

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

UHPLC Eksigent Ultra-LC 100 XL

Elaborado em 20/08/2015 por Thiago Rosa Sampaio

Revisado em 30/06/2016 por Alan Ribeiro Mól

OBJETIVO

Estabelecer uma metodologia básica para utilização do equipamento e seus acessórios.

1. ESPECIFICAÇÕES

O sistema UHPLC Eksigent Ultra-LC 100 XL é constituído por:

1. Sistemas de bombas de alta pressão, com dois módulos de duas linhas cada e pressão máxima de 1200 bar (18000 psi) e fluxo entre 200 a 800 $\mu\text{L}/\text{min}$.
2. Auto amostrador com bandeja (Vial Adapter) com espaço para 108 vials de 2 mL cada.
3. Forno para a coluna.

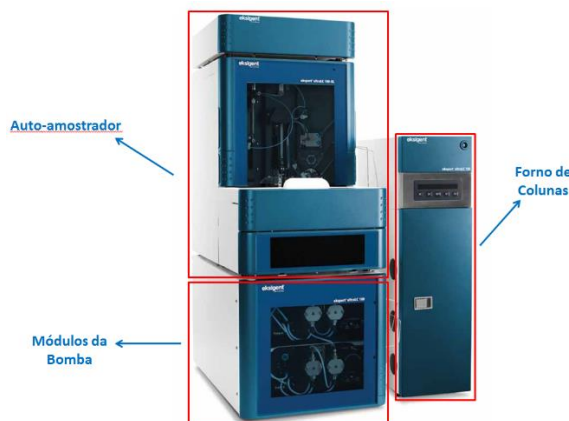


Figura 1. Dispositivos componentes do UHPLC

2. SOLVENTES

Deve-se ter extremo cuidado com os solventes que são utilizados no sistema. Recomenda-se que:

- Todos os solventes e soluções sejam filtrados em filtro com porosidade 0,22 μm .
- As amostras sejam filtradas em filtro com porosidade 0,22 μm .
- Todos os solventes sejam grau MS ou superior.
- Sempre sejam utilizadas soluções recém preparadas (no máximo uma semana).

Os seguintes solventes e soluções podem ser utilizadas no sistema:

2.1. Solventes

- Acetonitrila.
- Metanol.
- Isopropanol.
- Água Milli-Q.

2.2. Tampões

- Acetato de amônio, concentração menor que 1%.
- Formiato de amônio, concentração menor que 1%.

2.3. Ácidos e Bases

- Ácido fórmico, concentração menor que 1%.
- Ácido acético, concentração menor que 1%.
- Ácido trifluoroacético (TFA), concentração menor que 1%.
- Ácido heptafluorobutírico, (HFBA) concentração menor que 1%.
- Amônio/hidróxido de amônio, concentração menor que 1%.

3. LIGANDO O UHPLC

- 3.1. Ligue os módulos na parte traseira do UHPLC, no botão liga/desliga. Cada módulo tem seu próprio botão, sendo 2 para as bombas, 1 para o auto amostrador e 1 para o forno, que podem ser localizados perto dos cabos de alimentação.
- 3.2. Verifique se os solventes instalados no sistema estão de acordo com o que serão utilizados. Se necessário, faça a troca, observando que caso o solvente seja trocado deve-se lavar bem o tubo antes da imersão no frasco. Por padrão, utilizamos na linha A o solvente mais polar (água) e na linha B o solvente mais apolar (como metanol ou acetonitrila). Além disso, nas linhas A1 e B1 são utilizados solventes tamponados, enquanto nas linhas A2 e B2 são utilizados solventes puros.
- 3.3. Se necessário, ligue o computador. Inicie o software Analyst.
- 3.4. Na janela *Hardware Configuration*, ative o perfil *TripleToF5600+_Eksigent 100XL*.
- 3.5. Clique com botão direito no ícone do sistema de LC na barra de tarefas.
- 3.6. Espere até que o software ekspert ultraLC indique que o status da bomba esteja pronto (Ready).
- 3.7. Certifique-se que a informação do status da pressão no software ekspert ultraLC indique 0 ou --.
- 3.8. Se tiver sido feita troca de solventes, se o último uso tenha sido com solventes diferentes ou se houver suspeita de bolhas nas linhas, será necessária a purga do sistema. Siga os seguintes passos:
 - 3.8.1. No software ekspert ultraLC clique na figura sobre as bombas para abrir a janela de controle manual.
 - 3.8.2. Verifique para cada uma das bombas se a porta correta está selecionada, de acordo com os solventes que serão utilizados. Se necessário, mude as portas.
 - 3.8.3. Confira nos módulos das bombas se o LED correspondente à porta certa está aceso.
 - 3.8.4. Abra as válvulas de purga de cada bomba com $\frac{1}{4}$ de volta no sentido anti-horário.
 - 3.8.5. Conecte a seringa à saída abaixo da válvula.
 - 3.8.6. Pressione o botão de purga. A bomba é purgada a 2.5 mL/min por 10 minutos. Este procedimento pode ser repetido ou interrompido no meio (pressionando novamente o botão) de acordo com a necessidade.
 - 3.8.7. Feche a válvula de purga ($\frac{1}{4}$ de volta no sentido horário).

4. TROCANDO A COLUNA DO SISTEMA

- 4.1. Antes de iniciar qualquer análise, verifique se a coluna instalada é a mesma que será utilizada na análise.
- 4.2. Para trocar a coluna, verifique se as bombas estão paradas e o sistema despressurizado utilizando o software *ekspert ultraLC*. Caso contrário, interrompa o fluxo e aguarde até que não haja mais pressão.
- 4.3. As linhas devem estar conectadas à coluna com conector de plástico PEEK. Este conector pode ser solto apenas com as mãos, girando no sentido anti-horário.
- 4.4. Coloque as tampas para fechar a entrada e a saída da coluna e evitar que o solvente seque. Guarde a coluna em sua respectiva caixa.
- 4.5. Pegue a coluna que será instalada e verifique a indicação do sentido do fluxo.
- 4.6. Conecte os conectores PEEK com as mãos. **Atenção:** Não é necessário fazer força para apertar as conexões. Ao sentir uma resistência, não aplique mais força ou as conexões serão danificadas.
- 4.7. Caso alguma das conexões não seja PEEK e sim de metal, será necessária utilização de chave de boca. Pegue a chave de tamanho apropriado, e mantenha o cuidado com a intensidade do aperto. Força excessiva causará danos ao sistema.

5. UTILIZANDO O UHPLC EM CORRIDA CROMATOGRÁFICA

- 5.1. Aumente o fluxo da bomba gradualmente, em etapas, para pressurizar o sistema até o valor que será utilizado no método, monitorando a pressão do sistema pelo software *ekspert ultraLC*.
- 5.2. Verifique se a pressão está estável e de acordo com o esperado. Caso contrário, verifique todas as conexões para procurar por vazamentos.
- 5.3. Abra o compartimento de amostras do amostrador automático. A bandeja (vial adapter/108) será posicionada automaticamente perto da abertura. Retire
- 5.4. Retire a bandeja e coloque os vials nas posições que desejar, memorizando ou anotando sua ordem.

5.5. Coloque novamente a bandeja dentro do auto amostrador. Verifique cuidadosamente se ela está bem encaixada, não deve haver folga nas movimentações para os lados e para trás.

5.6. Consulte os outros POPs para realizar a análise.

6. UTILIZANDO O UHPLC COMO INJETOR AUTOMÁTICO SEM COLUNA

6.1. Verifique se no forno está instalada a conexão de *by-pass* ao invés de uma coluna, e faça a substituição de necessário.

6.2. Não é necessário controle manual do sistema. Crie um método no software Analyst com uma pequena corrida isocrática (1,5 a 2 min) apenas para realizar o transporte da amostra injetada até o espectrômetro.

7. DESLIGANDO O UHPLC

7.1. Após a utilização do UHPLC remova as fases móveis prejudiciais ao sistema.

7.2. Lave o sistema com uma mistura água:metanol (80:20) durante alguns minutos, para evitar a formação de depósitos nocivos ao sistema.

7.3. No software *ekspert ultraLC*, zere o fluxo e pare as bombas.

7.4. Feche o software *ekspert ultraLC*.

7.5. No software *Analyst*, na janela *Hardware Configuration*, desative o perfil *TripleToF5600+_Eksigent 100XL*.

7.6. Caso seja um desligamento prolongado, desligue as bombas, o amostrador automático e o forno de coluna na parte de trás dos módulos.

Observação: em caso de dúvidas consulte o manual do equipamento ou procure o responsável.