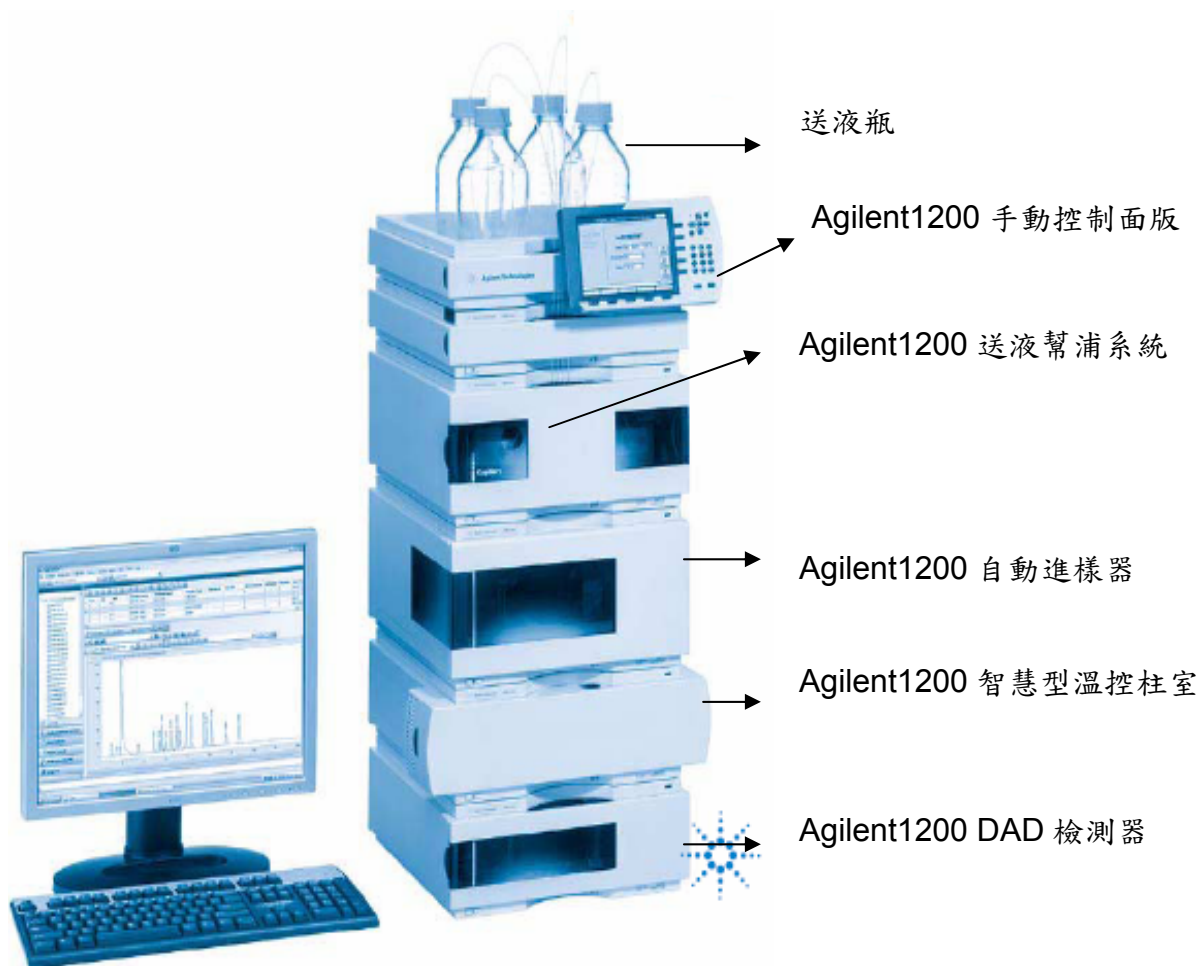


目錄

1、Agilent -1200 簡易介紹.....	2
2、HPLC 開關機操作程序.....	3
3、編輯完整方法(Edit entire Method).....	5
4、注射樣品設定(Sample Information).....	13
5、檢量線製作.....	25
6、數據分析.....	42
7、報告輸出格式設定.....	46
8、系統清理.....	50

壹、Agilent -1200 簡易介紹

設備外觀



貳、HPLC 開關機操作程序

A. 使用前檢查

1. 各設備間連線及電源插頭是否安插妥當。
2. 廢液出口端之管線是否接妥，並置於廢液桶內以免外漏。
3. 分離管柱是否為當時分析所需。
4. 檢視各移動相瓶管路是否接妥，移動相是否變質、沉澱。
5. 配製所需之移動相，經 $0.45\mu\text{m}$ 濾膜抽氣過濾後，倒至適當瓶內，以超音波振盪器驅離溶於其中之氣體，將系統移動相輸送管附過濾頭置入瓶中。若有 Degasser 則可以將此步驟省略，但建議還是做。

B. 開機程序

1. 啟動電腦，待開機完成後，可以看到下面畫面：



此為儀器連線常駐程式，若此程式未啟動，會造成儀控軟體與儀器之間連線的問題

2. 再啟動所有電源(共 5 個)；開關位於左下方。

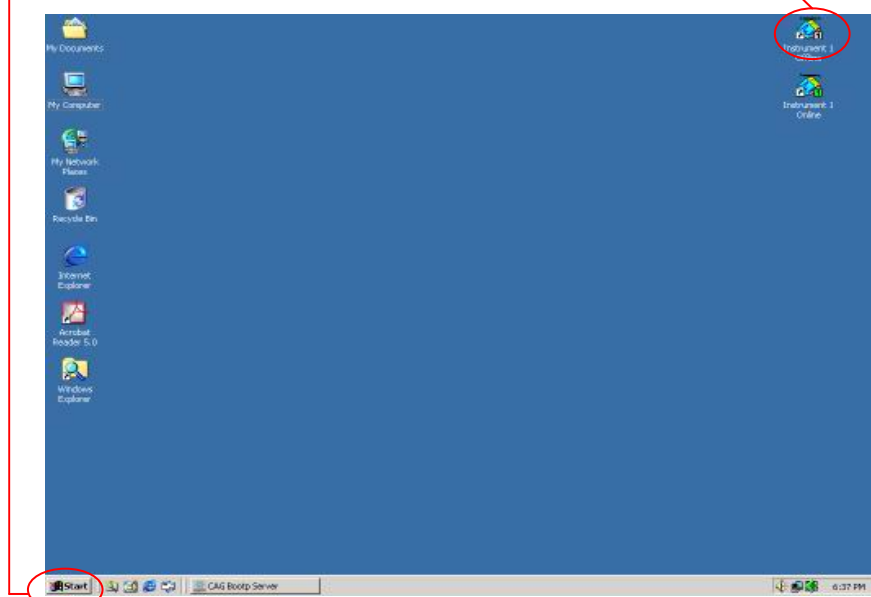
(壓下開關後可聽到儀器自我測試的聲音，同時指示燈亦會由橘色轉為黃色。若燈號為紅色則表示儀器開啟失敗，請通知儀器保管人協助處理。)



3.待電腦開機後，於電腦系統桌面雙擊 Online 圖示



或在桌面 Start\Programs\Agilent Chemstation\instrument 1 Online 後則將開啟下列主畫面：



啟動後儀控主畫面

注射系統監控

Column 監控管理可在此觀看得知管柱的流速、壓力，右下方之小方框為 Pump 單獨開關，方便使用者在不關閉系統直接關閉 Pump。

Pump 混合比例監控畫面

積分運算

報告產生

圖形分析

偵測器監控

管柱溫度監控

C. 關機程序

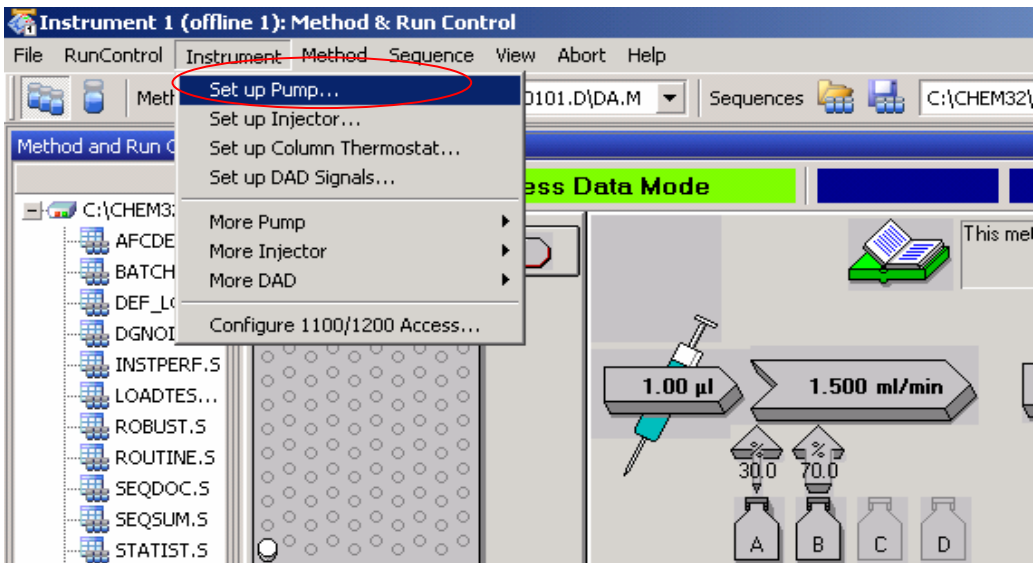
1. HPLC 關機需使用電腦將所有儀器操作的部分停止後，其中包括檢測器、智慧型溫控器、自動進樣器、送液幫浦系統等等，另一做法為設定關機方法，再將關機方法載入，待其達條件後即可關機。
2. 關機時請先將化學工作站軟體(Chemstation)關閉，再關閉 PC 及 HPLC Power

叁、編輯完整方法(Edit entire Method)

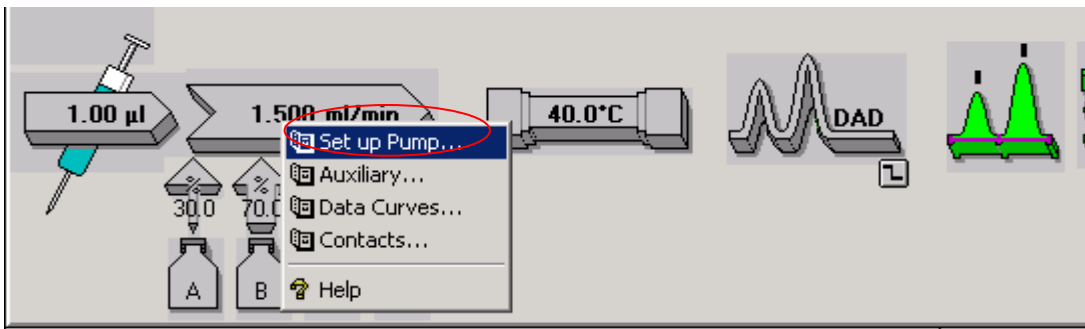
1. Pump 設定

以滑鼠點選主畫面中 Instrument 項目，將出現下圖之下拉選單：

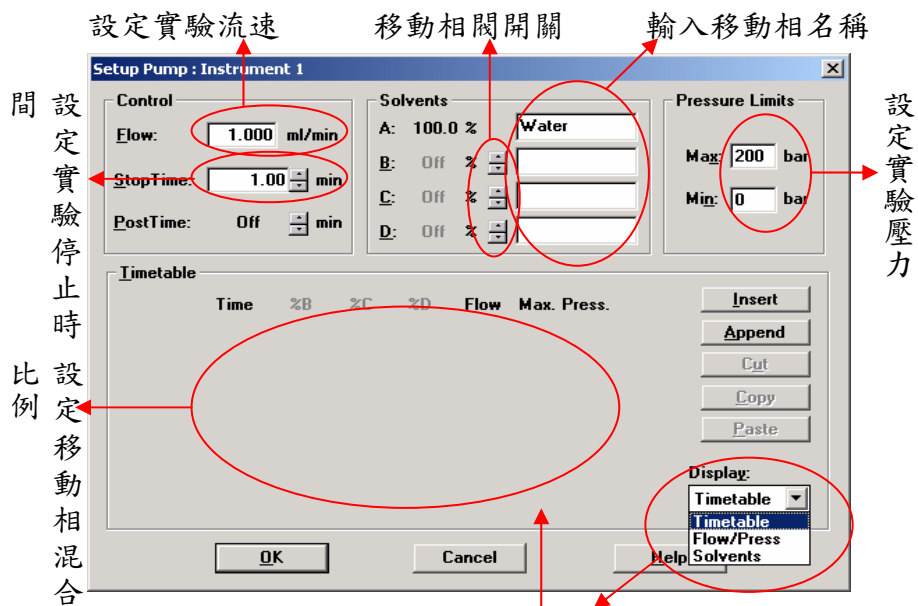
再選擇 **Set up Pump** 後，則會出現 Pump 條件設定表，如下圖：



亦可將滑鼠指標移至主畫面之 pump 圖示，如圖



直接點選後將出現下列選單，選取 **Set up Pump** 選項後，同樣會出現上一頁的 Pump 條件設定表。



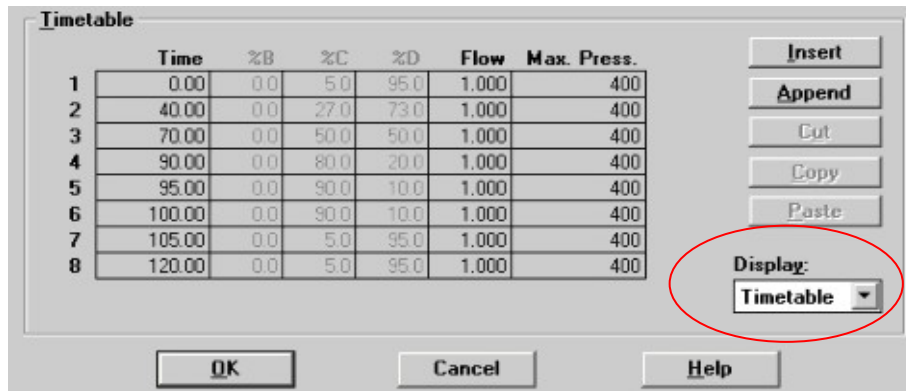
2. Pump 條件設定表填寫說明：

Flow：填入欲使用之流量。

Stop time：每個樣品於本次實驗分析時所需要的時間。

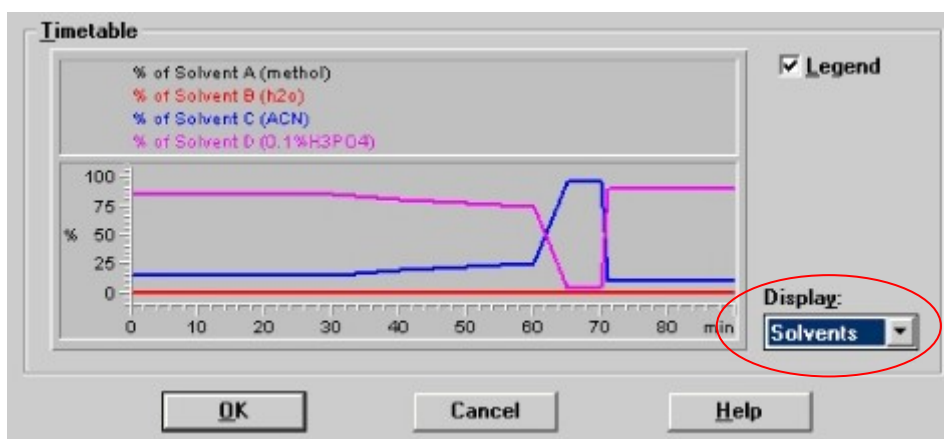
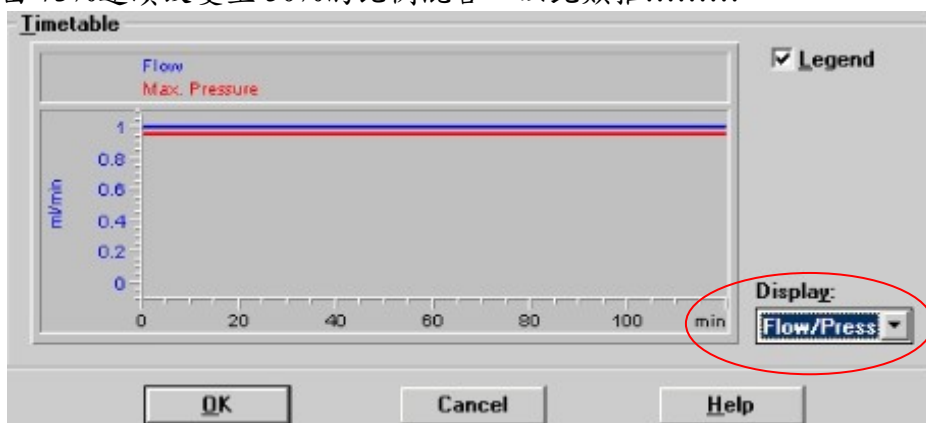
Solvents A~D：填入四個送液瓶所裝之溶劑名稱，及所需之混和比例。

Timetable：實驗過程採用 grade 方式時，才要設定。設定方式為按下 **Insert** 鈕後，則新增一行。則會看到下圖



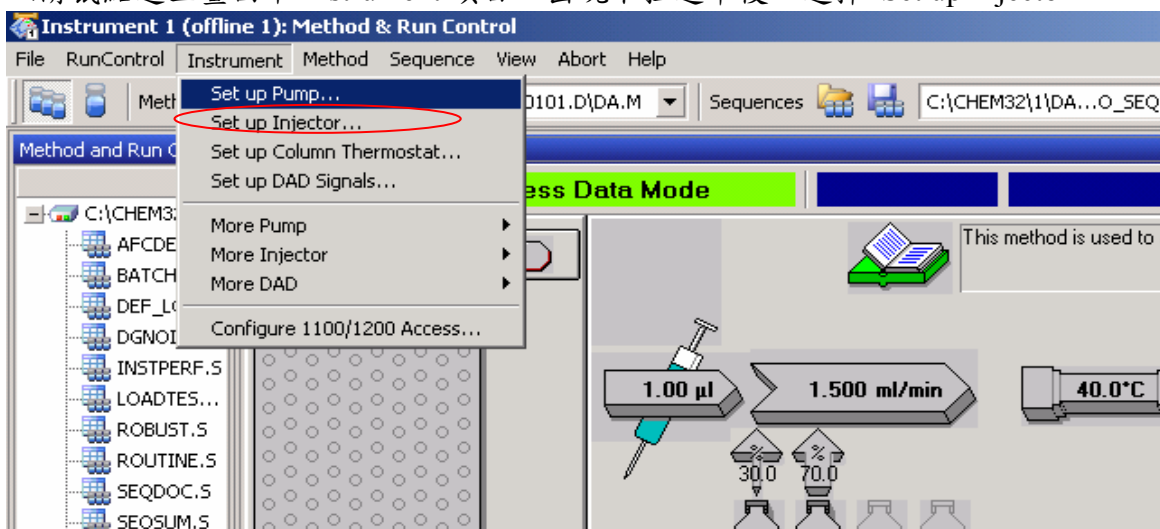
	Time	%B	%C	%D	Flow	Max. Press.
1	0.00	0.0	5.0	95.0	1.000	400
2	40.00	0.0	27.0	73.0	1.000	400
3	70.00	0.0	50.0	50.0	1.000	400
4	90.00	0.0	80.0	20.0	1.000	400
5	95.00	0.0	90.0	10.0	1.000	400
6	100.00	0.0	90.0	10.0	1.000	400
7	105.00	0.0	5.0	95.0	1.000	400
8	120.00	0.0	5.0	95.0	1.000	400

上圖所示明顯黑字的部份為有啟動之移動相，灰色部份為未啟動之移動相，上圖例為 0~40 分鐘時，當移動相 C 隨時間變化由 5%連續改變至 27%時，移動相 D 亦同時隨時間由 95%連續改變至 73%並進行混和，而當 40~70 分鐘時，移動相 C 則由 27%連續改變至 50%，而移動相 D 則由 73%連續改變至 50%的比例混合，以此類推.....

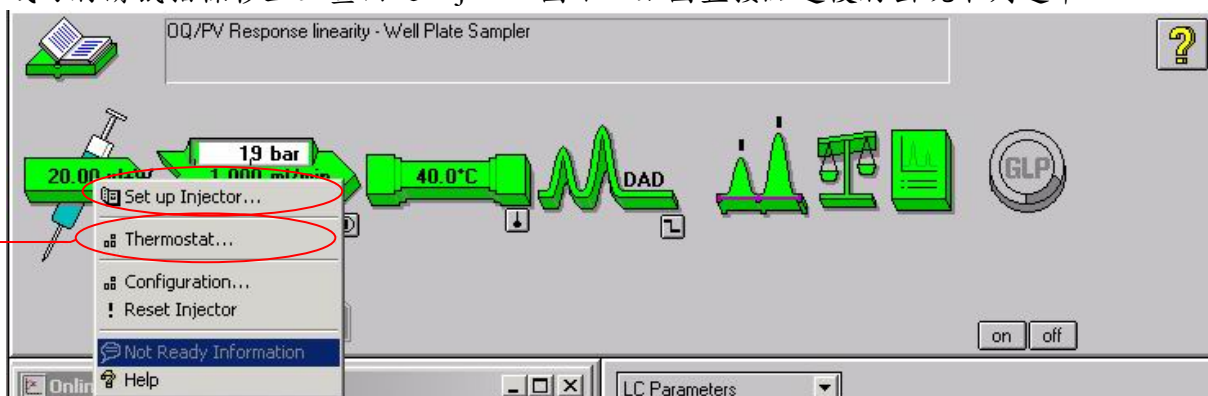


3.Injector 設定

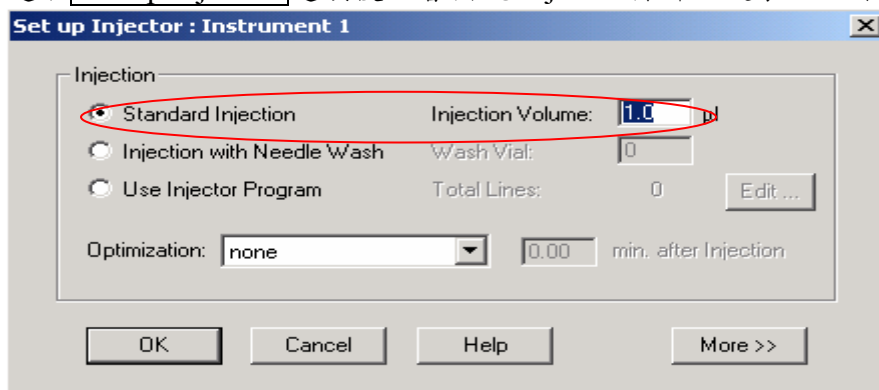
以滑鼠點選主畫面中 Instrument 項目，出現下拉選單後，選擇 Set up Injector；



或可將滑鼠指標移至主畫面之 Injector 圖示，如圖直接點選後將出現下列選單：



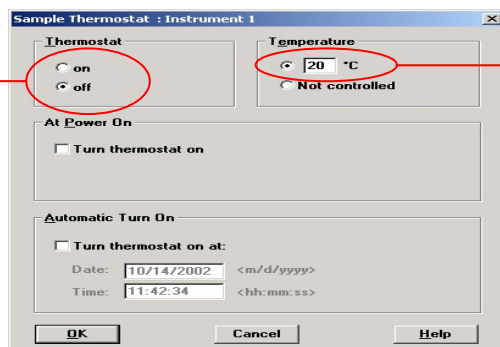
選取 set up Injector 選項後，會出現 Injector 條件設定表，如下圖：



於此表中僅需設定 Injection Volume 量即可。此例為注射量設定為 20.0 µl；

樣品注射系統溫度控制設定：選擇 Thermostat...，會出現下圖按下

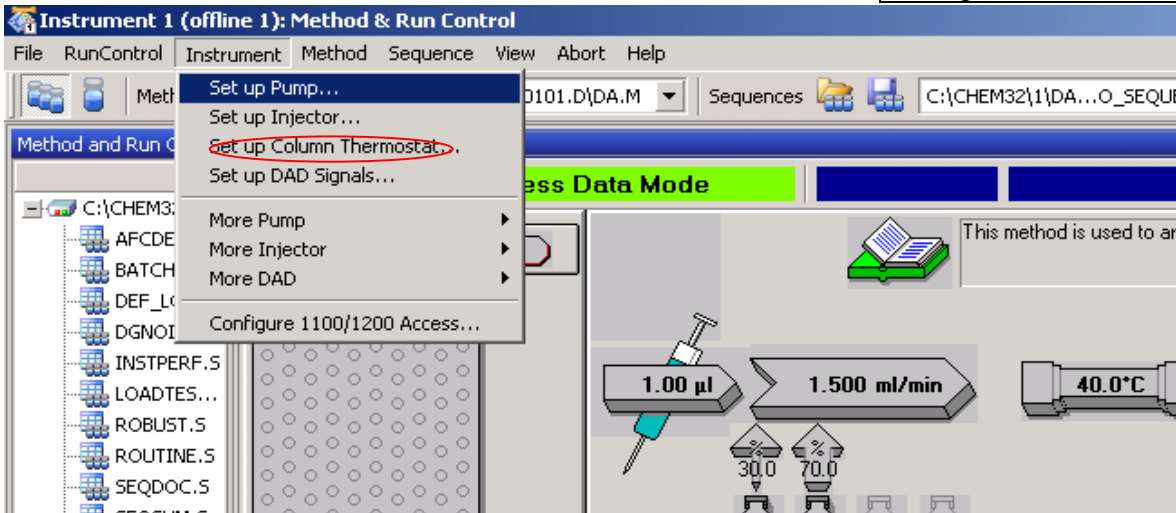
設定溫控系統是否啟動



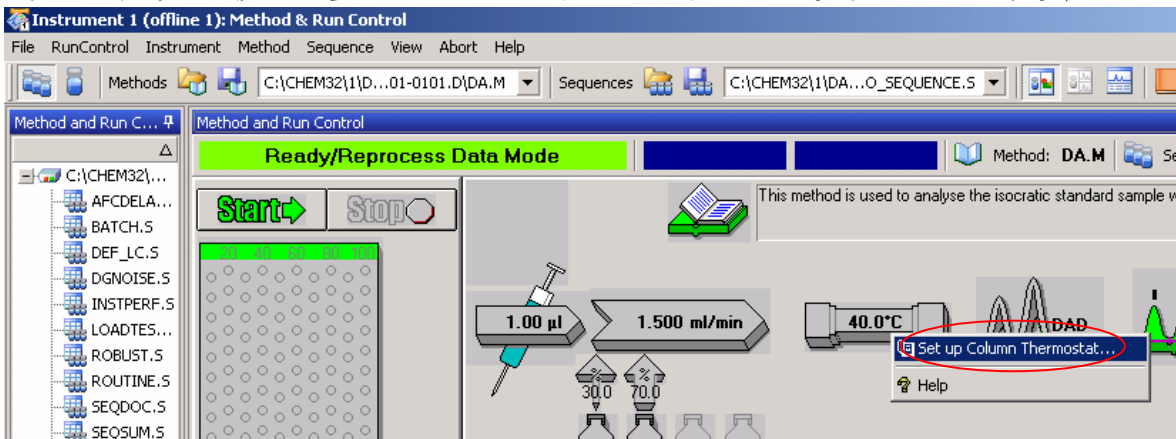
設定溫度，範圍需依分析方法而定

4.Column 溫度設定

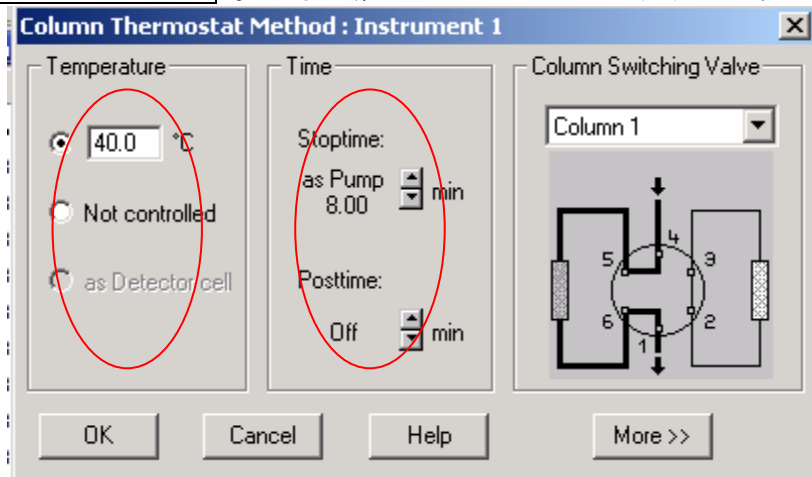
以滑鼠點選主畫面中 Instrument 項目，出現下拉選單後，選擇 **Set up Column Thermostat**；



或可將滑鼠指標移至主畫面之 Column 圖示，如圖直接點選後將出現下列選單，



選取 **Set up Column Thermostat** 選項後，會出現 Column 溫度條件設定表，如下圖：

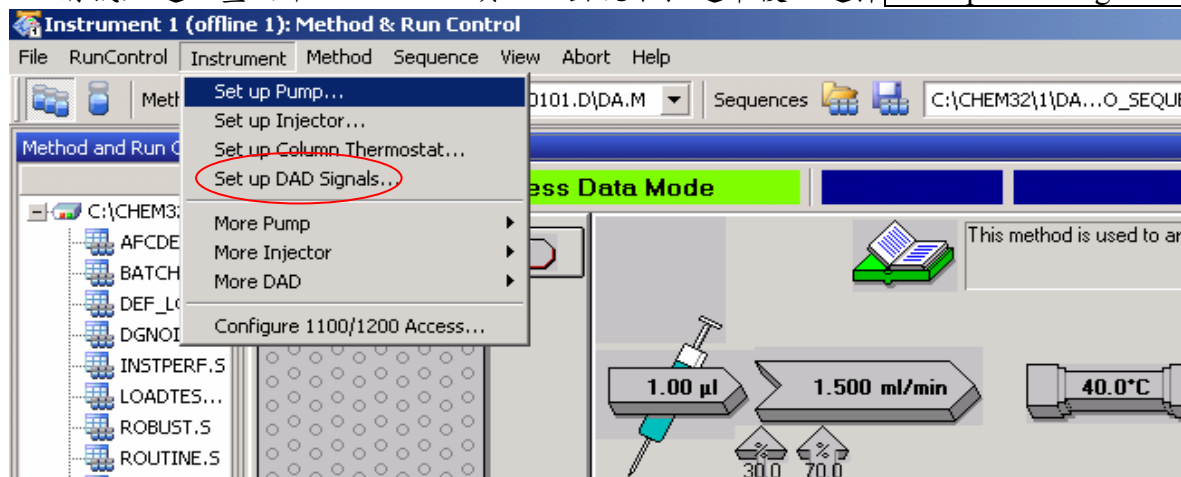


Temperature：建議設定為控溫狀態，本例為控制在 40°C 條件下。維持在控溫狀態最大優點在於 baseline 較容易保持在穩定狀態，而較不會隨室溫變化而上下飄移。

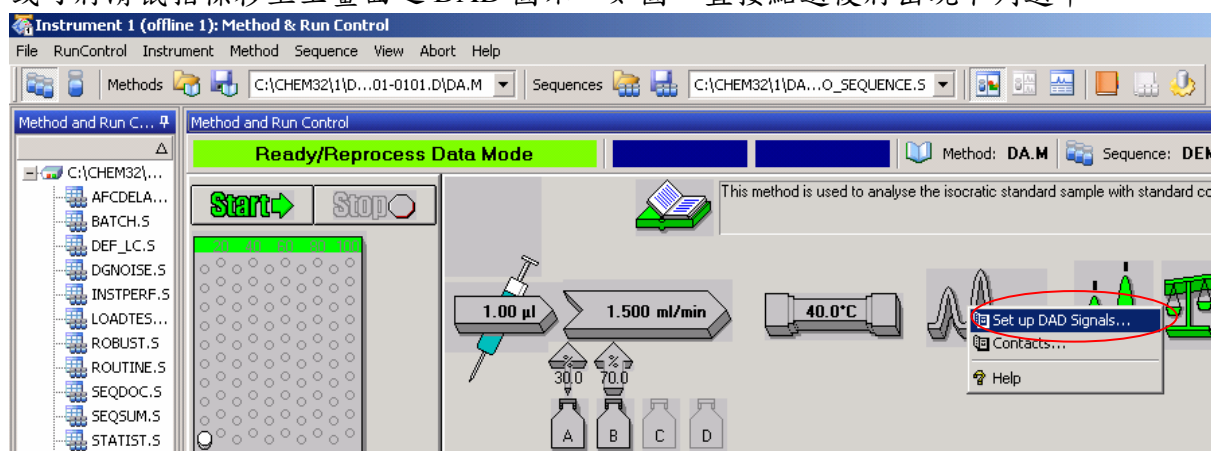
StopTime：控溫維持時間，建議與 pump 時間相同。

5.DAD 檢測器設定

以滑鼠點選主畫面中 Instrument 項目，出現下拉選單後，選擇 **Set up DAD Signals** ；



或可將滑鼠指標移至主畫面之 DAD 圖示，如圖，直接點選後將出現下列選單，



選取 **Set up DAD Signals** 選項後，會出現 DAD 檢測器條件設定表，如下圖：

可設定同時記錄五個波長，BW 為設定波長寬度，如 A Signal 為 273nm，BW 為 4，及偵測範圍為 271nm~275nm

Store	Sample.Bw	Reference.Bw
A: ☒	273 4	450 80 nm
B: ☐	254 16	360 100 nm
C: ☐	210 8	360 100 nm
D: ☐	230 16	360 100 nm
E: ☐	280 16	360 100 nm

設定欲使用之波長範圍要啟動的燈源

訊號之反應時間

設定愈小解析度愈好，但感度就會偏差

需要 3D 圖定性分析時，選擇波長範圍，但需要將 Store 設為 All 或是 All in peak 時才可以輸入數值

Wavelength：依照實際需要自行設定。

Peakwidth：訊號之反應時間，數值越小，訊號記錄就越密集。

StopTime：檢測維持時間，建議與 pump 時間相同。

同樣，設定完成後按下 OK 鈕即可。

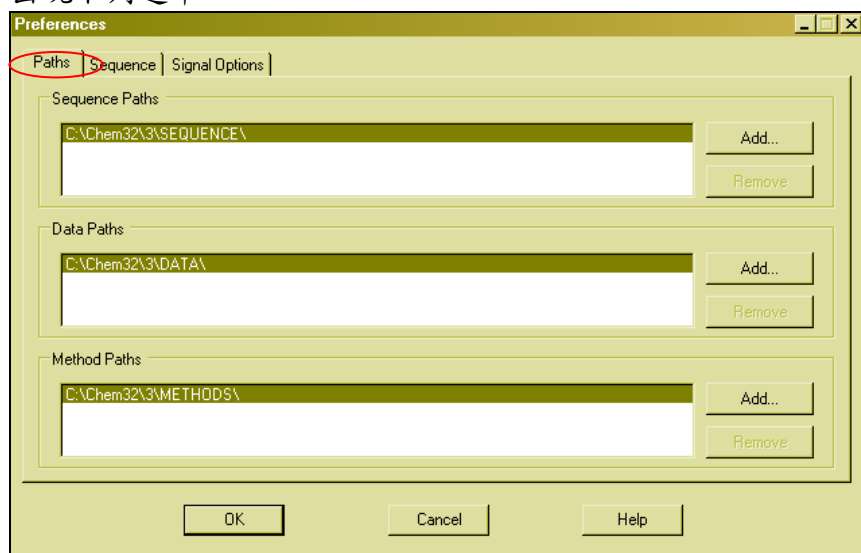
6. 存檔

上述設定動作若最後不進行存檔的話，則於下次開啟此軟體時，所有分析條件都將要再重新設定一次，非常浪費時間，故以下將介紹如何存檔。

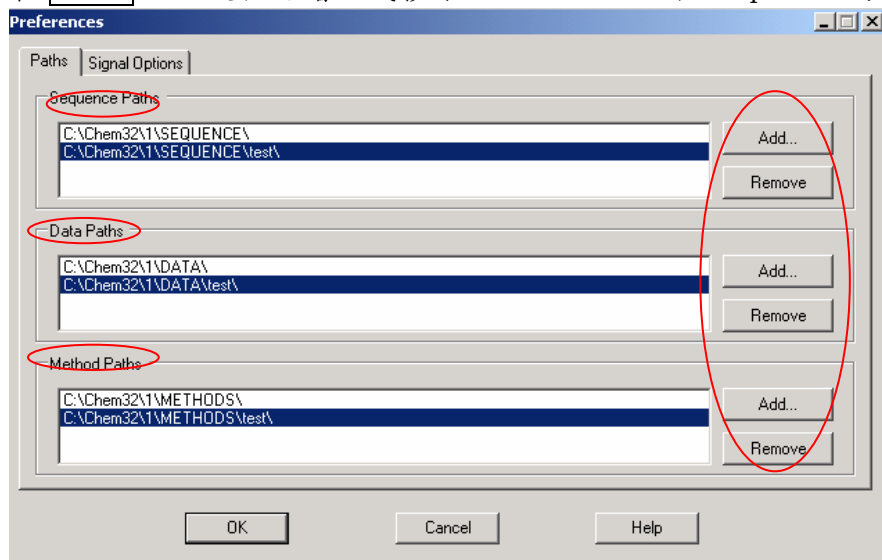
首先以滑鼠點選主畫面中 View 項目，待出現下拉選單後，選擇 **Preference**



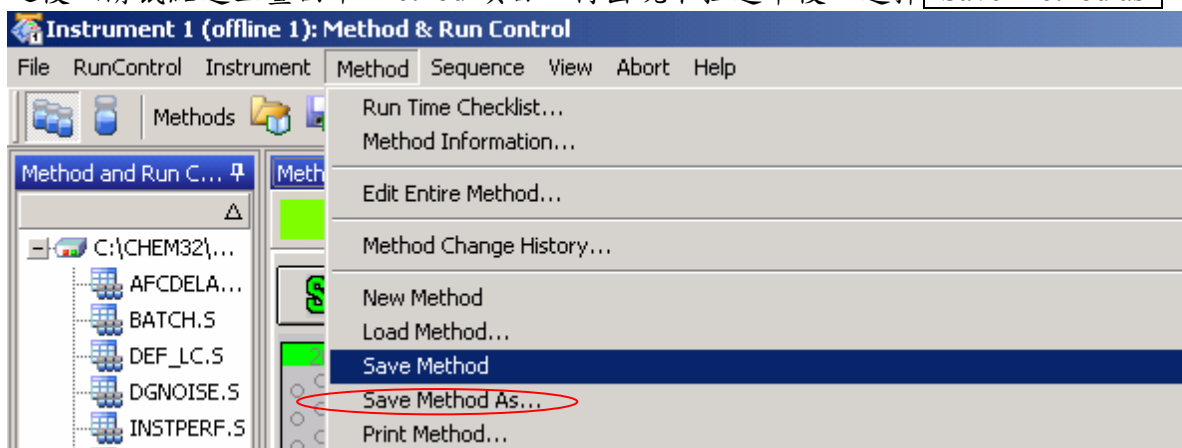
出現下列選單



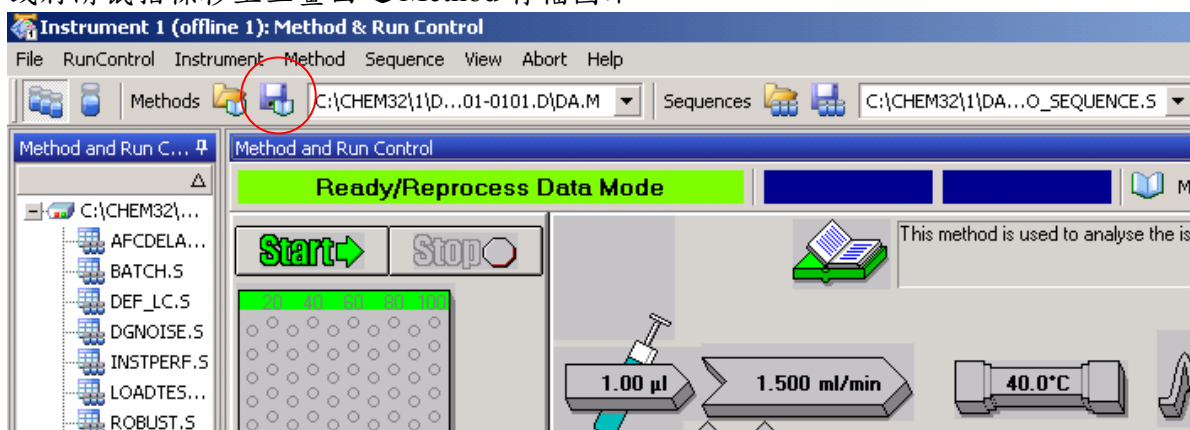
在 **Paths** Tab 鍵裡可增加或移除 Method、Data 和 Sequence 的儲存路徑



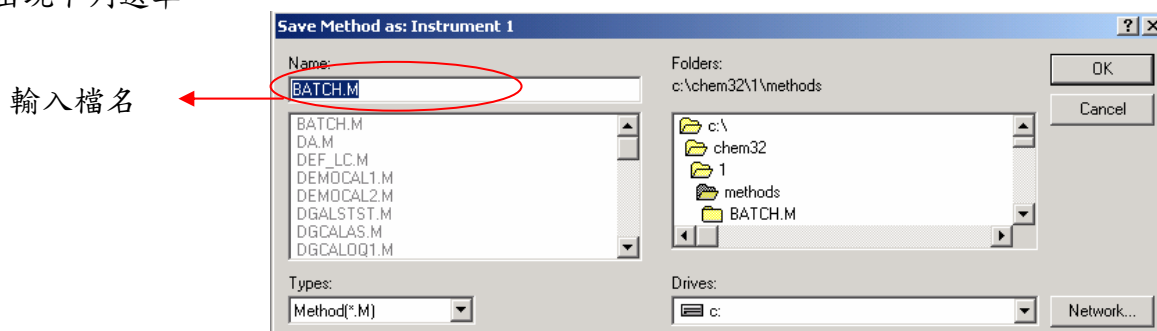
之後以滑鼠點選主畫面中 Method 項目，待出現下拉選單後，選擇 **Save Method as** ；



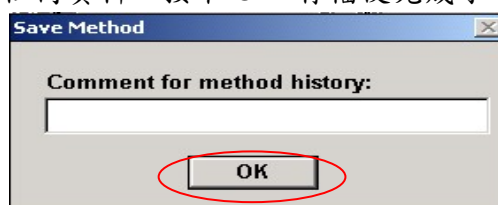
或將滑鼠指標移至主畫面之 Method 存檔圖示



出現下列選單



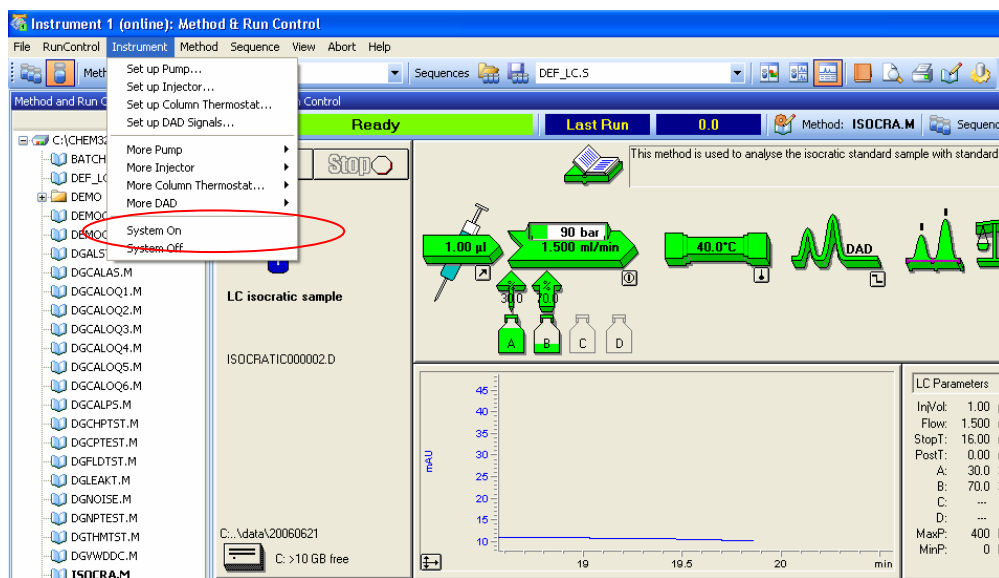
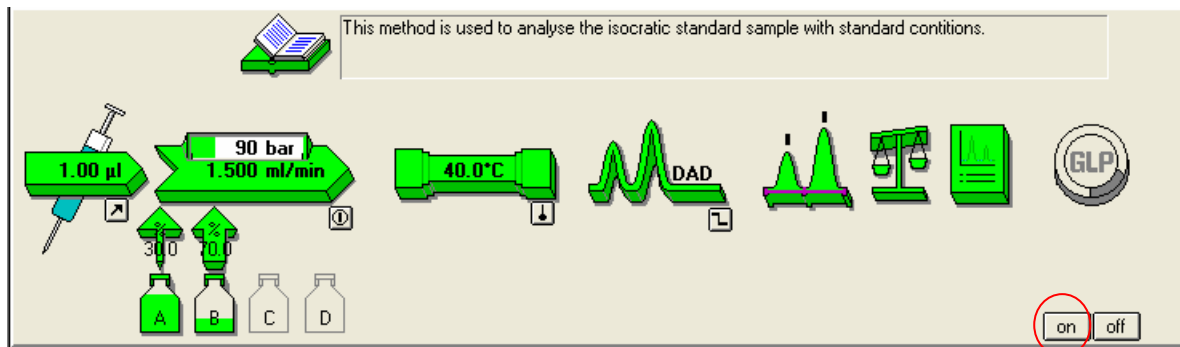
Name：輸入檔名，受限於 Chemsation 軟體的關係不可使用中文。
之後會出現下圖，不輸入任何資料，按下 OK 存檔便完成了



完成存檔動作後，即可先讓儀器進行分析條件平衡。

7. 啟動儀器方式

以滑鼠點選主畫面中 Instrument 項目，出現下拉選單後，選擇 **System On** 或將滑鼠指標移至主畫面右側 System On 圖示，如圖，直接點選後儀器即會開始運作。(此時可聽到 pump 運作的聲響)。

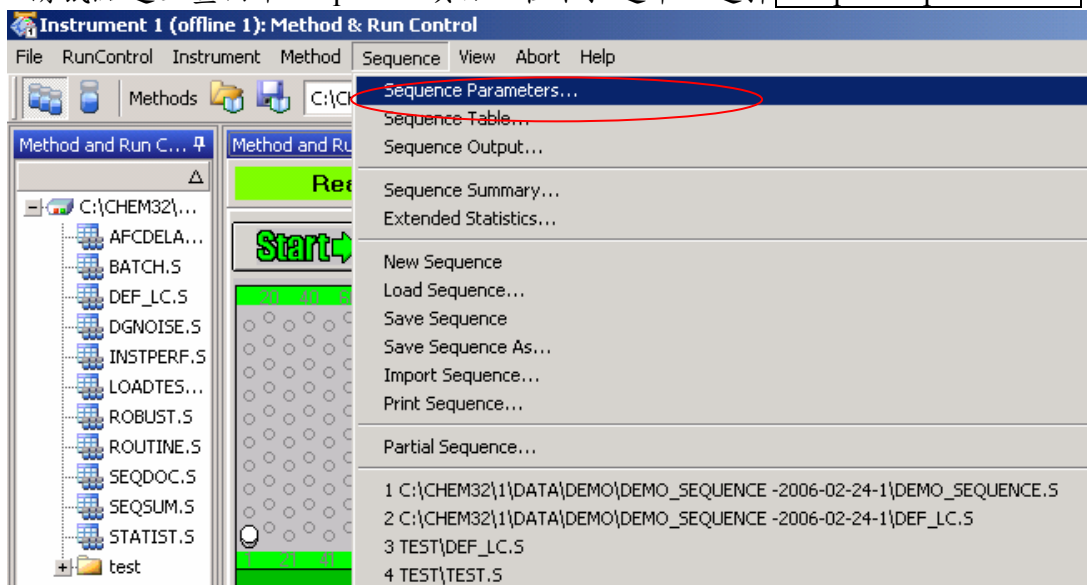


肆、注射樣品設定(Sample Information)

1.連續注射樣品系統

首先 Sequence parameters 設定

以滑鼠點選主畫面中 Sequence 項目，在下拉選單，選擇 Sequence parameters



將出現 Sequence parameters 設定表

Auto :

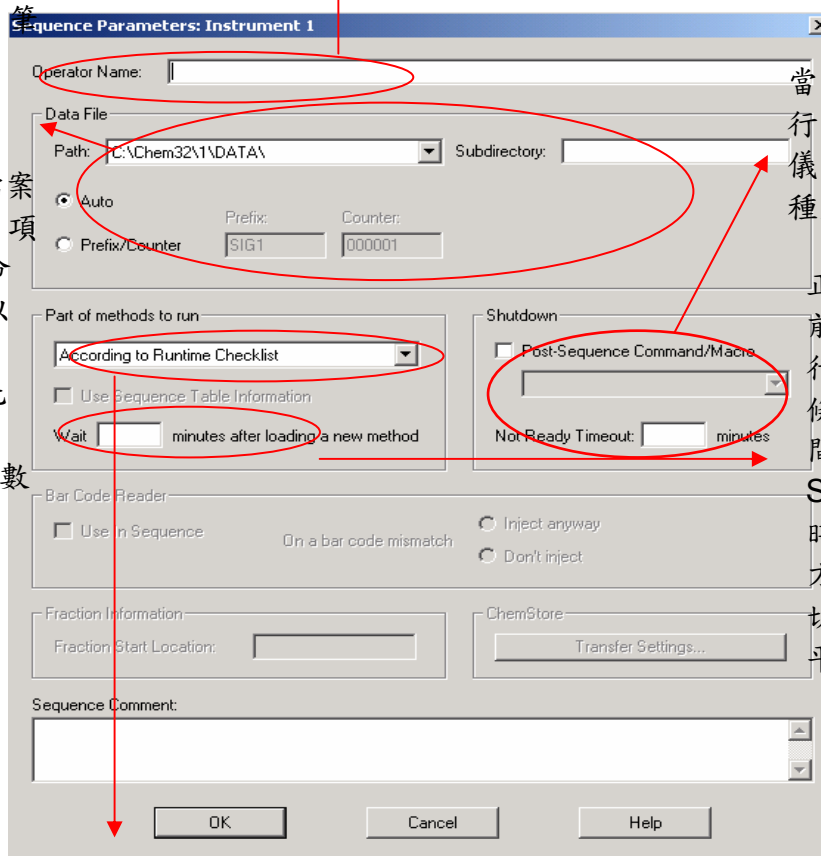
系統將自動對每一筆資料命名

Prefix/Counter :

可自己命名，若在 Prefix 項目中設定檔案開頭，則在 Counter 項目中將會自動計數命名。如本例則自動以 SIG1000001、SIG1000002....以此類推

Subdirectory : 檔案數據預計存放的目錄

實驗操作人員姓名

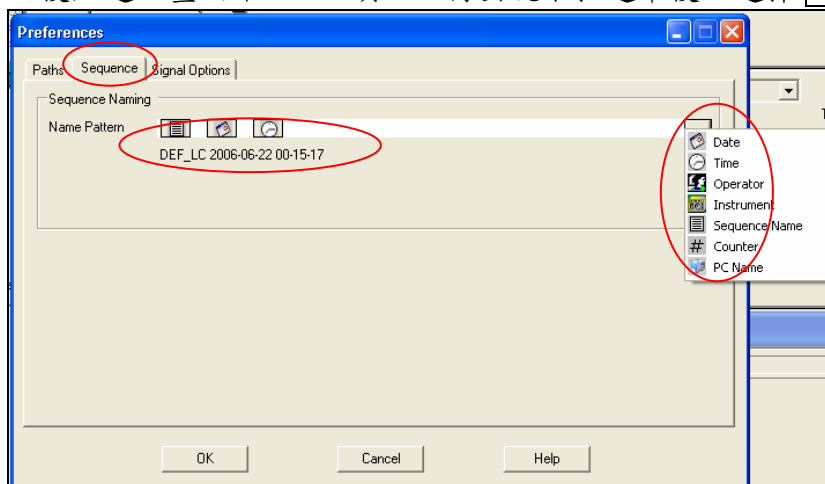


當 Sequence 執行完畢後，希望儀器維持在何種狀態

正式開始分析前，希望儀器能自行以目前的分析條件平衡一段時間；或者是在 Sequence 中同時採用多種分析方法，在方法彼此切換間所需間隔平衡時間。

According to Runtime Checklist : 執行含資料收集、積分、檢量線計算、報告...等資料
Acquisition Only : 僅執行資料的收集，不執行其他計算及報告列印

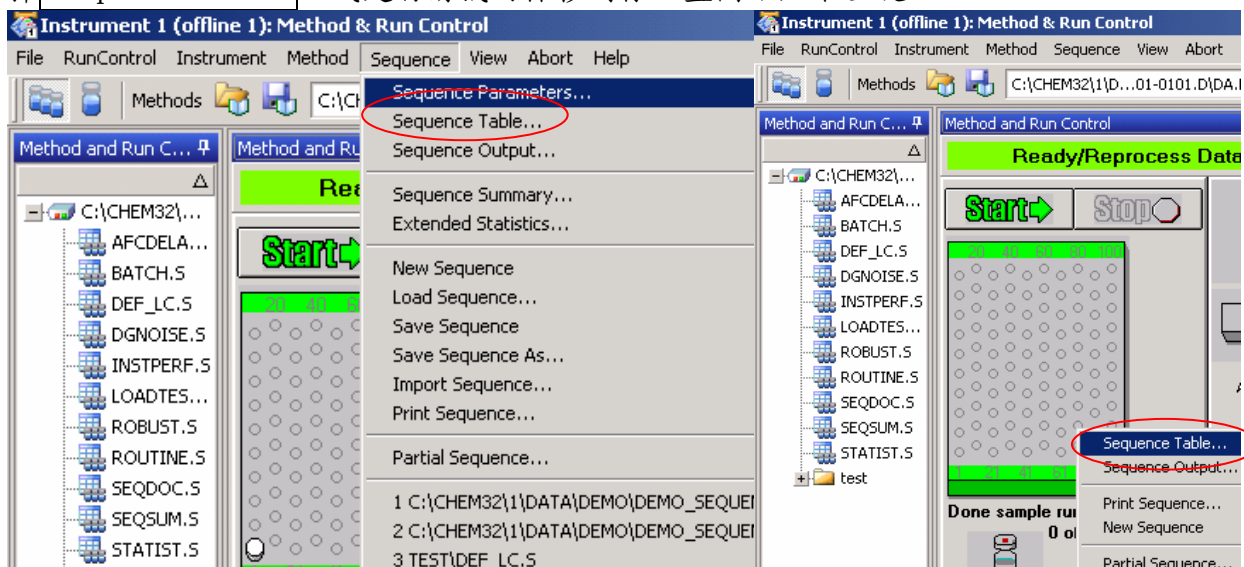
之後點選主畫面中 View 項目，待出現下拉選單後，選擇 Preference 出現下列選單



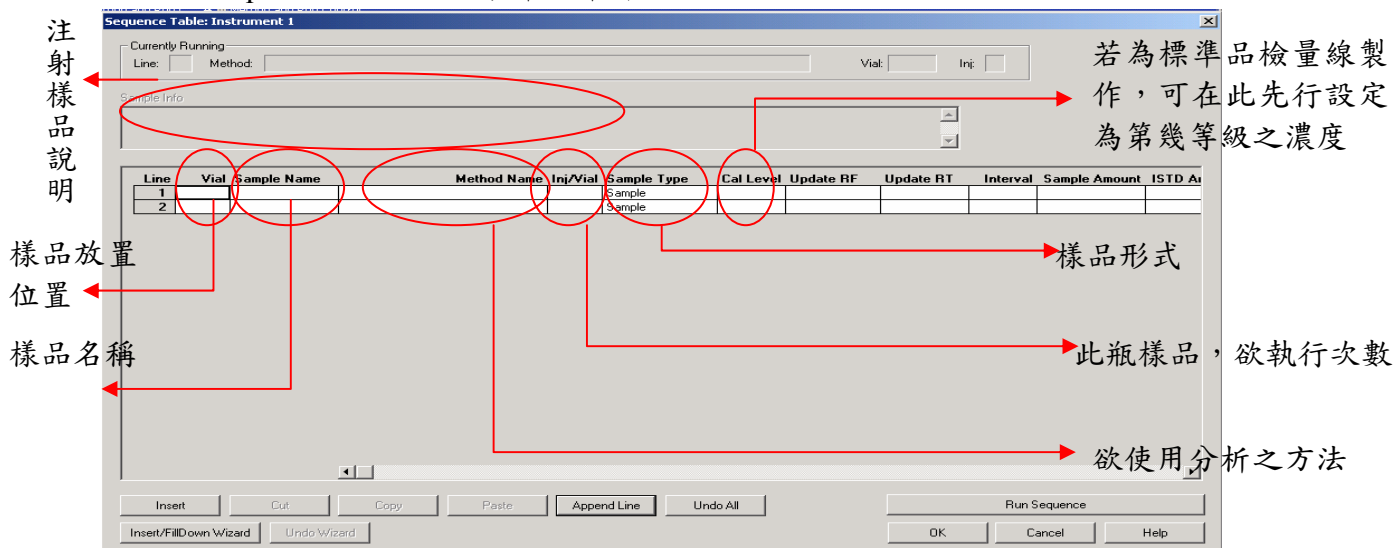
在 Sequence Tab 鍵裡，再設定 Run Sequence 時數據儲存之子目錄，子目錄會產生在上一頁所建立 Subdirectory 之底下中。

子目錄之建立方式可依照日期、時間、操作者、儀器、Sequence 名稱、運行 Sequence 之次數及電腦名稱等，軟體之預設值為 Sequence 名稱日期時間。

待檔案名稱路徑設定完成之後，以滑鼠點選主畫面中 Sequence 項目，待出現下拉選單後，選擇 Sequence Table，或是將滑鼠游標移到樣品盤圖示點下左鍵



將出現 Sequence Table 設定表單左半部：



剩下之欄位：

Sequence Table: Instrument 1

Currently Running
Line: Method: Vial: Inj: ☐

Sample Info

Line	Vial	Sample Name	ISTD Amount	Multiplier	Dilution	Datafile	Inj Volume	Lins ID	AutoBalance
1									

Insert Cut Copy Paste Append Line Undo All Run Sequence
Insert/FillDown Wizard Undo Wizard OK Cancel Help

使用者選擇。

Inj/Vial：每個樣品欲重複分析次數。

Sample Type：維持在 Sample 狀態即可，若為檢量線製作，可在此選為 Calibration。

Cal Level：在檢量線量限製作時，可設定此樣品為第幾等級濃度，供程式運算。

Sample Amount：可輸入樣品之濃度。

Inj Volume：分析時樣品注射量。

假若樣品數目很多，且僅使用一個分析方法時，則可以使用快速設定表單的方式設定，就不需要每個欄位一一輸入，同上頁畫面，左下方有個選項

Sequence Table: Instrument 1

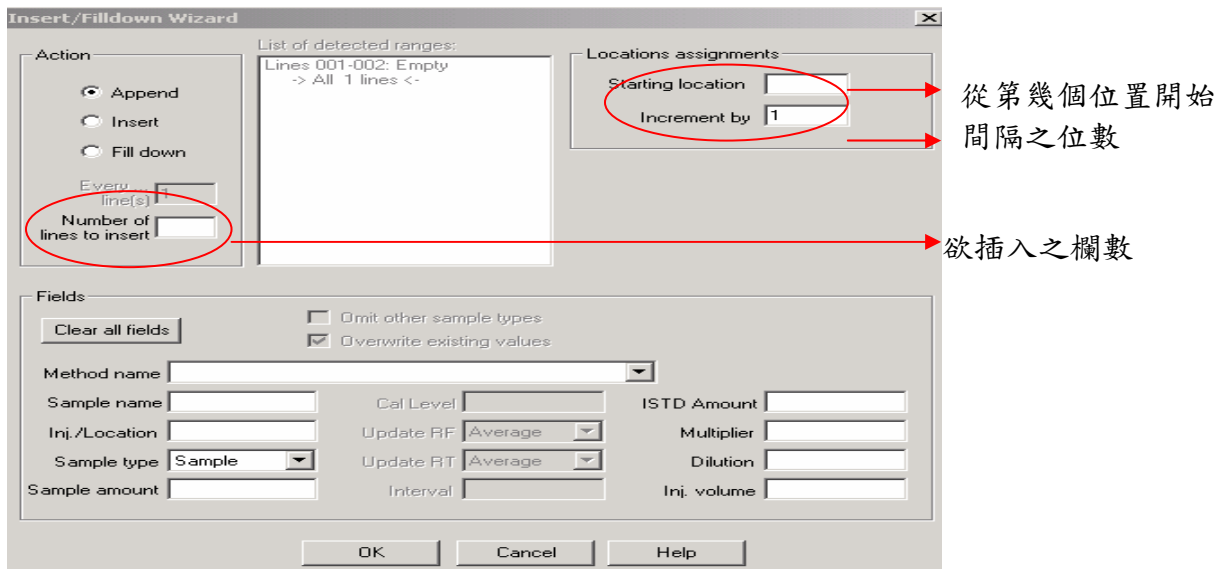
Currently Running
Line: Method: Vial: Inj: ☐

Sample Info

Line	Vial	Sample Name	Method Name	Inj/Vial	Sample Type	Cal Level	Update RF	Update RT	Interval	Sample Amount	ISTD Amount
1					Sample						
2											

Insert Cut Copy Paste Append Line Undo All Run Sequence
Insert/FillDown Wizard Undo Wizard OK Cancel Help

會出現下面的畫面

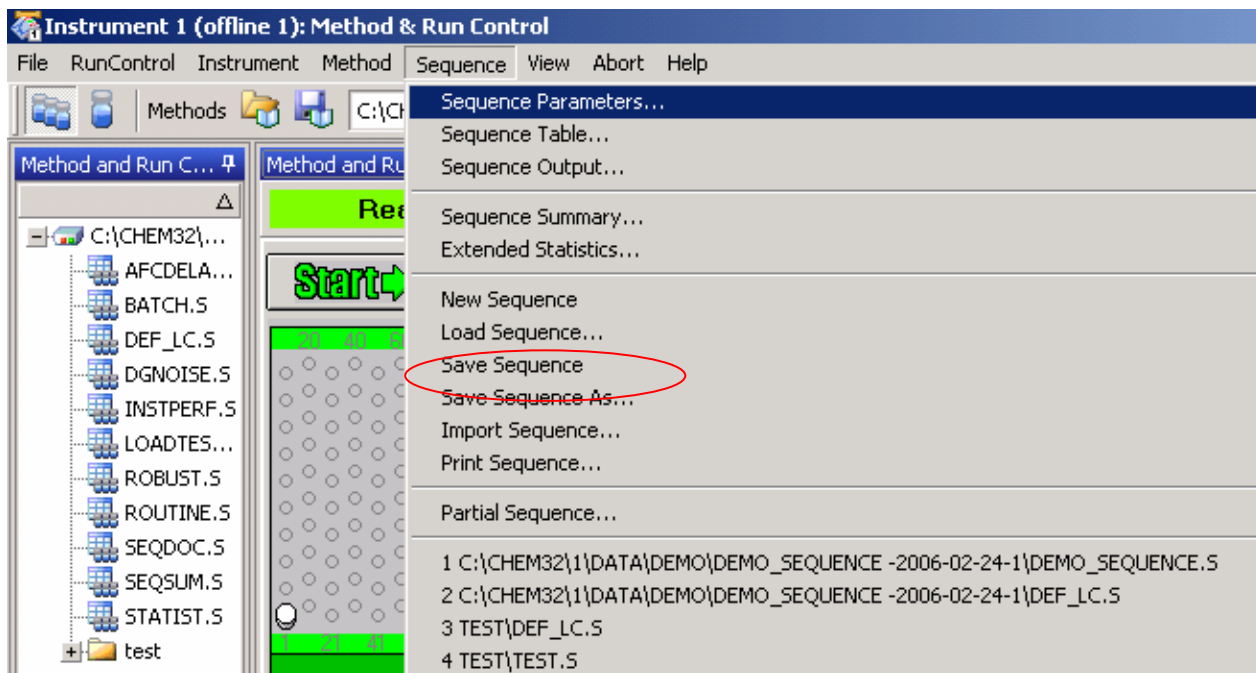


Method Name：選擇所需之分析方法。

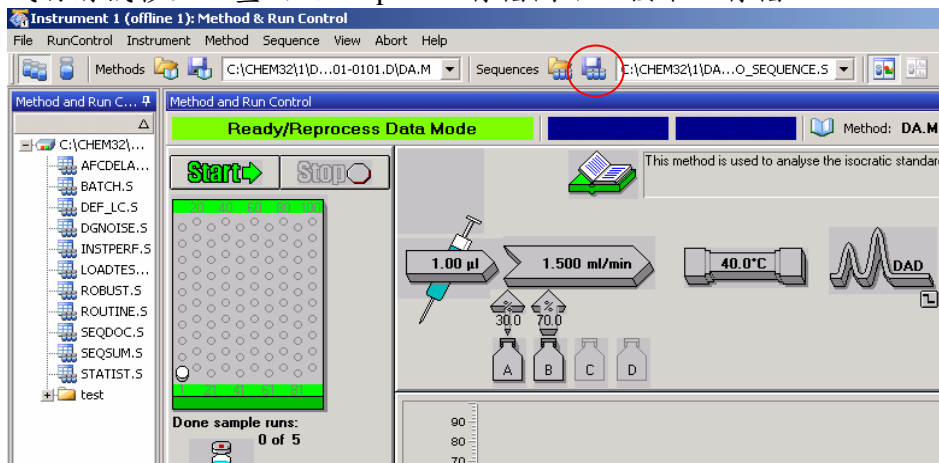
Inj./ Location：每個樣品重複分析次數。

Inj. volume：每個樣品注射量。

設定完畢後切回主畫面，按下 Sequence 存檔後

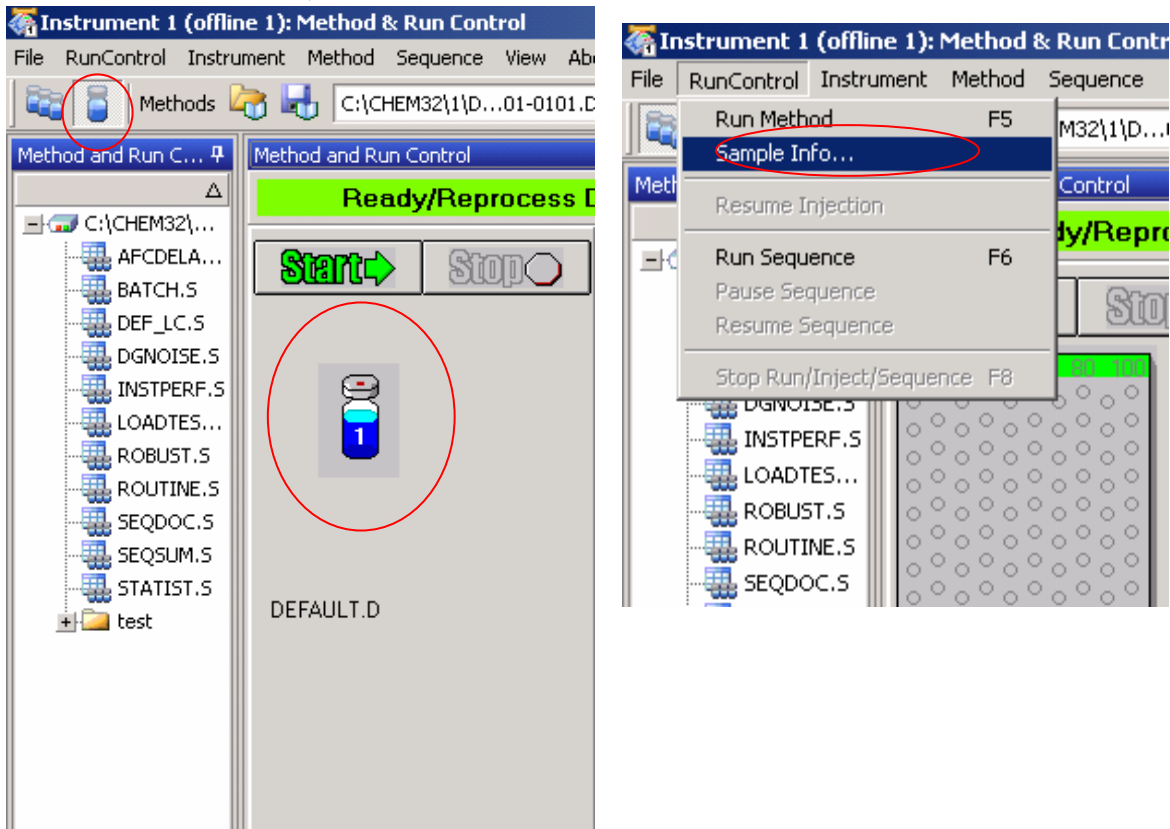


或將滑鼠移至主畫面之 Sequence 存檔圖示，按下以存檔



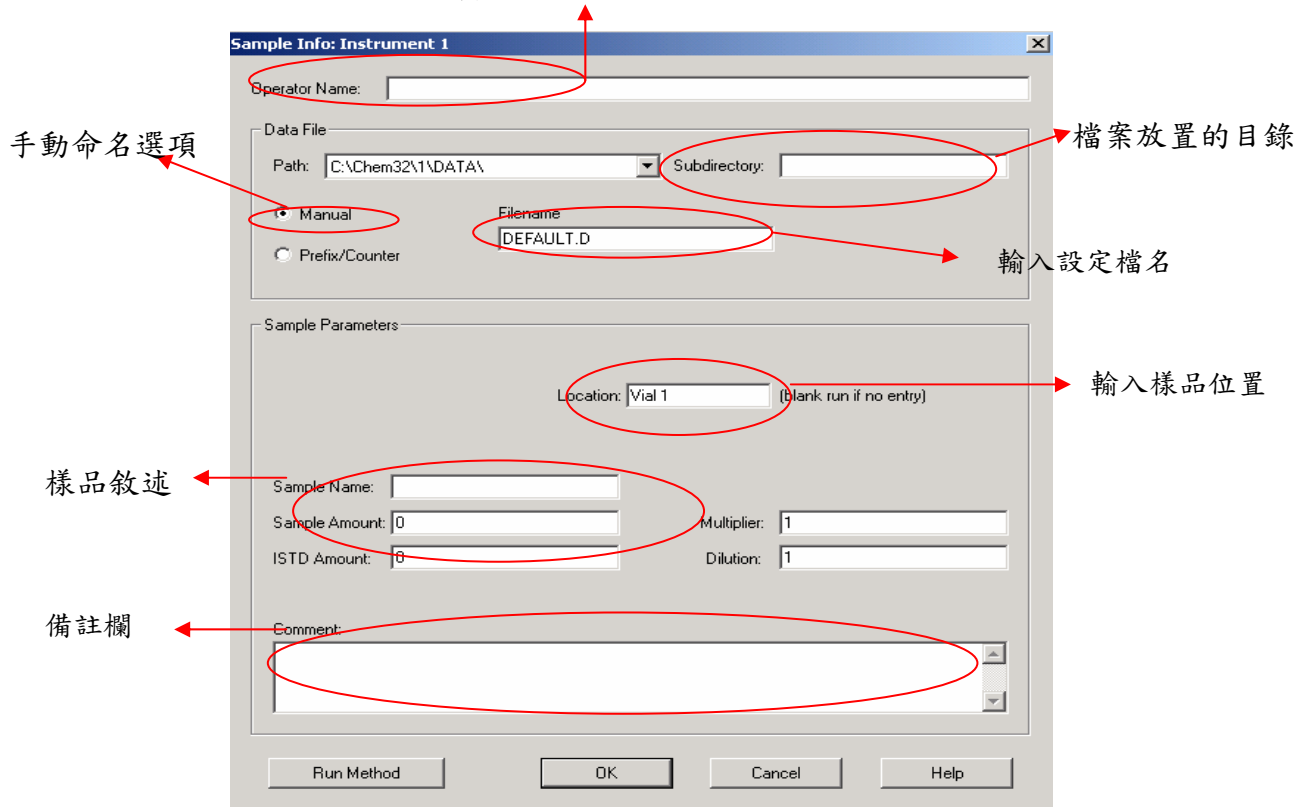
2. 單一注射樣品系統

首先，必須先切換至單一注射樣品模式，將主控制系統畫面，左上方的圖形切換到下圖所示



選擇 RunControl 選項裡的 Sample Info...，會出現下面的畫面，非常類似連續注射的畫面。

實驗者名稱

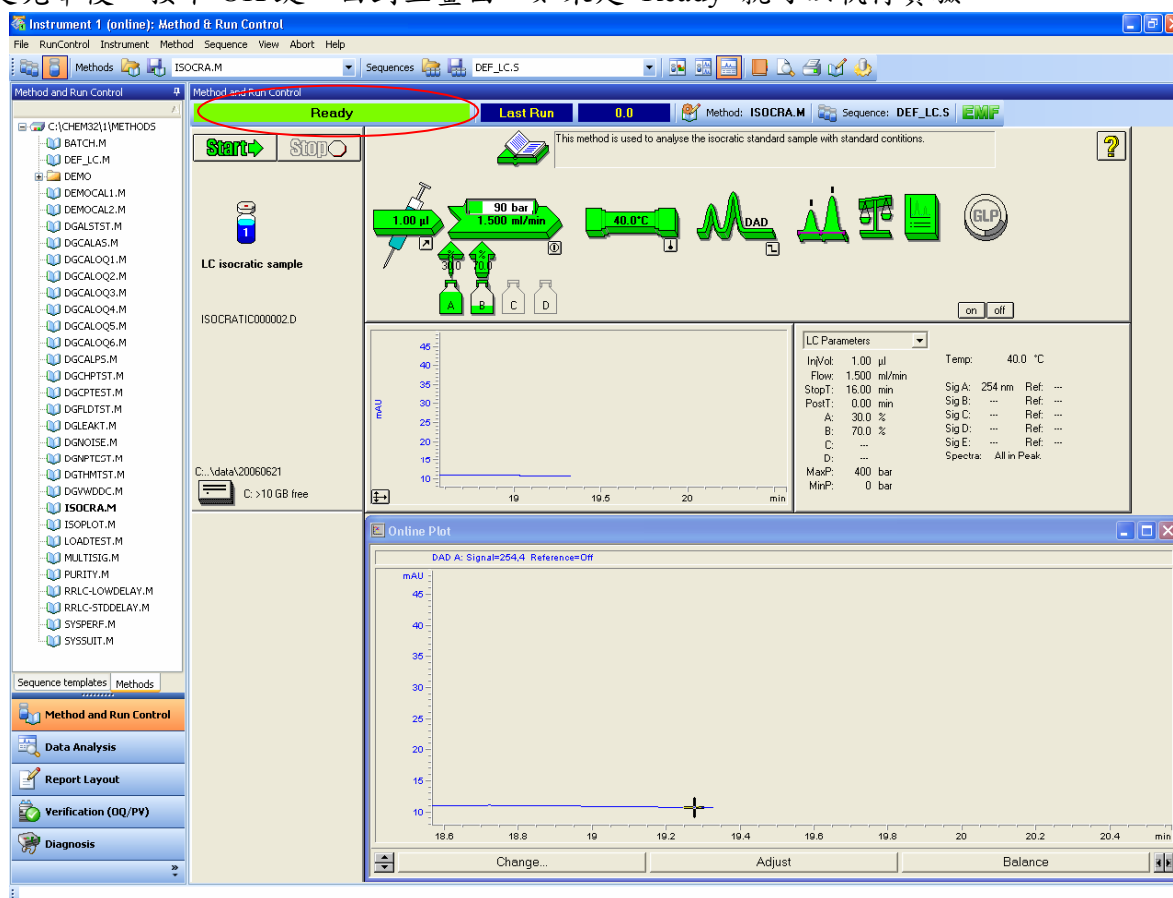


單一注射樣品，自動命名

自動命名選項

自動檔名，
counter 為自動編號部份，以此圖為例此次實驗會被命名為
SIG10001.D

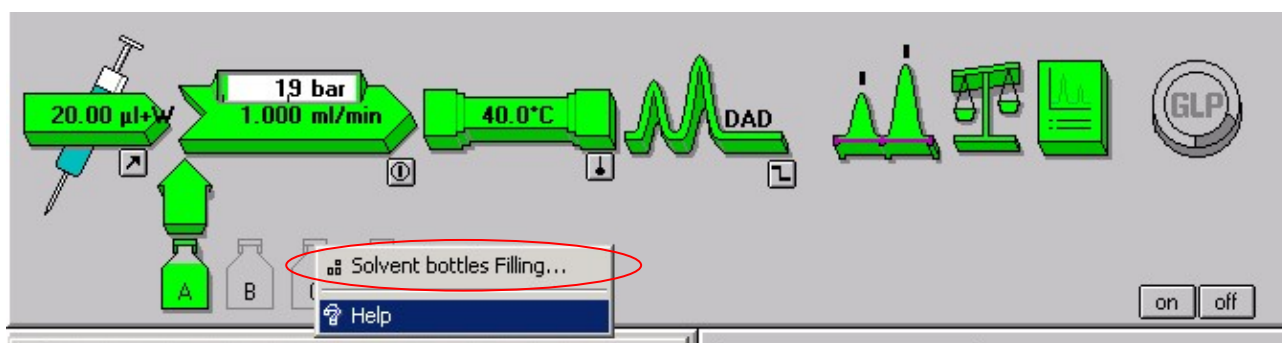
設定完畢後，按下 OK 鍵，回到主畫面，如果是 Ready 就可以執行實驗



3.按下開始鈕前，最後檢查動作：

3.1.送液瓶內容物體積設定

將滑鼠指標移至主畫面之送液瓶圖示，直接點選後將出現右列選單，



選取 **Solvent bottles Filling** 則會出現下列表單：

Solvent Bottles Filling : Instrument 1

	Actual Volume:	Total Volume:
A:	0.94 liter	1.00 liter
B:	0.00 liter	0.00 liter
C:	0.00 liter	0.00 liter
D:	0.86 liter	1.00 liter

☐ Prevent analysis if level falls below 0.100 liter

☐ Turn pump off if running out of solvent

OK Cancel Help

Actual Volume：送液瓶中目前實際存在溶劑體積。

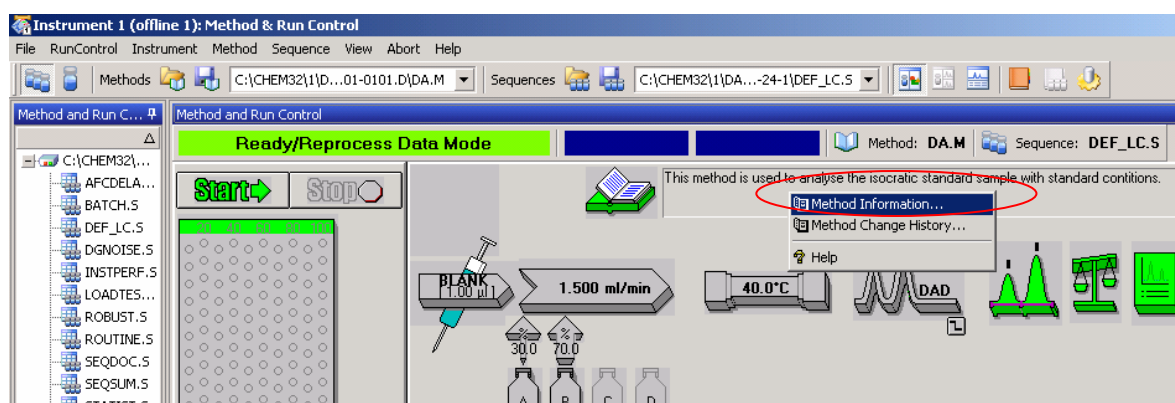
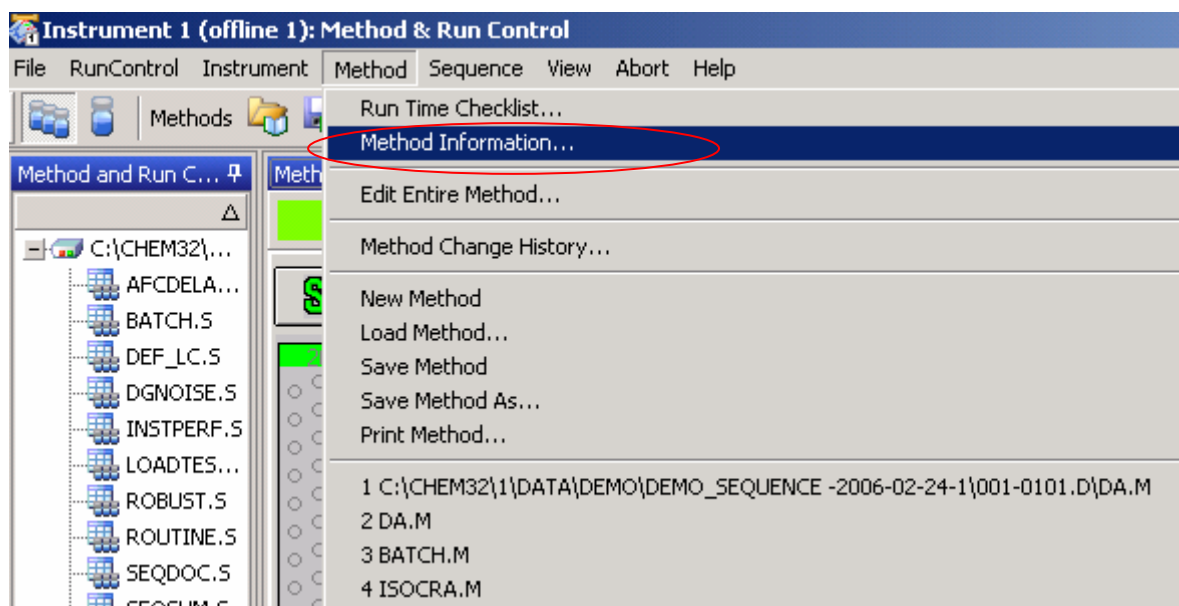
Total Volume：送液瓶最大可裝入之溶液體積。

Prevent analysis if level falls below：可設定一個最低安全體積，通常以瓶中溶劑能完全淹沒瓶中過濾頭為最低限度。

Turn pump off if running out of solvent：當勾選此項目時，則當瓶中溶劑體積低於設定之最低限度時，pump 將停止運作，而整體系統將 Shutdown，以保護 pump 及 Column。

3.2.Method Information 建立

將滑鼠指標移至主畫面之 method parameter 圖示，如圖直接點選後將出現下列選單

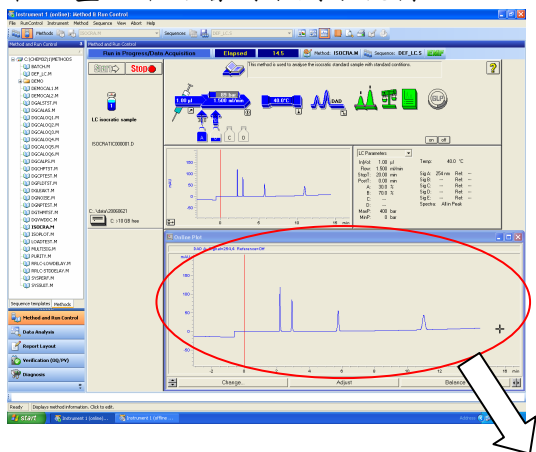


選擇 **Method Information** 項目後，將開啟 Method Information 設定表如下圖：

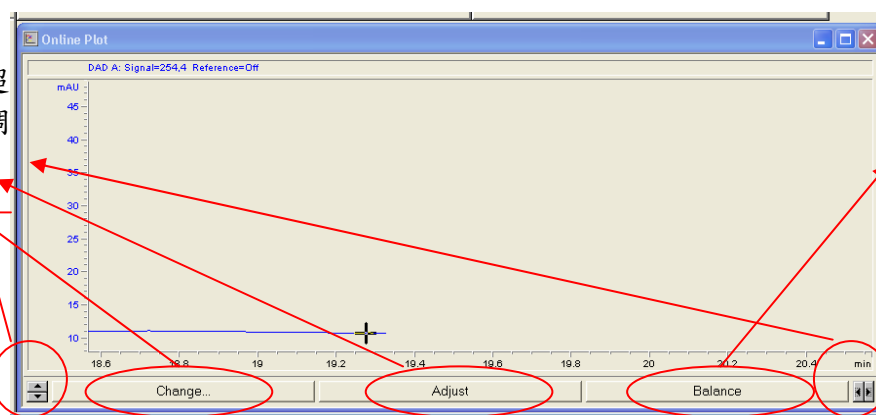


使用者可在其中填入欲記錄的資訊，內容不要超過三行，受限於操作系統的關係，僅能輸入英文

3.3. 檢測器 Online Plot 確認： 在主畫面中可看到下列小視窗：



若 Peak 高度、寬度超過視窗可視範圍,可調整至最合適之範圍

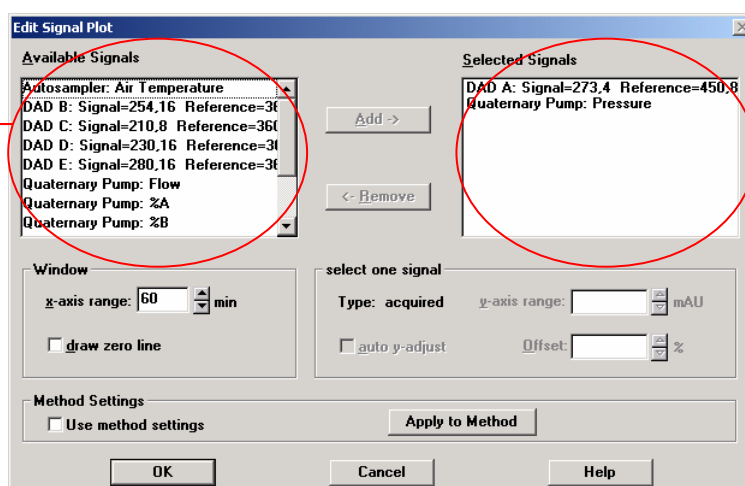


按下此鈕則
Baseline 將
重新歸零

此視窗圖形即時反應出目前檢測器所偵測得到之訊號，通常會以 Peak 形態呈現出來。Y 軸表示訊號強度，X 軸為檢測系統啟動後所進行的時間，通常可利用此視窗瞭解目前系統穩定度狀態。

Change..功能：

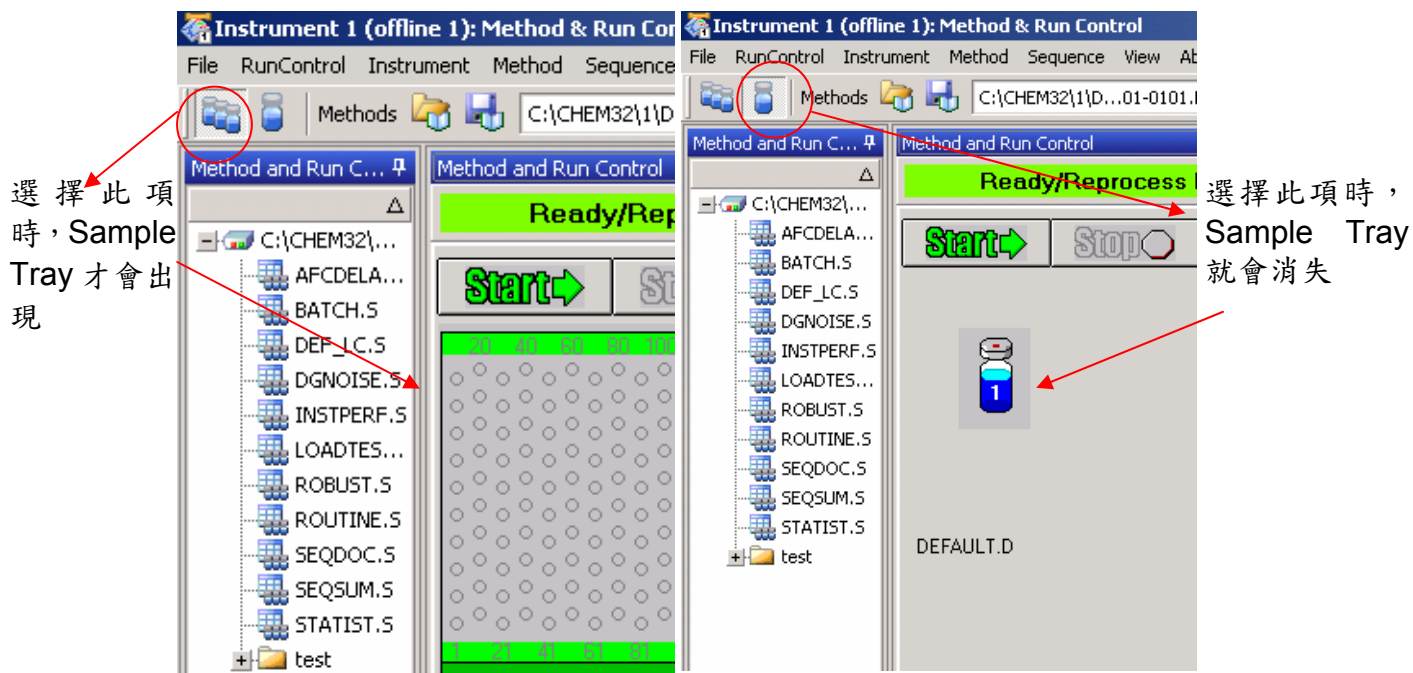
目前被記錄、監控
的項目



目前 Oline Plot
畫面上可觀看到
的項目

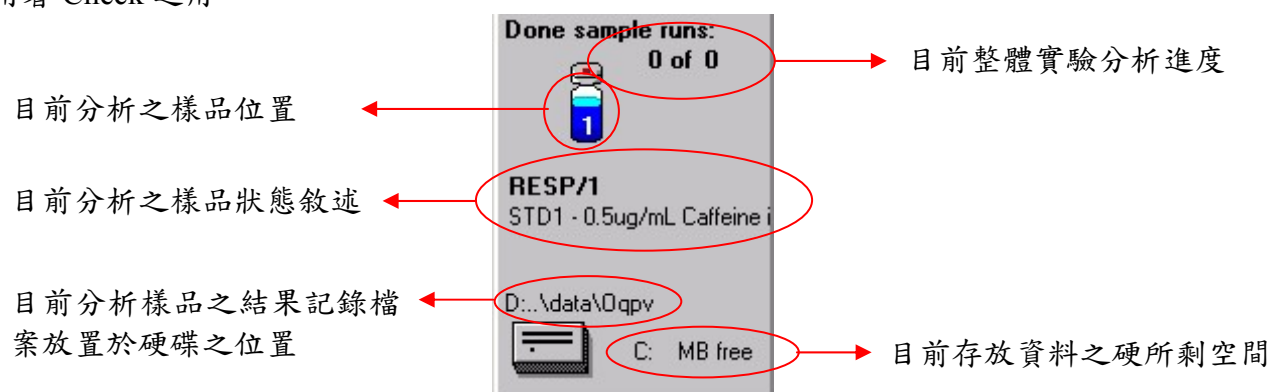
3.4. Sample Tray 中樣品數目位置之確認：

請先用滑鼠指標點選決定是否使用 Sample tray，若決定使用 Sample tray 則會出現 sample tray 圖示，如下圖，可真實表示出樣品擺設位置，若發現有誤，可直接以滑鼠指標點選 sample tray 圖示，則會出現下列選單



此時選擇 **Sequence table** 項目後將會開啟 Sequence table 設定表，如之前 4.2.1 所述。

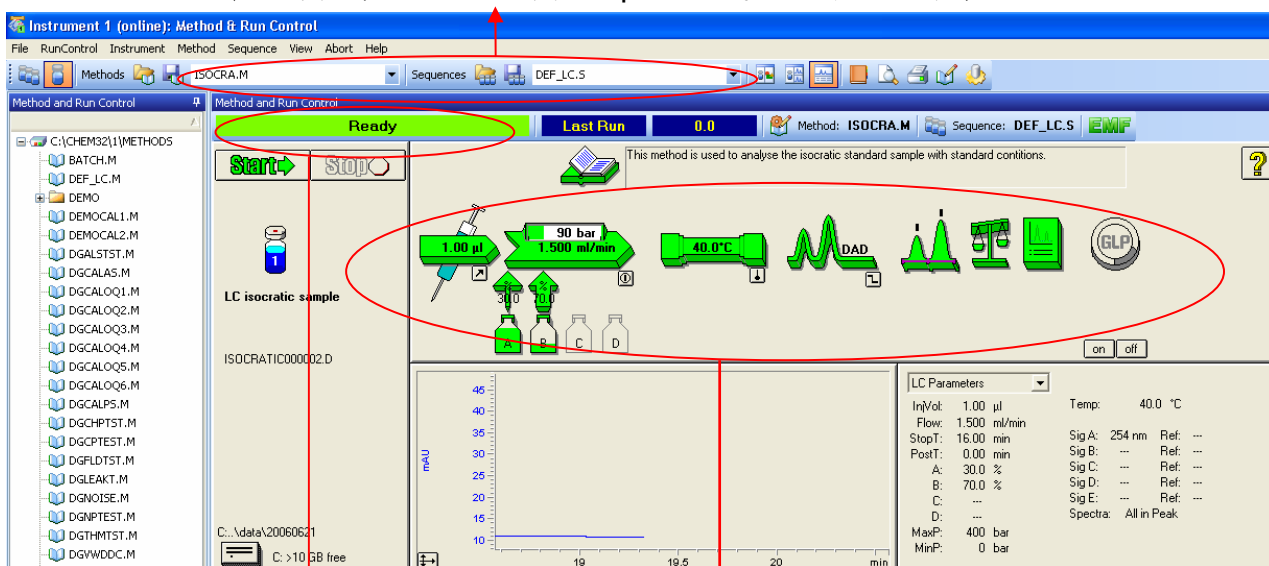
而在 Sample tray 圖示下方會有一塊區域，如下圖，其顯示目前正準備分析樣品相關資訊供使用者 Check 之用。



3.5 實驗正式開始：

當检查工作皆完成後請確認下面各項目

即將要執行的 Method 與 Sequence 是否正確，可再存檔一次



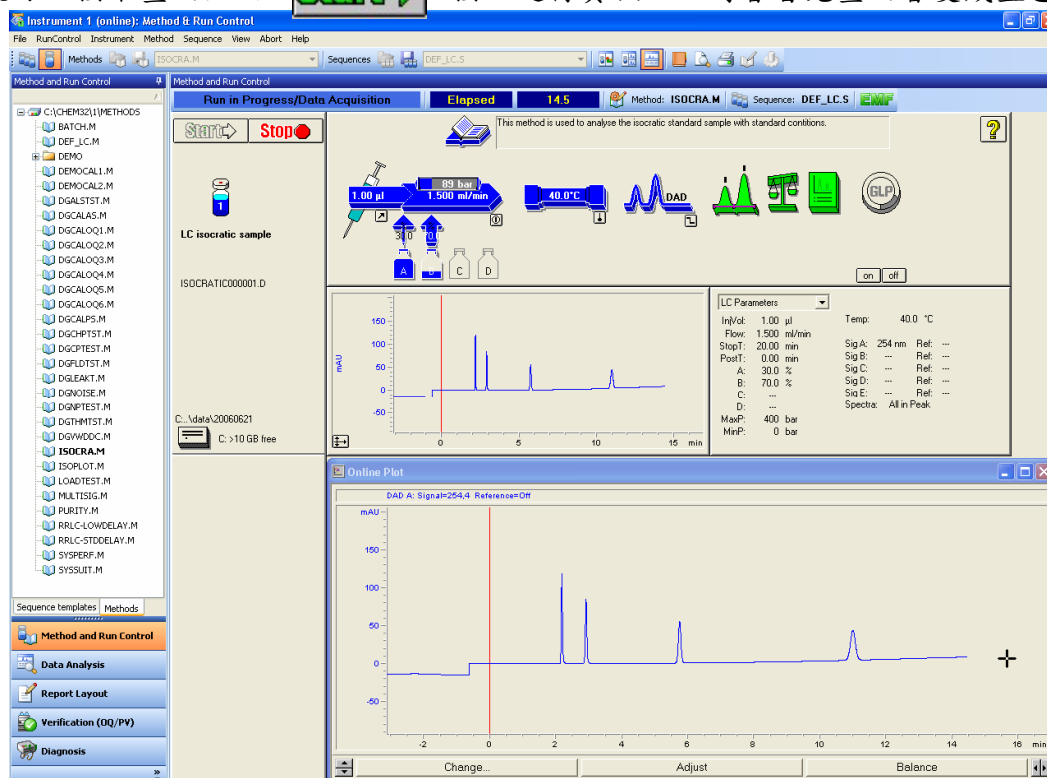
此時應綠色 Ready 狀態

各元件監控圖示均應為綠色之狀態

此時，就可以按下畫面上之



按鈕進行實驗，此時會看見畫面會變成藍色



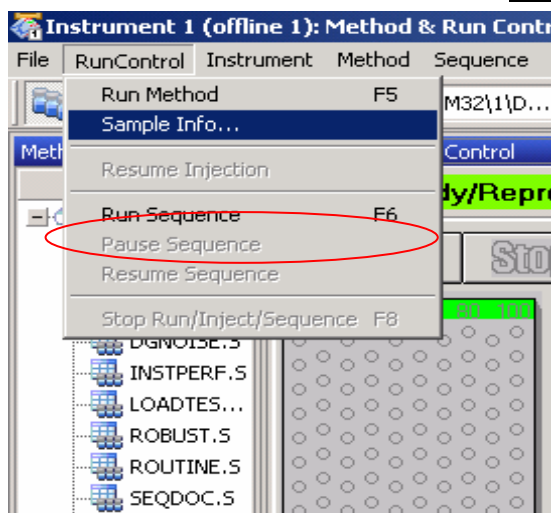
同時可看見 Autosampler 的機械手臂會自行移動至正確位置抓取樣品瓶。

若於實驗中途發現有問題而想終止實驗進行，立刻移動滑鼠指標點選器即會立刻終止目前正在進行的實驗，並進行資料處理，並以報告分析結果。

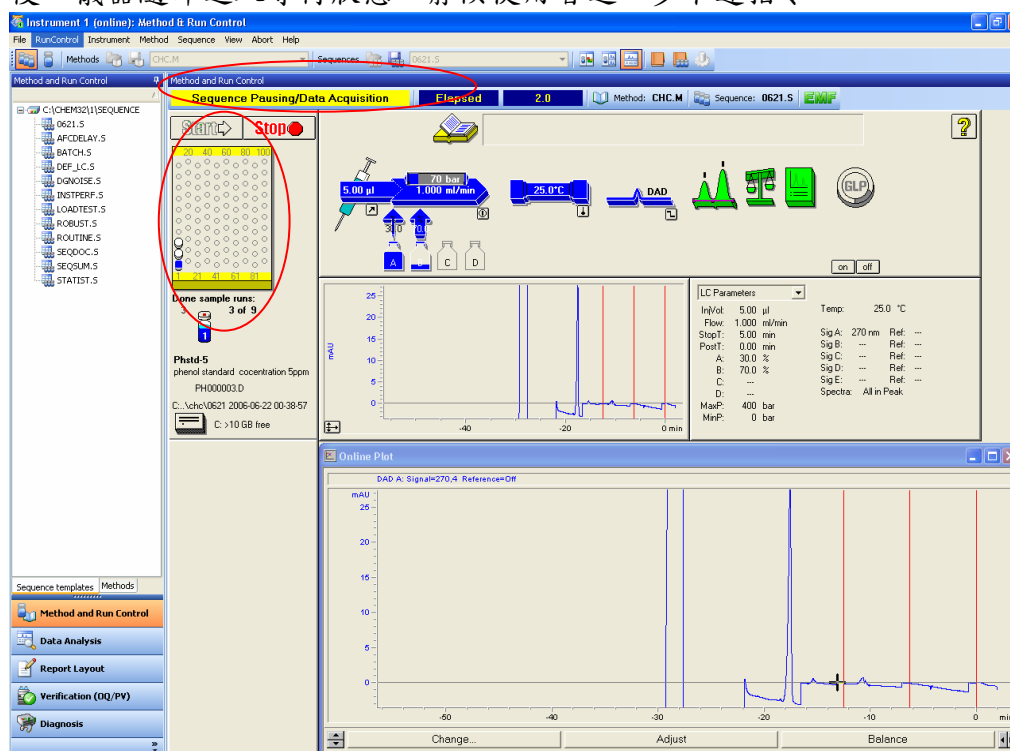


鈕，則儀式回覆分

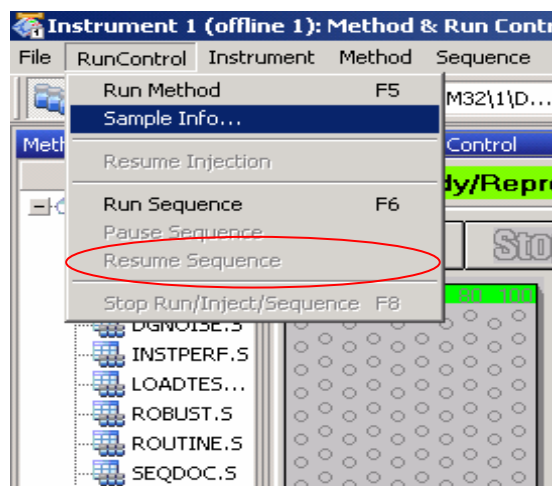
若僅想暫時停止進行中的實驗，則以滑鼠指標點選主畫面 **RunControl** 項目，則會出現一張下拉選單，如下圖：



再選擇 **Pause Sequence** 項目，此時畫面顏色會轉為黃色，並在完成目前進行中之分析工作後，儀器隨即進入等待狀態，靜候使用者進一步下達指令。



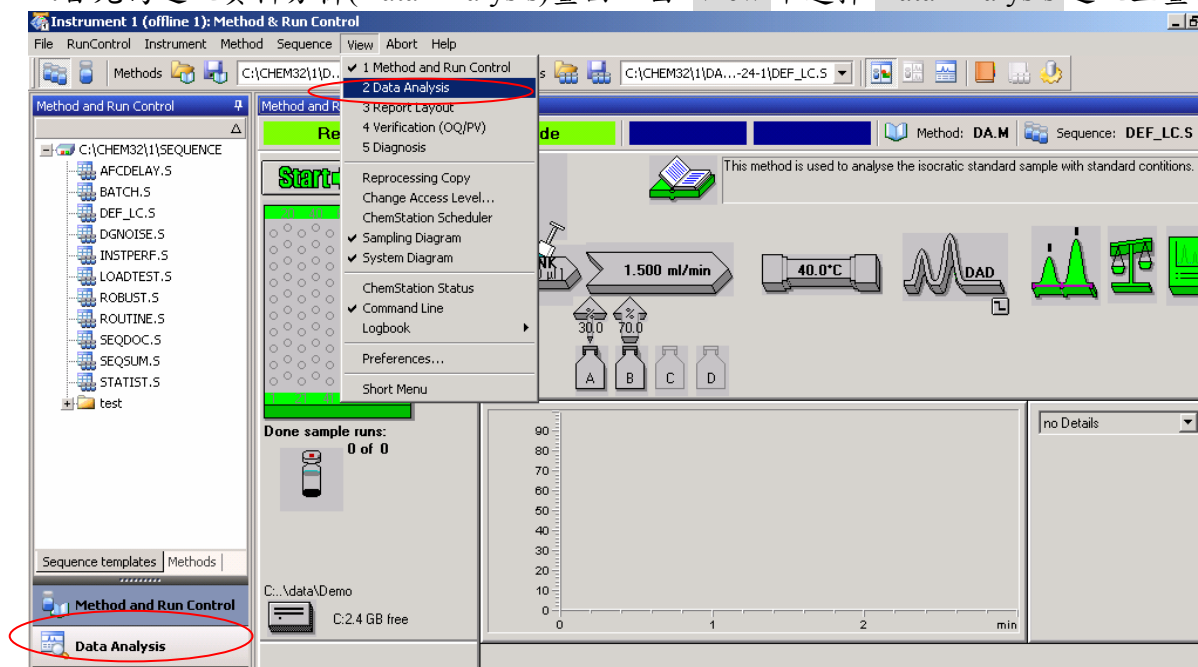
若想讓儀器接續剛才未完成的工作，則選用 **Resume Sequence** 項目。此時畫面顏色又會轉為藍色，並接續前面未完成的工作。



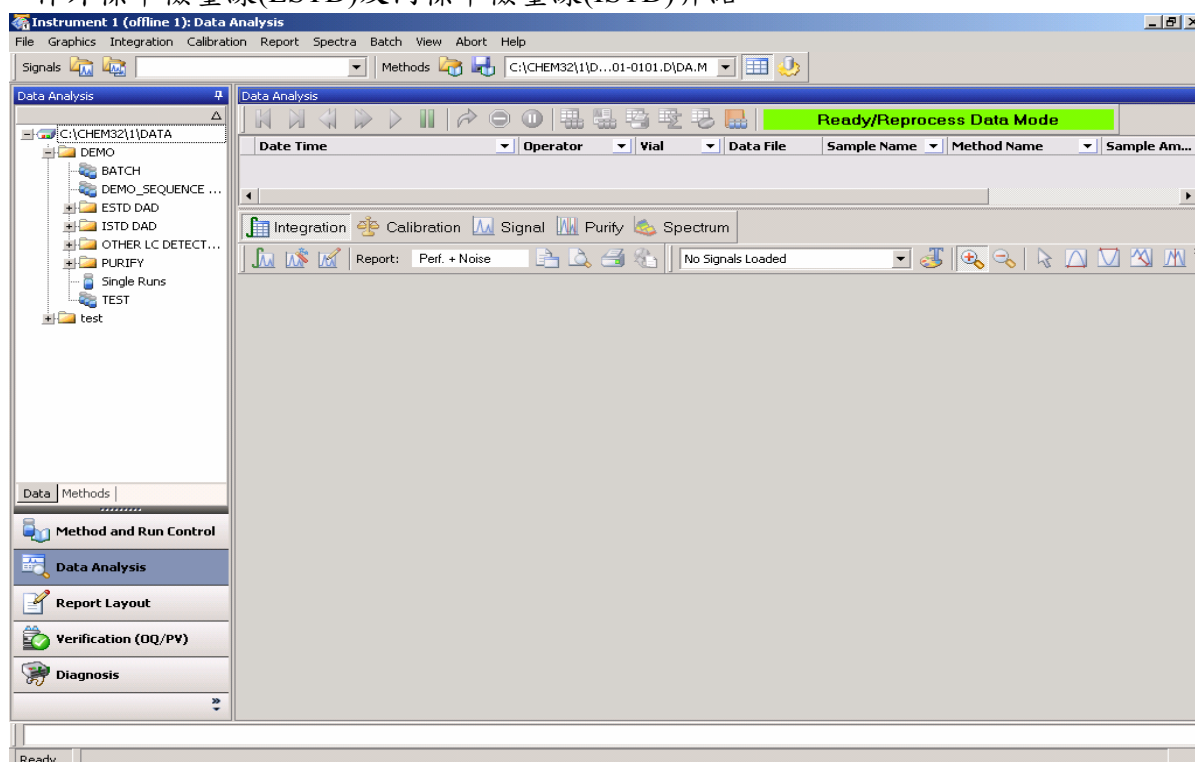
伍、檢量線製作

一般資料收集(Data Acquisition)完後會產生其相關資料檔案(Data file)，化學工作站(Chemstation)提供一資料處理的程式，能算出其樣品濃度或所欲了解的資訊，但首先便需製作檢量線，當然一個方法只能一有一個檢量線程式，所以在作檢量線之前，必先確認此方法再做適當的檢量線。以下便以最常用之外標準檢量線(ESTD)及內標準檢量線(ISTD)做簡單介紹。

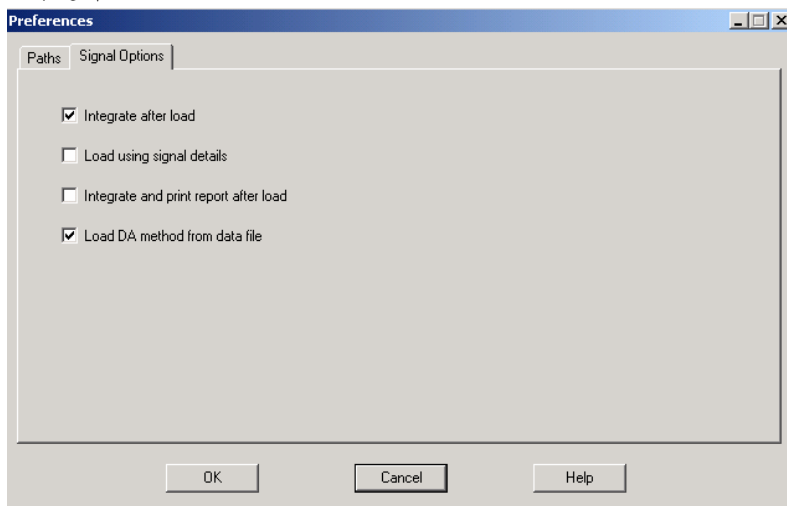
A. 首先為進入資料分析(Data Analysis)畫面，由 View 中選擇 Data Analysis 進入主畫面



B. 其資料處理主畫面如圖 2，以下便以化學工作站(Chemstation)之展示(Demo)檔案為例，分別作外標準檢量線(ESTD)及內標準檢量線(ISTD)介紹。

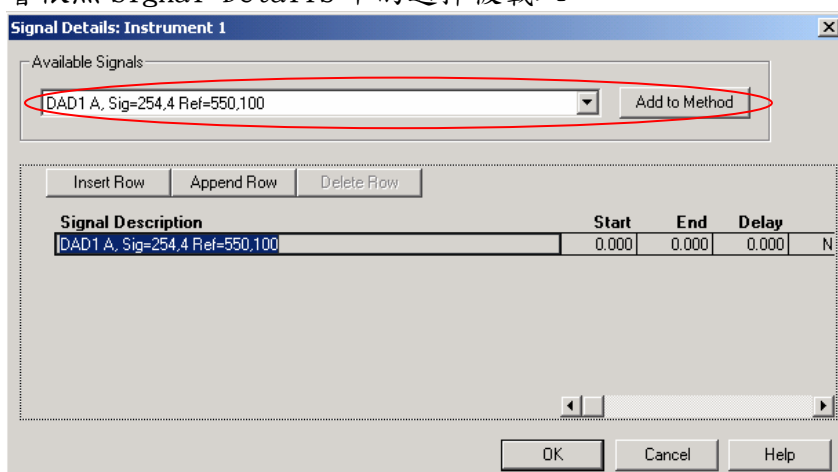


C.載入樣品之資料檔案時還要注意在 View 項目，待出現下拉選單後，選擇 **Preference** 出現下列選單



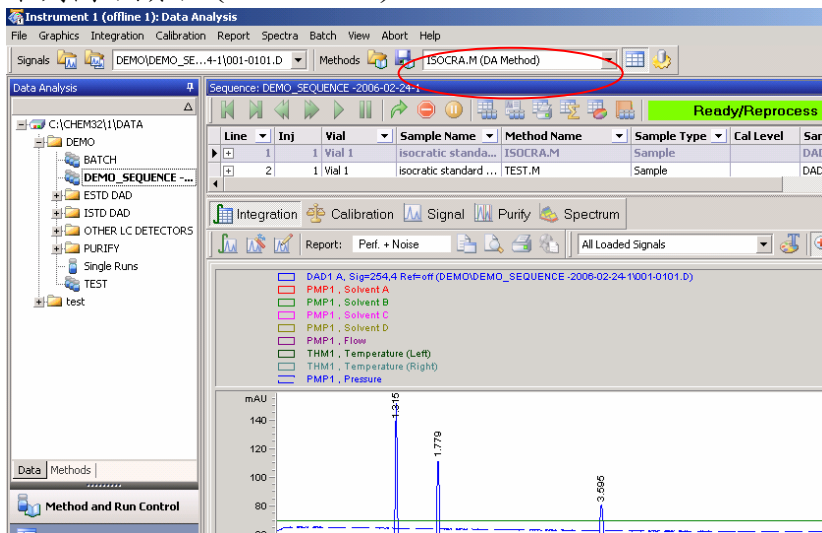
Integrate after load：載入檔案並依照目前方法之積分讀取

Load using signal details：可在 Calibration 項目之下拉選單中，選擇 **Signal details** 如下列圖示，選取每次要載入之訊號，然後 Add to method 之後按 OK 即可。之後載入數據的圖譜會依照 Signal Details 中的選擇被載入。



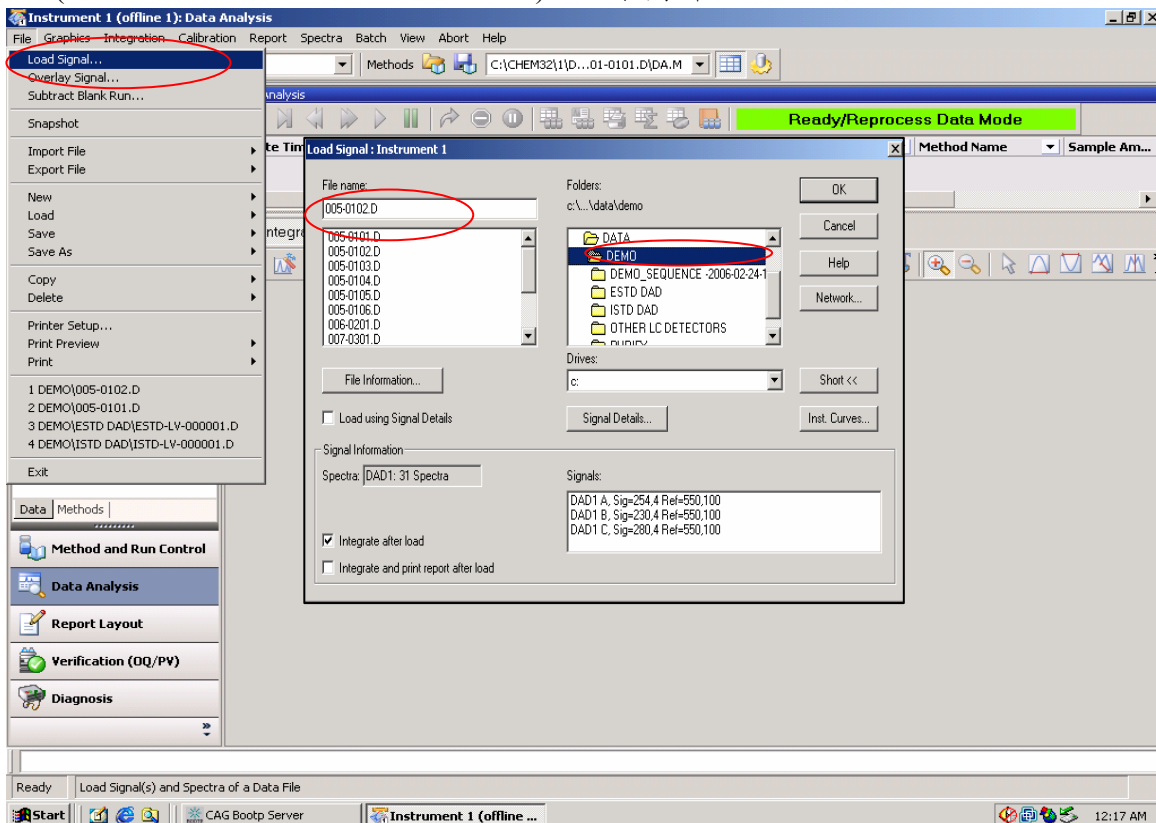
Integrate and print report after load：載入檔案並依照目前方法之積分讀取，並且列印報告

Load DA method from data file：如果執行連續自動注射運行時，會在檔案資料夾裡自動儲存處理檔案資料分析之方法，在載入方法時即可選擇是否載入此方法。如果載入，方法即會像下列圖示顯示（DA method）

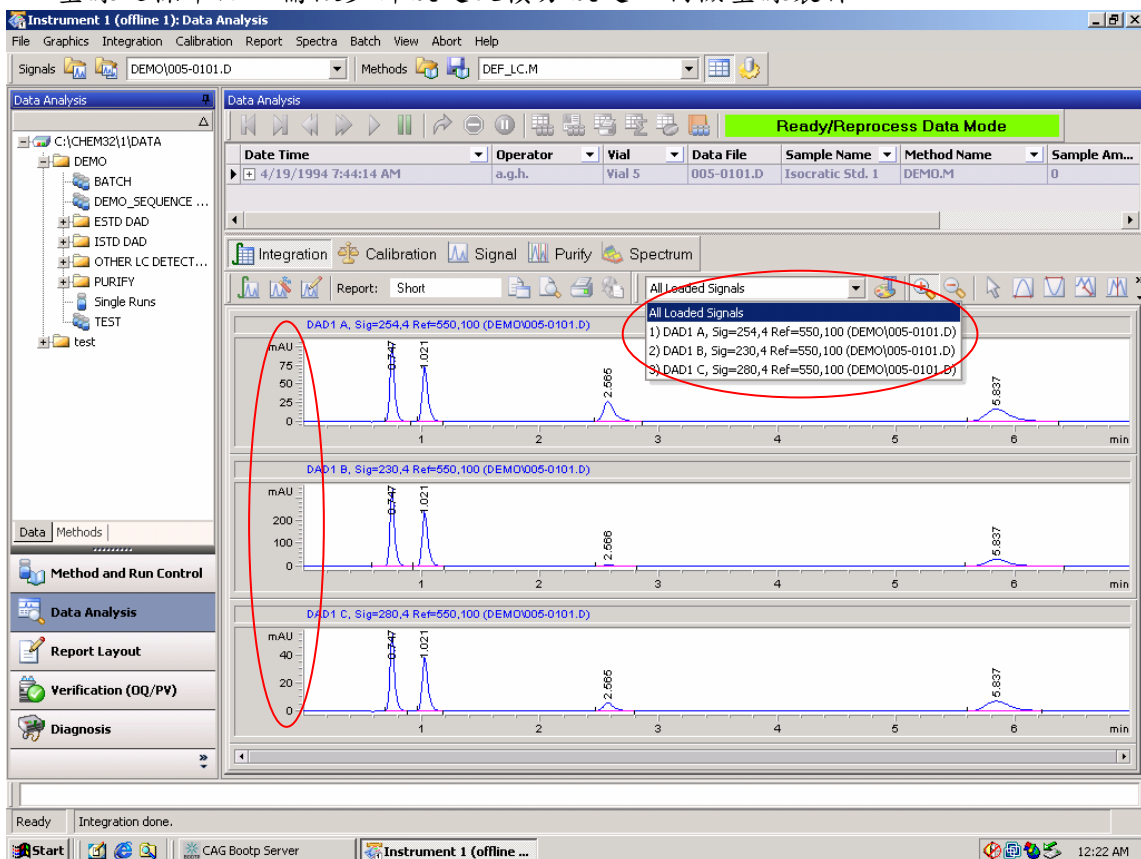


一、外標準檢量線(ESTD)

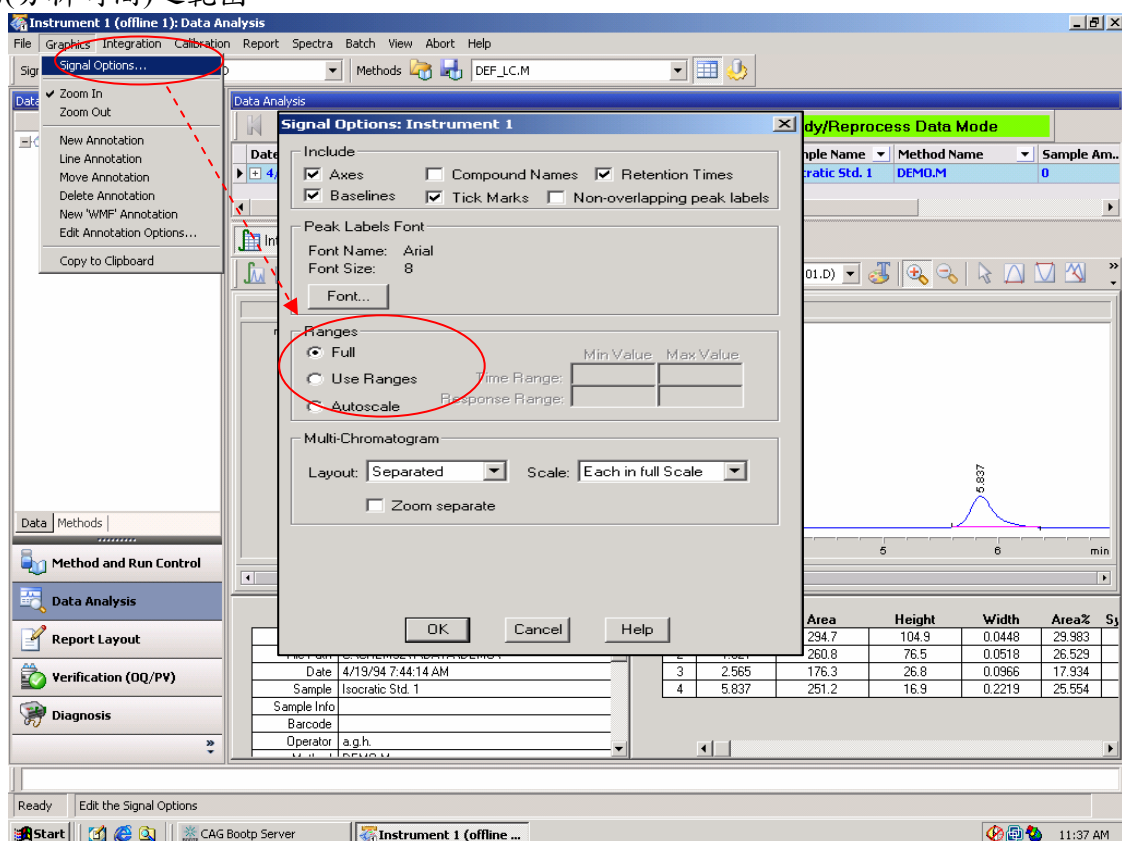
1. 進入資料分析畫面後，便需載入所屬標準品之資料檔案，以本例而言其檢量線之標準品檔案在 C:\Chem32\1\data\demo\ 中，所以便需由 File 進入 Load Signal 後，選擇其標準品檔案 (C:\Chem32\1\data\demo\005-0101.d)，如下圖所示。



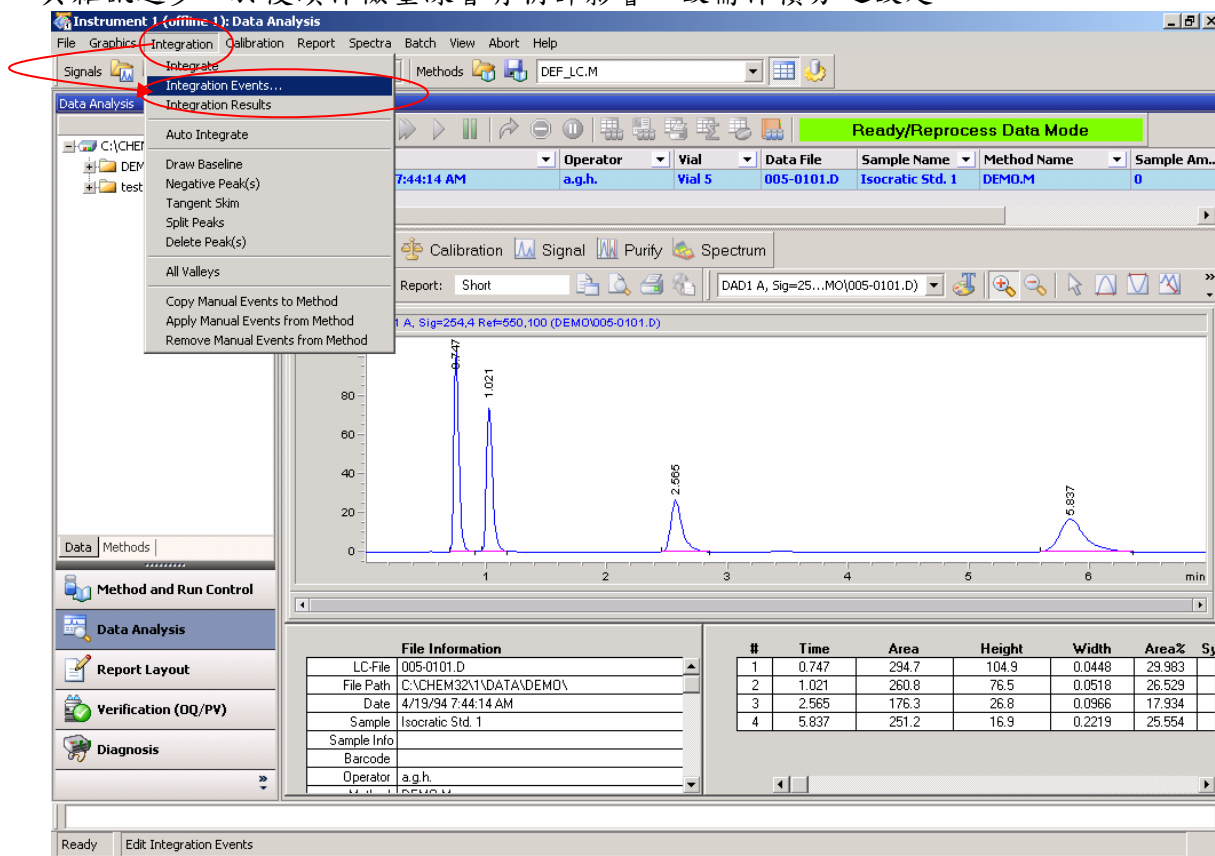
2. 進入後其畫面如下，因其 Y 軸是採最大之波峰為主，故此譜圖可能看不出那些是欲做檢量線之標準品，需做少許設定及積分設定以利檢量線製作。



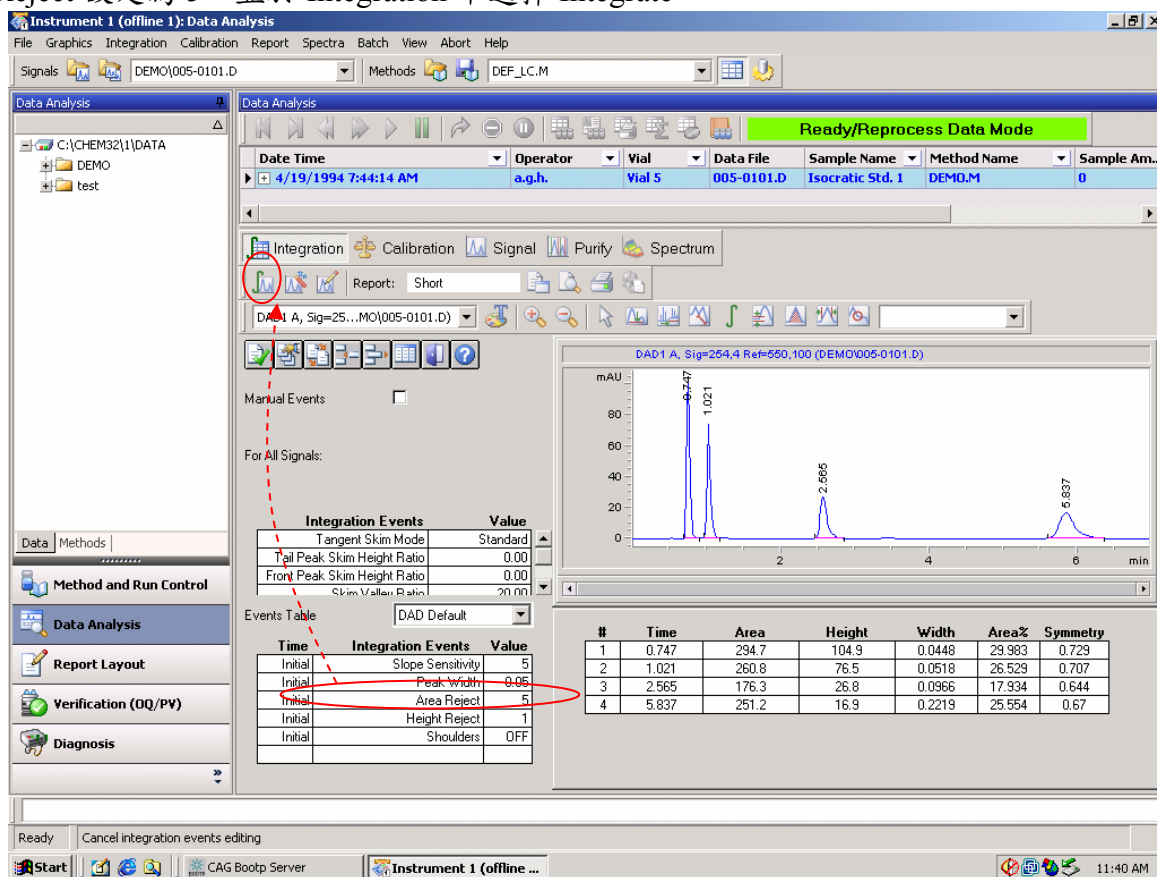
3. 調整 Y 軸參數於 Graphic 中選擇 Signal Option，進入畫面後再於 Ranges 中選擇 Autoscale，便可自動調整 Y 軸參數，或亦可選擇 Use Ranges 自行設定 Y 軸(訊號值大小)之範圍與 X 軸(分析時間)之範圍。



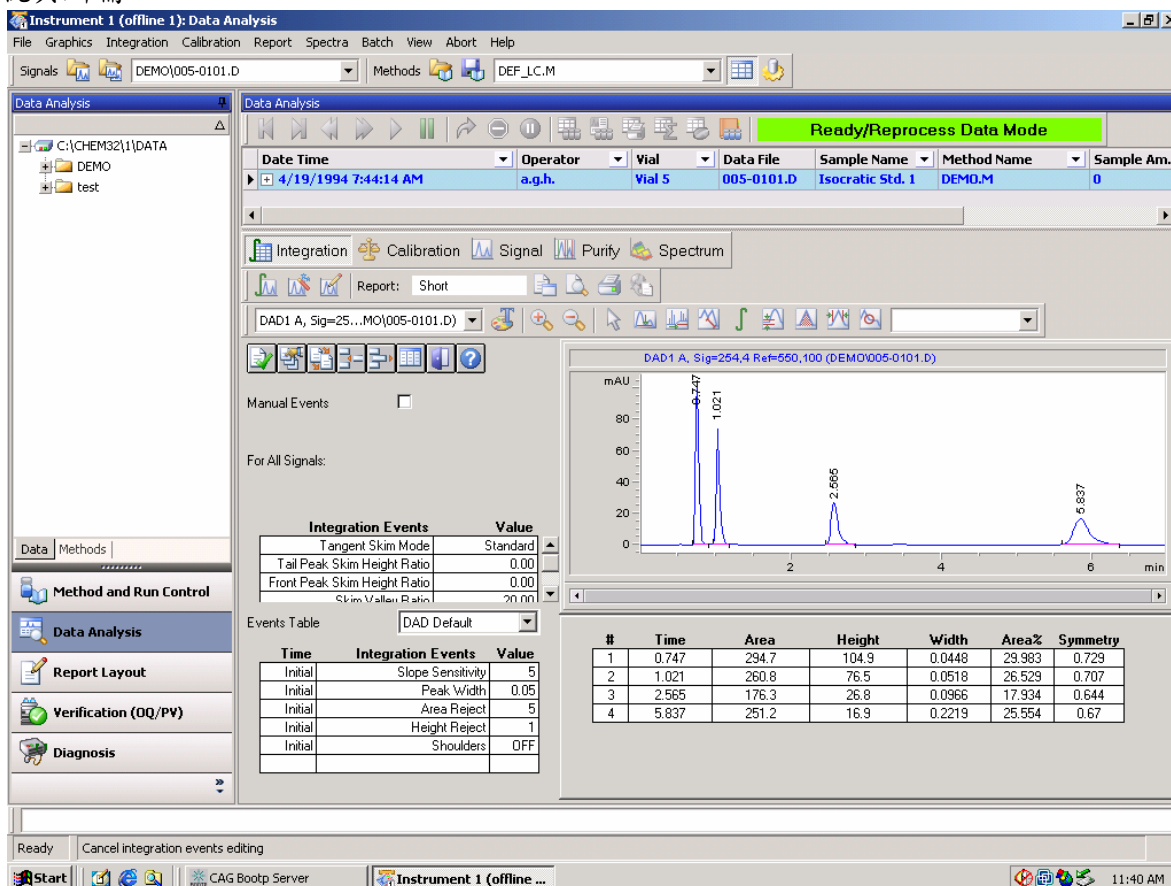
4. 使用 Autoscale 後便如下圖，其 Y 軸範圍已改變，可清楚看出所欲做檢量線之物質，但因其雜訊過多，於後續作檢量線會有稍許影響，故需作積分之設定。



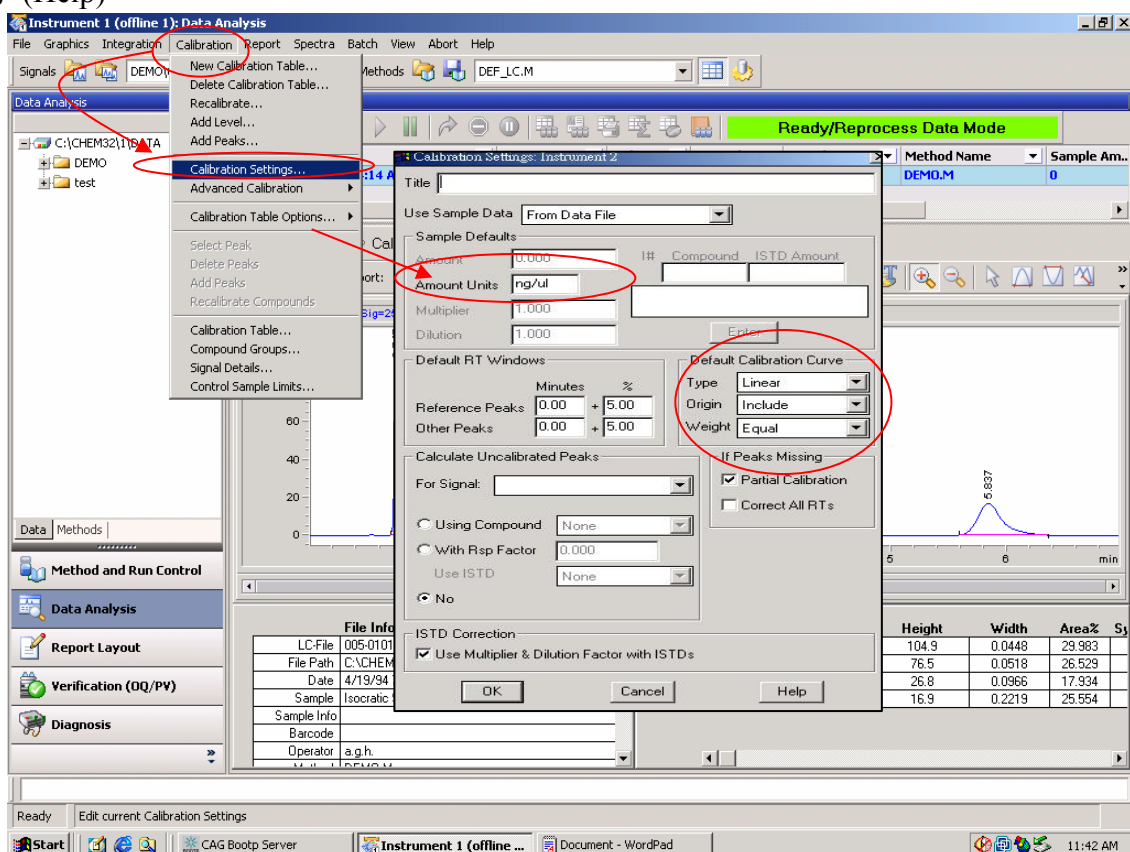
5. 積分設定於 Integration 中選擇 Integration Events...，積分設定主畫面於左中部分，選擇 Area Reject 設定為 5，並於 Integration 中選擇 Integrate。



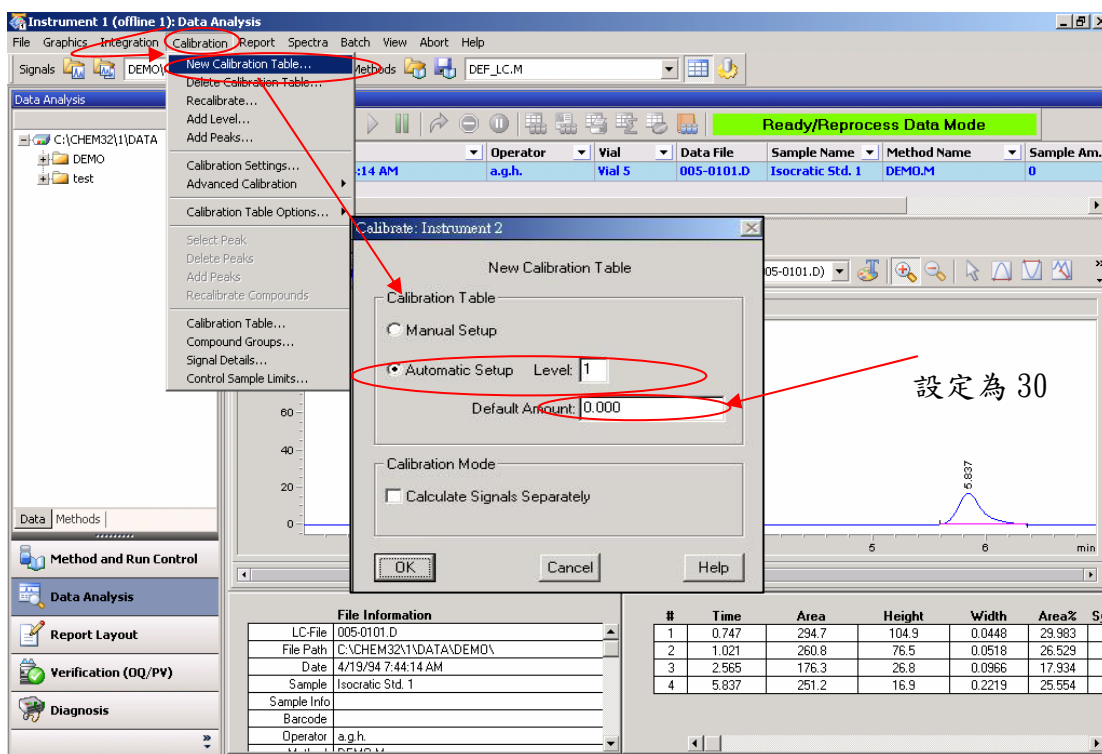
6. 積分完成後便如下圖，此動作為減少非標準樣品 Peak 之影響，Area Reject 設定值多寡則視其所需。



7. 當設定完成後，先於 Calibration 中選擇 Calibration Settings，設定所相關之參數，如濃度單位、檢量線型式等等，一般以原始設定即可，倘若欲知更高階設定，可於參閱”求助”(Help)。



8. 當於 Calibration settings 設定完畢後，於 Calibration 中選擇 New Calibration Table，進入主畫面後，可選擇手動或自動設定，本例以自動設定作說明，其中 Level 指其檢量線之點，所謂 Level 1 便指檢量線中之第一點，本例以 3 點作一檢量線，而 Default Amount 為其濃度，濃度為 30 ng/ul(單位於 Calibration Settings 中已設定)，所以於 Default Amount 欄中設定為 30。



9. New Calibration Table 設定完畢後便如下圖所示，於左下角 Calibration Table 中，選擇檢量線之物質，其餘部分可刪除，然後於 Compound 欄中填寫其物質名稱，如此檢量線之第一點(Level 1)便設定完畢。



10. 上述設定完畢後，便完成第一點檢量線(Level 1)設定，再來便是第二點(Level 2)檢量線之設定；首先載入第二點檢量線之資料，於 File 中選擇 Load Signal 並載入第二點(Level 2)檢量線資料(c:\Chem32\1\data\demo\006-0201.d)，然後於 Calibration 中選擇 Add Level，於 Add level 中的 Default Amount 設定濃度為 50，如此便完成第二點(Level 2)檢量線之設定。

The screenshot illustrates the steps to add a second calibration level in the Agilent Data Analysis software. The 'Load Signal' dialog is open, showing the file '006-0201.D' selected. The 'Add Level' dialog is also open, showing 'Level 2' and 'Default Amount: 50'. The main interface shows a table of calibration data and a chromatogram.

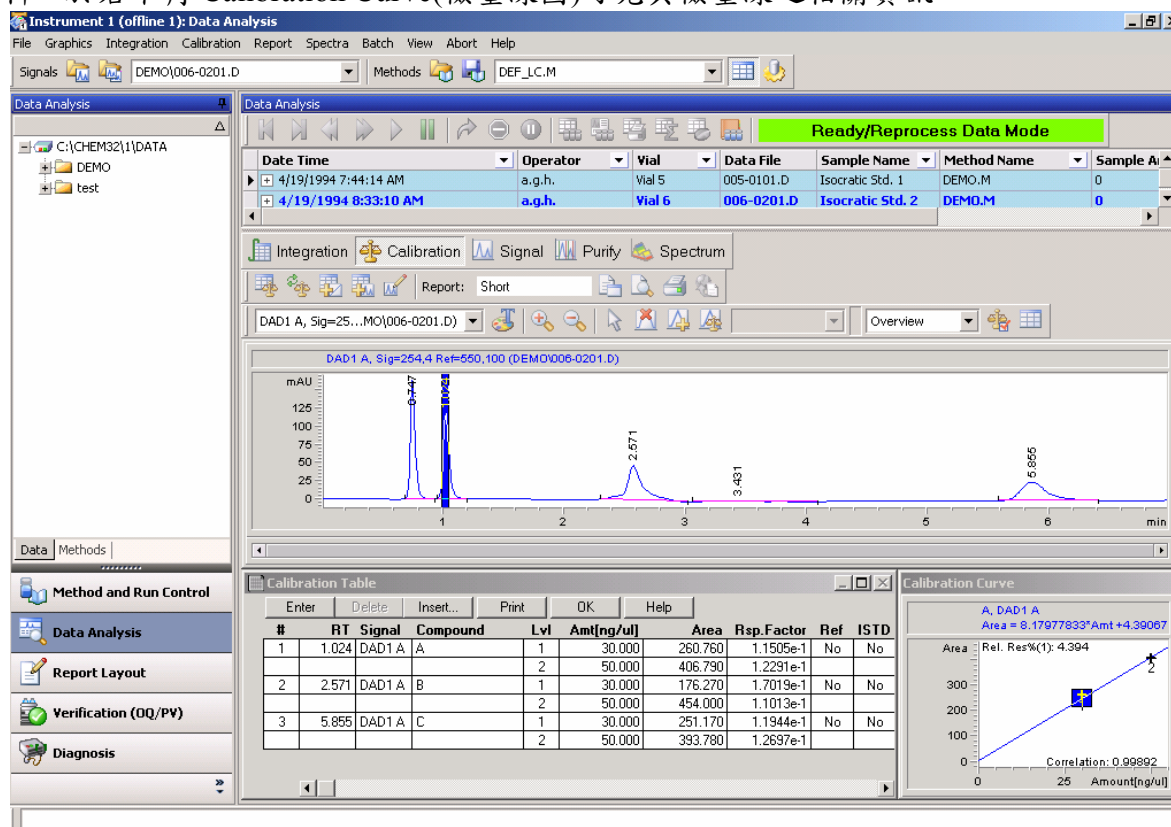
Calibration Table

#	RT	Signal	Compound	Lvl	Amt[ng/ul]	Area	Rsp.Factor	Ref	ISTD
1	1.021	DAD1 A	A	1	30.000	260.760	1.1505e-1	No	No
2	2.565	DAD1 A	B	1	30.000	176.270	1.7019e-1	No	No
3	5.837	DAD1 A	C	1	30.000	251.170	1.1944e-1	No	No

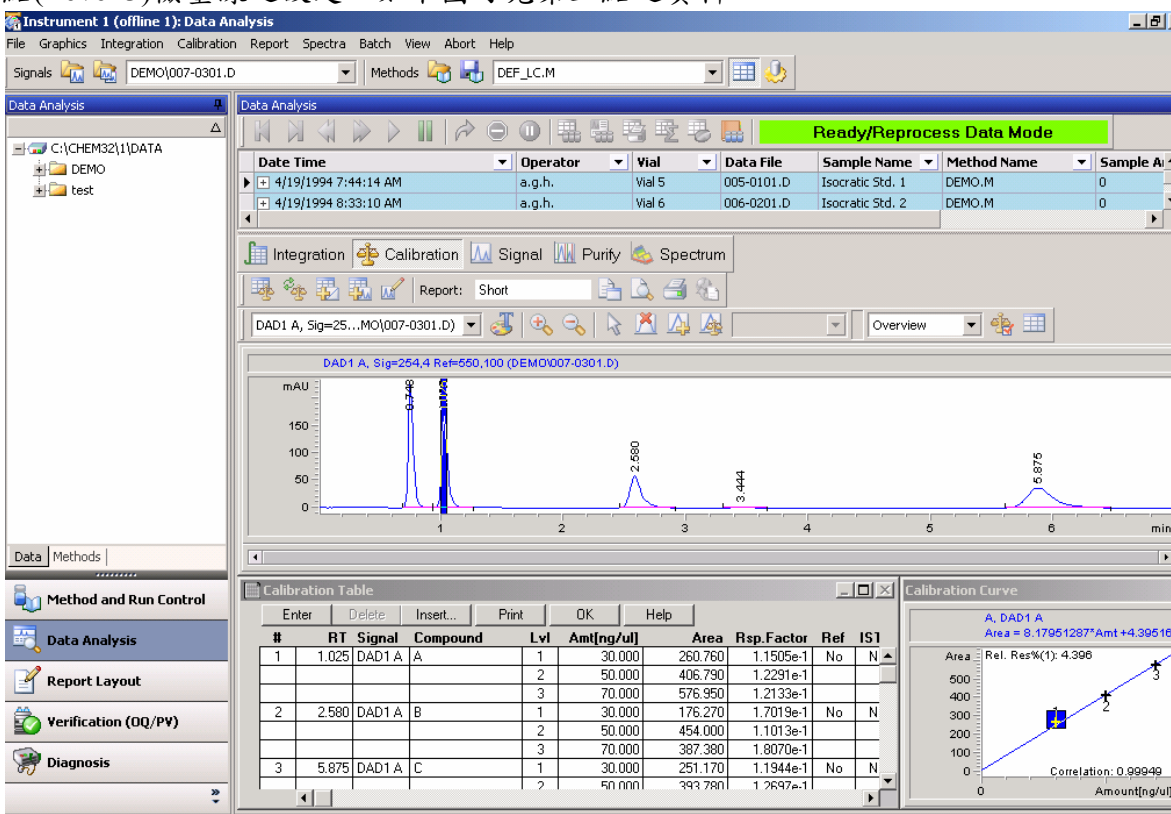
Calibration Curve

C, DAD1 A
Area = 8.37239634* Amt + 0
Correlation: 1.000000
Amount[ng/ul]

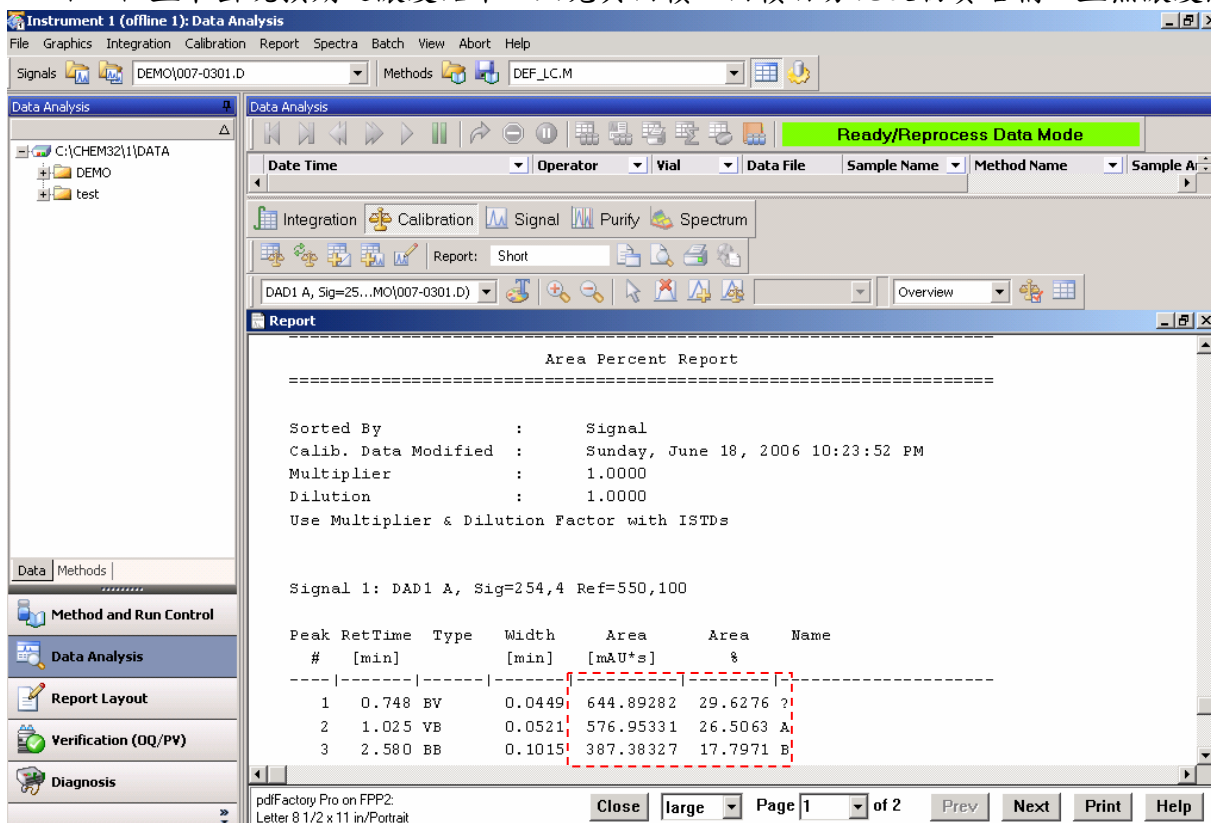
11. 完成步驟 10 設定畫面如下，於左下角 Calibration Table 中可發現已有第二點檢量線之資料，於右下角 Calibration Curve(檢量線圖)可見其檢量線之相關資訊。



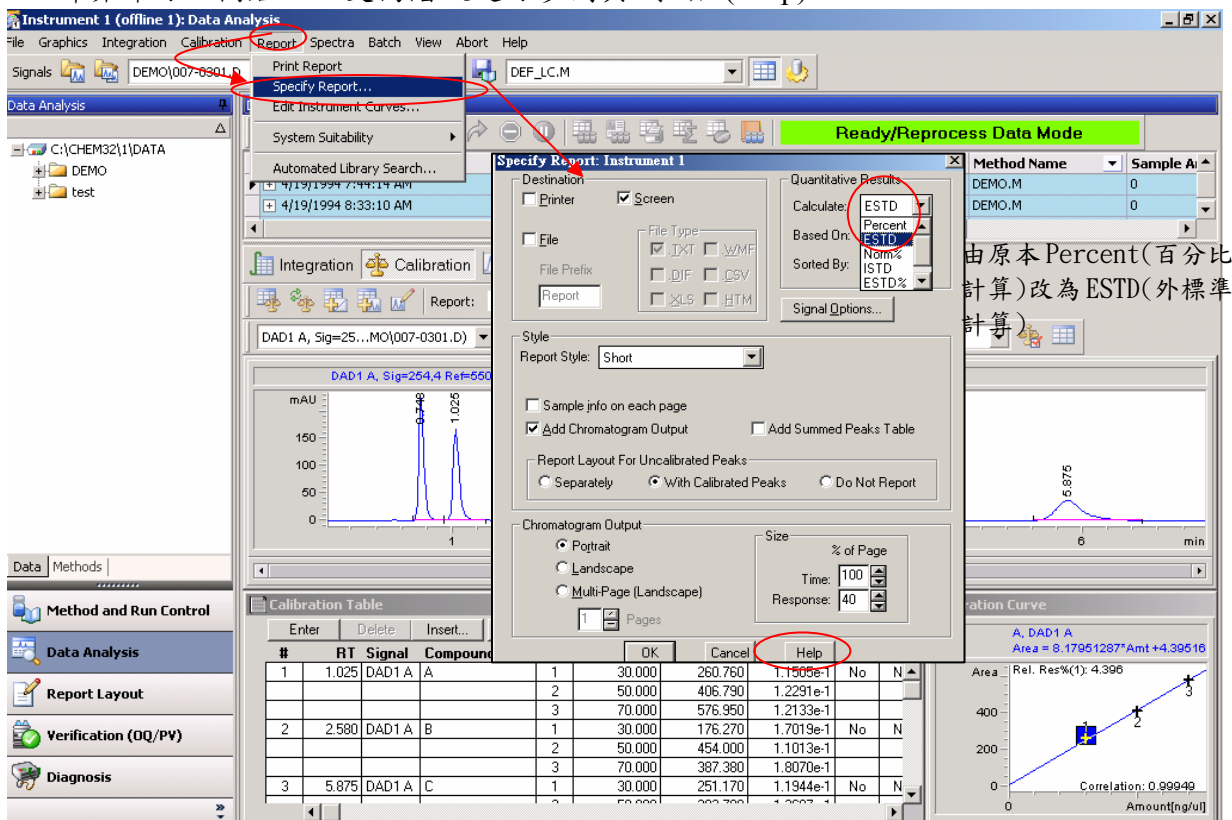
12. 而第三點(Level 3)檢量線設定與步驟 9 相似，惟第三點檢量線之資料檔為 (c:\Chem32\1\data\demo\007-0301.d)，而 Default Amount 設定濃度為 70，如此便完成第三點(Level 3)檢量線之設定，如下圖可見第三點之資料。



13. 完成上述步驟設定，便已完成簡易外標準品之檢量線，爾後便可以此檢量線算出未知濃度之樣品，但前提為在相同方法條件下；因本例無未知樣品之資料，假設 005-0101(濃度為 30)為未知樣品資料，載入 005-0101.d 資料，可驗證檢量線是否正確，其結果如下圖所示，但並未出現預期之濃度結果，只見其面積、面積百分比及物質名稱，並無濃度顯示。



14. 上述情形為報告格式未適當設定，於 Report 中選擇 Specify Report，於 Quantitative Results(定量結果)中更改其計算方式，由 Percent(面積百分比) 計算更改為 ESTD(外標準) 計算即可，倘若欲知更高階設定可參閱其”求助”(Help)。



15. 步驟 14 設定完畢後在載入 estd1.d(假設 estd1.d，濃度 30 ng/ul 為未知樣品)資料並檢測其報告，結果如下圖，便可見其相關物質之濃度單位、濃度值及物質名稱。

The screenshot shows the 'Instrument 1 (offline 1): Data Analysis' software interface. The 'Report' window is open, displaying an 'External Standard Report'. The report includes the following information:

- Sorted By : Signal
- Calib. Data Modified : Sunday, June 18, 2006 10:28:53 PM
- Multiplier : 1.0000
- Dilution : 1.0000
- Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
- Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=550,100

The report table is as follows:

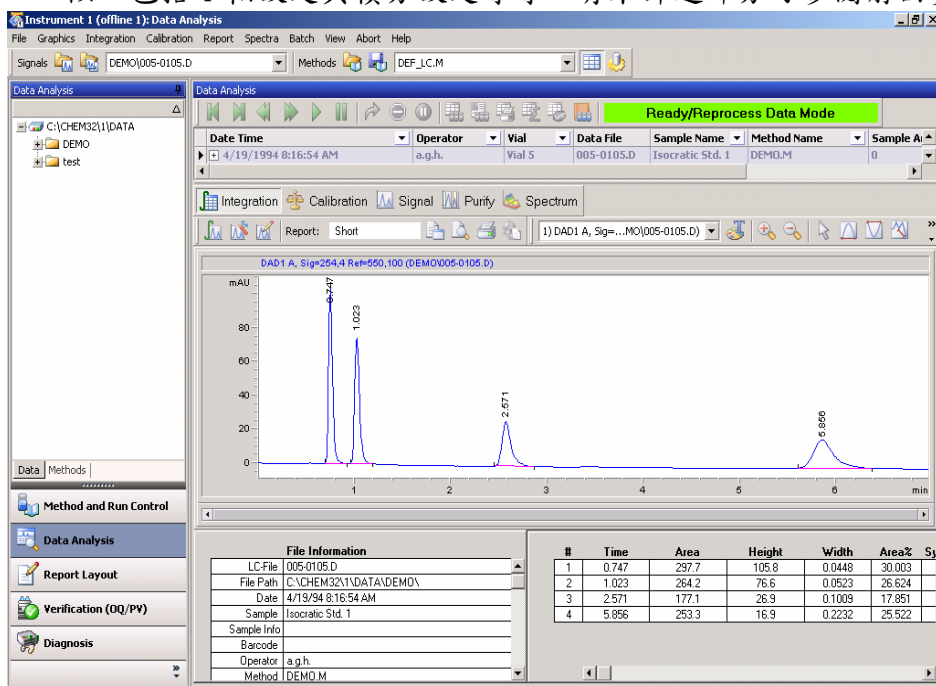
RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [ng/ul]	Grp	Name
1.025	VB	576.95331	1.21325e-1	69.99905	A	
2.580	BB	387.38327	1.50996e-1	58.49338	B	
5.875	BB	555.43567	1.25822e-1	69.88606	C	

A red dashed box highlights the 'Amount' column and the values for the three peaks: 69.99905, 58.49338, and 69.88606.

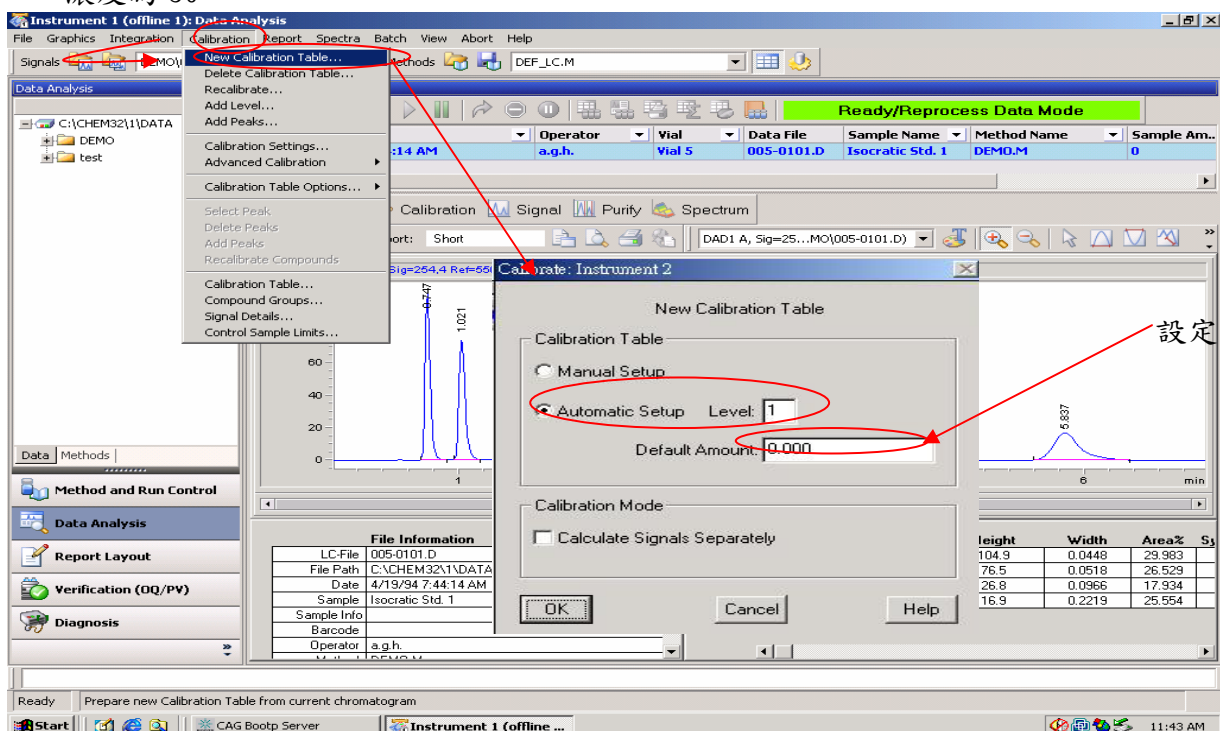
二、內標準檢量線(ISTD)

所謂內標準品檢量線為一組檢量樣品中加入標準品，此標準品必須與其他樣品不同，且其濃度必須一定，例如三種不同濃度之檢量標準品，其內標準品的濃度必須是相同的。本例以 005-0101, 006-0201 及 007-0301 的資料作為說明，以下便一一說明。

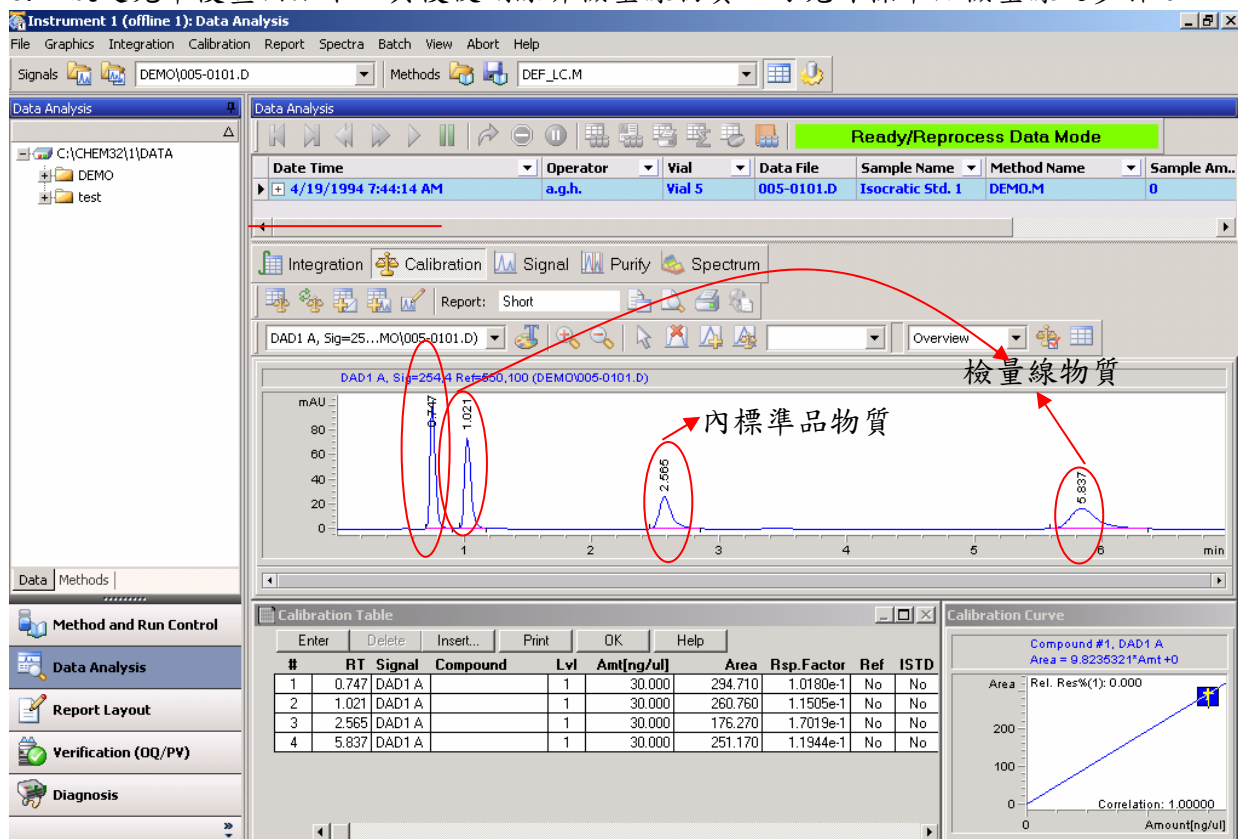
1. 載入內標準品之方法，本例以 Def_lc.m(視本身所需)為例，載入其檢量標準品資料，於 Data Analysis 中選擇 File\Load Signal，以本例而言其檢量線之標準品檔案在 C:\Chem32\1\data\demo\005-0101.d 中，所以便需由 File 進入 Load Signal 後，選擇其標準品檔案(C:\Chem32\1\data\demo\005-0101.d)，如下圖所示。其步驟與外標準品相似，包括 Y 軸設定與積分設定等等，有未詳述部分可參閱前面步驟 1~7。



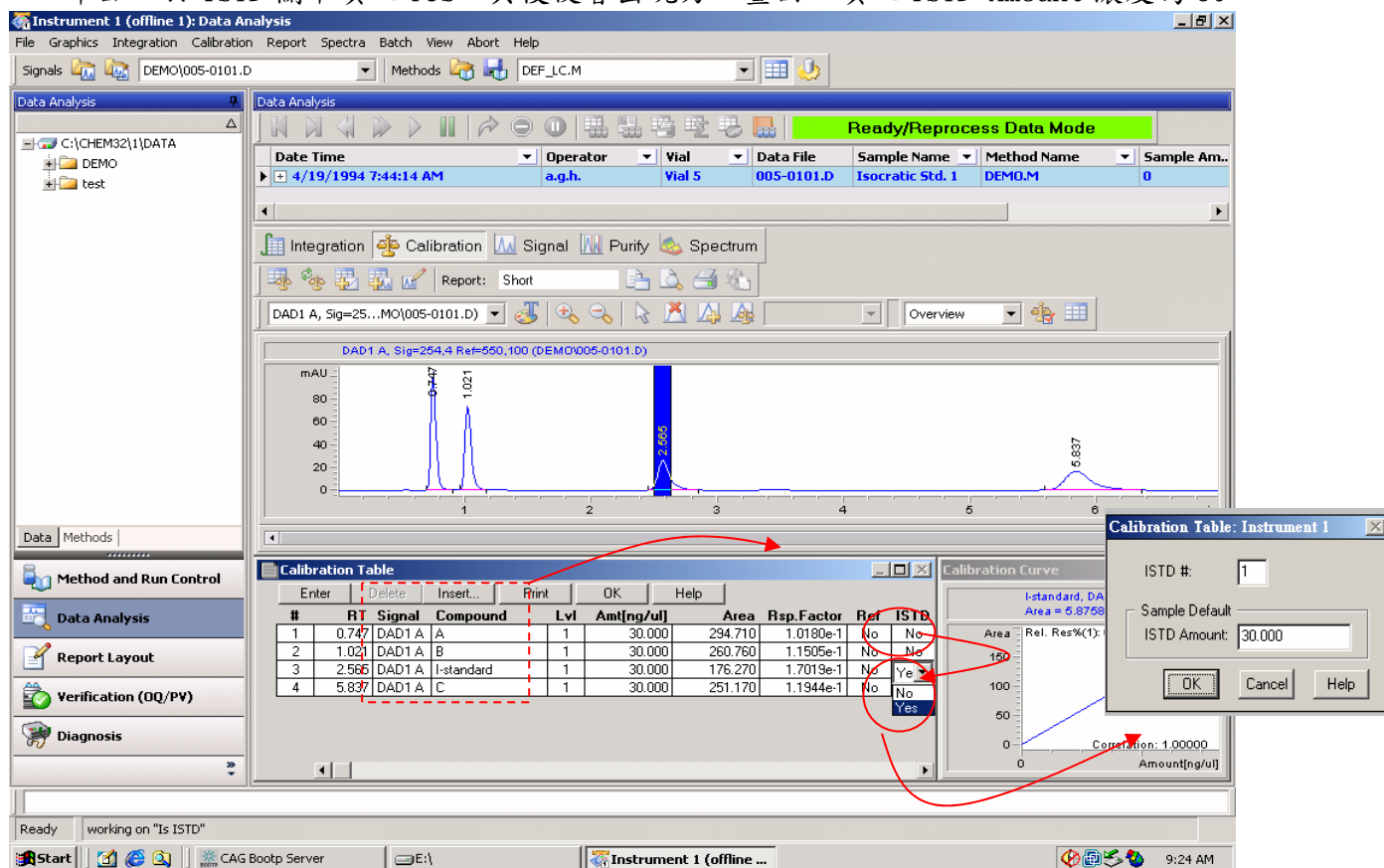
2. 載入資料並完成相關設定(含Y軸及積分設定)後，於 Calibration 中選擇 New Calibration Table，一般選擇 Automatic Setup，而 Level 1 為檢量線之第一點資料，Default Amount 濃度為 30。



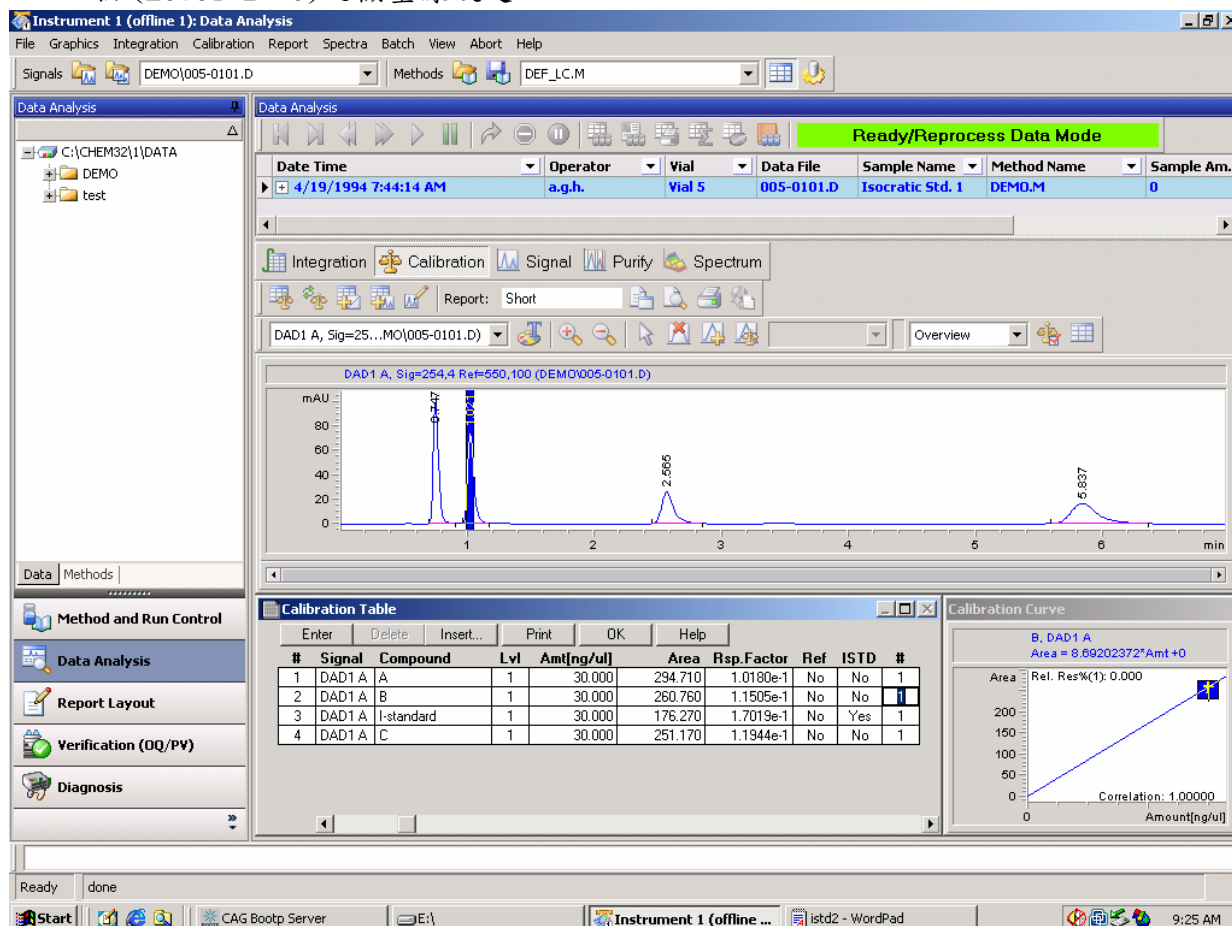
3. 設定完畢後畫面如下，其後便刪除非檢量線物質，可見外標準品檢量線之步驟9。



4. 上述設定完畢後，填入 Compound 名稱，而名稱 I-standard(R. T. 為 3.225)為本例之內標準品，於 ISTD 欄中填入 Yes，其後便會出現另一畫面，填入 ISTD Amount 濃度為 30。



5. 設定完畢後畫面如下，如此便完成第一點(Level 1)檢量線之設定，以下便繼續說明第二、三點(Level 2、3)之檢量線設定。



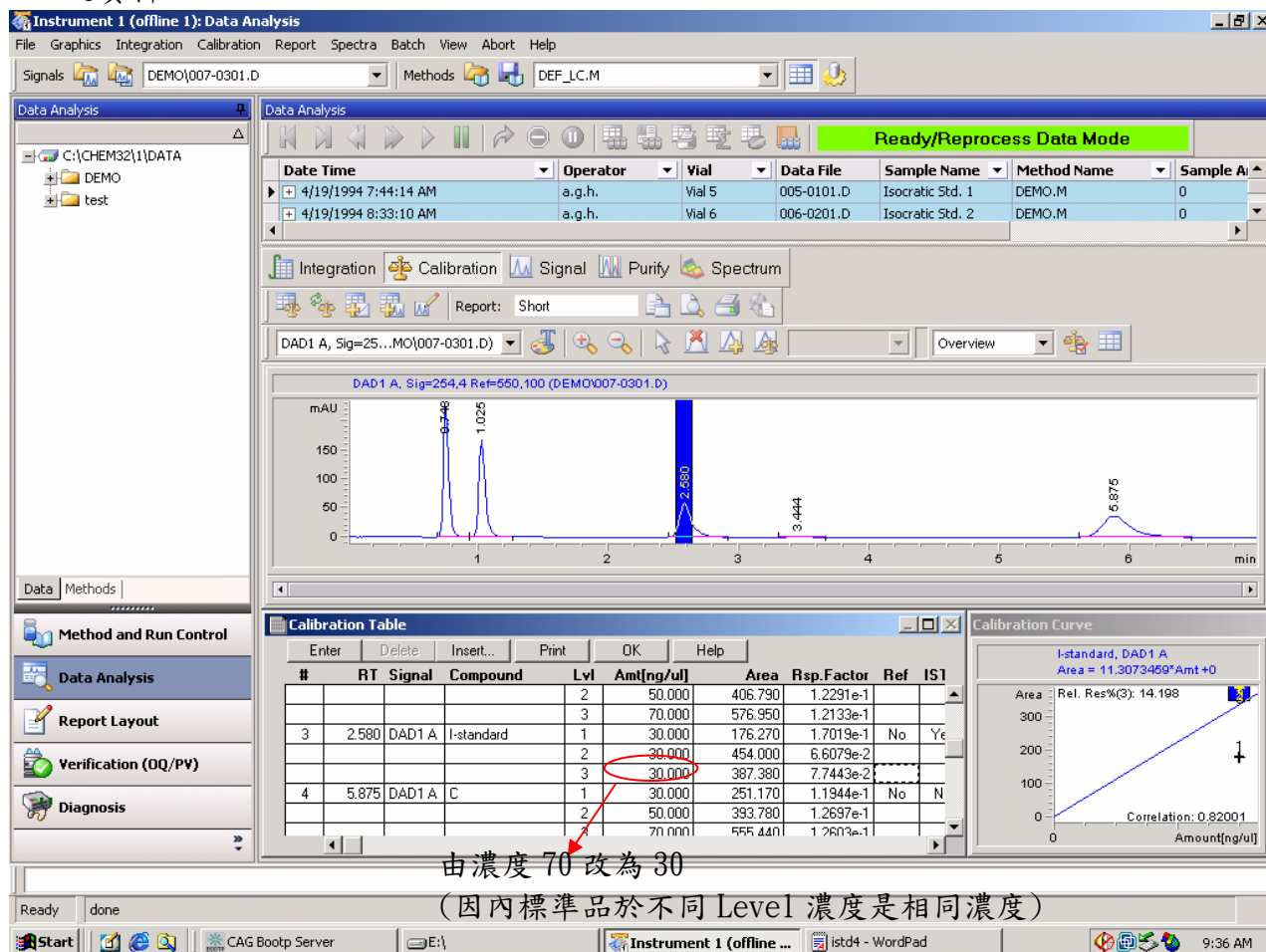
6. 第二點(Level 2)檢量線之設定, 首先便載入第二點檢量線之資料, 先於 File 中選擇 Load Signal, 並載入第二點(Level 2)檢量線之資料(c:\Chem32\1\data\demo\006-0201.d), 然後於 Calibration 中選擇 Add Level, 於 Add level 中的 Default Amount 設定濃度為 50, 但因內標準品(I-standard)之濃度於不同 Level 中濃度是相同的, 故需將 I-standard 之 Level 2 濃度更改為 30, 如此便完成第二點(Level 2)檢量線之設定。

The following table represents the data in the 'Calibration Table' window from the third screenshot:

#	RT	Signal	Compound	Lvl	Amt[ng/ul]	Area	Rsp.Factor	Ref	ISI
2	1.024	DAD1 A	B	1	30.000	260.760	1.1505e-1	No	N
2	1.024	DAD1 A	B	2	58.000	406.790	1.2291e-1	No	N
3	2.571	DAD1 A	I-standard	1	30.000	176.270	1.7019e-1	No	Ye
3	2.571	DAD1 A	I-standard	2	30.000	454.000	6.6079e-2	No	N
4	5.855	DAD1 A	C	1	30.000	251.170	1.1944e-1	No	N
4	5.855	DAD1 A	C	2	50.000	393.780	1.2697e-1	No	N

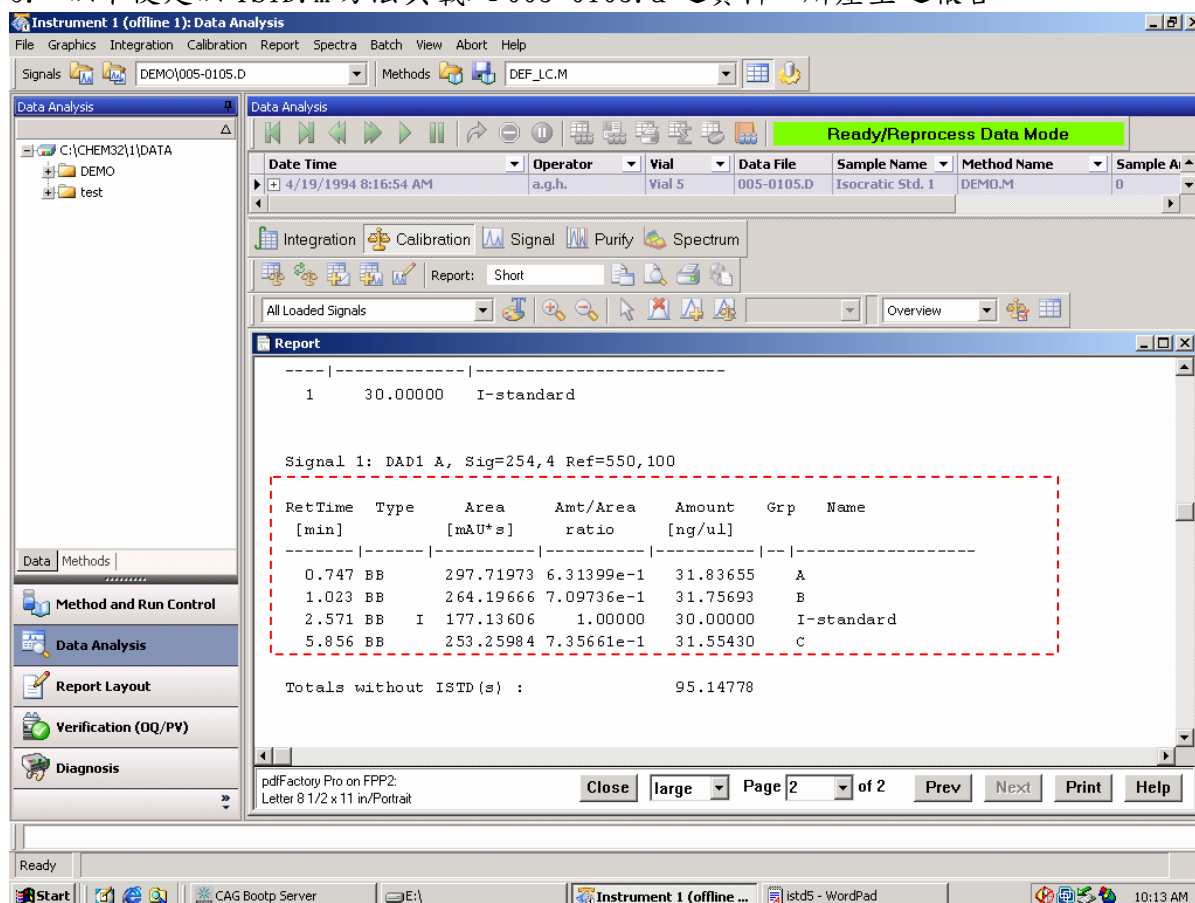
The 'Calibration Curve' window shows a plot of Area vs. Amount[ng/ul] for the I-standard, DAD1 A, with a correlation of 0.79493.

7. 而第三點(Level 3)檢量線設定與步驟 6 相似，惟第三點檢量線之資料檔為 007-0301.d (c:\Chem32\1\data\demo\007-0301.d)，而 Default Amount 設定濃度為 70，但同樣的因內標準品(I-standard)之濃度於不同 Level 中濃度是要相同的，故需將 I-standard 之 Level 3 濃度更改為 30，如此便完成第三點(Level 3)檢量線之設定，如下圖可見第三點之資料。



8. 完成上述步驟設定，便已完成簡易之內標準品之檢量線，爾後便可以此檢量線算出未知濃度之樣品，但前提為在相同方法條件(有製作檢量線之方法)下；因本例無未知樣品之資料，假設 005-0105.d(濃度為 30)為未知樣品資料，載入 ISTD.m 方法和 005-0105.d 資料，可驗證檢量線是否正確，但為避免外標準檢量線所犯的錯誤(外標準檢量線之步驟 13，無濃度結果，只見其面積、面積百分比及物質名稱，並無濃度顯示)，先於 Report 中選擇 Specify Report，於 Quantitative Results(定量結果)中設定其計算方式，更改為 ISTD(內標準)計算即可，可參閱外標準檢量線之步驟 14。

9. 以下便是以 ISTD.m 方法與載入 005-0105.d 之資料，所產生之報告。



Instrument 1 (offline 1): Data Analysis

File Graphics Integration Calibration Report Spectra Batch View Abort Help

Signals DEMO\005-0105.D Methods DEF_LC.M

Data Analysis

Ready/Reprocess Data Mode

Date Time 4/19/1994 8:16:54 AM Operator a.g.h. Vial Vial 5 Data File 005-0105.D Sample Name Isocratic Std. 1 Method Name DEMO.M Sample A 0

Integration Calibration Signal Purify Spectrum

Report: Short

All Loaded Signals Overview

Report

1 30.00000 I-standard

Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=550,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area ratio	Amount [ng/ul]	Grp	Name
0.747	BB	297.71973	6.31399e-1	31.83655	A	
1.023	BB	264.19666	7.09736e-1	31.75693	B	
2.571	BB I	177.13606	1.00000	30.00000	I-standard	
5.856	BB	253.25984	7.35661e-1	31.55430	C	

Totals without ISTD(s) : 95.14778

pdfFactory Pro on FPP2: Letter 8 1/2 x 11 in/Portrait

Close large Page 2 of 2 Prev Next Print Help

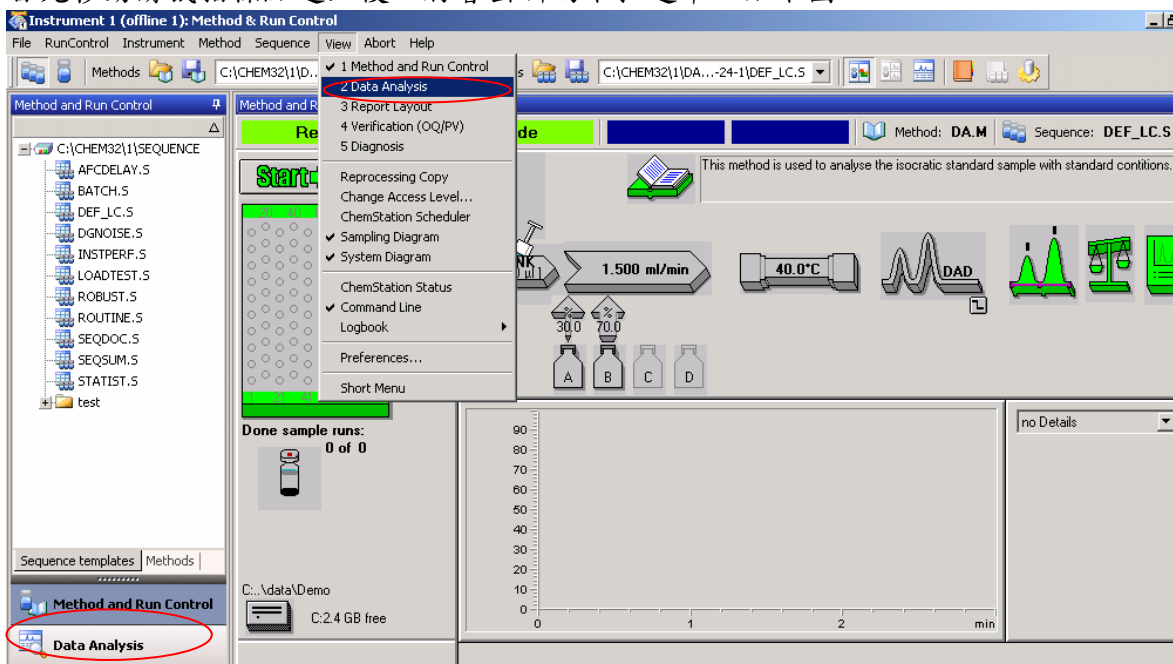
10. 上述便是簡易之檢量線設定，其中只有較常用之外標準品與內標準品檢量線製作說明，但檢量線之製作並非只有此兩種，其餘未說明部分請自己參考使用，若有未詳述或不明白地方，可電詢相關工程師。

陸、數據分析

1. Peak Area 積分方式的設定

當實驗完成後，使用者可能會發現預設的 Peak Area 積分方式不是我們所需要的，如積分取點位置不對、Peak Area 太小，軟體自動忽略不去積分等問題，因此以下將介紹如何進行積分設定，以符合我們的需求。

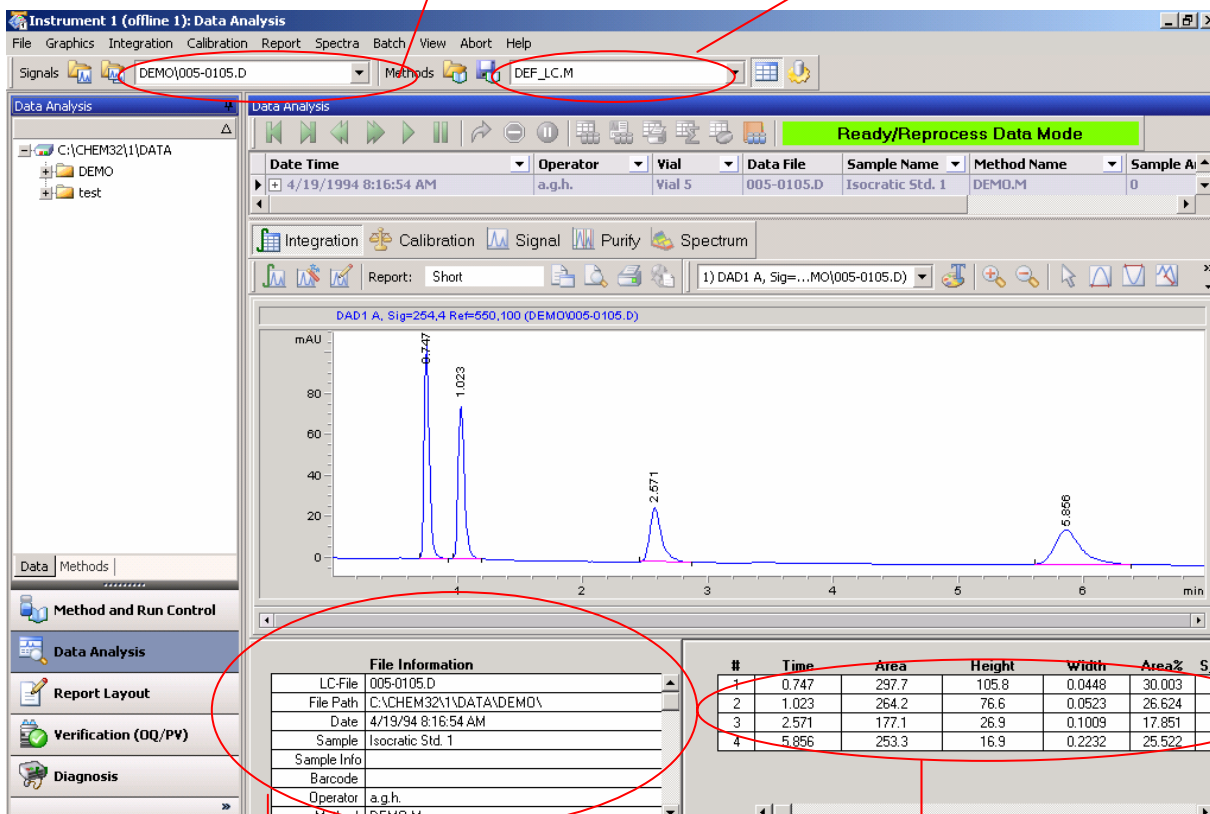
首先移動滑鼠指標點選鈕後，將會出新的下拉選單，如下圖：



選擇 **Data Analysis** 選項後，將會切換至 Data Analysis 主畫面，見下圖：

目前開啟檔案

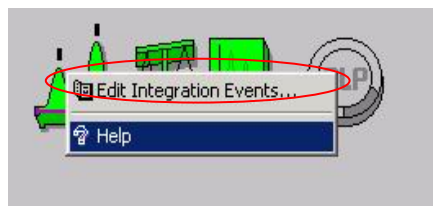
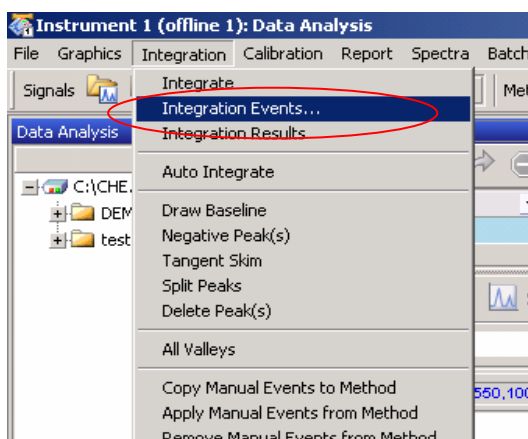
目前使用的方法



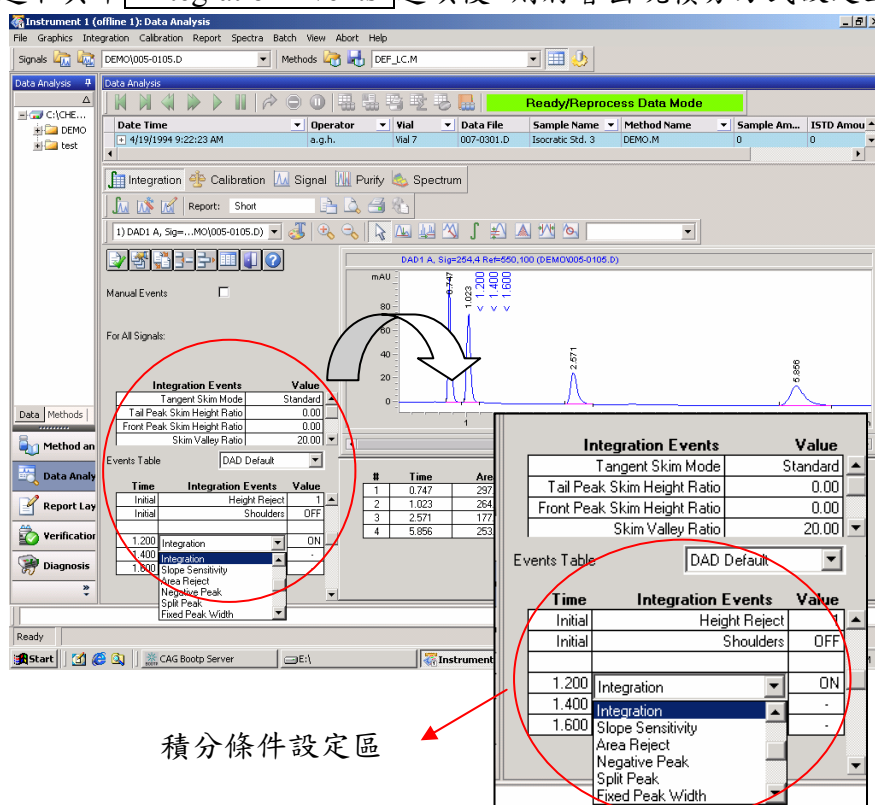
目前此檔案之相關訊息

已被積分出的 Peak 資訊

選取欲處理的資料檔案後，畫面會切回 Data Analysis 主畫面，此時移動滑鼠指標點選畫面中 Integration 項目，則會出現另一張下拉選單，如下圖：



移動滑鼠指標選取其中 **Integration Events** 選項後，則將會出現積分方式設定主畫面，如下圖：



積分條件設定區

Time：此欄可輸入積分條件起始或結束時間。

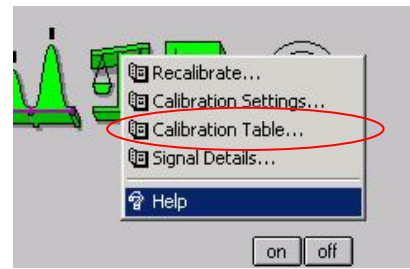
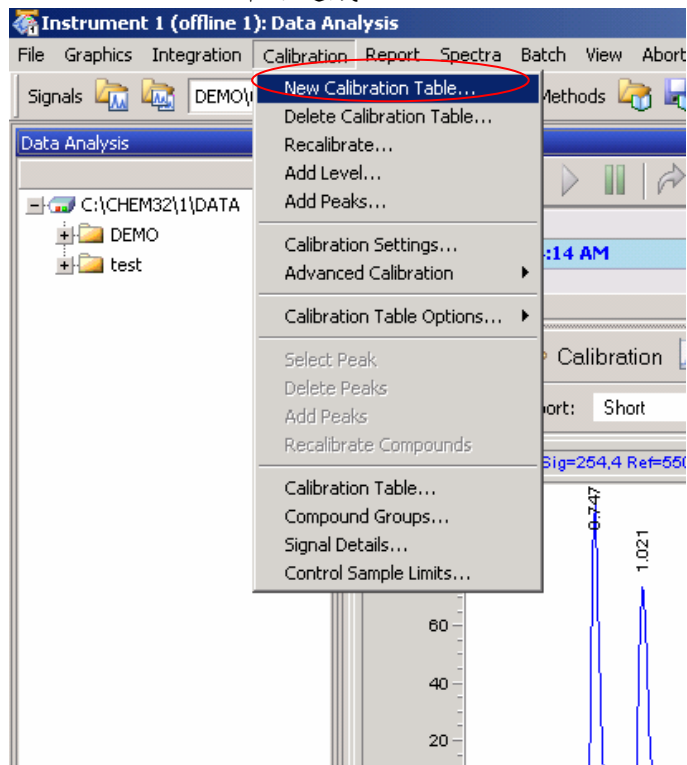
Integration Events：將滑鼠指標移至該欄上，點選後將會出現積分方式選擇欄，如下圖，使用者可依 Peak 實際形狀，選用最適當積分方式。

Value：決定開啟或關閉選用之積分方式。同樣以將滑鼠指標移至該欄位上，點選後將會出現開關選單，如右圖圖示，請依實際情況自行選用。

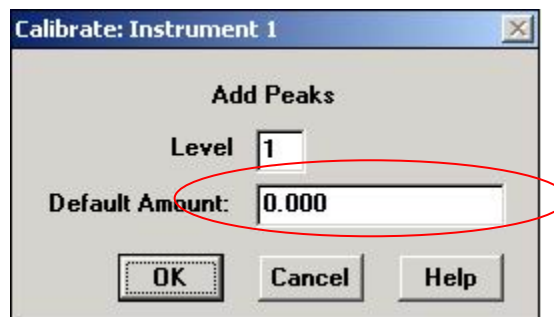
Time	Integration Events	Value
Initial	Height Reject	1
Initial	Shoulders	OFF
1.200	Integration	OFF
1.400	Baseline Now	OFF
1.600	Baseline Now	ON

2. Peak 名稱標示設定

當我們需要在每張報告中自動加上 peak 名稱，只要依循下列三種方式中任一種設定 Calibration table 即可達成。

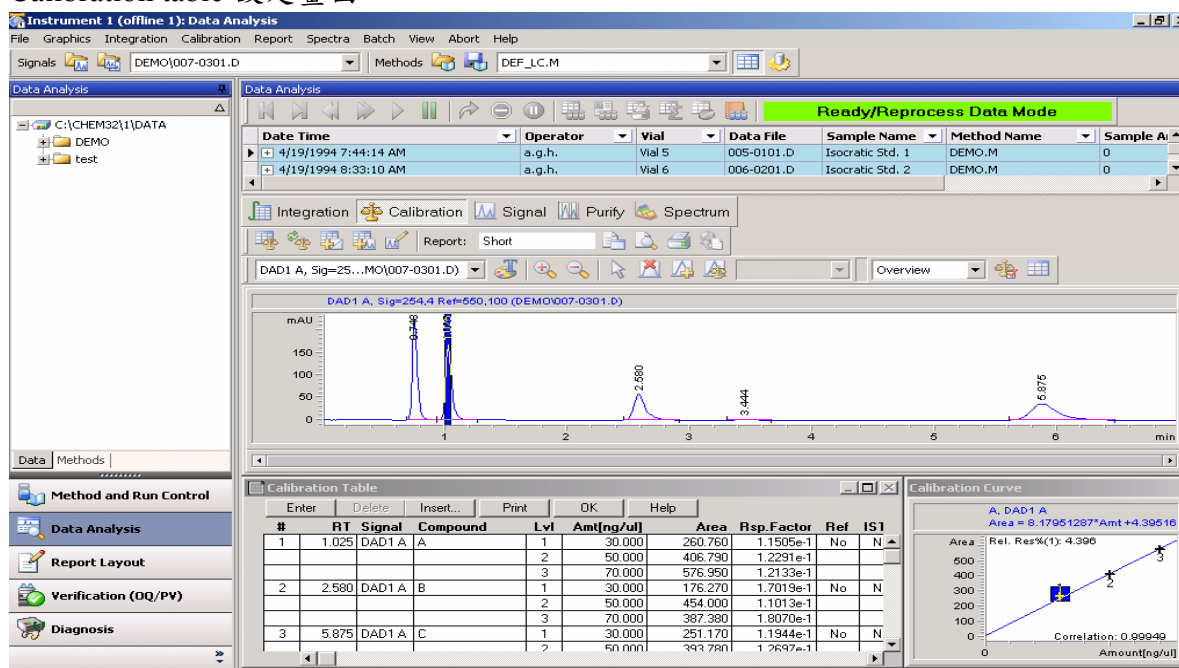


尚未建立過就使用 **New Calibration Table...**，若已有建立過了，預增加新的 Peak，則選擇 **Add Peaks...**，會出現下圖畫面

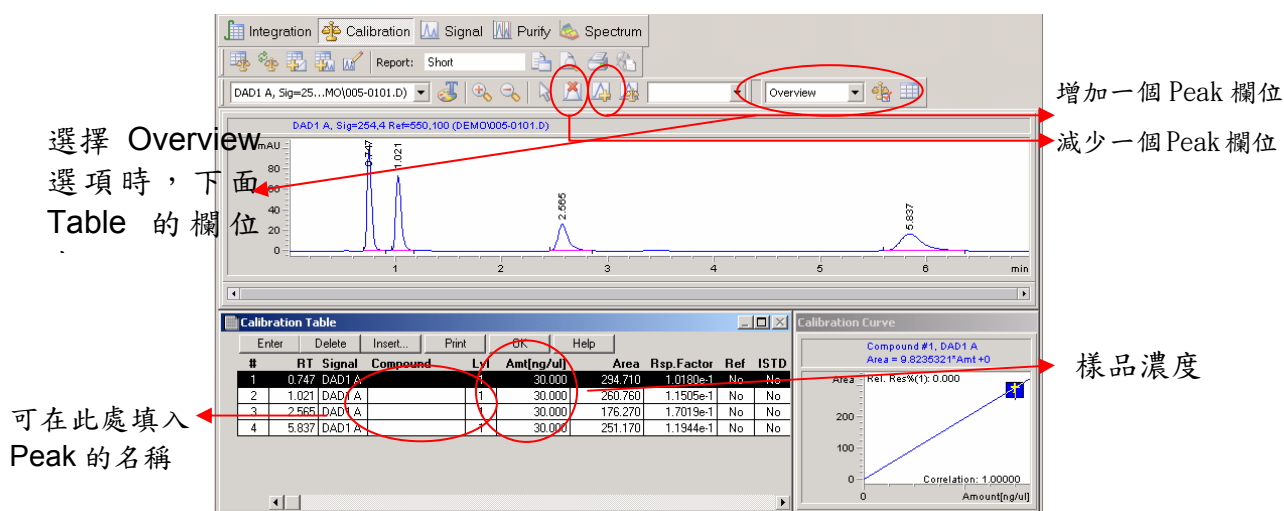


此時，可以輸入樣品濃度於 Default Amount 的欄位

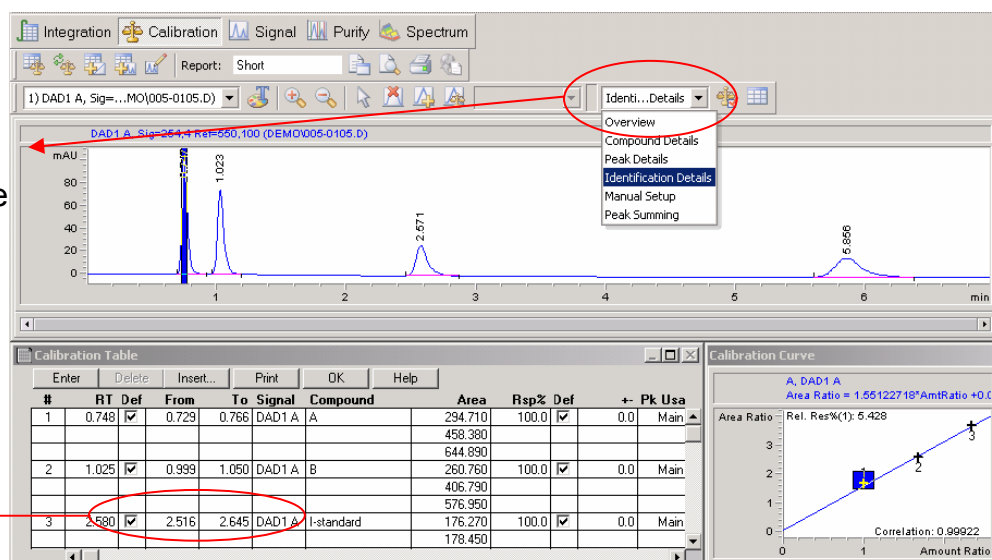
Calibration table 設定畫面：



在此畫面中概略說明

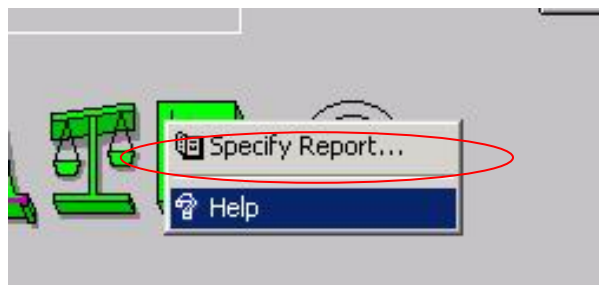
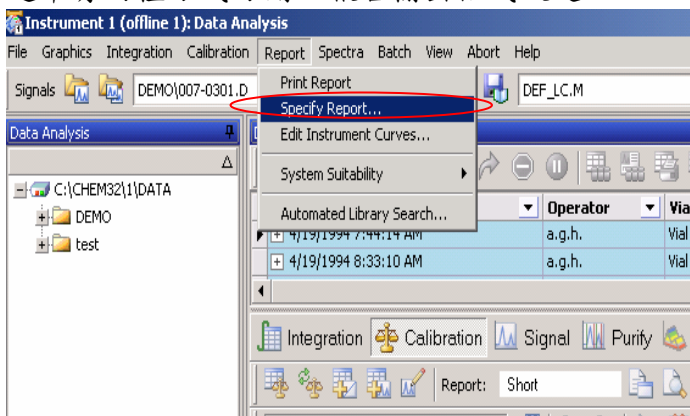


選擇 Identification Details 選項時，下面 Table 的欄位畫面



柒、報告輸出格式設定

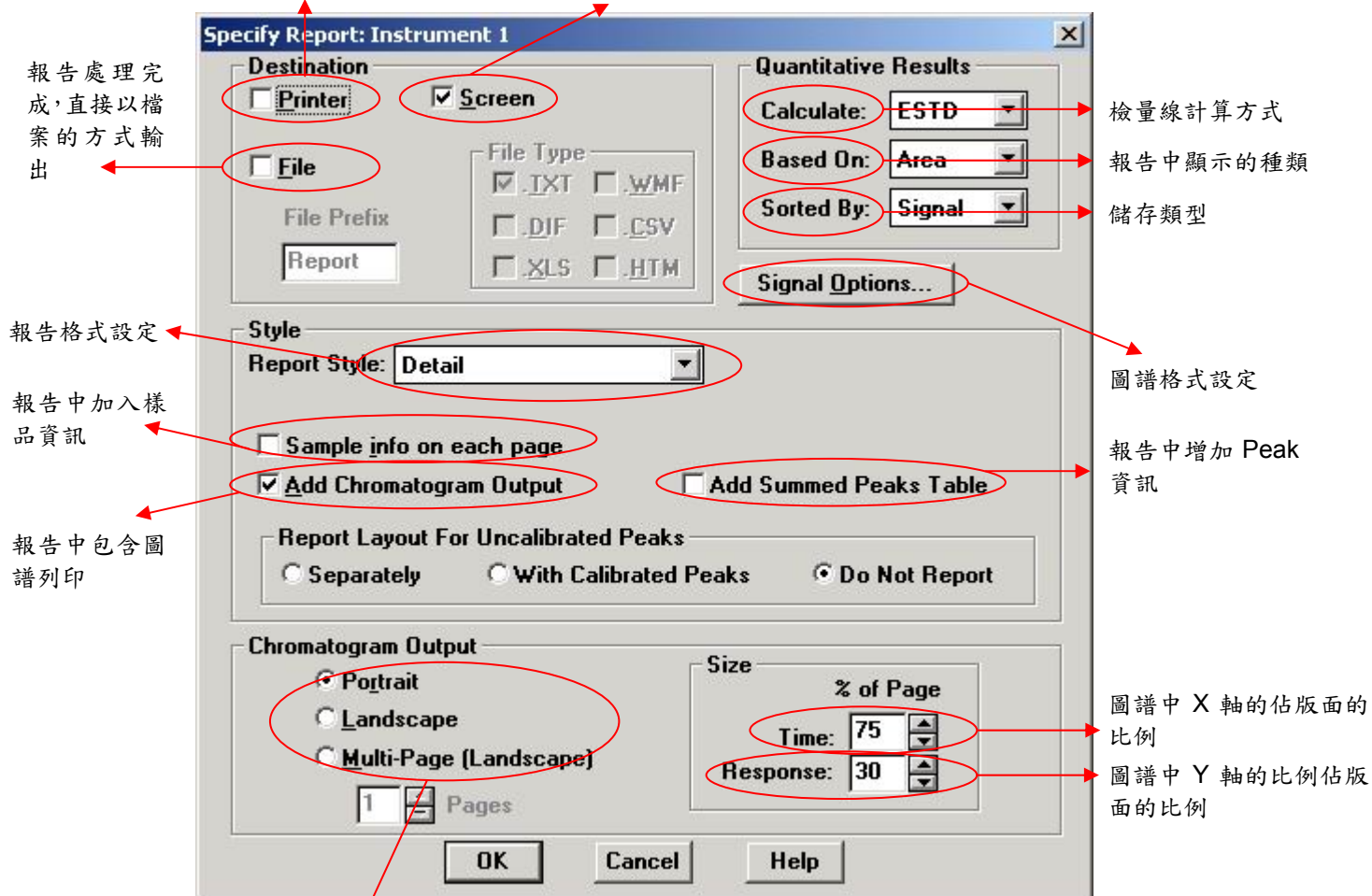
通常有兩種方式可開啟報告輸出格式設定



以滑鼠指標點選，選擇 **Specify Report** 即會開啟報告輸出格式設定表。

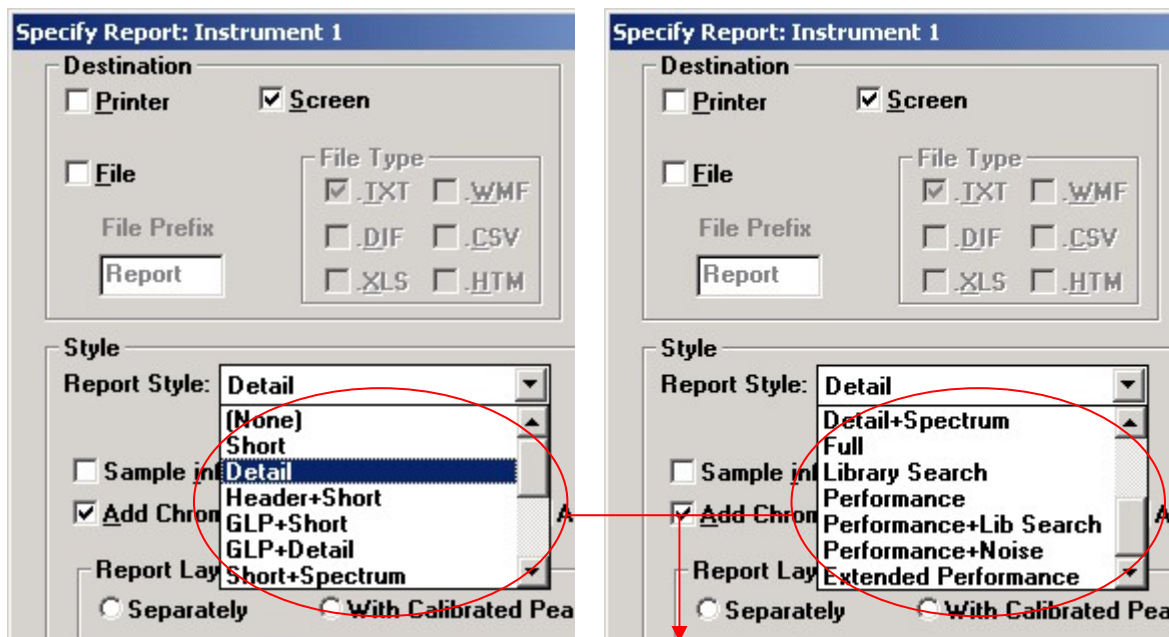
報告處理完成，直接輸出至印表機輸出

報告處理完成，直接在螢幕上顯示報告



報告列印模式：
Portrait：直式列印
Landscape：橫式列印
Multi-page：多頁橫向列印

Report Style：點選後，將會出現一張下拉選單，如下圖：

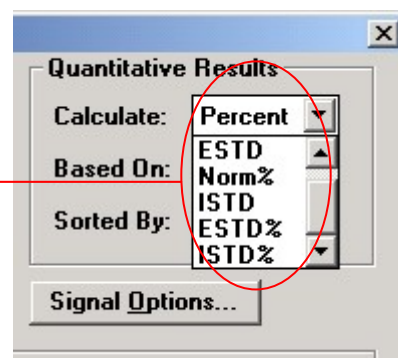


Short	簡短型報告
Detail	詳細型報告
Header+Short	有表頭簡短型報告
GLP+Short	GLP 簡短型報告
GLP+Detail	GLP 詳細型報告
Short+Spectrum	簡短型有光譜圖之報告
Detail+Spectrum	詳細型有光譜圖之報告
Full	完整型報告
Library Search	程式庫搜尋
Performance	效能型報告(結果多偏重於與 peak 分離效能相關的參數)
Performance+Lib Search	效能型報告+光譜資料庫搜尋報告
Performance+Noise	效能型報告+ 雜訊報告
Extended Performance	延伸效能型報告

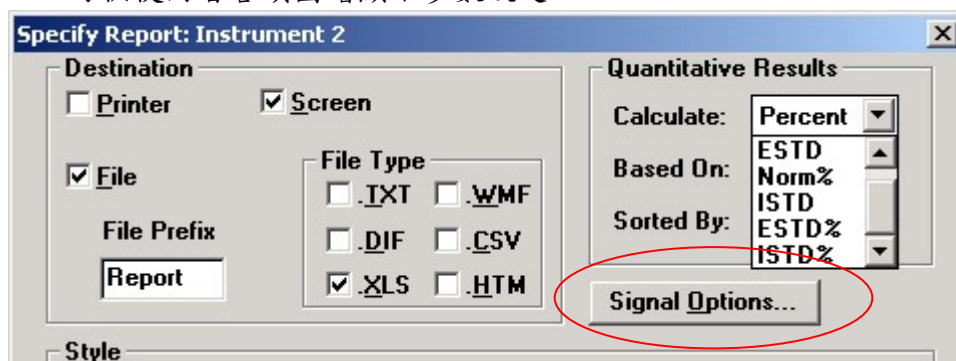
定量結果

結果經計算後共有 6 種模式可供選擇：

Percent	以百分比表示
ESTD	以外標準品檢量線定量所得結果表示
Norm%	經歸一化計算後以百分比表示
ISTD	以內標準品檢量線定量所得結果表示
ESTD%	經外標準品檢量線所得定量結果除以樣品量, 並將其轉換成百分比表示之(前提:於 <i>Sample amount</i> 欄位中有填入 0 以外的數字時,才使用此功能)
ISTD%	經內標準品檢量線所得定量結果除以樣品量, 並將其轉換成百分比表示之(前提:於 <i>Sample amount</i> 欄位中有填入 0 以外的數字時,才使用此功能)



Signal Options：可供使用者各項圖譜顯示參數設定

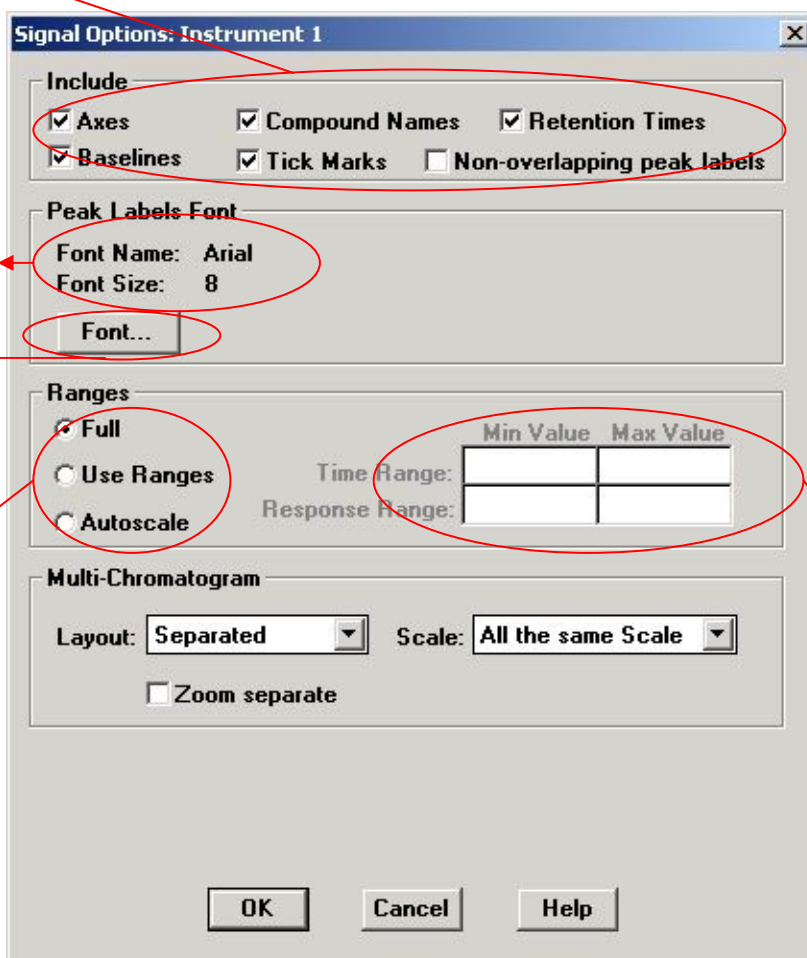


選擇上面的選項，會出現下面畫面

勾選的項目，為圖譜上欲顯示的資訊

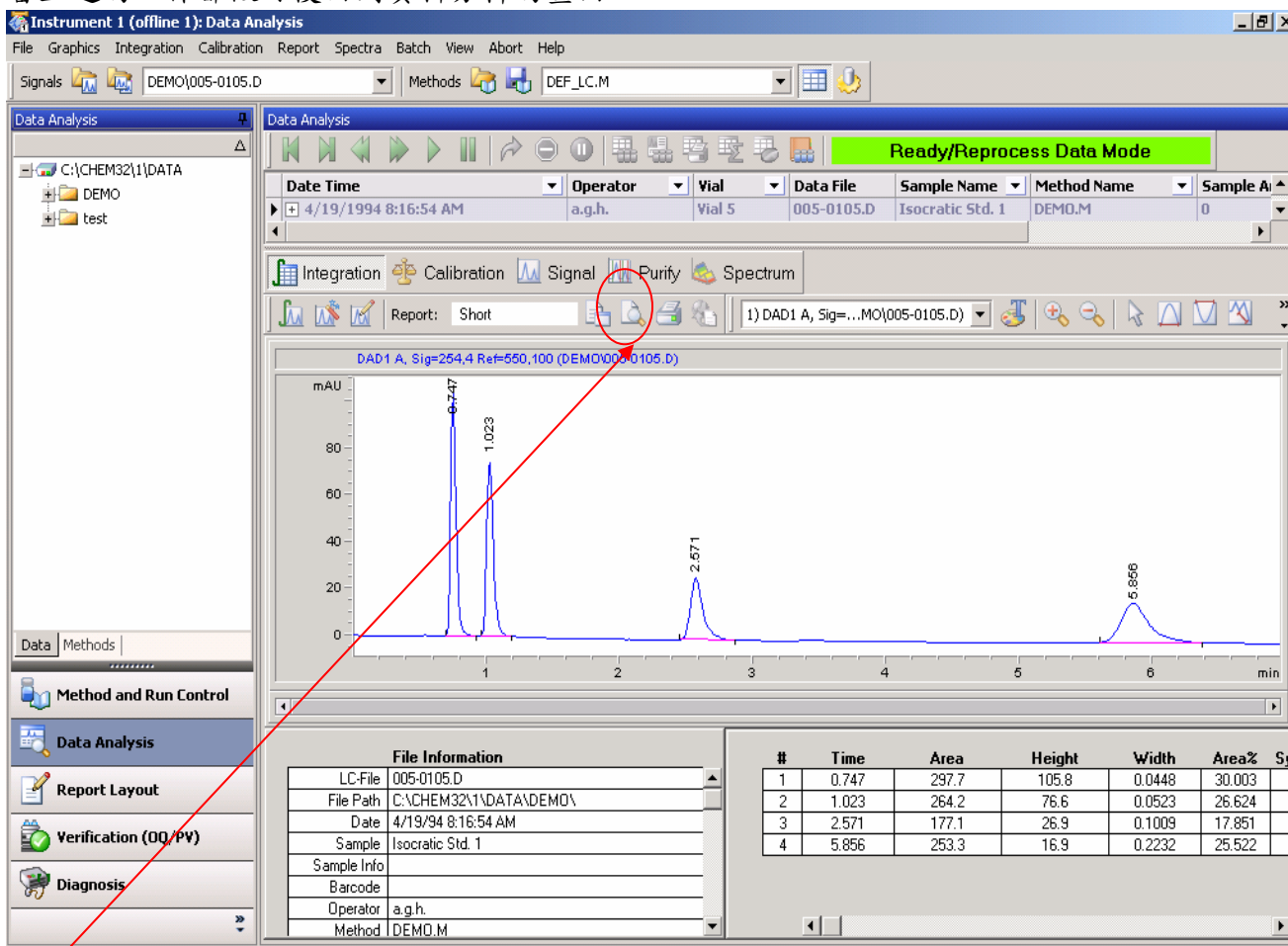
目前圖譜上所使用的字形及大小，或是自行修改字形

圖譜顯示之比例，可選擇全圖、自定範圍、系統自動決定

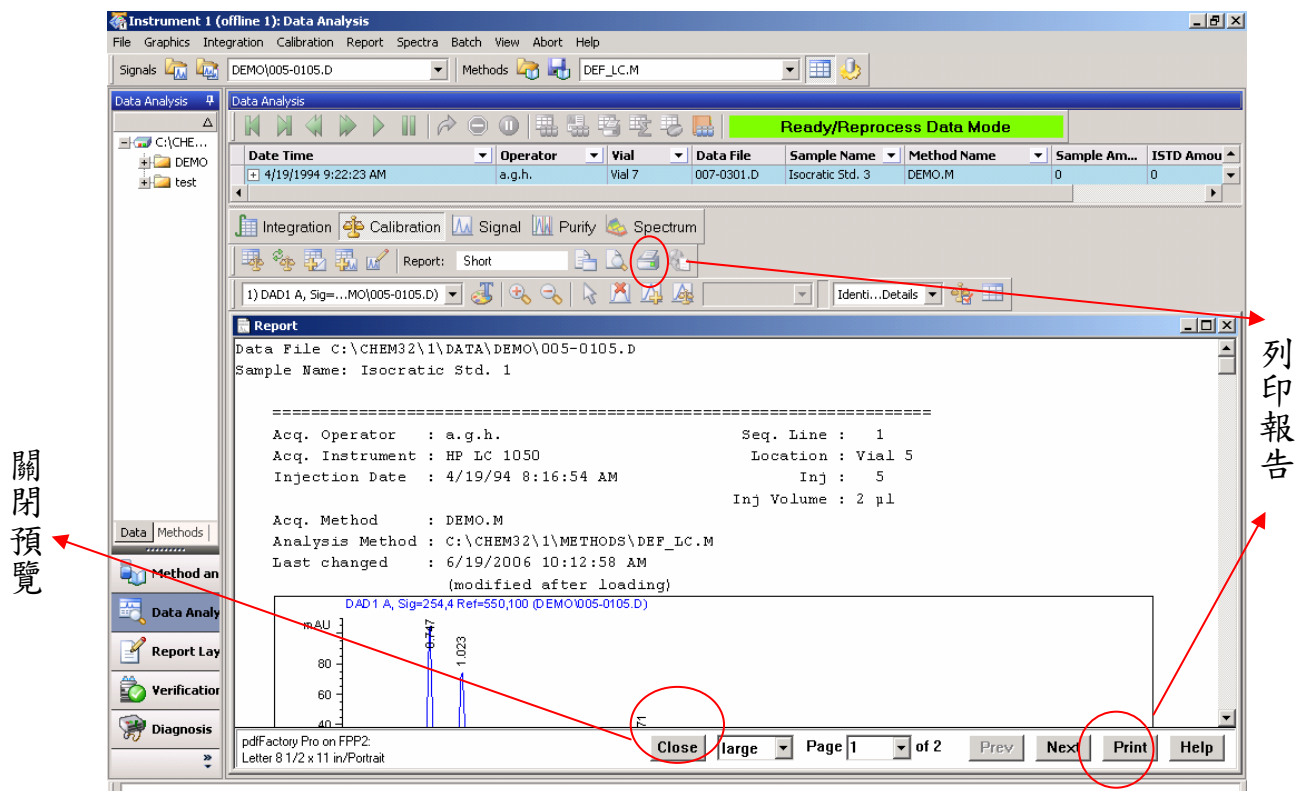


若為使用者自定範圍，可在此輸入X、Y軸的範圍

當上述的工作都做好後回到資料分析的畫面



按下預覽報告的圖示，會出現下圖



確定無誤後，便可以按下列印功能鍵，列印出報告，這樣就算是一個樣品的實驗完成。

捌、系統清理

一、系統清洗

1. 若使用的移動相含鹽類(如 buffer)，請先用水清洗。
2. 打開排水閥約 3 分鐘，使原先的移動相自管路排出。
3. 緊關排水閥，將流速設至適當值，啟動 pump 清洗至所需時間。
4. 將清洗溶液換為保存溶液，以 1ml/min 之流速清洗約 60 分鐘。
5. 關閉 pump 及電源。
6. 若要長期清洗，可設定 Clean Method。