

May 27, 2025

POP – HPLC AUTOMÁTICO

DOI

<https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bp2l68k8zgqe/v1>

Nivea Rodrigues¹, Anddrea Monte¹, Ricardo Borges¹, Rômulo ereira¹

¹UFRJ



Ricardo M. Borges

UFRJ

Create & collaborate more with a free account

Edit and publish protocols, collaborate in communities, share insights through comments, and track progress with run records.

Create free account

OPEN  ACCESS



DOI: <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bp2l68k8zgqe/v1>

Protocol Citation: Nivea Rodrigues, Anddrea Monte, Ricardo Borges, Rômulo ereira 2025. POP – HPLC AUTOMÁTICO. protocols.io <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bp2l68k8zgqe/v1>

License: This is an open access protocol distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](#), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited

Protocol status: In development

We are still developing and optimizing this protocol

Created: March 19, 2025



Last Modified: May 27, 2025

Protocol Integer ID: 124648

Keywords: IPPN, UFRJ, HPLC Shimadzu, ANALÍTICO, automatic hplc system within the analytical laboratory, safe operation of the automatic hplc system, hplc automático na central analítica, automatic hplc system, hplc automático, analytical laboratory, standard operating procedure, hplc, procedure, labsolutions software, comprehensive guide for laboratory personnel, preparing analytical method, este procedimento operacional padrão, key parameters for data acquisition, software labsolution, configuração do detector, laboratory, descreve detalhadamente os passos para, analytical accuracy, analytical method, data acquisition, configuração, configuration of the column, column oven control

Abstract



LABORATÓRIO DE CROMATOGRAFIA
PROF. AFFONSO DO PRADO SEABRA
Elaborado por: Nívea e Cristiane (02/2017)

Abstract

This Standard Operating Procedure (SOP) outlines the detailed steps for operating the automatic HPLC system within the analytical laboratory. The document covers the installation and configuration of the column and associated equipment, including proper connection identification and positioning. It provides guidelines for preparing analytical methods using the LabSolutions software, setting key parameters for data acquisition, pump operation, detector configuration, autosampler settings, and column oven control. Additionally, the procedure describes the steps for purging, conditioning the column, and executing both single and batch injections to ensure reproducibility and data quality. This SOP serves as a comprehensive guide for laboratory personnel to maintain standardized practices, ensure analytical accuracy, and promote safe operation of the automatic HPLC system.

Resumo

Este Procedimento Operacional Padrão (POP) descreve detalhadamente os passos para a operação do sistema HPLC automático na central analítica. O documento abrange desde a instalação e configuração da coluna e dos equipamentos associados, com a correta identificação e posicionamento das conexões, até a preparação dos



métodos analíticos por meio do software LabSolutions. São definidos os parâmetros essenciais para a aquisição de dados, operação da bomba, configuração do detector, ajustes do autosampler e controle do forno da coluna. Além disso, o procedimento detalha os métodos para purga, condicionamento da coluna e execução de injeções únicas e em lote, garantindo reprodutibilidade e qualidade dos dados. Este POP serve como um guia abrangente para a equipe do laboratório, assegurando práticas padronizadas, precisão analítica e segurança operacional.

Instalação da Coluna no Forno

1 Conexões e Identificação

■ Conexões:

1. **Peek Bege (etiqueta amarela):** Refere-se ao HPLC analítico automático.
2. **Peek Bege com azul (etiqueta vermelha):** Refere-se ao HPLC analítico antigo.

■ Posicionamento:

1. Fixar a coluna na base do forno.
2. Verificar se o "FLOW" está posicionado para cima, pois:

- O injetor (conexão metálica) está na parte inferior.
- O detector (peek plástico) está na parte superior.

2 Verificação de Vazamento na Coluna

1. Clique no botão para destravar o teclado do CTO-20A.
2. Pressione "func" até que apareça "MONITOR" na tela do forno.
3. Clique em "LS LEVEL" e anote o valor da corrente de ar (ex.: 6361).
4. Durante a análise, verifique se o valor permanece constante. Qualquer variação indica possível vazamento.

3

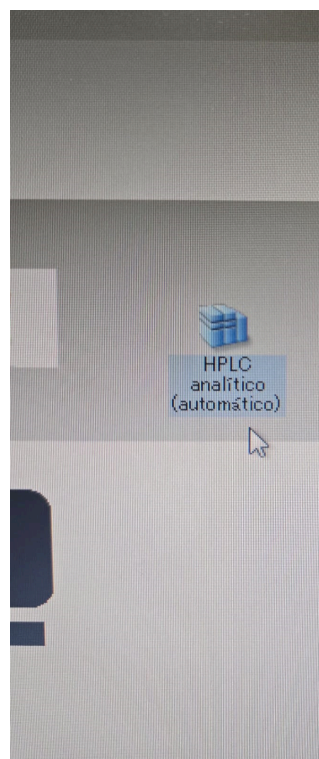
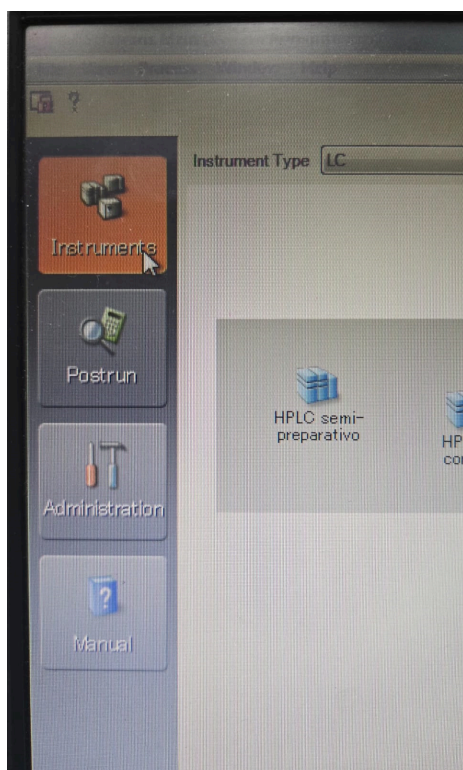
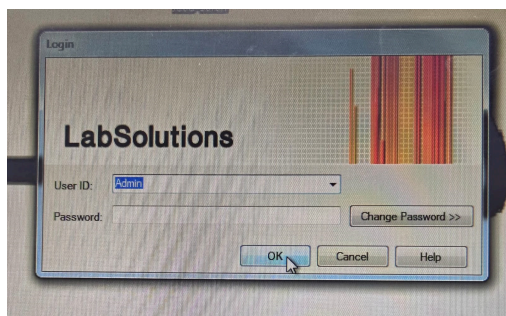


destravar o teclado do CTO-20A

Ligando o Equipamento

4 Ordem de Ligamento

1. HPLC: Ligue-o, deixando a CBM-20A por último.
2. Computador e Monitor: Ligue ambos.
3. Login do Computador: Usuário: Admin; Senha: sem senha.
4. Abra o programa LAB-Solutions e clique em OK na janela que se abrirá.
5. Selecione Instruments.
6. Aguarde o carregamento do programa e o apito da CBM (SCL).
7. Clicar em HPLC analítico (automático)



Preparação do Método

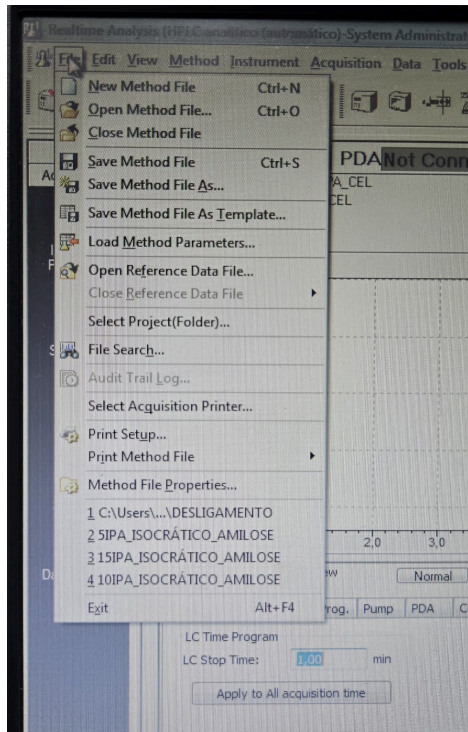
5 Configuração Inicial

- Tela Principal (Real time Analysis):

Se já existir um método salvo, vá em File > Open Method File.

Se for desenvolver um novo método, clique em New Method File.

- Observação: Selecione PDA para monitorar a linha base.

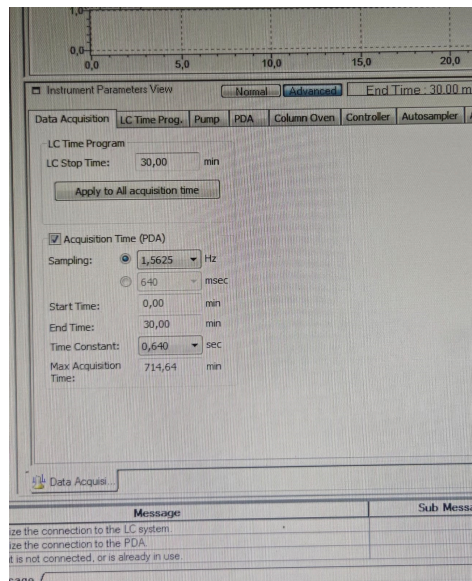


6 Janela DATA ACQUISITION

1. LC Stop time: Tempo total de análise (modifica-se conforme os dados do LC Time Prog).
2. Acquisition Time (PDA): Deve estar sempre selecionado.
3. Sampling: 1,5625 Hz (afeta a integração).

- Se usar 640 msec, esse valor deve coincidir com o Time constant.

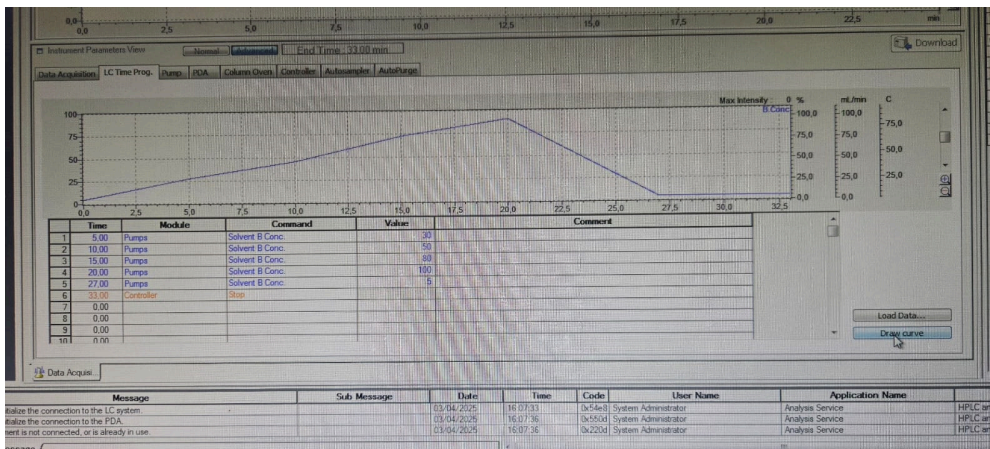
4. Start time: 0
5. End time: Tempo de análise
6. Time constant: Idealmente 0,640 sec



7 Janela LC TIME PROGRAM

1. Tabela de Tempo: Inserir os tempos.
2. Módulos: Selecionar conforme a função:

- PUMP: Uso da bomba.
- Controller: Para comandos do controlador (ex.: parar).
- Autosampler: Funções do injetor.
- Column Oven: Funções do forno.

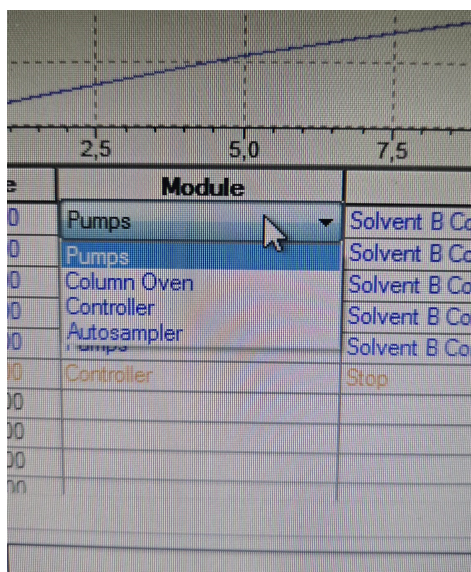


The screenshot shows the 'Instrument Parameters View' window with the 'Pump' tab selected. The 'Mode' is set to 'Low pressure gradient'. The 'Configured Pumps' section shows Pump A: LC-20AT, Pump B: , Pump C: , and Pump D: . The 'Solenoid Valve' section shows Pump A: LPGE Unit, Pump B: A, Pump C: , and Pump D: . The 'Pressure Limits (Pump A)' section shows Maximum: 400 kgf/cm2 and Minimum: 0 kgf/cm2. The 'Total Pump A Flow' is set to 1,000 mL/min. The 'Solvent B Conc.' is set to 5,0 %, 'Solvent C Conc.' is set to 0,0 %, and 'Solvent D Conc.' is set to 0,0 %.

3. Comand e Value: Definir comando e valor.
4. Draw Curve: Exibe a rampa do gradiente de solventes.

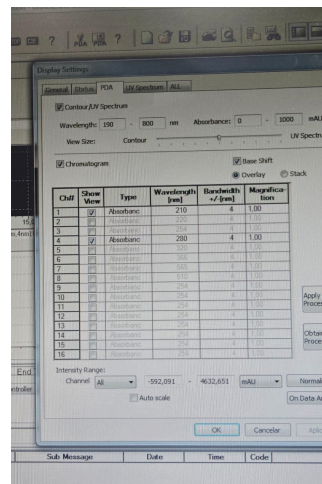
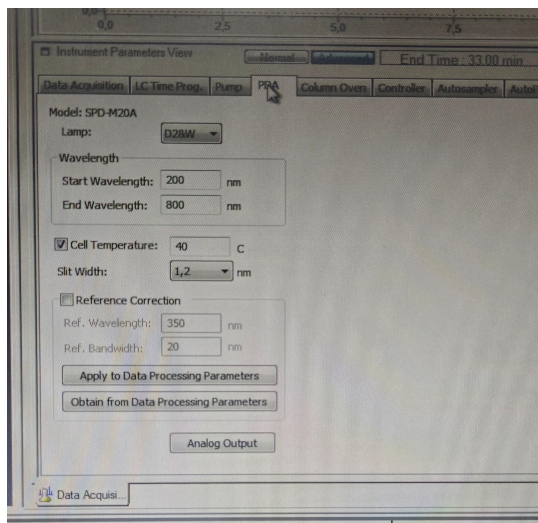
8 Configurações Específicas *(colocar foto)*

1. Janela Pump
2. Mode isocratic flow: Sempre deixar em LOW PRESSURE GRADIENTE.
3. Total pump A flow: Fluxo de análise.
4. Solvent B conc: Concentração do solvente B inicial.
5. Pressure Limits:
 - Máximo: 400 kgf/cm²
 - Mínimo: 2 kgf/cm²



9 Janela PDA

1. Lamp: Selecione D2&W.
2. Start Wavelength: 190 nm.
3. End Wavelength: Geralmente 800 nm.
4. Cell Temperature: Selecionado e ajustado para 30°C.
5. Slit Width (fenda): 1,2 nm (ajusta a seletividade).

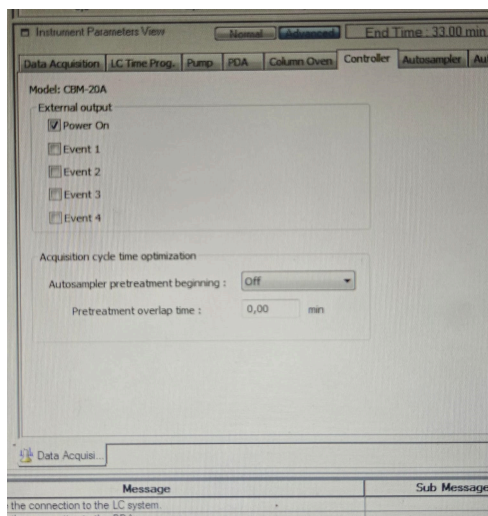


10 Janela Column Oven (colocar foto)

1. Column Oven: Selecionar para o aquecimento do forno conforme o método utilizado
2. Oven Temperature: Ajustar a temperatura de acordo com o método de análise utilizado.
3. Temperatura Máxima: Ajustar a temperatura máxima de acordo com o método de análise utilizado.

11 Janela Controller

1. Mantenha Power On selecionado.



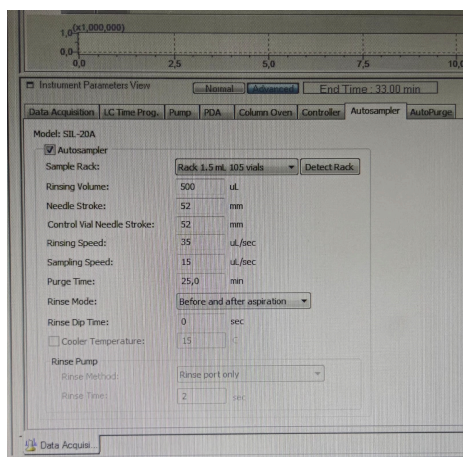
12 Janela Autosampler

1. Selecionar Autosampler.
2. Rack Utilizado: Central analítica – Rack 1,5 mL com 105 vials.
3. Clique em Detect rack para confirmar o posicionamento:

- Se o visor mostrar L: none, o rack está correto.
- Se mostrar R: none, a bandeja está fora do lugar.

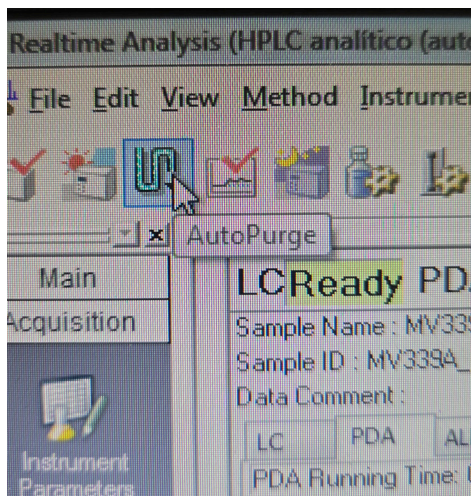
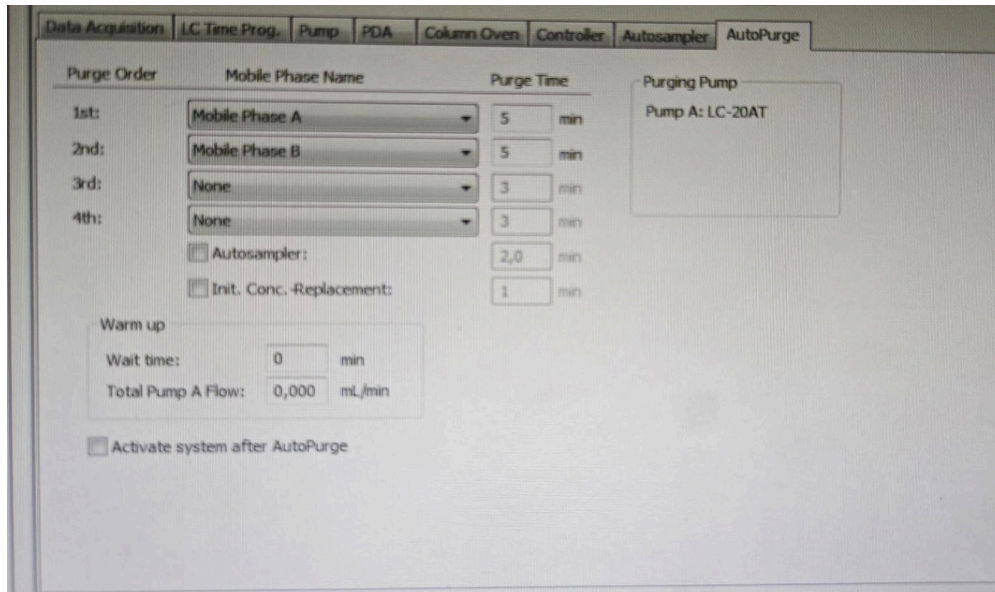
4. Configurações:

- Rising volume: 500 μ L (para lavagem da seringa).
- Needle Stroke e Control vial needle Stroke: 52 mm (altura que a seringa alcança o vial).
- Rinsing e Sampling Speed: 35 e 15, respectivamente.
- Purge time: 25 min.
- Rinse Mode: Manter para lavar a seringa antes e depois.



13 Janela Autopurge (colocar foto)

1. Selecione os canais de solvente para autopurge.
2. Purge time: Geralmente 5 min.
3. Clique no ícone do Autosampler para que, após a purga dos canais, seja realizada a purga do injetor.
4. (((((((((((Mantenha Activate system after Autopurge selecionado para iniciar a metodologia automaticamente.)))))))))) (eu faço manualmente))))))))
5. Clicar em autopurge.



Salvando o Método

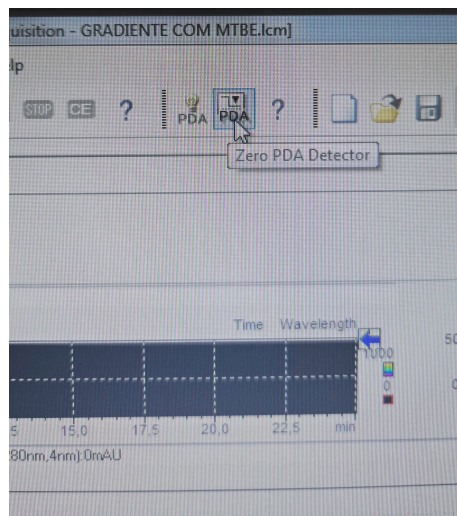
1. Após desenvolver o método, vá em **FILE > Save Method File As.**
2. Salve na pasta **MÉTODOS HPLC AUTOMÁICO.**
3. Em **Method File Properties**, utilize o campo **COMENT** para registrar detalhes como coluna, fluxo, gradiente, etc.

(colocar foto)

15

Monitoramento Durante a Análise

- 16
1. Clique em View > Instrument Monitor para visualizar os parâmetros. **(colocar foto)**
 2. Para verificar a linha base e o condicionamento da coluna:
 - Clique em PLOT.
 - Se desejar dar autozero, clique em ZERO PDA DETECTOR.
 - Clique com o botão direito no cromatógrafo para acessar NORMALIZE e melhorar a visualização da linha base.
 - Em Display Settings, é possível ajustar os comprimentos de onda.



17

Purgar e Condicionar a Coluna

- 18
- Purgar**
1. Clique em Download na parte direita da tela principal e depois em Autopurge.

19

20 Condicionamento Inicial da Coluna

1. Inicie com uma vazão mais baixa:

- Clique em View > Instrument Monitor e pressione enter.
- Aumente gradativamente o fluxo.
- Ao atingir o fluxo de trabalho, clique em Download.
- Aguarde o mixer encher e a solução passar pela coluna.

(colocar foto)

21

Injeção de Amostras**22 Injeção de Amostra Única**

1. Após o tempo de equilíbrio, clique em Start Single Run.
2. Preencha os campos:

- Sample Name, Sample ID e Data File (devem ser iguais).
- Selecione a pasta para salvar o arquivo.
- Confirme que o método selecionado está na pasta correta e que o Data Comment esteja preenchido.
- Em Vial#, selecione a posição do vial no rack (ex.: 1, 2, 3...).
- Em Tray, selecione:
 - Rack de 105 vials: número 1.
 - Rack pequeno de 10 vials: número 0.
- Volume de injeção: Volume de amostra a ser injetado.

(colocar foto)

23

24 Injeção em Batch (Várias Amostras)

1. Clique em Main > Batch Editor.
2. Preencha os seguintes campos na tela do editor:

- **Editor:**
 - Vial#: Posição da amostra.
 - Tray Name: Rack 1 (150 vials) ou Rack 0 (10 vials).
 - Sample Name e Sample ID: Código da amostra.
 - Sample Type:
 - Standard > Initialize Calibration Curve: Para curvas de calibração.
 - Unknown: Para amostras desconhecidas.
- Method file: Pasta de origem do método.
- Data file: Pasta onde será salvo o arquivo (nome da amostra).
- Level#: Ponto na curva de calibração.
- Inj. Volume: Volume de injeção.
- Report output: Para impressão.
- Data coment: Metodologia de análise aplicada.

25 Ferramentas de Edição na Tabela:

1. Clique com o botão direito na tabela para:

Add row: Adicionar linhas.
Fill down: Copiar os dados selecionados para as demais células.
Fill series: Criar uma sequência nas células.

2. Após selecionar as células, clique no ícone correspondente para abrir a janela "Select Batch Execution Page" e marque:

All rows: Para todas as células ou
Select rows: Para linhas selecionadas.

26



Select Bath execution Page



Processamento dos Dados

- 27
1. No LabSolution, clique em Postrun.
 2. Abra a máscara NPPN.

(colocar foto)

1. Em cada parte do documento, clique com o botão direito e selecione PROPERTIES.
2. Na aba FILE, abra o arquivo a ser analisado.

(colocar foto)

- 28
- Feche a janela Instrument Monitor e aguarde o apito da CBM (SCL).**
1. Desligue o HPLC (a CBM/SCL deve ser desligada primeiro).
 2. Feche o programa LC-Solution.
 3. Encerre o Windows.
 4. Desligue o computador e o monitor.

29