

ThermoFisher
Dionex Ultimate 3000
UHPLC

Manual do Utilizador



Laboratório de Engenharia e Biotecnologia Ambiental

CIMA - UAlg

2023

Índice:

1. O Equipamento

O equipamento é composto por uma bomba para 4 solventes, um autosampler com capacidade termostática, um forno de colunas, um detetor DAD, um detetor FLD e um detetor RI como representado na figura 1.

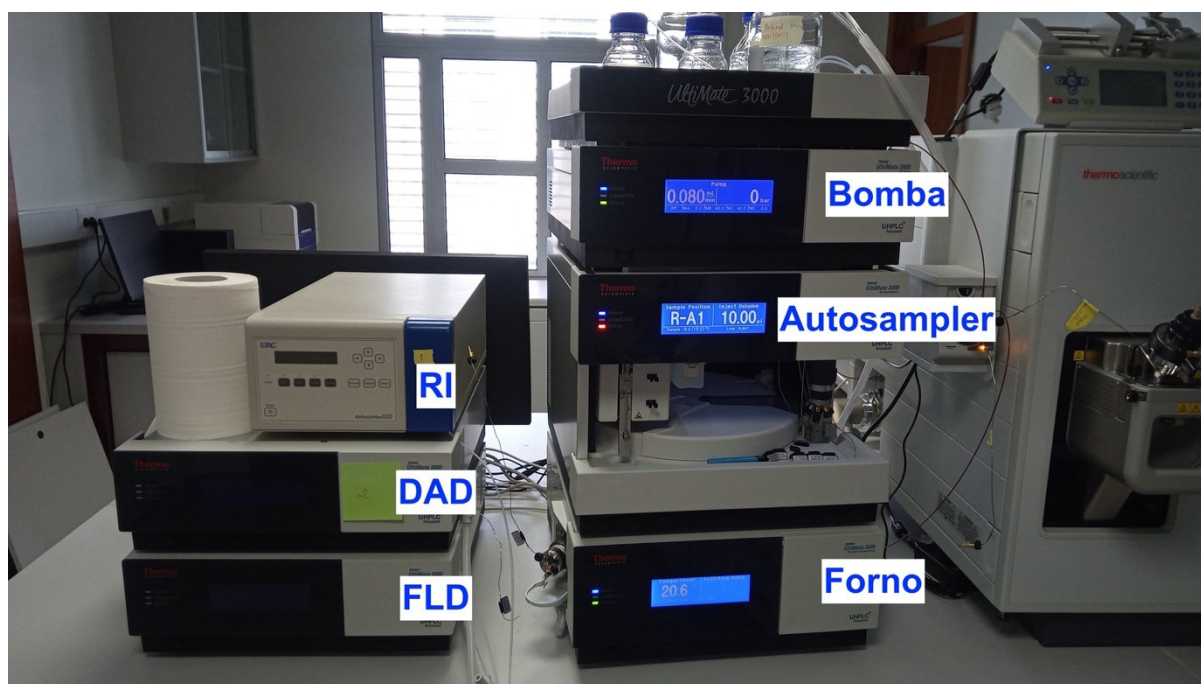


Figure 1 - Equipamento completo.

2. Iniciar o Sistema:

Devido à acoplação do detetor de massas MS/MS antes de ligar qualquer aparelho verificar se o cabo USB que conecta o UHPLC ao computador está ligado ao computador correto. Ligar o computador. Ligar os botões **on/off** localizados nas traseiras dos módulos do UHPLC começando pela bomba, depois autosampler, forno e detetores. Abrir o programa **Chromeleon**. Na página “Home” do software, selecionar os módulos ligados como na Figura 2. Atenção que os detetores DAD e FLD estão ligados em cadeia e na ocasião de utilizar um destes, ambos devem estar ligados e conectados. Confirmar se se mantêm todos conectados e verificar o log, caso não apareçam erros os módulos devem estar todos conectados ao computador e prontos.

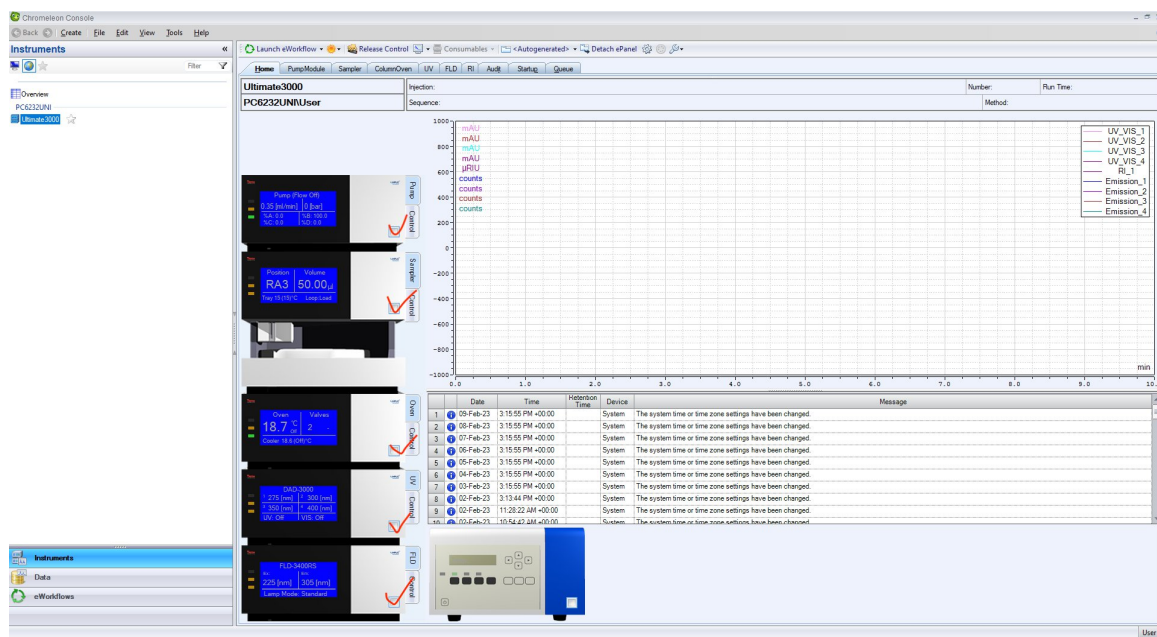


Figure 2 - Layout da página →Home→ com os módulos conectados.

3. Adicionar Solventes Frescos:

O solvente fresco (novo) deve ser primeiro sonificado num banho ultrassons para libertar o gás em excesso e colocado numa das linhas de solvente A, B, C, ou D. A linha que liga à bomba deve ser purgada para limpar o solvente anterior e remover quaisquer bolhas de ar que possam ter entrado no sistema. Para iniciar a purga deve-se primeiro abrir a válvula de escape desapertando um pouco o parafuso localizado no módulo da bomba como representado na Figura 3.

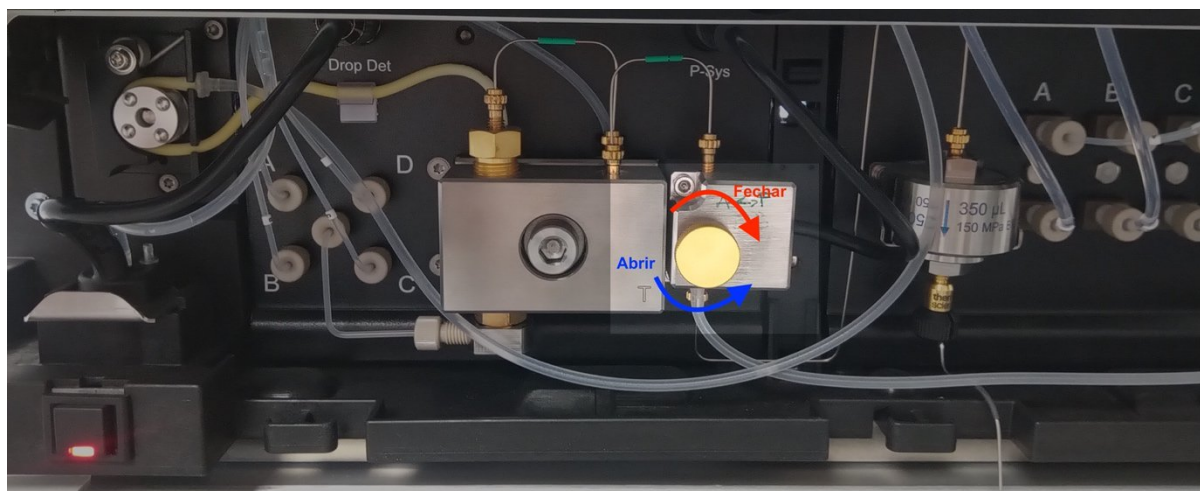


Figure 3 - Abrir e fechar válvula para a purga.

Na página “Pump Module” do software selecionar o modo *Purge* como na Figura 4. O tempo e fluxo desta purga podem ser alterados nas definições. O tempo

de purga encontra-se no ecrã do módulo em contagem decrescente. As definições atuais foram programadas pelos técnicos da UNICAM (Fevereiro 2023). Uma vez que o solvente foi purgado verificar se não existem bolhas de ar no sistema e está pronto para ser utilizado.

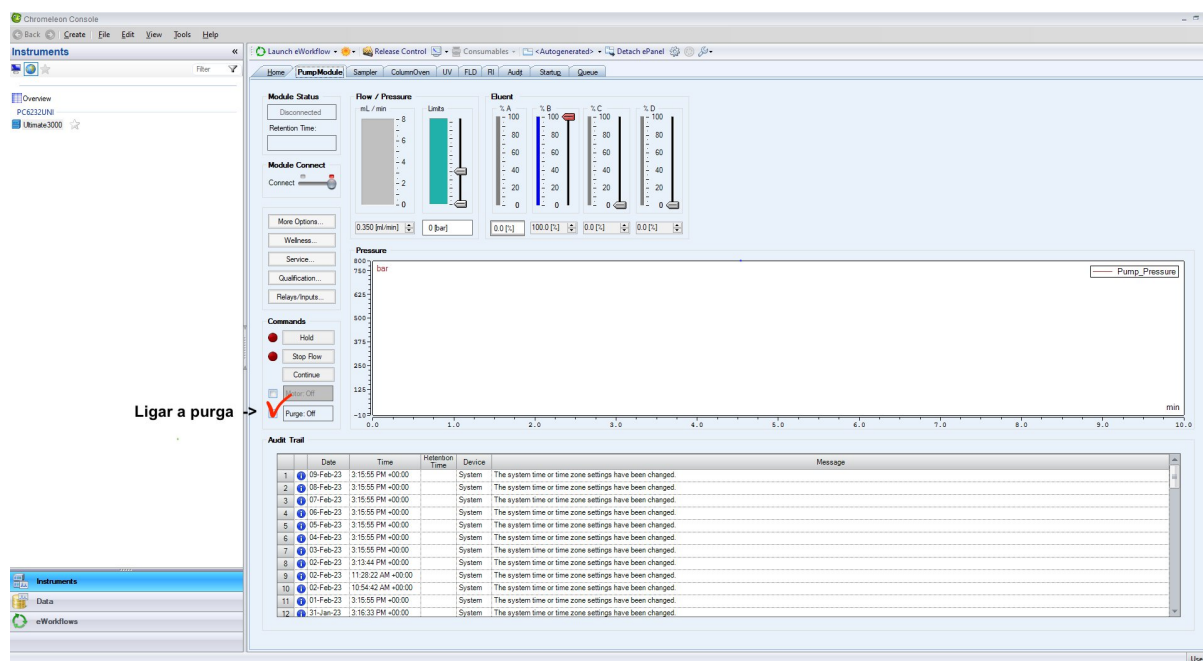


Figure 4 - Página →Pump Module→ com indicação de como iniciar a purga.

Atenção ← Não esquecer de fechar novamente a válvula de purga antes de ligar a bomba para o sistema.

4. Equilibrar e Estabilizar o Sistema

Para qualquer corrida o detetor e o sistema têm de ser estabilizado e equilibrado. Esta estabilização deve ser feita de acordo com o método a ser utilizado. O solvente principal ou mistura de solventes na proporção correta correspondente ao método a ser utilizado deve ser bombeada com um fluxo um pouco inferior ao método durante algum tempo com o(s) detetor(es) ligados em modo de leitura para estes estabilizarem.

Para iniciar a bomba, vai-se à página “Pump Module” onde se define a proporção dos solventes e o fluxo. Após definir os métodos é ligar a bomba ao selecionar esta opção como representado na Figura 5. Normalmente mudar o valor do fluxo inicia automaticamente a bomba. Deve-se iniciar com fluxos mais baixos (relativo consoante a coluna utilizada) e subir gradualmente pois algumas colunas são

mais suscetíveis à variação de fluxo e aumentão bastante a pressão o que pode danificar a coluna. No retângulo nomeado “Limits” ao lado do fluxo pode-se definir a pressão máxima permitida e no caso de a pressão ultrapassar o limite, o sistema interrompe automaticamente o fluxo.

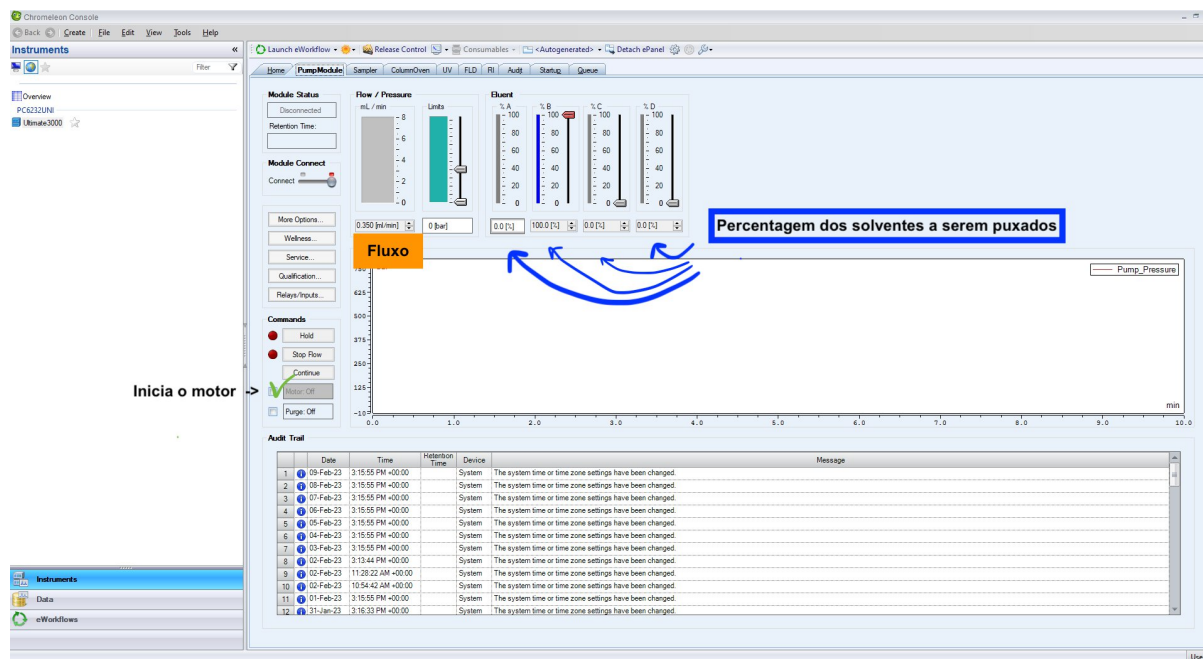


Figure 5 - Página →Pump Module→ com as definições para iniciar a estabilização.

A estabilização dos detetores pode variar com os detetores, neste caso a explicação é feita para o DAD e o FLD (mais utilizados). Para o DAD é necessário ir à página “UV” e configurar as definições do detetor de acordo com as definições utilizadas no método. As definições aplicadas ao detetor devem ser iguais às definições programadas no método. Existem 4 canais de captação: UV1, UV2, UV3 e UV4. A *Wavelength* associada a cada um destes é onde o detetor vai ler o sinal do cromatograma apesar de o detetor fazer o *full scan* do espectro UV/Vis para cada pico individualmente. A *Bandwidth* será a janela de variação do comprimento de onda. Para ligar as lâmpadas UV e Vis é necessário seleccioná-las tal como na Figura 6. Podem demorar uns segundos a ligar.

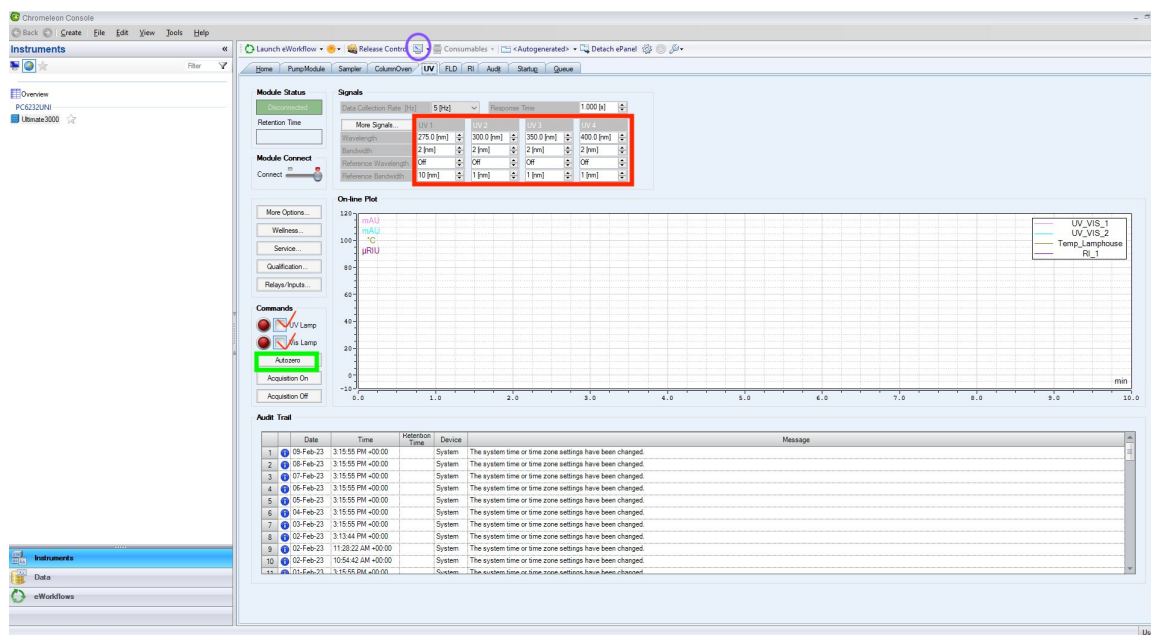


Figure 6 - Definições do Detetor DAD para estabilização do detetor antes da corrida.

Assumindo que apenas se vai utilizar o DAD: Selecionar a monitorização do sinal, ou seja, o símbolo do computador no topo da página circundado a roxo. Selecionar os parâmetros de interesse a observar, especialmente os 4 canais UV e iniciar a aquisição de dados. Clicar no botão “Autozero” para zerar o detetor. O detetor deve estar ligado entre 30 mins a 1 hora para estabilizar. Deve-se fazer autozero algumas vezes especialmente quando o detetor parecer estabilizar.

No caso de detetor FLD, deve-se definir a temperatura da célula e os comprimentos de onda de emissão e excitação de acordo com o método, tal como para o DAD inicia-se a monitorização do sinal no botão circundado a roxo na Figura 7. Após iniciar a monitorização do sinal deve-se fazer autozero e ir zerando até o sinal parecer estável.

Após carregar no botão de monitorização do sinal pode-se seleccionar os detetores e sinais todos que quisermos monitorizar, no caso de querermos utilizar ambos DAD e FLD.

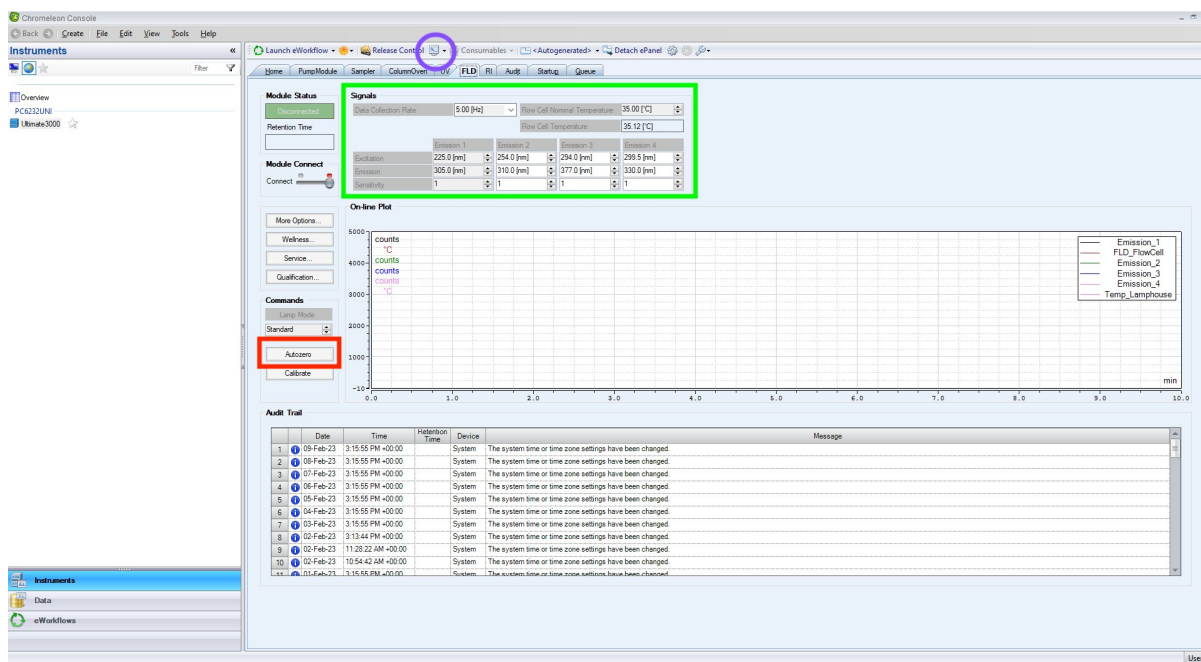


Figure 7 - Definições do Detetor FLD para estabilização do detetor antes da corrida.

5. Lavar a Seringa

Antes de qualquer corrida ou injeção a seringa deve ser lavada. Isto pode ser feito enquanto os detetores estabilizam. Para se lavar a seringa e o loop é necessário ir à página “Sampler” e clicar em “Prime Syringe”, “Wash Buffer Loop” e “Wash Needle Externally”, um de cada vez, como indicado na Figura 8. Cada operação demora um pouco de tempo.

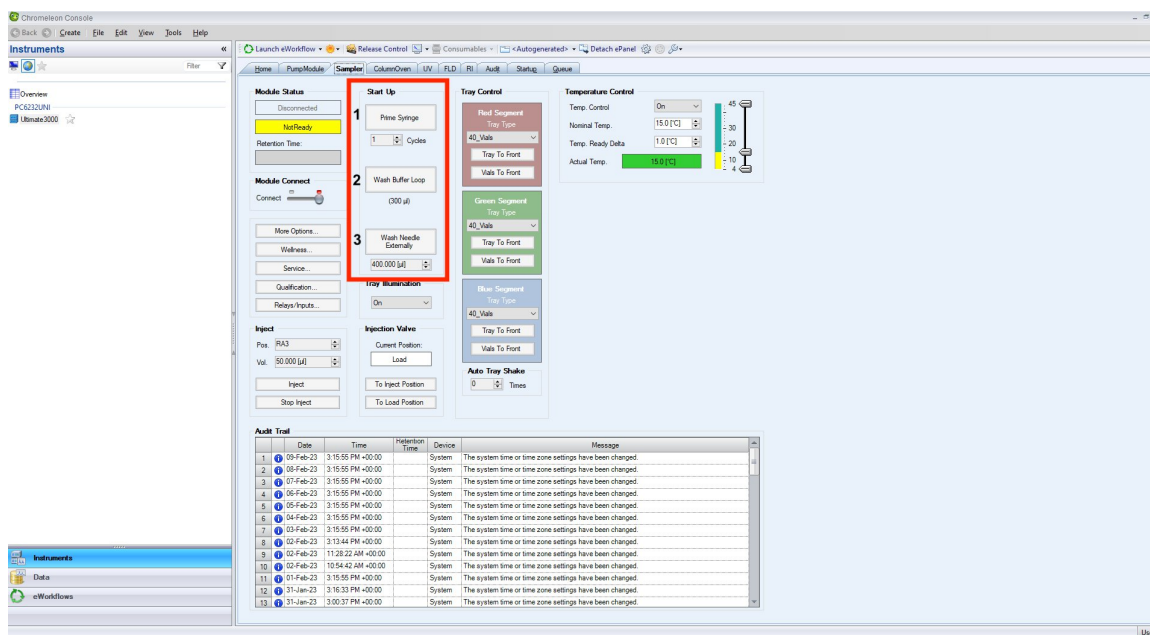


Figure 8 - Definições do sampler para limpeza da seringa.

Verificar se a seringa tem o solvente de lavagem entre as marcas de mínimo e máximo (Figura 9). Este solvente é composto por 90% metanol e 10% água.



Figure 9 - Solvente de Lavagem da Seringa

6. Definir Temperatura da Coluna

Antes de iniciar a corrida deve-se ajustar a temperatura da coluna à temperatura do método através da página “Column Oven” como na Figura 10. Para a utilização dos detetores DAD e FLD a válvula necessita estar na posição 2, isto é importante porque sempre que se liga e desliga o equipamento ele reverte para o default que é a posição 1.

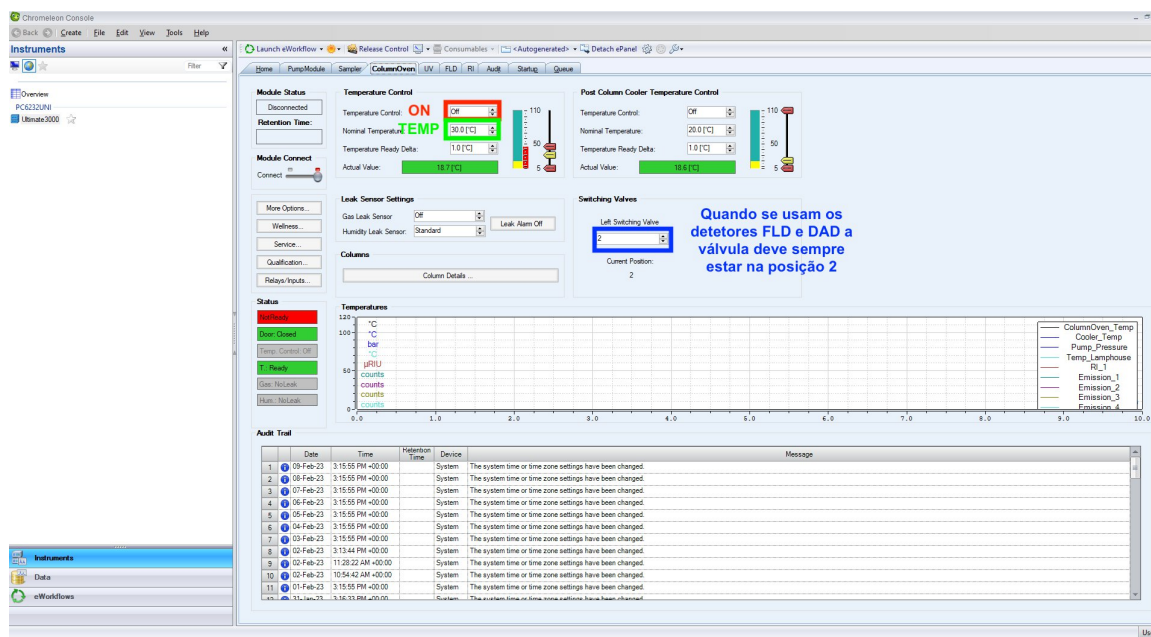


Figure 10 - Definições do forno da coluna.

7. Preparar uma Sequência

No canto inferior esquerdo seleccionar o separador “Data”. No separador data, no canto superior esquerdo seleccionar “Create” e “New Sequence”, é necessário seleccionar os métodos de instrumento e processamento, volumes de injeção, entre outras informações e no final teremos uma sequência em branco. Para exemplificar, na Figura 11 está representada uma sequência completa, é preciso ter atenção ao atribuir a posição na *rack* a cada amostra/injeção. É preciso adicionar um nome diferente a cada amostra/injeção e ter atenção tanto com os métodos do instrumento e do processamento.

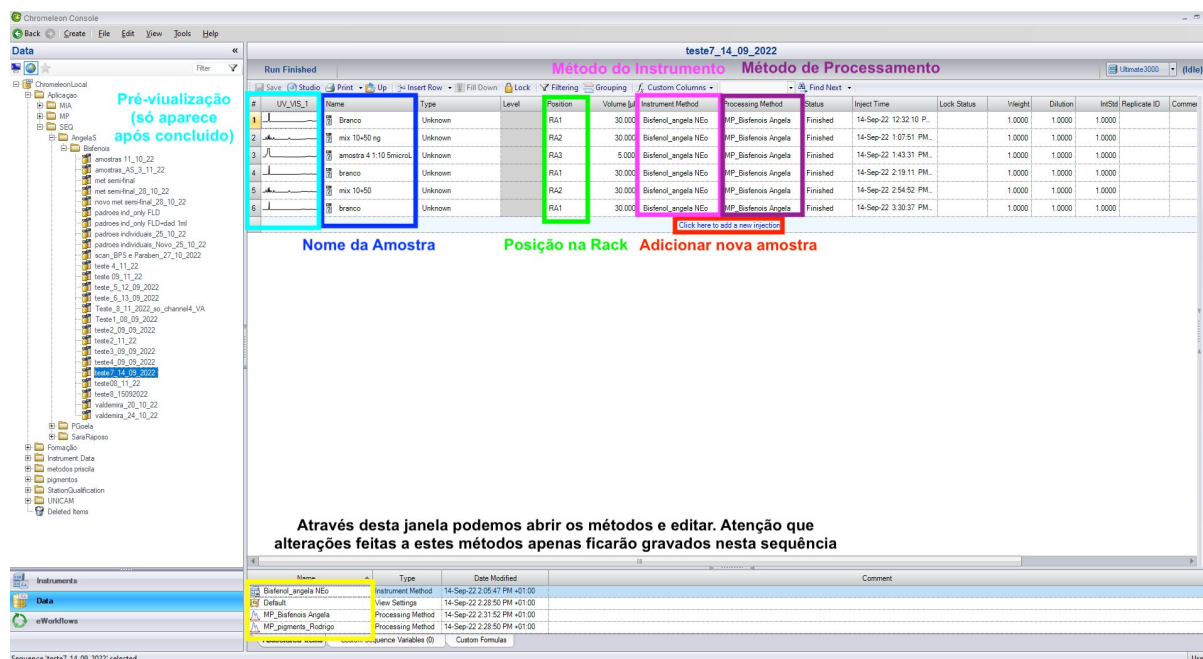


Figure 11 - Exemplo de sequência para correr.

Depois de ter a sequência completa é importante gravar a sequência no botão por cima da pré-visualização do cromatograma.

8. Correr Sequência

Para correr a sequência é preciso voltar ao separador “Instruments”, à página “Queue”. Para adicionar uma sequência clicar no botão “Add” como representado na Figura 12. Depois de seleccionar a(s) sequências a serem corridas, clicar em “Ready Check” para verificar se está tudo pronto e se não dá nenhum erro e também permite ver o volume de cada solvente necessário para a corrida. Se estiver tudo Ok clicar em “Start”.

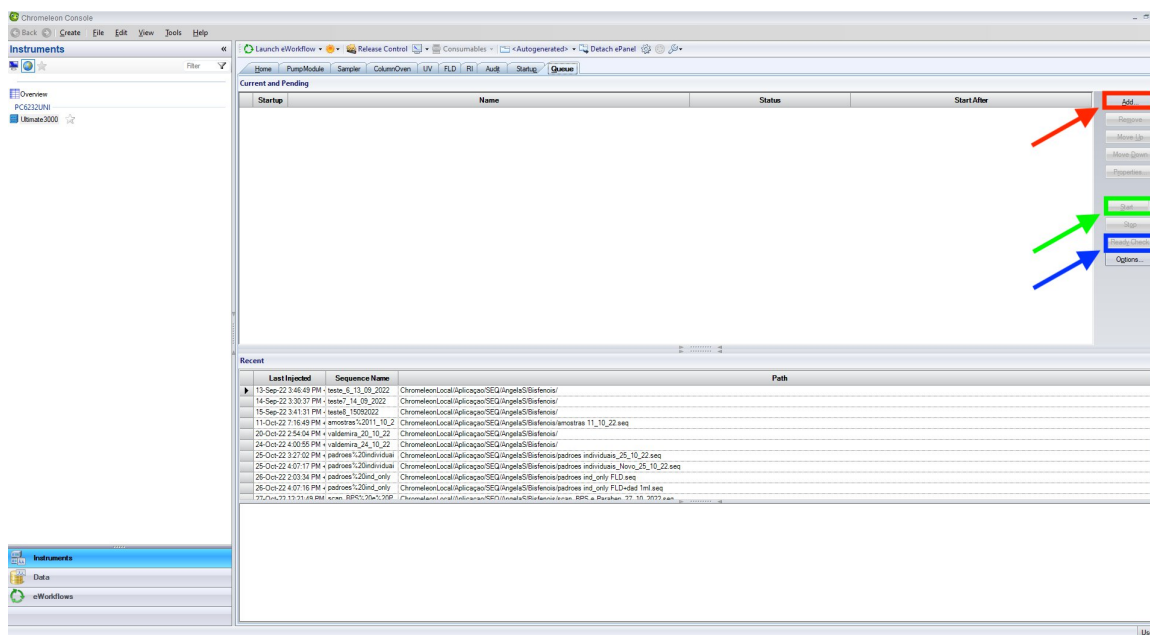


Figure 12 - Para iniciar uma corrida é necessário adicioná-la à queue.

9. Como Desligar

Após terminar uma corrida deve-se deixar passar um pouco de solvente para limpar a coluna como por exemplo metanol ou acetonitrilo (dependendo da coluna) com um fluxo médio por exemplo 0.2-0.3 ml/min (dependendo da capacidade da coluna) durante uns 20 a 30 min. Passar para o solvente ideal de estabilização/acondicionamento da coluna (até poderá ser o mesmo) com um fluxo mais baixo, por exemplo 0.1 ml/min. Parar o fluxo e desconectar os módulos na página “Home” como descrito na Figura 2. Desligar os módulos no botão traseiro **on/off** começando pelos detetores, forno, autosampler e finalmente bomba. Desligar o computador.

10. Preparar o Método do Equipamento

Para criar um novo método de corrida é preciso ir ao separador “Data” no canto esquerdo inferior, clicar em Create -> Instrument Method... que faz abrir o Instrument Method Wizard. A primeira página é para selecionar o Instrumento mas existe apenas um, clicar em next. Na segunda página define-se o tempo de corrida, os detetores utilizados e os canais de diagnóstico (Figura 13). Ao contrário de como representado na figura o detetor RI e os detetores FLD e DAD (UV) não podem ser utilizados em parêntese uma vez que estão ligados a válvulas diferentes.

Instrument Method Wizard - System: General Settings

General Settings for System.

Run Time
Please specify the run time of the method:
60.000 [0.100..100000.000 min]

Detectors
Select detectors to be used:
☒ RI
☒ FLD
☒ UV

Diagnostic Channels
Select diagnostic channels to be used:

No	Channel
1	☒ ColumnOven_Temp
2	☒ Cooler_Temp
3	☒ FLD_FlowCell
4	☒ Pump_Pressure
5	☒ Temp_Lamphouse

Select all channels
Deselect all channels

< Back Next > Cancel Help

Figure 13 - Instrument Method Wizard tempo de corrida e seleção de detetores.

Na terceira página permite nomear os 4 solventes que podem ser utilizados no gradiente, os limites de pressão e os limites de aceleração desaceleração do fluxo (Figura 14).

Instrument Method Wizard - Pump (LPG-3400RS): General Settings

General Settings for Pump (LPG-3400RS).

Solvents

Name
%A: B2
%B: %B
%C: %C
%D: %D

Pressure Limits

Lower Limit: 0 [0..1034 bar]	Upper Limit: 1034 [0..1034 bar]
------------------------------	---------------------------------

Maximum Flow Acceleration/Deceleration

Up: Infinite [0.001..9999.999 ml/min²]	Down: Infinite [0.001..9999.999 ml/min²]
--	--

< Back Next > Cancel Help

Figure 14 - Instrument Method Wizard nomes de solventes e limites de fluxo e pressão.

Na quarta página permite definir a curva de gradiente dos solventes e os respectivos tempos (Figura 15).

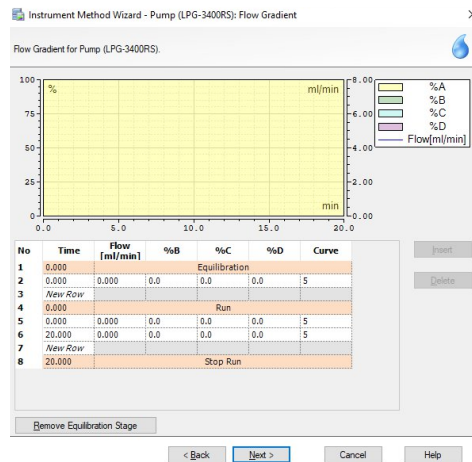


Figure 15 - Instrument Method Wizard curva de fluxo e gradiente.

Na quinta página permite definir as condições do sampler, de injeções e lavagens (Figura 16).

Draw Speed	0.050	[0.010...83.333 µl/s]
Draw Delay	7.000	[0.000...300.000 s]
Dispense Speed	2.000	[0.010...83.333 µl/s]
Dispense Delay	2.000	[0.000...300.000 s]
Dispense To Waste Speed	4.000	[0.010...83.333 µl/s]
Sample Height	2.000	[0.000...30.000 mm]
Inject Wash	NoWash	
Wash Volume	75.000	[0.000...5000.000 µl]
Wash Speed	4.000	[0.010...83.333 µl/s]

Figure 16 - Instrument Method Wizard definições de injeção.

Na sexta página permite definir o modo de injeção (Figura 17).

Instrument Method Wizard - Sampler (WPS-3000): Inject Mode

Inject Mode for Sampler (WPS-3000).

Inject Mode: Normal

Connected Pump Device: Pumps

☐ Synchronize Injection With Pump

☐ Bypass

Flush Out Factor: 2.0 [1.0...10.0]

Maximum Inject Volume: 250.000 [0.001...250.000 µl]

Flow: [ml/min]

Bypass Time: [min]

< Back **Next >** Cancel Help

Figure 17 - Instrument Method Wizard modo de injeção.

Na sétima página o controlo de temperatura do sampler (Figura 18).

Instrument Method Wizard - Sampler (WPS-3000): Temperature Control

Temperature Control for Sampler (WPS-3000).

☐ Use Temperature Control

Temperature: 20.0 [4.0...45.0 °C]

Max. Deviation: None [None...10.0 °C]

Safety Limits

Lower Limit: 4.0 [4.0...45.0 °C]

Upper Limit: 45.0 [4.0...45.0 °C]

< Back **Next >** Cancel Help

Figure 18 - Instrument Method Wizard controlo de temperatura do Sampler.

Na oitava página o controlo de temperatura do forno e a temperatura do arrefecedor pós-coluna (Figura 19).

Instrument Method Wizard - ColumnOven (TCC-3100): General Settings

General Settings for ColumnOven (TCC-3100).

Temperature Control

☒ Use Temperature Control

Temperature: 20.0 [5.0...110.0 °C]

Lower Limit: 5.0 [5.0...110.0 °C]

Upper Limit: 110.0 [5.0...110.0 °C]

Equilibration Time: 0.5 [None...30.0 min]

Ready Temp Delta: 1.0 [None...5.0 °C]

☒ Use Temperature Control (Post-column Cooler)

Temperature: 20.0 [5.0...110.0 °C]

Lower Limit: 5.0 [5.0...110.0 °C]

Upper Limit: 110.0 [5.0...110.0 °C]

Equilibration Time: 0.5 [None...30.0 min]

Ready Temp Delta: 1.0 [None...5.0 °C]

< Back Next > Cancel Help

Figure 19 - Instrument Method Wizard temperatura do forno.

A nona página apenas é relevante na eventualidade de se utilizar duas colunas. A décima página é para variações à temperatura da coluna. Na décima primeira página definem-se as condições do detetor RI (Figura 20).

Instrument Method Wizard - RI (RefractoMax521): Settings

Settings for RI (RefractoMax521).

Detection Range Parameter

Integrator Range: 500 [μRIU/V]

Baseline Shift: 0 [mV]

Polarity: Plus

Data Collection

☒ Detector Active

Acquisition on: 0.000 [min]

Acquisition off: 20.000 [min]

Rise Time: 1.00 [s]

Data Collection Rate: 10.00 [Hz]

Temperature Control

Temperature: Off [30...55]

< Back Next > Cancel Help

Figure 20 - Instrument Method Wizard definições detetor RI.

Na décima segunda página programam-se as condições para o detetor DAD (Figura 21). Os 4 canais diferentes de permitem a aquisição em 3 comprimentos de onda diferentes. O 3D Field permite a aquisição de todos os comprimentos de onda e permite detetar em que comprimentos de onda certos picos possuem maior intensidade de sinal.

Channel Settings for UV (DAD-3000).

Channel start settings:

No	Channel	Wavelength [nm]	Bandwidth [nm]	RefWavelength [nm]	RefBandwidth [nm]
1	☒ UV_VIS_1	225.0	1	OFF	1
2	☒ UV_VIS_2	250.0	1	OFF	1
3	☒ UV_VIS_3	275.0	1	OFF	1
4	☒ UV_VIS_4	300.0	1	OFF	1
5	☒ 3D FIELD			OFF	1

In initial experiments, we recommend to acquire data with RefWavelength set to OFF.

Data Collection

Specify the width of the narrowest expected peak at half height in your chromatogram:

Peak Width: 0.100 [0.002 min]

☒ Use Recommended Values

Data Collection Rate: 5 [Hz] recommended [1...100 Hz]

Response Time: 1.000 [s] recommended [0.000...20.000 s]

3D Field

Min. Wavelength: 190.0 [190.0...800.0 nm]

Max. Wavelength: 800.0 [190.0...800.0 nm]

Bandwidth: 1 [1...400 nm]

< Back Next > Cancel Help

Figure 21 - Instrument Method Wizard definições detetor DAD.

Nas décima terceira e quarta página programam-se as condições para o detetor FLD (Figura 22 e 23). Como para o detetor DAD, a aquisição 2D permite a deteção de fluorescência a determinados comprimentos de onda de excitação e emissão. A aquisição 3D permite fazer um scan de emissão a um certo comprimento de excitação ou o contrário.

General Settings for FLD (FLD-3400RS).

Acquisition Settings

☒ 2D data acquisition on

☐ 3D data acquisition on

☐ Deactivate data acquisition

Temperature Settings

☐ Temperature control

Temperature: 0.01 [0.01...50.00 °C]

Beady temp. delta: 0.10 [None...50.00 °C]

< Back Next > Cancel Help

Figure 22 - Instrument Method Wizard tipo de aquisição do FLD.

Instrument Method Wizard - FLD (FLD-3400RS): Channel Settings

Channel Settings for FLD (FLD-3400RS):

Channel start settings: ☐ Edit acquisition times

No	Channel	Excitation WL [nm]	Emission WL [nm]	Sensitivity	PMT	Filter wheel
1	☒ Emission_1	300.0	350.0	1	Pmt1	Auto
2	☐ Emission_2					
3	☐ Emission_3					
4	☐ Emission_4					

Data Collection

Specify the width of the narrowest expected peak at half height in your chromatogram:

Peak width: [0.001..min]

☐ Use recommended values

Data collection rate: [0.00..200.00 Hz]

5.00 [Hz] recommended

Response time: [None..60.000 s]

2.000 [s] recommended

Lamp mode:

< Back Next > Cancel Help

Figure 23 - Instrument Method Wizard definições para aquisição 2D no FLD.

11. Como Trocar a Coluna

Para trocar a coluna deve-se primeiro lavar quaisquer resíduos com um solvente forte e colocar a coluna atual no solvente ideal para estabilização/acondicionamento durante algum tempo para certificar que a coluna fica bem cheia e sem contaminantes. Parar o fluxo do solvente e desaparafusar a coluna. Colocar os parafusos protetores da coluna bem apertados para não secar.

Importante: No caso de a coluna que se vai colocar ser mantida em solventes diferentes, trocar os gradiente/solventes e “sangrar” primeiro os que lá estão recolhendo com um copo no local que ligaria à coluna até o solvente que está a passar ser igual ao de acondicionamento da coluna. Parar o fluxo e ligar a coluna ou coluna + pré-coluna. Retomar o fluxo.