

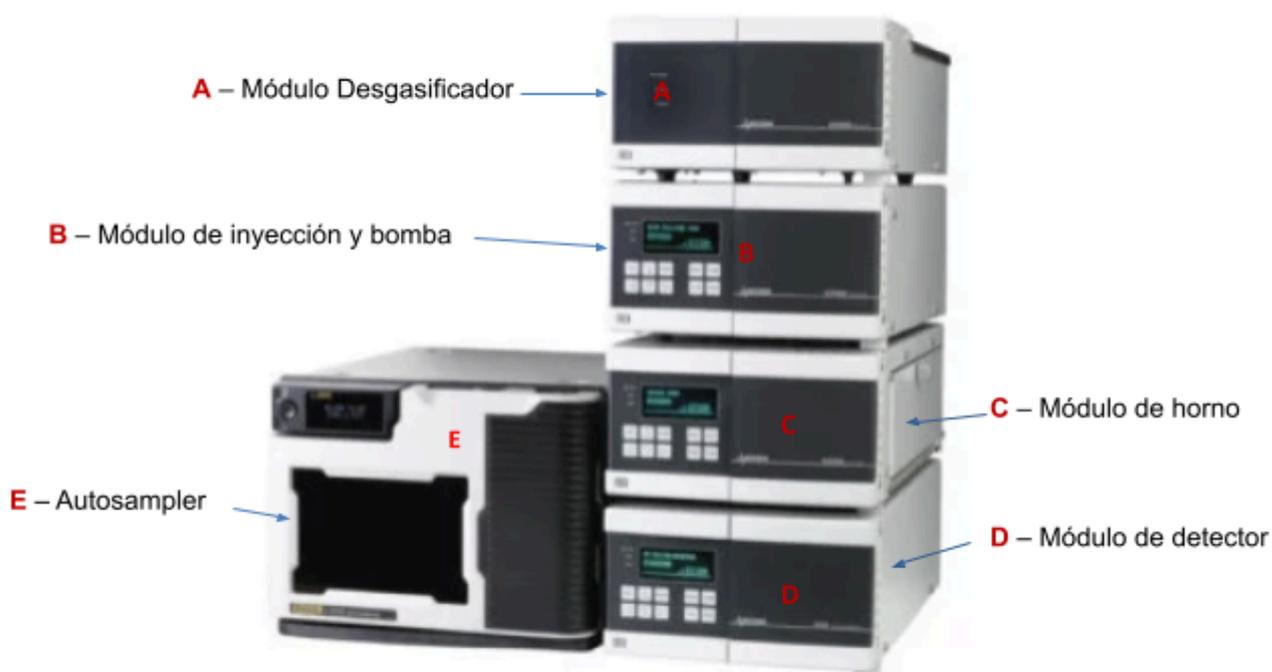
 U N I T E F A	OPERACION Cromatógrafo Líquido de Alta Presión (HPLC) ECOM 2000	INS-HPLC-001 Versión: 0 Vigencia desde: 05/03/2024
ÁREA INFRAESTRUCTURA Y EQUIPAMIENTO	Instructivo	Página 1 de 11

OBJETIVO:	ALCANCE	ELABORADO POR:
Describir la forma correcta de operación del Cromatógrafo Líquido de Alta Presión (HPLC) ECOM 2000	HPLC ECOM 2000	CPA Lic. Johana López

1. DESARROLLO

a) Generalidades:

El equipo se encuentra instalado en la sala instrumental ubicada en el segundo piso del edificio de Ciencias II de la Facultad de Ciencias Químicas. Este equipo está conformado por 5 módulos:



La conexión entre los módulos y el equipo CPU se realiza mediante un switch multipuerto intermediario, y desde éste a la entrada ethernet del CPU. Todos los módulos tienen conexión eléctrica independiente y toman su energía desde dos UPS dispuestas para tal fin.

Antes de comenzar a trabajar, asegúrese que todos los suministros estén en correcto funcionamiento y los insumos disponibles en cantidad y calidad adecuada. Recordamos que en HPLC es importante que los solventes utilizados posean un grado alto de pureza y también estén perfectamente filtrados. Controle:

- energía eléctrica estabilizada mediante UPS on line (indicadores de funcionamiento ok)
- conexión de red desde PC al Equipo CPU (el software no funciona si no están todos los módulos encendidos).

 U N I T E F A	OPERACION Cromatógrafo Líquido de Alta Presión (HPLC) ECOM 2000	INS-HPLC-001 Versión: 0 Vigencia desde: 05/03/2024
ÁREA INFRAESTRUCTURA Y EQUIPAMIENTO	Instructivo	Página 2 de 11

- Fase móvil para el ensayo en un volumen suficiente*, perfectamente filtrada y desgasificada.
- Soluciones de lavado en un volumen suficiente, perfectamente filtradas y desgasificadas.

* Para calcular el “Volumen suficiente” debe tener en cuenta el tiempo de corrida, la cantidad de muestras y un margen de seguridad mínimo del 20% extra.

b) Procedimiento para el uso del HPLC ECOM2000

- 1) Encienda el equipo (todos los módulos) y la CPU:** para ello se debe apretar el botón que se encuentra indicado con un led rojo en cada módulo, el cual cambiará a verde a medida que sean encendidos los módulos, y el botón negro en el autosampler (observar la figura). Por otro lado, se debe encender la CPU.



- 2) Abrir el programa *Clarity*:** desde su ícono en el escritorio, haga clic en iniciar y luego en aceptar, se abrirá una pestaña de trabajo.

  U N I T E F A	OPERACION Cromatógrafo Líquido de Alta Presión (HPLC) ECOM 2000	INS-HPLC-001 Versión: 0 Vigencia desde: 05/03/2024
ÁREA INFRAESTRUCTURA Y EQUIPAMIENTO	Instructivo	Página 3 de 11



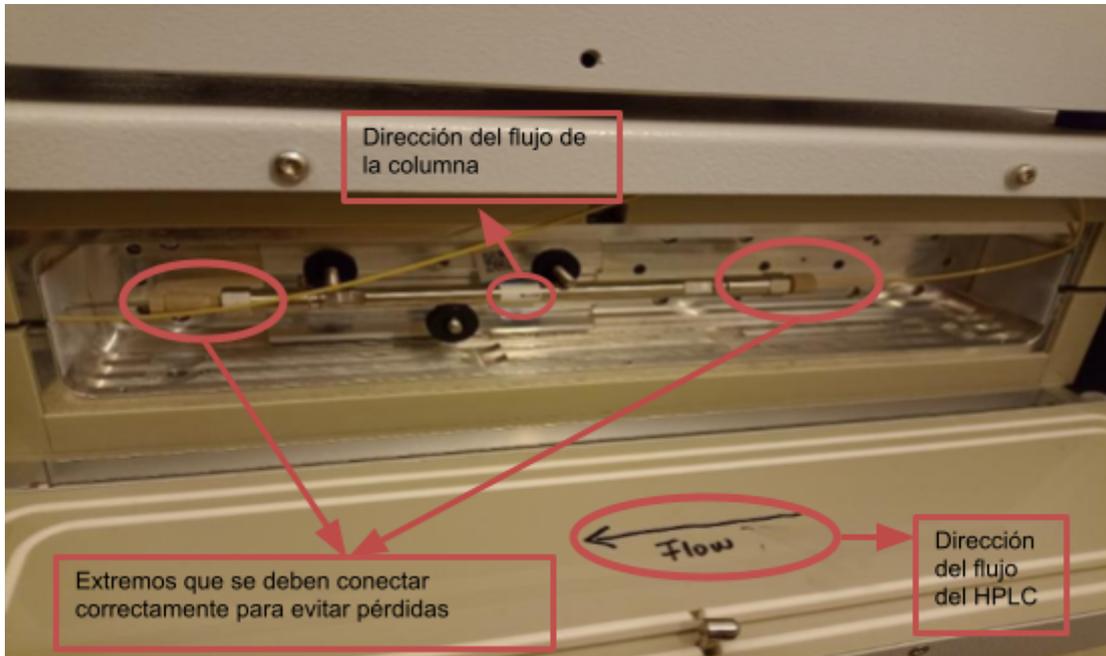
3) **Colocar los buzos en la fase móvil:** Cambiar el recipiente de almacenamiento (metanol) por la fase móvil de trabajo ubicado en la parte superior del módulo de desgasificador.



4) **Colocación de la columna:** Se debe colocar la columna en dirección del flujo (en la columna hay una flecha que indica en qué dirección de la columna va el flujo) en el HPLC

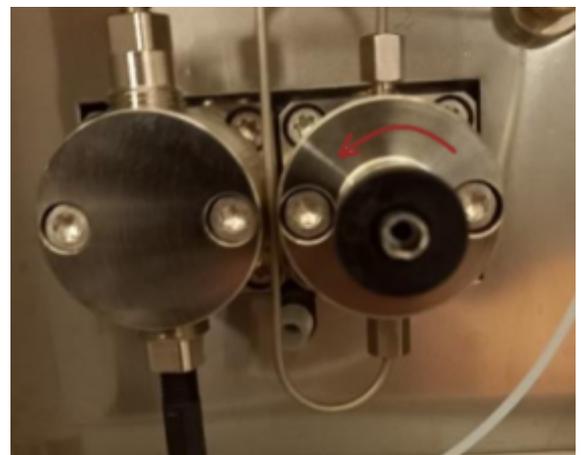
  U N I T E F A	OPERACION Cromatógrafo Líquido de Alta Presión (HPLC) ECOM 2000	INS-HPLC-001 Versión: 0 Vigencia desde: 05/03/2024
ÁREA INFRAESTRUCTURA Y EQUIPAMIENTO	Instructivo	Página 4 de 11

conectando los extremos del sistema, cabe destacar que la conexión se debe hacer bien y



fuerte para que no haya pérdidas.

- 5) **Purga del sistema:** para eliminar las burbujas que se hayan originado mientras no estaba en uso el equipo, se debe realizar una purga girando la perilla negra en sentido antihorario y se debe programar el flujo de purga.

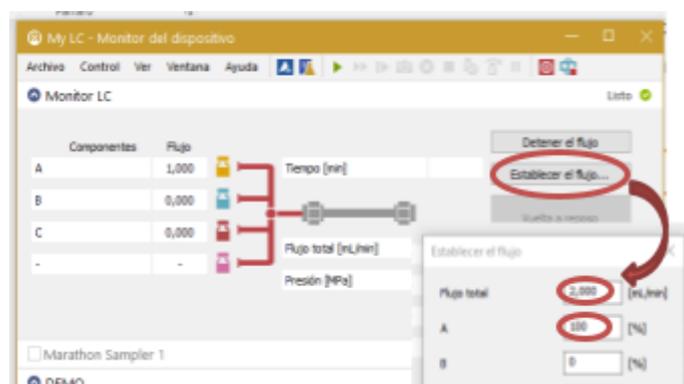


Para esto hay que hacer clic en el botón que se llama **monitoreo del dispositivo:**



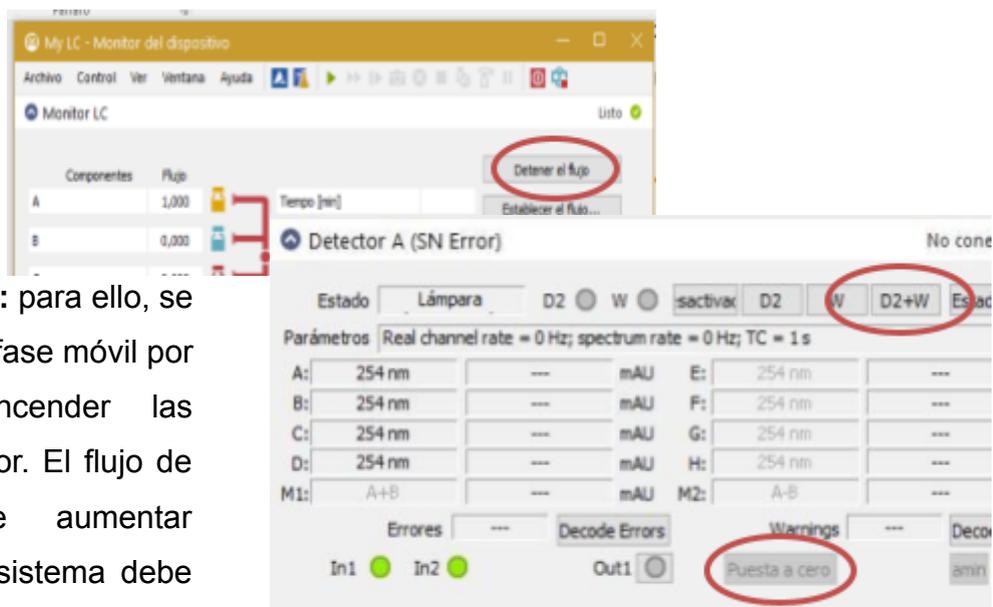
Se debe seleccionar la opción: “Establecer el flujo” y setear el mismo en 2 mL/min.

La purga se debe llevar a cabo por mínimo 10 min y hasta que no se observe ninguna



  U N I T E F A	OPERACION Cromatógrafo Líquido de Alta Presión (HPLC) ECOM 2000	INS-HPLC-001 Versión: 0 Vigencia desde: 05/03/2024
ÁREA INFRAESTRUCTURA Y EQUIPAMIENTO	Instructivo	Página 5 de 11

burbuja en las cánulas de la fase móvil. Terminada la fase de purga debe detenerse el flujo seleccionando la opción de “Detener el flujo”.



6) **Estabilizar el HPLC:** para ello, se debe dejar correr la fase móvil por el sistema y encender las lámparas del detector. El flujo de fase móvil debe aumentar gradualmente, y el sistema debe permanecer en estabilización en un lapso no menor a 40 minutos.

Por ejemplo, un aumento gradual aconsejado es de: 0.2, 0.5, 0.7 mL/min (aproximadamente 5 minutos en cada aumento) hasta llegar al flujo de trabajo que el método requiera. Un parámetro fundamental por controlar es la presión del sistema, la cual debe permanecer siempre por debajo de 40 MPa que es la máxima presión en la que trabaja la bomba del equipo.

Para encender las lámparas del sistema, se debe seleccionar la opción **D2+W** dentro del menú de monitoreo.

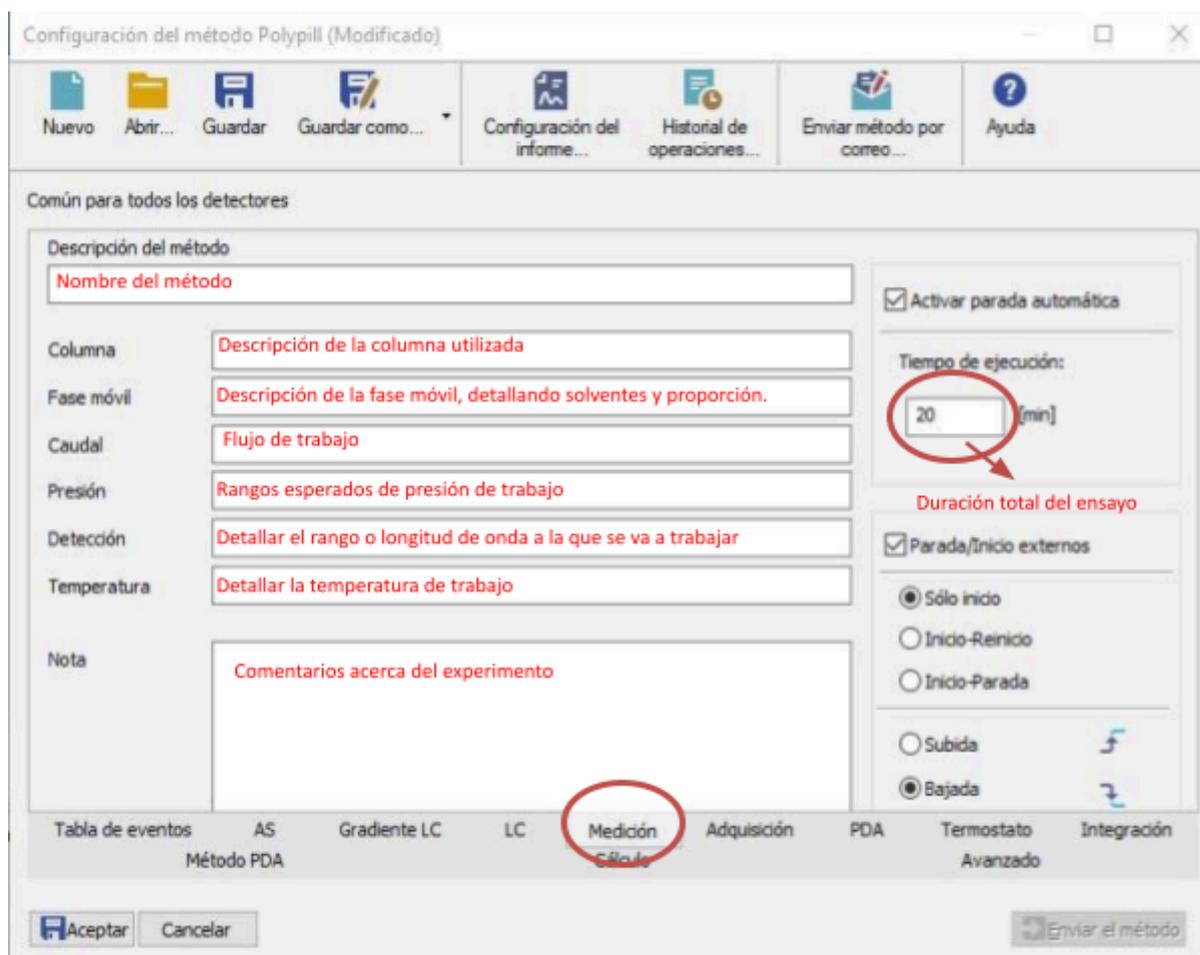
7) **Puesta en cero:** esto se realiza para suprimir la absorción que presenta la fase móvil al rango de longitud de onda en el que se trabaja, para ello debe hacer clic en el botón “**Puesta en cero**” resaltado en rojo en la figura.

8) **Configurar el método que se utilizará:**

Abrir el menú Configuración  y seguir los pasos que se detallan a continuación:

  U N I T E F A	OPERACION Cromatógrafo Líquido de Alta Presión (HPLC) ECOM 2000	INS-HPLC-001 Versión: 0 Vigencia desde: 05/03/2024
ÁREA INFRAESTRUCTURA Y EQUIPAMIENTO	Instructivo	Página 6 de 11

- a. **Pestaña Medición** (circulada en la figura): Se deben detallar todos los parámetros que se van a utilizar en las mediciones. Estos campos se llenan a modo de comentarios para describir el método completamente, ya que éste quedará guardado para futuro uso



Configuración del método Polypill (Modificado)

Nuevo Abrir... Guardar Guardar como... Configuración del informe... Historial de operaciones... Enviar método por correo... Ayuda

Común para todos los detectores

Descripción del método

Nombre del método

Columna Descripción de la columna utilizada

Fase móvil Descripción de la fase móvil, detallando solventes y proporción.

Caudal Flujo de trabajo

Presión Rangos esperados de presión de trabajo

Detección Detallar el rango o longitud de onda a la que se va a trabajar

Temperatura Detallar la temperatura de trabajo

Nota Comentarios acerca del experimento

Activar parada automática

Tiempo de ejecución: 20 [min]

Duración total del ensayo

Parada/Inicio externos

Sólo inicio

Inicio-Reinicio

Inicio-Parada

Subida 5

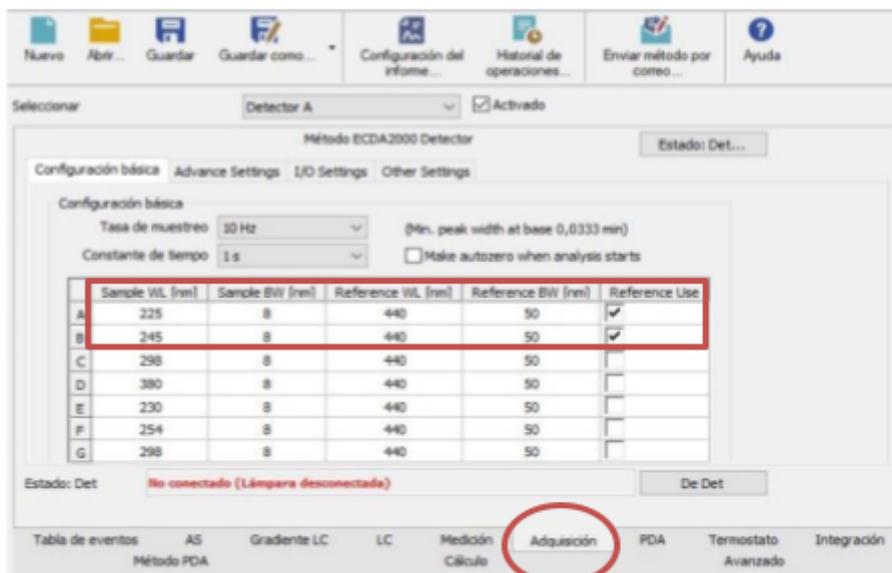
Bajada 2

Tabla de eventos AS Gradiente LC LC Medición Adquisición PDA Termostato Integración

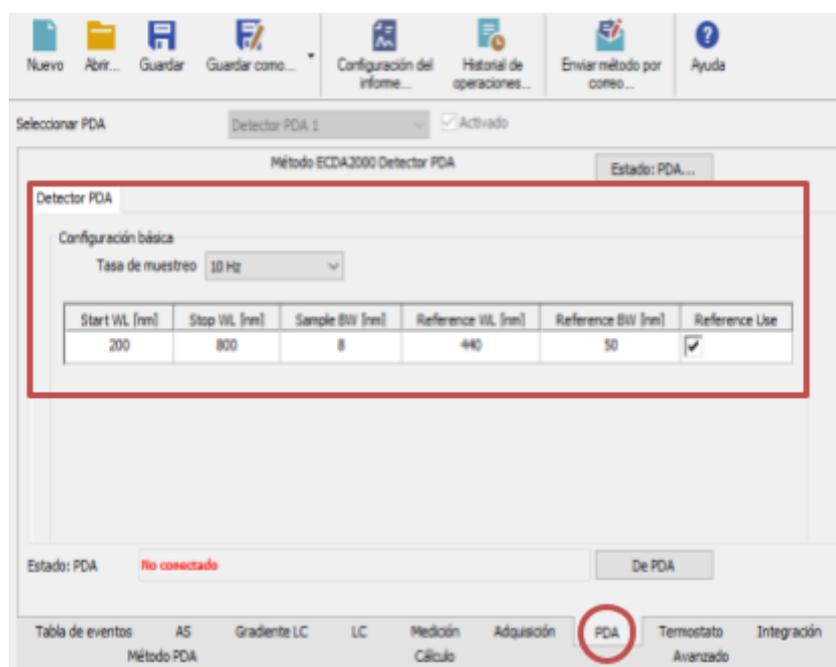
Método PDA Método Avanzado

Aceptar Cancelar Enviar el método

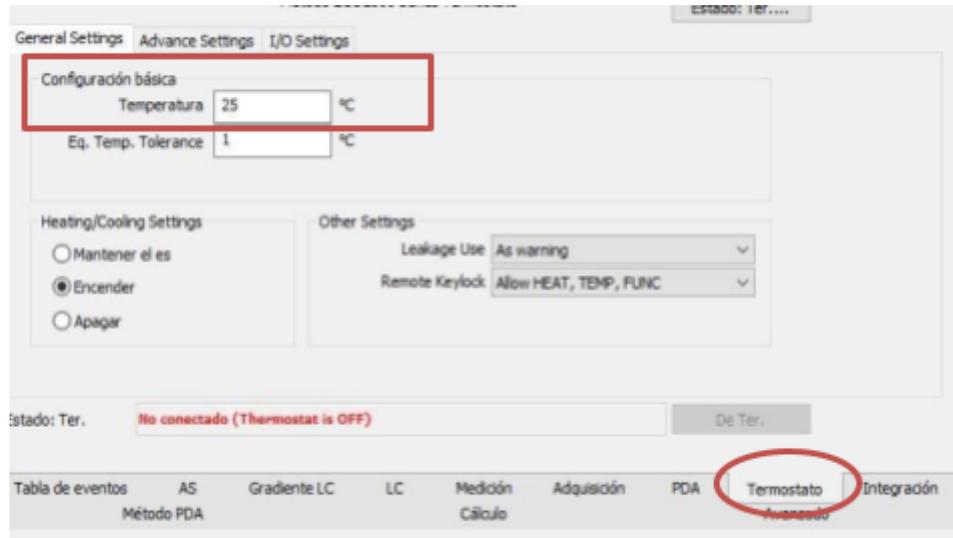
- b. **Adquisición:** Marcar la referencia de longitud onda (máximos de absorción de cada lámpara) que se utilice en el experimento.



- c. **Detector de ordenamiento de fotodiodos (PDA):** Establecer un rango de longitud de onda colocando la longitud de onda inicial y final.



- d. **Termostato:** Setear la temperatura del horno en la que se va a trabajar.



e. **Gradiente:** Si el experimento es isocrático, fijar el flujo y el porcentaje 100% a la bomba que corresponda, es decir si la fase móvil está conectada a la bomba A entonces el porcentaje es 100% en A. En cambio, si el experimento es con gradiente, se debe configurar el flujo de trabajo y el porcentaje de cada bomba que se va a utilizar. Por ejemplo, si nuestro experimento es 50:50 H₂O / MetOH, hay que fijar 50% en la bomba A, que contiene el metanol, y 50% en la bomba B, que contiene el H₂O.

Tiempo [min]	A [%]	B [%]	C [%]	D [%]	Flujo [mL/min]
1	Inicial	100,0	0,0	0,0	0,0
2					

Flujo en espera: 1 mL/min
 Transición a estado de espera: 0 min
 Tiempo de espera: 0 min

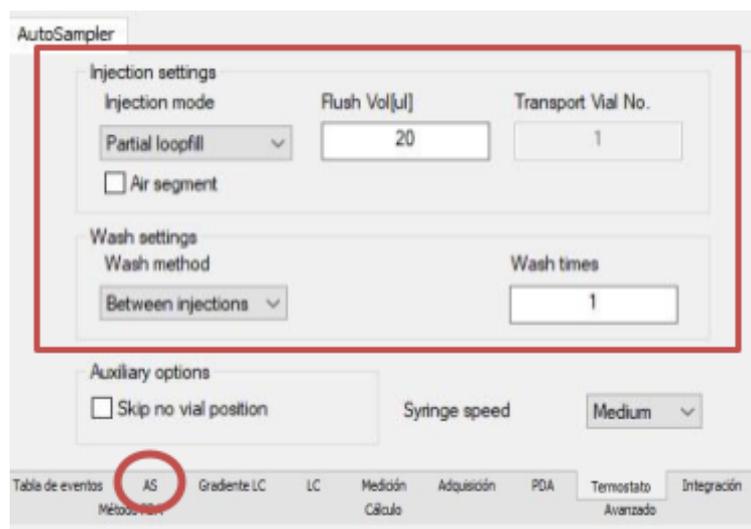
Flujo al terminar los gradientes en la tabla

Tiempo para el cambio gradual desde los últimos valores en la tabla hasta el flujo de espera

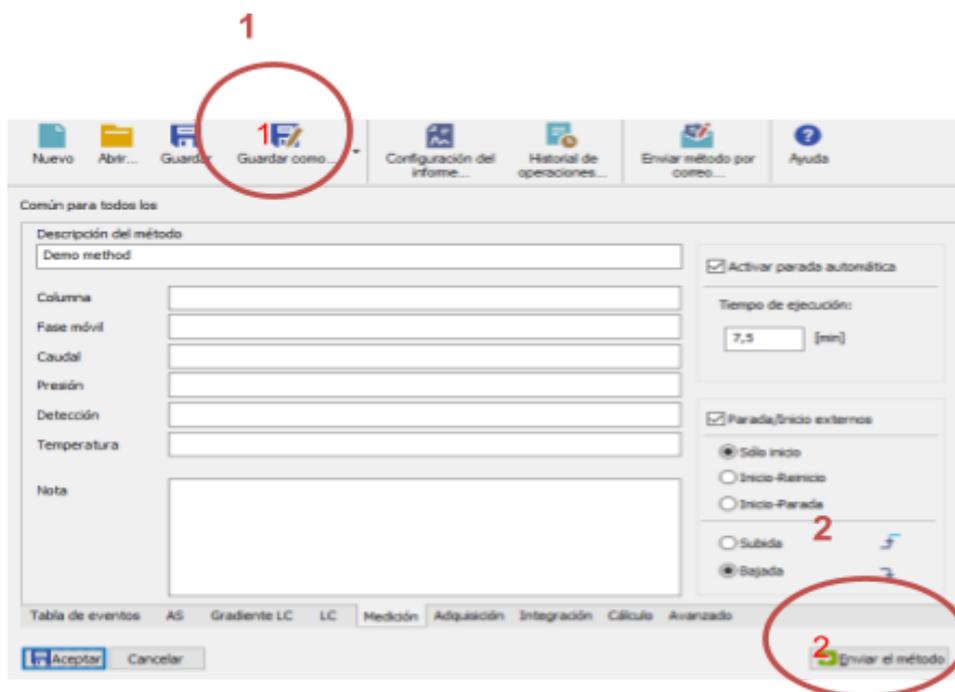
Duración del flujo de espera

  U N I T E F A	OPERACION Cromatógrafo Líquido de Alta Presión (HPLC) ECOM 2000	INS-HPLC-001 Versión: 0 Vigencia desde: 05/03/2024
ÁREA INFRAESTRUCTURA Y EQUIPAMIENTO	Instructivo	Página 9 de 11

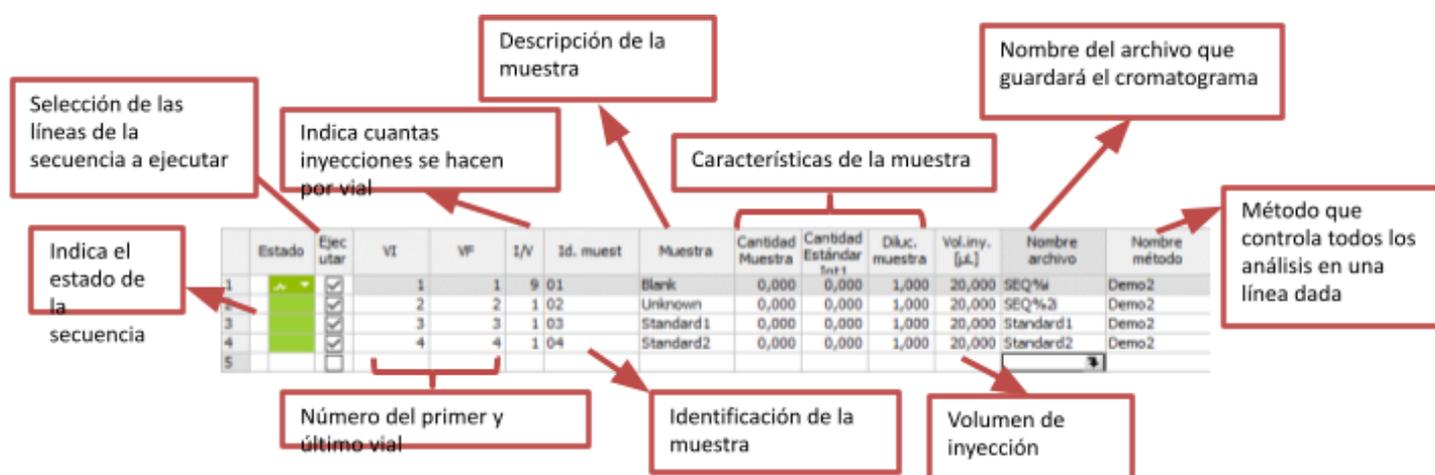
- f. **Autosampler** (pestaña AS): Establecer el volumen de inyección que se requiere. Además, se debe elegir el tipo de lavado del inyector: si se hace entre cada medida (recomendado) o al final de la inyección de todas las muestras.



- 9) **Guardar el método:** Una vez que se haya finalizado la programación del método se debe guardar en la carpeta que desee y posteriormente se debe enviar el método al equipo para que éste tome los parámetros establecidos.



10) Armar la secuencia de inyección: para programar la secuencia de las muestras y los métodos que se van a utilizar, se debe seleccionar la sección *secuencia* del menú principal y se deben completar la tabla con los siguientes contenidos:

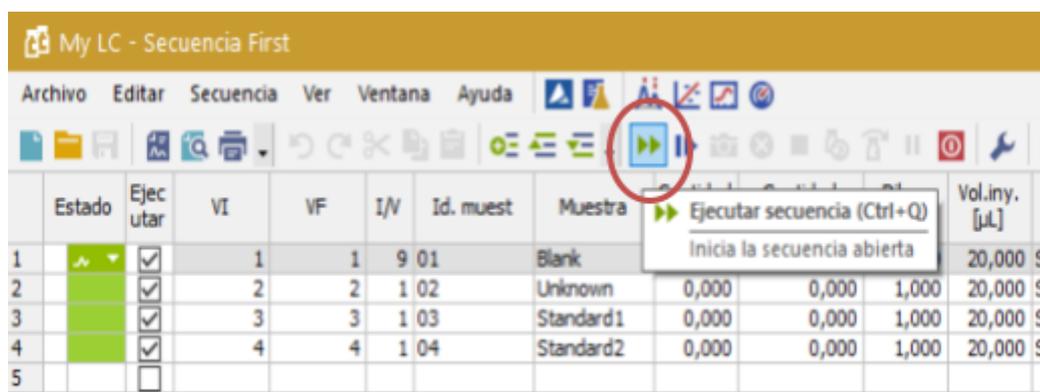


Estado	Ejecutar	VI	VF	I/V	Id. muestr	Muestra	Cantidad Muestra	Cantidad Estándar	Diluc. muestra	Vol.iny. [µL]	Nombre archivo	Nombre método
1	<input checked="" type="checkbox"/>	1	1	9	01	Blank	0,000	0,000	1,000	20,000	SEQ%a	Demo2
2	<input checked="" type="checkbox"/>	2	2	1	02	Unknown	0,000	0,000	1,000	20,000	SEQ%2	Demo2
3	<input checked="" type="checkbox"/>	3	3	1	03	Standard1	0,000	0,000	1,000	20,000	Standard1	Demo2
4	<input checked="" type="checkbox"/>	4	4	1	04	Standard2	0,000	0,000	1,000	20,000	Standard2	Demo2
5	<input type="checkbox"/>											

Estado: En esta columna se indica el estado con un código de colores. La muestra que se encuentra corriendo se colorea en gris, mientras que las que están pendientes aparecerán en verde

VI/VF: para el caso de hacer duplicados/triplicados o más repeticiones de una misma muestra en distintos viales, se consigna en esta columna cual es el primer vial y el último que contienen la muestra citada en esa fila.

11) Ejecutar secuencia: para ejecutar la secuencia se presiona el icono que se encuentra resaltado en la siguiente figura:

My LC - Secuencia First

Archivo Editar Secuencia Ver Ventana Ayuda

Ejecutar secuencia (Ctrl+Q)
Inicia la secuencia abierta

Estado	Ejecutar	VI	VF	I/V	Id. muestr	Muestra	Vol.iny. [µL]
1	<input checked="" type="checkbox"/>	1	1	9	01	Blank	20,000
2	<input checked="" type="checkbox"/>	2	2	1	02	Unknown	20,000
3	<input checked="" type="checkbox"/>	3	3	1	03	Standard1	20,000
4	<input checked="" type="checkbox"/>	4	4	1	04	Standard2	20,000
5	<input type="checkbox"/>						

  U N I T E F A	OPERACION Cromatógrafo Líquido de Alta Presión (HPLC) ECOM 2000	INS-HPLC-001 Versión: 0 Vigencia desde: 05/03/2024
ÁREA INFRAESTRUCTURA Y EQUIPAMIENTO	Instructivo	Página 11 de 11

12) Lavado final: Una vez finalizada la medición se procede a lavar el sistema con Agua MiliQ a un flujo de 0.5mL/min durante 30-40min y luego con una mezcla xx:yy de Agua/Metanol a un flujo de 0.5 mL/min por 30/40 min o más hasta observar que la presión del sistema y la señal de base haya bajado lo suficiente y se hayan estabilizado. Esta etapa de lavado es a fin de regenerar la columna y que quede en la solución de almacenamiento, por lo tanto la mezcla de solventes a utilizar y su proporción (xx:yy) será la indicada por el fabricante y/o el profesor responsable.

13) Apagado: Se debe apagar el HPLC apagando los módulos y autosampler (el orden de apagado es indiferente). Luego se procede a cerrar el programa y apagar la CPU.