
| 2. Aldicarb sulfone | 6. Aldicarb | 10. 1-Naphthol |
| 3. Oxamyl | 7. Propoxur | 11. Methiocarb |
| 4. Methomyl | 8. Carbofuran | 12. BDMC internal standard |



中英文对照如下:

1. 涕灭威亚砷 (Aldicarb sulfoxide)	7. 残杀威 (Propoxur)
2. 涕灭威砷 (Aldicarb sulfone)	8. 克百威 (Carbofuran)
3. 杀线威 (Oxamyl)	9. 西维因 (Carbaryl)
4. 灭多威 (Methomyl)	10. 1-萘酚 (1-Naphthol)
5. 3-Hydroxy carbofuran	11. 甲硫威 (Methiocarb)
6. 涕灭威 (Aldicarb)	12. BDMC (内部标准)

❖ 氨基酸分析:

➤ 1100 开机

1. 在试剂瓶A中放入分析包中的酸性洗脱液。
2. 在试剂瓶B中放入分析包中的中性洗脱液。
3. 在试剂瓶C中放入分析包中的色谱柱再生液。
4. 开启1100各模块, 打开Purge阀, 开启液相泵Purge系统, 每个通道至少各用30mL冲洗一直到From Injector管线的出口。
5. 设定100% C流量0.3mL/min, 关闭Purge阀, 连接离子交换柱, 然后冲洗色谱柱5分钟左右, 切换到洗脱程序初始条件平衡30分钟。
6. 以1193250钠盐离子交换色谱柱和蛋白水解样品为例, 按照色谱柱所附条件设定梯度或按照下表设定:

步骤	时间(分钟)	间隔	% Na328	% Na740	%RG011	注释
平衡			100	0	0	0.3mL/min
0	0-10	10	100	0	0	进样
1	10-32	22	0	100	0	线性梯度
2	32-56	24	0	100	0	等梯度
3	56.1	0.1	0	0	100	梯度改变
4	56.1-58	1.9	0	0	100	柱再生
5	58.1	0.1	100	0	0	梯度改变
6	70	11.9	100	0	0	重新平衡

7. 氨基酸分析所用的衍生试剂为茚三酮 (Ninhydrin) 或邻苯二甲醛 (OPA)，注意：在第一次安装时，试剂瓶，管线和泵应该用甲醇冲洗以减少可能的荧光背景。
8. 设定好VWD吸收波长405nm（茚三酮方法同时检测一级和二级氨基酸）或者FLD的操作条件，激发波长330nm，发射波长465nm（OPA方法）。

➤ 反应试剂的准备

茚三酮的配制：

1. 彻底清洗衍生试剂瓶，并用甲醇涮洗并擦拭试剂瓶盖内管线。
2. 茚三酮试剂基本不需要或者很少准备，取决于使用的试剂类型
T100：不需要配制，只需要倒入衍生试剂瓶；
T200：将瓶1倒入衍生试剂瓶，再向其中加入瓶2，盖紧瓶盖并注入氮气，摇匀。

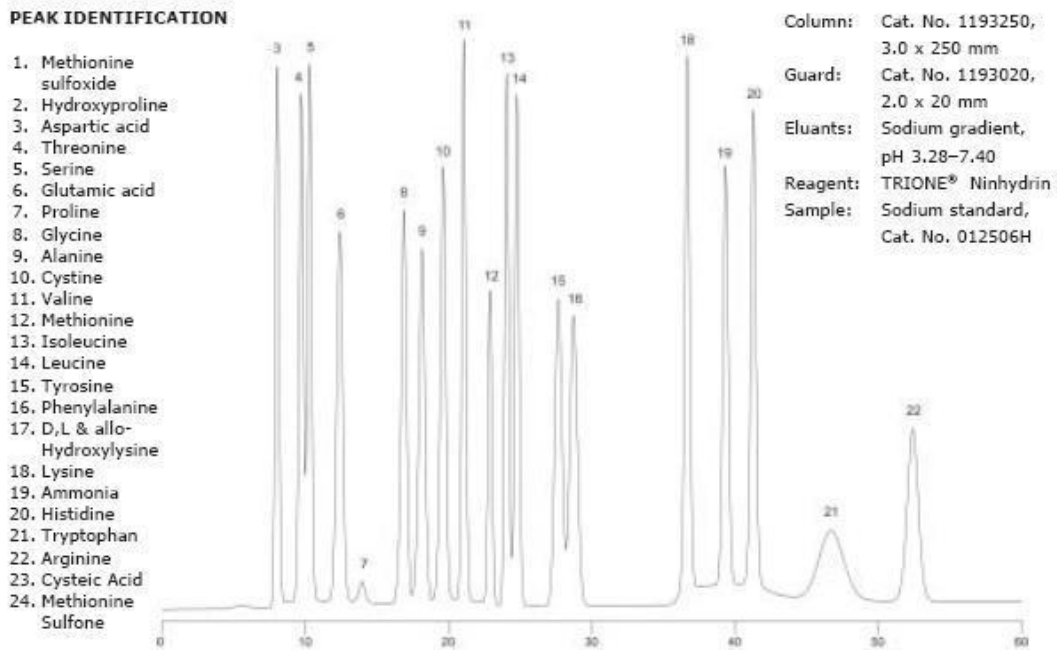
注意！ 茚三酮对空气敏感，必须置于氮气氛围下。未开瓶情况下T100的有效期为3个月，置于衍生试剂瓶内氮气氛围下可使用一个月。T200未开瓶混合前保存期限为1年，混合后可使用一个月。

OPA衍生试剂的配制：

1. 倒入945mL OPA稀释剂（CB 910）到反应试剂瓶中（留下5mL备用）。
2. 盖上瓶盖，打开Vent阀，打开气源，用惰性气体鼓泡至少10分钟。
3. 溶解300mg OPA到大约10mL HPLC级甲醇中。
4. 关闭气源，移走瓶盖，加入OPA溶液到已经脱氧的OPA稀释剂瓶中。
5. 溶解2g Thiofluor (Cat. No. 3700-2000) 到刚才剩下的5mL OPA稀释剂中，然后加入到反应试剂中。
6. 加入3mL 35% Brij-35®溶液。
7. 盖上瓶盖并打开气源，连续鼓泡1min。关闭Vent阀。轻摇试剂瓶直到完全混合。

注意！ OPA试剂易于氧化且一直降解。PCX 5200系统设计减少这种氧化，从而使得因氧化而造成的OPA损失很少，在惰性气体体密封下，OPA试剂可以维持两周而没有明显的活性降低。

- 柱塞清洗和Prime试剂泵的准备工作与上节描述相同。
- PCX 5200开机
 1. 打开HPLC泵并设定好操作条件直到压力达到500psi (35Bar) 以上。
 2. 打开PCX 5200电源。
 3. 输入温度各参数（如柱温48℃，第一个反应器温度130℃-Ninhydrin或者45℃-OPA）。
 4. 在HPLC流量0.3mL/min情况下按Enable键，启动PCX 5200泵和加热系统，直到所有条件达到。
 5. 检漏。
- 进样
 1. 柱子平衡后，确认PCX 5200温度均达到条件且两个试剂泵工作正常后，启动自动进样器活扳动手动进样罚进样。典型的色谱图如下：



六.系统关机

- ❖ 短期关机 (<3天)
 - 按ENABLE键手动关闭PCX 5200。

- 设定HPLC流速到1mL/min甲醇冲洗系统至少10分钟。
- 设定HPLC流速到0.1mL/min甲醇。直到反应器温度低于60℃。
- 关闭1100/1200液相各模块和PCX 5200主电源。

❖ 长期关机 (>7天)

- 设定HPLC泵流量为甲醇1mL/min。
- 按Pump键关掉试剂泵。
- 设定反应器温度小于60℃。
- 关闭气体阀，放空加压试剂瓶。
- 将两个试剂瓶换成水，用注射器从Prime/Purge阀抽取10mL。
- 将H₂O换成H₂O/MeOH。
- 按Pump键开启试剂泵直到反应器温度低于60℃或至少30min。
- 关闭PCX 5200主电源。
- 打开Bypass阀卸掉压力表中的压力。
- 等1-2min，关掉惰性气源。
- 关闭HPLC系统，从荧光检测器卸掉100Psi柱后背压，移走色谱柱和保护柱，封好保存。

七.故障排除

❖ 涉及压力问题请参见下表（单位psi）对系统进行诊断：

Condition	Column	Post-Column	Reagent 1	Reagent 2
Normal	1200	250	1500	1500
Pre-column filter blocked	▲	—	—	—
Heated reactor obstructed	▲	▲	▲	—
Ambient reactor obstructed	▲	▲	▲	▲
Reagent 1 not pumping	—	▼	▼	▼
Reagent 2 not pumping	—	▼	—	▼
Restrictor 1 blocked	—	—	▲	—
Restrictor 2 blocked	—	—	—	▲

❖ 可能出现的硬件问题：

➤ 柱前压力太高，导致PEEK接头崩开：
根据压力诊断表观察其它压力是否过高，一般情况下如果其它压力不高，最有可能就是0.5u的柱前过滤器堵，需要更换，部件号为3102-9032。请注意，在PCX 5200的“From Injector”处不能使用金属接头连接，否则极易造成此柱前过滤器堵塞。对于Vector PCX和Pinnacle PCX，每个混合器的流动相入口都有同样的过滤器，如发生堵塞则会引起相应试剂泵压力过高，从而需要更换。

➤ 一个试剂泵压力表不动：
一般情况下由于试剂泵及其管线含有气泡导致气栓所致，按照前面的步骤彻底Prime试剂泵，或者将试剂瓶换成水试验。

➤ 两个压力表同时不动：
最可能的情况是，在运输时由于震动导致供给两个试剂泵的电源线从上部松动，打开机箱，检查并向上插紧电源线。

❖ 氨基甲酸酯分析的问题：

➤ 除1-naphthol和carbaryl外所有峰消失：
1-萘酚并不属于氨基甲酸酯类化合物，它本身即有荧光效应，而carbaryl水解产生1-萘酚，只是保留时间不同，如果仅仅这两个化合物出峰，说明水解反应正常，而甲胺与OPA的反应有问题，请检查第二个压力表是否摆动，如果第二个试剂泵工作正常，请冲洗配制反应试剂，因为此试剂涉及OPA、巯基乙醇及PH。

➤ 除1-naphthol外所有峰消失：
此现象说明没有水解反应，请检查第一个试剂泵和水解试剂。

➤ 水样分析时有些峰消失或者低回收率，但其它没有问题。
此类问题主要由于样品的水解或者氧化造成。记住使用ChlorA C用于保存水样会因为水解造成oxamyl和carbaryl消失，憎水性氨基甲酸酯类如methiocarb非常易于粘附于塑料样品瓶上。含硫氨基甲酸酯类如aldicarb和methiocarb易于被水中氯和过氧化物氧化。

注意！ ChlorA C为氯乙酸和乙酸钾的缓冲溶液，为EPA 531.1指定用于保存水样，阻止样品氧化和防止共流出干扰（4℃ 28 天）。

❖ 氨基酸分析的问题：

➤ 所有峰消失或变小：
检查茚三酮或OPA衍生试剂是否已氧化失活；试剂泵压力表是否摆动，流量是否准确；反应器温度是否正确；样品制备不当或者液相系统金属部件的腐蚀造成离子交换柱被金属盐污染，也会引起此结果。

- 苏氨酸和丝氨酸分辨率下降：
考虑更换柱前过滤器，用柱再生液反冲保护柱，否则更换保护柱/分析柱。

- 延迟出现的宽峰：
考虑在运行结尾添加或者延长柱再生步骤，确保样品中的蛋白质被完全去除。

- 反应器或混合器出现矿物盐沉积：
用阻尼管代替色谱柱，液相溶剂瓶和衍生试剂瓶中放入20%硝酸，开启液相泵和衍生试剂泵冲洗系统，然后换纯水冲洗干净后再回到样品分析所需要的溶剂。

- 茚三酮沉积造成试剂泵压力过高：
依次用纯水，乙醇，纯水冲洗柱后衍生系统管路，更换滤芯。