FMUSP	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP	CIENCEA E HEMANISMO
Data: 01/07/2018	LABORATÓRIO DE METABOLISMO E LÍPIDES	№: 023 Versão: 04
Proxima revisao: 01/07/2019		Página 1

POP: Cromatografia líquida de alta eficiência

Equipamento: UHPLC Modelo: NexeraX2 Marca: SHIMADZU

A. Objetivo

Separar individualmente os constituintes de uma mistura de substâncias (identificação, quantificação ou obtenção da substância pura).

B. Definição

A cromatografia é um método físico-químico que permite a separação de componentes de uma mistura, através da distribuição destes componentes em duas fases, sendo uma móvel (solvente) e outra estacionária (coluna).

C. Observações importantes

Estas instruções são para uma análise básica. Maiores detalhes devem ser obtidos através dos manuais ou através da tecla F1 (Help) no programa LabSolutions. Como outros programas para Windows, o LabSolutions possui

Elaborado por: Jair	Aprovado por:	1
	Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão	
Revisado por: Priscila Carvalho		

um sistema de ajuda associado ao ponteiro do mouse para botões do programa. Basta deixar o mouse parado sobre o botão que aparecerá o nome do mesmo. Além desse, na janela principal canto inferior lado esquerdo existe uma barra de ajuda. Esta funciona tanto para os botões quanto para os menus.

Outra característica é que uma mesma função pode ser acessada através de vários menus e teclas de atalho. Escolha aquele que lhe for mais prático.

Esta seqüência foi elaborada tendo como base a versão 5.57 do *LabSolution;* podem surgir algumas discrepâncias com outras versões.

O detector usado foi o SPD-M20A. Para outros detectores, verifique o manual do software e do detector para ajustar seus parâmetros. Apenas a janela *Instrument Parameters*, no menu *Method* sofrerá alteração.

O melhor aproveitamento dar-se-á se o usuário repetir os processos aqui descritos. Assim, quando houver necessidade de explanações sobre outras funções do software ele já estará a par dos procedimentos básicos.

Suporte online: http://www.shimadzu.com/LC_VirtualAdvisor



Elaborado por: Jair	Aprovado por:	2
	Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão	
Revisado por: Priscila Carvalho		

D. Operacionalização

Antes de iniciar os procedimentos para qualquer análise, alguns itens devem estar disponíveis:

a)Fase móvel: preparada/filtrada de acordo. Desgaseificada. b)Coluna: instalada no sistema c)Bombas: devem estar purgadas com a fase móvel. d)Padrões/Amostras: preparados e filtrados estando disponíveis para injeção.

Visão Geral do Software

1) Clique duas vezes (botão esquerdo do mouse) no ícone LabSolutions, entre com usuário e senha.



2) A opção "Administration" dá acesso as funções administrativas, sendo as principais opções:

- Security Policy (gerenciamento do sistema)

- User Administration (criar usuários e definir privilégios).

- Log Browser (visualizar os Logs gerados pelo sistema).

- Agent Registration Settings (somente ativado o Class-Agent estiver instalado, software opcional para gerenciamento de dados).

Elaborado por: Jair	Aprovado por:	3
	Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão	
Revisado por: Priscila Carvalho		



Elaborado por: Jair	Aprovado por:	4
	Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão	
Revisado por: Priscila Carvalho		

2) A opção "Instruments" permite acessar o Realtime Analysis para os instrumentos instalados.

Realtime Analysis é a janela onde serão desenvolvidos os métodos e serão feitas as análises.



Elaborado por: Jair	Aprovado por:	5
	Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão	
Revisado por: Priscila Carvalho		

Procedimento para ligar o sistema

- 1) Ligar o HPLC sendo a CBM-20A (SCL-10Avp) por último.
- 2) Ligar o computador e o monitor. Entrar no programa *LabSolutions*.
- 3) Entrar com o usuário e a senha.
- 4) Selecionar o instrumento.
- 5) Esperar o programa carregar e a CBM (SCL) apitar.

Procedimento para desligar o sistema

- 1) Fechar a janela do instrumento e esperar a CBM (SCL) apitar.
- 2) Desligar o HPLC sendo a CBM (SCL) primeiro.
- 3) Fechar o programa *LabSolutions*.
- 4) Fechar o Windows.
- 5) Desligar o computador e o monitor.

PARA EFETUAR ANÁLISE

CRIAÇÃO/ALTERAÇÃO DE UM MÉTODO

Selecione inicialmente a pasta de trabalho (File > Select Project(Folder)). Para evitar confusões futuras em relação onde os arquivos foram salvos, *salve os arquivos de método junto com os arquivos de cromatograma e batch.*

Elaborado por: Jair	Aprovado por:	6
	Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão	
Revisado por: Priscila Carvalho		

<u>I</u> F	Realti	ime Analysis (LB-383-Executor) - [Da	ata Acquisition - repetibilidade.lcm, Gradiente CD.lcd]
<u>1</u>	<u>F</u> ile	<u>E</u> dit <u>V</u> iew <u>M</u> ethod <u>I</u> nstrument	<u>A</u> cquisition <u>D</u> ata <u>T</u> ools <u>W</u> indow <u>H</u> elp
		New Method File Ctrl+N	🔲 🤈 🗖 🔊 🗇 🖓 🖌 🏹 🕅
	12	Open Method File Ctrl+O	
	1	Close Method File	
A		Save Method File Ctrl+S	
	*	Save Method File <u>A</u> s	
	Ę,	Save Method File As <u>T</u> emplate	
	5	Load Method Parameters	
	2	Open Reference Data File	
		Close <u>R</u> eference Data File	•
		Select Project(Folder)	
	墨	File Searc <u>h</u>	
	ß	Audit Trail <u>L</u> og	
		Select Acquisition Printer	
	4	Print Setup	
		Print Method File	•
	23	Method File Properties	
		<u>1</u> repetibilidade	
		2 Grad AB	
D		3 Grad CD	
		<u>4</u> Desvio	
		Exit Alt+F4	

Quando se entra no programa ele sempre carrega o último método usado. Entrar em File e escolher método ou criar um novo.

Elaborado por: Jair	Aprovado por:	7
	Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão	
Revisado por: Priscila Carvalho		

Criar um novo método: **File>New Method File** Ou abrir um já existente: **File>Open Method File**.

Pile Edit Yiew Method Instrument Acquisition Data Tools Window Help New Method File Ctrl+N Pile P	<u>73</u> F	Realti	ime Analysis (LB-383-Executor) - [Data	Acquisition - repetibilidade.lcm, Gradiente CD.lcd]
New Method File Ctrl+N Open Method File Ctrl+O Close Method File E Save Method File E Save Method File As E Open Reference Data File E Close Reference Data File h Select Project(Folder) File Search Audit Trail Log Select Acguisition Printer Print Setup Print Method File Method File Properties I I repetibilidade Grad AB Grad CD Desvio	2	<u>F</u> ile	<u>E</u> dit <u>V</u> iew <u>M</u> ethod <u>I</u> nstrument <u>A</u>	cquisition <u>D</u> ata <u>T</u> ools <u>W</u> indow <u>H</u> elp
Open Method File Ctrl+O Close Method File Save Method File Save Method File Save Method File As Save Method File As Save Method File As Save Method File As Save Method File As Save Method File As Save Method File As Save Method File As Template Dodo Method Parameters Open Reference Data File Dodo min Ch1(254nm,4nm):0mAU Open Reference Data File			New Method File Ctrl+N	II 2 IS 0 0 D 2 IM % I
Close Method File Image: Close Method File Save Method File As Save Method File As Open Reference Data File Save Method File As Close Reference Data File Note Close Reference Data File Close Reference Data File Note Close Reference Data File File Search Select Acguisition Printer Select Acguisition Printer Select Acguisition Printer Print Setup Print Method File Print Method File Note Close Reference Method File Properties Note Close Reference I repetibilidade Grad AB Grad AB Grad CD A Desvio Method File	_	1	Open Method File Ctrl+O	
A Save Method File Ctrl+S Save Method File As Save Method File As Save Method File As Iemplate 0,00 min Ch1(254nm,4nm):0mAU Image: Save Method File As Implate 0,00 min Ch1(254nm,4nm):0mAU Image: Save Method File 1 Image:		1	Close Method File	-t
Save Method File As Save Method File As Template Load Method Parameters Open Reference Data File Close Reference Data File Select Project(Folder) File Search Select Acguisition Printer Print Setup Print Method File Print Method File Method File Properties 1 repetibilidade 2 Grad AB 3 Grad CD 4 Desvio	A	B	Save Method File Ctrl+S	<u> </u>
Save Method File As Template Load Method Parameters Open Reference Data File Close Reference Data File Select Project(Folder) File Search Audit Trail Log Select Acguisition Printer Print Setup Print Method File Print Method File I repetibilidade 2 Grad AB 3 Grad CD 4 Desvio		*	Save Method File <u>A</u> s	
Image: Destine in the second seco		Ð	Save Method File As <u>T</u> emplate	
Open Reference Data File Close Reference Data File Select Project(Folder) Select Project(Folder) File Search Audit Trail Log Select Acquisition Printer Print Setup Print Method File Print Method File I repetibilidade 2 Grad AB 3 Grad CD 4 Desvio		₽	Load Method Parameters	0.00 min Ch1(254nm.4nm):0mAU
Close <u>R</u> eference Data File		2	Open Reference Data File	
Select Project(Folder) File Search Audit Trail Log Select Acquisition Printer Print Setup Print Method File Method File Properties 1 repetibilidade 2 Grad AB 3 Grad CD 4 Desvio			Close <u>R</u> eference Data File	n
File Search Audit Trail Log Select Acquisition Printer Print Setup Print Method File Method File Properties 1 repetibilidade 2 Grad AB 3 Grad CD 4 Desvio			Select Project(Folder)	
Audit Trail Log Select Acquisition Printer Print Setup Print Method File Method File Properties 1 repetibilidade 2 Grad AB 3 Grad CD 4 Desvio		墨	File Searc <u>h</u>	
Select Acquisition Printer Print Setup Print Method File Method File Properties I repetibilidade 2 Grad AB 3 Grad CD 4 Desvio		ß	Audit Trail <u>L</u> og	
 Print Setup Print Method File Method File Properties 1 repetibilidade 2 Grad AB 3 Grad CD 4 Desvio 			Select Acquisition Printer	
Print Method File Method File Properties 1 repetibilidade 2 Grad AB 3 Grad CD 4 Desvio		-	Print Set <u>u</u> p	
Method File Properties 1 repetibilidade 2 Grad AB 3 Grad CD 4 Desvio			Print Method File	
1 repetibilidade 2 Grad AB 3 Grad CD 4 Desvio		C3	Method File Properties	1
2 Grad AB 2 Grad CD 4 Desvio			1 repetibilidade	-
D: <u>3</u> Grad CD <u>4</u> Desvio			2 Grad AB	
4 Desvio	п		3 Grad CD	
			<u>4</u> Desvio	
E <u>x</u> it Alt+F4			Exit Alt+F4	

No Assistant Bar, clique em **Data Acquisition** e depois em **Instrument Parameters**.

Em seguida clique em Advanced uma janela com as seguintes fichas abrirá:

- **Data Acquisition**
- **⇒** LC Time Prog.
- Pump
- **PDA** (Detector A)
- **Column Oven**
- Controller
- **S** Autosampler
- **Auto Purge**

Elaborado por: Jair	Aprovado por:	8
	Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão	
Revisado por: Priscila Carvalho		

Instrument Para	amel	ers View		Norma	al Adva	anced	End	Time : 60.	00	min	🔁 Download
Data Acquisition	LC	Time Prog.	Pump	PDA	Column	Oven	Controller	Autosamp	ler	AutoPurge	
LC Time Progra	m										<u>^</u>
LC Stop Time:		4,00	min								
Apply to A	All a	cquisition tin	ie								
Acquisition T	Time	(PDA)									
Sampling:	0	1,5625	✓ Hz								
	۲	640	msec								
Start Time:		0,00	min								
End Time:		60,00	min								
Time Constant:		0,640	 sec 								
Max Acquisition Time:		702,94	min								
											-
y Data Acquisi											

Pump

Escolher o modo de operação da bomba(s). (Isocratic Flow, Gradiente ou Low Pressure Gradiente).

No caso de haver mais de uma bomba, escolha modo gradiente, mesmo que para efetuar uma análise isocrática. Basta não criar a tabela para gradiente em LC Time Program.

Coloque o fluxo. Coloque o valor para pressão máxima e pressão mínima do sistema.

Data Acquisition

No item **LC Time Program>LC Stop Time** coloque o tempo total de análise (tempo de programação), caso a análise seja isocrática clique em **Apply to all aquisition time** para que o mesmo tempo seja aplicado para o tempo de aquisição dos detectores.

Ativar Acquisition Time. Clicar no quadrado deste quadro.

Sampling: ajusta a velocidade de amostragem do sinal do detector pelo micro. O valor ótimo é aquele que executa mais de 20 pontos no mais estreito pico que se deseja analisar. *Inicialmente escolha 1,5625Hz para o PDA e 2 Hz para o SPD*.

End time: colocar o tempo de aquisição de dados do detector. É *o tempo da análise*.

Start Time: colocar o tempo que o programa espera para começar a gravar os dados do detector após o início da análise. *Geralmente zero*.

Time Constant: (presente somente no PDA) colocar o valor respectivo em segundos relativo ao item **Sampling**.

CTime Prog.

Nesta ficha definem-se parâmetros que serão modificados durante a análise. É nesta ficha que se faz a programação do gradiente para as bombas.

Time: coloca-se o tempo (contado a partir do início da análise) em que o parâmetro será modificado.

Module: escolhe-se o módulo cujo parâmetro será modificado.

Elaborado por: Jair	Aprovado por:	9
	Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão	
Revisado por: Priscila Carvalho		

Command: escolhe-se o parâmetro a ser modificado.

Value: coloca-se, se necessário, o novo valor para esse parâmetro.

Comment: escreve-se algum comentário sobre essa ação. Não é obrigatório.

Clique em **Draw curve** para visualizar em forma de gráfico os parâmetros alterados no tabela **do LCTime Prog**.

Em **Load Data** é possível selecionar um arquivo de cromatograma para visualizar com o item **Draw curve**.

PDA (Detector A)

Lamp: escolha a lâmpada que será utilizada (D2, W ou as duas). Esta escolha deve estar de acordo com o intervalo de comprimento de onda a ser utilizado em *Wavelength* (nos detctores SPD-20A ou SPD-20AV escolha entre D2 e W de acordo com os comprimentos de onda estabelecidos em *Wavelength Ch1 e Ch2*.

Polarity: escolher a polaridade do sinal (inverte o sinal de saída).

Response é parecido com **Sampling**, só que neste caso é a freqüência de amostragem que o detector faz na cela de amostra. Usam-se valores entre 0,5 s e 1 s (ajustes 3 e 4, respectivamente).

Output escolha unidade Volts ou AU, sugestão: AU.

Auxiliary range selectione o fundo de escala do detector. Usualmente trabalha-se com um fundo de escala menor do que 1 Abs/V.

Cell Temperature habilite e configure a temperatura da cela, no caso dos detectores da série 20A.

Slit Width (SPD-M20A) escolha entre 1,2 ou 8 nm. Utilizando-se 8 nm há um ganho na sensibilidade em degradação da resolução. Só é recomendado utilizar 8 nm quando a amostra a ser analisada esta em baixa concentração.

Column Oven (se houver)

Habilite o aquecimento do forno em **Enable Oven** e em **Oven Temperature** coloque a temperatura para aquecimento. Defina a temperatura máxima em **Maximum temperature** (ver manual da coluna).

Controller

O item **Power on** é para a Option Box. *Desabilite*. Os itens **Event 1, 2, 3 e 4** estão relacionados com os relês de eventos.

Autosampler (se houver)

Clique em AutoSampler para habilitar o auto-injetor e peça para detectar o rack clicando em Detect Rack.

Auto Purge (não é obrigatório preencher)

Para os modelos da série 20 defina a fase móvel, o auto-injetor e o tempo que deseja realizar o Auto Purge.

Após ajustar os parâmetros nas fichas da janela Instrument Parameters,

Elaborado por: Jair	Aprovado por: Prof. Dr. Baul Cavalcante Maranhão	10
Revisado por: Priscila Carvalho		

clicar em File>Save Method File e salvar o método.

Clique em 🔁 Download

para transferir as informações do método para os módulos.

Para os modelos da série 20 pode-se executar a Auto Purge clicando em

1U

Para evitar uma mudança brusca de pressão, que diminui a vida útil da coluna, altere o fluxo para 0,2 ml/min no Instrument Monitor, coluna Setting, e tecle enter, aguarde a alteração ocorrer.

Ative o instrumento em Instrument On/Off .	1
Allye o instrumento em instrument On/O .	

Vá aumentando o fluxo em incrementos de 0,2 até o fluxo desejado.

Para Verificar a Linha de Base

Antes de iniciar-se uma análise é necessário ver se a linha de base está estável, verifique se o fluxo está no valor de análise e a pressão estável.

A linha de base é mostrada automaticamente, exceto com PDA.

Clicar em Aquisition > Start Plot para monitoração da linha de base (PDA).



Elaborado por: Jair	Aprovado por: Prof. Dr. Baul Cavalcante Maranhão	11
Revisado por: Priscila Carvalho		

A estabilidade da linha de base depende de vários fatores (estado da fase móvel, tipo de detector, estado da coluna, temperatura do ambiente, rede elétrica, interferência eletromagnética etc.).

Para "zerar" a linha de base clique em	PD/
1	

Para terminar a visualização clicar em Aquisition > Stop Plot.

Iniciando	a Aquisição de uma Análise	

<u>Análise única (uma injeção)</u>

Com a amostra pronta para ser injetada e uma linha de base satisfatória, clique em **Aquisition > Single Run**. Aparecerá a seguinte janela:

Single Run					X
Acquisition Information Sample Name: Sample ID:					
				Option	
Method File:	Desvio.lcm				
Data File:	Create into:	C:\LabSol	utions\Data\Qua	lificação\Fev 201	4
	Gradiente (CD.lcd			F
	Auto-Inc	rement:	1, 2,	-	
Report:					2
Data Comment:					* *
	•			ŀ	
Sampler					_
Vial#:	-1		Tray:		
Injection Volume:	1	uL			
Advanced >>		ОК	Cancel	Help	•

Os itens **Sample Name** e **Sample ID** são campos de texto. Coloque a identificação da amostra.

Method File: especifica qual será o arquivo método que será utilizado para a aquisição/processamento. Este campo vem preenchido com o nome do método que já está aberto.

Elaborado por: Jair	Aprovado por:	12
	Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão	
Revisado por: Priscila Carvalho		

Data File: escrever o nome do arquivo que será salvo a análise.

Selecione Auto Increment se desejar que o software numere automaticamente o próximo Data File.

Report é utilizada para habilitar e selecionar o modelo de relatório para impressão logo após a análise.

Data Comment: escreve-se algum comentário sobre a análise. Não é obrigatório.

O campo **Sampler** só é utilizado se existir um auto-injetor no sistema.

Vial#: coloque o numero da posição do vial no rack do auto-injetor.

Injection Volume: coloque o volume que vai ser injetado para análise.

Tray#: alguns auto-injetores possuem dois racks (esquerdo e direito), coloque o numero relativo ao lado que o vial com a amostra esta.

Advanced: ao clicar em Advanced aparecerão duas sessões novas:

l	Other Handlings				
l	Background Data File:				
I	Quantitative				
I	Type: Unknown			Calibration Level:	0
l	ISTD Amount #1:	1		Sample Amount:	1
	Dilution Factor:	1			
	Advanced <<		ОК	Cancel	Help

Other Handlings > Background Data File: escolha um arquivo de cromatograma cujo perfil será descontado do cromatograma adquirido.

A principal aplicação é corrigir um desvio de linha de base causado pelo gradiente.

Quantitation é utilizado para gerar pontos para uma curva de calibração e valores para quantificação.

Type: escolha o tipo de amostra que esta injetando (Padrão ou amostra desconhecida).

Calibration Level : Coloque o número correspondente ao ponto da curva de calibração. **ISTD Amount#1**: Coloque a concentração do padrão interno, caso esteja utilizando o método de quantificação padrão interno.

Dilution Factor: coloque o valor que será multiplicado na concentração obtida na quantificação.

Sample Amount: quantidade de amostra, a concentração será dividida por este valor. OBS. Para deixar desabilitado, Dilution Factor e Sample Amount use o valor 1 (padrão) pois não há como desabilitar estas operações.

Sugestão: realize quantificação posteriormente a análise em "Postrun".

Clicar em **OK** para início da análise.

Elaborado por: Jair	Aprovado por:	13
	Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão	
Revisado por: Priscila Carvalho		

Para parar a análise basta clicar em Aquisition > Stop.

Para estender o tempo de análise basta clicar em Acquisition > Change Analysis Time.

冯 Realtime Analysi	s (LB-383-Executor) - [D	ata A	cquisition - Des	vio.lcm(Read or	nly), Teste	e1.lcd]	
<u> F</u> ile <u>E</u> dit <u>V</u> iew	<u>M</u> ethod <u>I</u> nstrument	<u>A</u> cq	uisition <u>D</u> ata	<u>T</u> ools <u>W</u> indow	<u>H</u> elp	_	
	Q 🖥 🐺 🔲 🖬	() () ()	<u>S</u> ingle Run Sample <u>I</u> nform	ation		y # @ 🕅 🚆 🕯	a <u>k</u> a ?
Main	LC <mark>Running</mark> PD	Ð	Change Acquis	ition Time			
Acquisition	Sample Name : Sample ID :	-	Show Batch Qu	eue		_	
	LC PDA ALL		Download Instr	ument Paramet	ers	_	
Parameters	PDA Running Time: 0,2		Start Plo <u>t</u> Stop <u>P</u> lot			.nm):0mAU	
\otimes	1000 Ch1 250nn Ch2 600nn	n,4nm n,4nm					
Start Single Run	750						
🦁 Stop	500						
Snapshot	250						
Data Analysis							
	0,0		2,5	5,0		7,5	10,0

Após o término da análise o arquivo da análise (arquivo de dados ou arquivo do cromatograma) estará salvo e processado de acordo com os parâmetros do método utilizado.

Seqüência de análises (Batch)

Executar uma seqüência de análises é executar várias análises simples, uma após a outra. Para isso deve-se preparar uma tabela que representa várias janelas de **Single Run** colocadas linha a linha.

Na barra de tarefas Assistant Bar clique em Realtime Batch.

Elaborado por: Jair	Aprovado por:	14
	Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão	
Revisado por: Priscila Carvalho		



Aparecerá a tabela de injeções que foi utilizada anteriormente. Clique em **File>New Batch File** para gerar uma tabela nova.

Os campos da tabela nova podem ser preenchidos manualmente ou utilizando Wizard.

Elaborado por: Jair	Aprovado por:	15
	Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão	
Revisado por: Priscila Carvalho		

0	Realt	time Analysis (LB-383-Executor) - [R	Realtime Batch - D	lesvio.lcb]							×
14	File	<u>E</u> dit <u>V</u> iew Instrument <u>B</u> atch]	Tools <u>W</u> indow <u>I</u>	<u>H</u> elp						-	- B X
		New Batch File Ctrl+N	2 2 2	B 1	1 I		00 📾 🖌	5 (Q 🖂 🖬 🗛 15	? 🗊	.	1 @ P
-	1	Open Batch File Ctrl+O									
	P	Close Batch File	ata \Qualificação \	Fev 2014	Comple ID	Sample Time	Mathed File	Data Filo	Lovol#	lai Volumo	Pape
		Save Batch File Ctrl+S	1	Sample Name	Sample ID	0:Unknown	Desvio.lcm	Desvio003.lcd	0	10	перс
Re		Save Batch As Template	-								
		Select Project(Folder)	-								
١.		File Search	-								
1	ß	Audit Trail Log	-								
		Select Acguisition Printer									
	-	Print Setup									
1		Print Batch Table	_								
		Batch File Properties	_								
		1 C:\LabSolutions\\Desvio									
			-								
R	eaium	Exit Alt+F4									
	i i										
	Batch	Queue									
1											
	Edit 1	Table/									
	ne										•
		🗾 🛃 Data Acquis 🏄 F	Realtime B								
Cre	ate a	new batch file.							C: 213GB F	ree NUM	

Configuração Manual

Quando a tabela de injeções for preenchida manualmente os itens abaixo devem ser preenchidos linha por linha.

Vial#/ Tray Name: Digite a posição do Rack e do vial da amostra que será analisada. Sample Name e Sample ID: são campos de texto. Coloque a identificação da amostra. Sample type: Selecione um tipo de amostra.

"Standard" para um padrão utilizado para criar uma curva de calibração. No primeiro padrão utilizado para criar uma curva de calibração, habilite a opção "Initialize Calibration Curve".

"Unknown" para uma amostra utilizada para análise quantitativa.

Sugestão: realize quantificação posteriormente à análise em "Postrun".

Method file: Selecione o arquivo de método utilizado para análise.

Data File: Digite o nome para os dados que serão adquiridos. Se não for especificada a pasta do arquivo, os dados serão criados em uma pasta de projeto de referência.

Level#: Selecione o nível de concentração do padrão (como no Sample Login) e das amostras QA/QC.

Inj. Volume: Digite o volume de amostra injetada em unidades de µL.

Report output: Selecione para que o relatório de resultado de análise seja impresso automaticamente.

Report Format File: Selecione o formato de relatório que será utilizado.

Data Comment: escreve-se algum comentário sobre a análise.

Utilizando o "Wizard"

Clique em Wizard na barra de tarefas Assistant bar.

Elaborado por: Jair	Aprovado por:	16
	Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão	
Revisado por: Priscila Carvalho		



Aparecerá uma janela (figura a seguir) que pedirá os dados inicias para preenchimento da tabela.

Elaborado por: Jair	Aprovado por:	17
	Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão	
Revisado por: Priscila Carvalho		

Na primeira janela preencha os seguintes campos:

Batch table: selecione **New** (a opção **Append** é usada quando se quer adicionar linhas a um Batch já existente).

Method File: especifique qual será o arquivo de método que será utilizado para a aquisição e processamento (ou reprocessamento) das análises. Este campo vem preenchido com o nome do método que já está aberto. Caso queira trocá-lo clicar no botão "abrindo pasta" que está ao lado. *Neste caso manter o nome que está*.

Injection volume: defina o volume de injeção.

Number of Sample Groups (número de grupos de amostras) com o valor 1, pois, na maioria das vezes, usa-se um só grupo. Selecione **Unknown** se vai realizar a construção da curva de calibração posteriormente.

Clique em Avançar.

Elaborado por: Jair	Aprovado por: Prof. Dr. Baul Cavalcante Maranhão	18
Revisado por: Priscila Carvalho		

Na segunda janela preencha os seguintes campos: Sample Name. Sample ID. Data File Name. Number of Unknown Vials in each Group: número de vials a serem injetados. Repetitions per Run: replicatas por vial. Tray: digite em qual rack os vials estão posicionados. Vial #: selecione o vial inicial.

Clique em Avançar.

Elaborado por: Jair	Aprovado por:	19
	Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão	
Revisado por: Priscila Carvalho		

Batch Table Wizard - Sum	mary Report	X	ſ
	QA/QC Print Summary Report Summary Report Format File:		
	Analysis		
	③ Standard Samples	🔘 Unknown Samples	
	Summarize per each Group	 Summarize of All Samples 	
	Summary Report Format File:		

Na terceira janela clique em Avançar.

Batch Table Wizard - Other Set	tings	X
	Auto Conditioning	Set the startup method and pumping period. Please set the start date and time in the batch settings.
	🕅 AutoPurge	Perform AutoPurge using the specified parameters in method.
	Baseline Check	
	(Acquire)	
	Shutdown	Set the shutdown method and cool down time.

Na quarta janela clique em Avançar.

Elaborado por: Jair	Aprovado por:	20
	Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão	
Revisado por: Priscila Carvalho		

Batch Table Wizard - Save	Batch File	X
	Batch File Save Batch File Batch File Name:	

Na quinta e ultima janela, entre com o nome de arquivo do Batch e clique em Concluir.

Edite se for necessário o campo **Data File**, ou outros, na tabela de injeções e salve o batch em **File > Save Batch File**.

Sample Type	Method File	Data File	Level#
0:Unknown	Desvio.lcm	Arquivo-001.lcd	0
0:Unknown	Desvio.lcm	Arquivo-002.lcd	0
0:Unknown	Desvio.lcm	Arquivo-003.lcd	0
0:Unknown	Desvio.lcm	Arquivo-004.lcd	0
0:Unknown	Desvio.lcm	Arquivo-005.lcd	0



Clique em Start Realtime Batch

para iniciar o Batch.



Clique em Edit Table/Restart

para editar a tabela.

Depois da edição, clique novamente em Edit Table/Restart para dar seqüência no Batch.

Elaborado por: Jair	Aprovado por:	21
	Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão	
Revisado por: Priscila Carvalho		

Para selecionar o comprimento de onda que deseja visualizar (PDA) durante a aquisição dos dados, clique com o botão da direita do mouse em cima da tela do cromatograma e selecione **Display Settings**. Na janela que aparecer digite o comprimento de onda desejado, ou clique em **Obtain from Data Processing Parameters.**

Wave Viev	length: w Size:	190 - 8 Contour	00 nm A	bsorbance: 0	- 100	0 mAU UV Spectrum
Chro	omatogra	m			Base Shift	
	Charry		Manual and A	O (Overlay 🔘	Stack
Ch#	View	Туре	[nm]	+/-[nm]	tion	
1	V	Absorbanc	250	4	1.00	
2	V	Absorbanc	600	4	1,00	
3		Absorbanc	254	4	1,00	
4		Absorbanc	254	4	1,00	
5		Absorbanc	254	4	1,00	
6		Absorbanc	254	4	1,00	
7		Absorbanc	254	4	1,00	
8		Absorbanc	254	4	1,00	
9		Absorbanc	254	4	1,00	
10		Absorbanc	254	4	1,00	Apply to Data
11		Absorbanc	254	4	1,00	Processing Parameters
12		Absorbanc	254	4	1,00	
13		Absorbanc	254	4	1,00	
14		Absorbanc	254	4	1,00	Obtain from Data Processing Parameters
15		Absorbanc	254	4	1,00	Frocessing Farameters
Intensit Char	y Range: nnel All		-100 - :	1000 m	AU -	Normalize

Para os outros modelos de detectores não é necessário este passo.

Elaborado por: Jair	Aprovado por:	22
	Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão	
Revisado por: Priscila Carvalho		

Para ajustar a altura do cromatograma para o maior pico clique com o botão direito do mouse em cima da tela do cromatograma e selecione **Normalize**.



Para visualizar no **Post Run** e obter os valores do cromatograma que está sendo adquirido, clique no ícone **SnapShot** que aparecerá na barra de ferramentas **Assistant Bar** durante a aquisição.

Durante a aquisição é possível sobrepor cromatogramas já adquiridos, clicando em **File** > **Open Reference Data File**. Selecione o arquivo do cromatograma e o canal. Para finalizar a sobreposição clique em **File** > **Close Reference Data File**.

Elaborado por: Jair	Aprovado por:	23
	Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão	
Revisado por: Priscila Carvalho		

<u>F</u> ile	<u>E</u> dit	<u>V</u> iew	<u>M</u> ethod	Instrument	<u>A</u> co
	New	Metho	d File	Ctrl+N	
3	<u>O</u> pen	Meth	od File	Ctrl+O	
٢	<u>C</u> lose	Meth	od File		
	Save	Metho	d File	Ctrl+S	
袀	Save	Metho	d File <u>A</u> s		
暇	Save	Metho	d File As <u>T</u>	emplate	
驟	Load	<u>M</u> etho	d Parame	ters	
1	Open	Re <u>f</u> ere	ence Data	File	
	Close	<u>R</u> efere	ence Data	File	•
	Select	t Proje	ct(Folder).		
35	File S	earc <u>h</u>			
C	Audit	Trail <u>L</u>	<u>.</u> og		
	Select	t Ac <u>q</u> u	isition Prir	nter	
4	Print	Set <u>u</u> p.			
	Pr <u>i</u> nt	Metho	d File		•
	Meth	od File	<u>P</u> ropertie	s	
	<u>1</u> Test	te			
	<u>2</u> Des	vio			
	<u>3</u> rep	etibilid	ade		
	4 Gra	d AB			
	Exit			Alt+F4	

ANÁLISE QUANTITATIVA E QUALITATIVA

INTEGRAÇÃO E CURVA DE CALIBRAÇÃO

Para acertar os parâmetros de integração e construir curva de calibração dos dados já obtidos entre em **Postrun**, selecione a opção **Postrun** na janela principal do programa **LC-Solution**, depois clique no ícone



Em seguida clique nos ícones **Data Analysis** ou **PDA Data Analysis** (Assistant Bar) dependendo do detector utilizado para a análise.

Elaborado por: Jair	Aprovado por:	24
	Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão	
Revisado por: Priscila Carvalho		



Abrir o Data Explorer clicando em **View > Data Explorer**.

Elaborado por: Jair	Aprovado por:	25
	Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão	
Revisado por: Priscila Carvalho		



Selecione em **Folder:** a pasta onde foram armazenados os dados de interesse. Clique na ficha referente aos dados (cromatogramas) e depois clique duas vezes no arquivo referente a um dos pontos da curva de calibração.

Se o detector utilizado for **PDA**, selecione **Multi Chrom**, nas fichas, inferior direito, o comprimento de onda de interesse (figura a seguir).

Elaborado por: Jair	Aprovado por:	26
	Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão	
Revisado por: Priscila Carvalho		

ulti Chro	m Integ	gration Io	dentification	Quantitati	ve Compound	Group	Performance	UV Spectrum	Library	Pur
Ch#	Disp- lay	Тур	e Wa	velength (nm)	Bandwidth +/-(nm)	Magnif catior	i- 1			
1	v	Absorba	nce	254	4	1,00				
2		Absorba	nce	254	4	1,00	Ref	erence Correcti	on	
3		Absorba	nce	254	4	1,00	Def	Wayalanathy [250	
4		Absorba	nce	254	4	1,00	Rei,	wavelengun:	550	
5		Absorba	nce	254	4	1,00	Daf	Bandwidth:	20	DD0
6		Absorba	nce	254	4	1,00		Dallawiddir.		
7		Absorba	nce	254	4	1,00				
8		Absorba	nce	254	4	1,00	✓ Displa	ay Extracted Ch	romatogra	am
9		Absorba	nce	254	4	1,00	Extrac	tion Settinas —		
10		Absorba	nce	254	4	1,00			_	
11		Absorba	nce	254	4	1,00	(@) Ab	sorbance	Derivativ	/e
12		Absorba	nce	254	4	1,00	Band	width:	1	nm
13		Absorba	nce	254	4	1,00				
14		Absorba	nce	254	4	1,00				
15		Absorba	nce	254	4	1,00	NA===	ification.	1	
16		Absorba	nce	254	4	1.00	I*lagr	incation:	1	



para começar a definir os

Na barra de tarefas (**Assistant Bar**) clique no ícone parâmetros de integração e curva de calibração.

Na janela **Compound Table Wizard 1/5** selecione em **Channel** o(s) comprimento(s) de onda de interesse.

This wizard automatical table will be replaced w On this page, please se	ly creates a compou ith the new one cre t the peak processio	ind table. Pl ated by this ng paramete	ease note t wizard. rs for peak	that the current compound
	Channel:	Ch1 254nm		•
	Width:	5	sec	Copy to All Channels
	Slope:	1000	uV/min	
	Drift:	0	uV/min	
	T. DBL:	1000	min	Program
	Min. Area/Height:	1000	counts	Noise/Drift Calculation
	Calculated by:	Area	🔿 Height	Advanced
	Register Spectru	im to Table		
	<	Voltar 🛛	vançar >	Cancelar Ajuda

Elaborado por: Jair	Aprovado por:	27
	Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão	
Revisado por: Priscila Carvalho		

Modifique os valores de **Width** e **Slope** até que a integração dos picos de interesse fique adequada.



Clicando no ícone pode-se visualizar se a integração e utilizar outros parâmetros de integração. Ex: **Integration On e OFF** este parâmetros oculta a integração em determinado intervalo de tempo. Clique **OK** e em seguida **Avançar**.



Na janela Compound Table Wizard 2/5 selecione os picos de interesse.

Elaborado por: Jair	Aprovado por:	28
	Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão	
Revisado por: Priscila Carvalho		



Na janela **Compound Table Wizard 3/5** ajuste os seguintes parâmetros da curva de calibração:

Quantitative Method: escolha o método Quantitativo Ex: Padrão Externo ou Interno. **Calculated by**: selecione se as áreas ou as alturas serão utilizadas nos cálculos quantitativos.

of Calib. Levels: digite o número de níveis de calibração da curva.

Curve Fit Type: selecione qual o tipo de equação para ajustar a curva.

Zero: selecione forçar ou não a curva de calibração passar pelo zero.

Weighting Method: recursos matemáticos para melhorar a curva de calibração.

X Axis of Calib. Curve: selecione qual parâmetro estará no eixo X (Concentração ou Área/Altura).

Unit: digite a unidade das concentrações (campo de texto).

Format of Concentration: selecione o formato que o resultado da concentração será mostrado (numero de decimais ou algarismos significativos).

Grouping Type: somente selecione se os picos vão ser quantificados em grupos. Após ajustar os parâmetros clique em **Avançar**.

Elaborado por: Jair	Aprovado por:	29
	Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão	
Revisado por: Priscila Carvalho		

External Standar	d 🔹	Format of Concentration	
Calibration Curve # of Calib. Levels:		5 Decimal Digits O significante Digits	
Curve Fit Type:	Linear 🔻	Grouping Type:	
Zero: Weighting Method:	Not Forced	Not Used	
X Axis Calib. Curve:	Conc. Area/Height		

Na janela **Compound Table Wizard 4/5** ajuste os seguintes parâmetros para a identificação dos picos:

Window: os picos serão identificados no intervalo estipulado em porcentagem do tempo de retenção.

Band: os picos serão identificados no intervalo estipulado em minutos.

Peak Selection: selecione a maneira de identificação dos picos caso dois picos estiverem no mesmo intervalo de tempo. Ex: **All Peaks** os picos serão identificados como um pico único, somando-se as áreas ou altura.

Retention Time Update: selecione o que fazer com a variação do tempo de retenção dos picos. **None** (nada a fazer), **Replace** (substitui pelo novo tempo de retenção) e **Average** (faz a média entre o tempo de retenção novo e o velho).

Após ajustar os parâmetros para o método de identificação, clique Avançar.

Aprovado por:	30
Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão	
	Aprovado por: Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão

Window/Band:	Window
Window:	5 %
Default Bandwidth;	0,01 min
Identification Method:	Absolute Rt 🔻
Peak Selection:	Closest Peak
Display not identified	peaks as peaks with zero area(height)
Add the peaks w	ith zero area(height) to calibration level
Retention Time Update:	
None Rep	lace 🔘 Average

Elaborado por: Jair	Aprovado por:	31
	Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão	
Revisado por: Priscila Carvalho		

Na janela **Compound Table Wizard 5/5** digite os nomes dos picos. Selecione em **Type** o padrão interno (**ISTD**), caso esteja realizando uma análise com padrão interno. Coloque os valores das concentrações de cada nível (**Conc.1, Conc2..**).

Em seguida clique em Concluir.

1 Metil Parabeno Target Ch1 254nm 2,036 2 Target Ch1 254nm 0,001	<u>5</u> 1
2 Target Ch1 254nm 0,001	1

Com parâmetros de quantificação e identificação ajustados clique em **View** e selecione a ficha **Compound** para certificar-se de que os parâmetros foram transferidos corretamente.

Γ	🗖 🗘 Met	hod View - Comp	ound Table								👶 View 📝 E	Edit
	Multi Chron	n Integration	Identification	Qua	ntitative	Compound	Group	Perfo	ormance	UV Spect	trum Library	
	ID#	Name	Туре		Cha	nnel	Ret. Ti	me	Con	ic.(1)		
	1	Metil Parabeno	Target		Ch1 254	nm		2,036		5		

Elaborado por: Jair	Aprovado por:	32
	Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão	
Revisado por: Priscila Carvalho		

Este passo é muito importante e gera muita confusão, por isto preste muita atenção no nome do método utilizado para aquisição e principalmente o diretório onde esta salvo.

Aplique as alterações realizadas para o método original. Clique em **Apply to Method** na barra de tarefas **Assistant Bar** ou clique em **File>Save Method As...**, para transferir as novas informações para o método original.



Nesta etapa verifique com atenção e tenho certeza que o nome do método e o diretório estejam corretos. Então clique em **Salvar**.

Save Metho	od As	×
Salvar em:]] Fev 2014	- G Ø ▷ □.
Nome	*	Data de modificaç Ti
🗟 Desvio		05/02/2014 17:42 Sł
🗟 Grad AB		05/02/2014 10:07 Sł
🔂 Grad CD		05/02/2014 10:07 Sł
🔣 Repetibili	dade	05/02/2014 13:29 Sł
🔂 Teste		06/02/2014 09:00 Sł
•		4
Nome:	Repetibilidade	✓ Salvar
Tipo:	LC Method File (*.lcm)	✓ Cancelar

Aprovado por:	33
Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão	
P	rof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão

Sempre deverá aparecer a mensagem a seguir, então clique em Sim.



Em seguida clique em OK na janela que surgirá.

Select Method Parameters	? ×
 Current Settings Acquisition Settings Data Processing Data Processing Parameters Peak Integration Parameters Identification Parameters Quantitative Parameters Compound Table Calibration Curve Column Performance Parameters Group Parameters QC Check Multi Chromatogram Table Purity Parameters Spectrum Parameters Library Search Parameters 	OK Cancel
- QA/QC Parameters	
System Suitability Settings	

Fechar a janela Data Acquisition, pois esta análise vai ser utilizada no Batch.

No **Data Explorer** clique na ficha referente ao **Batch** e depois clique duas vezes no arquivo referente ao **Batch** que possui os arquivos da curva de calibração.

Modifique as seguintes colunas no **Batch**: **Sample Type**: Selecione **Standard>Initialize Calibration Curve** para o primeiro padrão da curva e **Standard>Add Calibration Level** para os padrões restantes.

Elaborado por: Jair	Aprovado por: Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão	34
Revisado por: Priscila Carvalho		



Level#: selecione cada corrida com o respectivo nível (concentração). Ex: o primeiro ponto da curva está relacionado ao Level 1.

Sample Type	Method File	Data File	Level#	Inj. Volume	
1:Standard:(I)	repetibilidade.lcm	Repetibilidade-01.lcd	1	20	
0:Unknown	repetibilidade.lcm	Repetibilidade-02.lcd	0	20	
0:Unknown	repetibilidade.lcm	Repetibilidade-03.lcd	0	20	
0:Unknown	repetibilidade.lcm	Repetibilidade-04.lcd	0	20	
0:Unknown	repetibilidade.lcm	Repetibilidade-05.lcd	0	20	
0:Unknown	repetibilidade.lcm	Repetibilidade-06.lcd	0	20	



Clique em para reprocessar o **Batch** aplicando as novas informações e construir a curva de calibração.

Para visualizar a curva de calibração e os parâmetros gerados, clique na ficha referente ao Método (Data Explorer) e depois clique duas vezes no arquivo referente ao método utilizado no Batch. Abrirá uma nova janela referente à curva de calibração. Nesta tela há informações sobre a curva de calibração de cada composto. Se desejar imprimir o relatório da curva de calibração clique em **File > Print Graph Image > Print**. Figura a seguir.

Elaborado por: Jair	Aprovado por: Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão	35
Revisado por: Priscila Carvalho		



Se necessitar fazer alguma alteração nos parâmetros de integração e da curva de calibração, clique em **Edit** na tela acima, ou, abra um arquivo de um cromatograma da curva de calibração, faça as alterações e clique em **Apply to Method (Assistant Bar).** Abra o **Batch** e reprocesse novamente.

Abra o método e verifique se a curva está OK.

Todas as análises de amostra desconhecida, que forem realizadas utilizando-se deste método, os picos serão identificados e automaticamente quantificados, basta reprocessar o Batch para as amostras obtidas antes da construção da curva de calibração. Para visualizar o resultado selecione em **Folder** a pasta onde foram armazenados os dados de interesse, clique na ficha referente aos dados (cromatogramas) e depois clique duas vezes no arquivo referente a uma amostra.

Os resultados estarão disponíveis na ficha Results.

(campo inferior esquerdo).

O LabSolutions disponibiliza 2 tipos de resultados:

-Peak Table, todos os picos integrados são mostrados.

-Compound, apenas os picos identificados são mostrados.

Elaborado por: Jair	Aprovado por:	36
	Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão	
Revisado por: Priscila Carvalho		

Peak Table	Compound G	Group	Calibration Cu	irve			
Peak#	Ret. Time		Area	Height	Mark	Conc.	Unit
1	2,037	7	631477	118093		4,998	mg/L
2	2,350	0	1911	304	V	0,000	
3	2,56	1	21650	3585	V	0,000	
4	2,919	9	13559	2089		0,000	
Total			668597	124071		4,998	
I → λ Ch	1 254nm /			•			

Relatórios.

Existem 2 maneiras para imprimir o relatório do cromatograma.

1- Impressão utilizando o Batch.

Abra o Batch contendo o arquivo do cromatograma.

Selecione **Report Output** e em **Report Format File** escolha o formato de relatório que deseja aplicar.

Processe o Batch, o relatório será impresso para o cromatograma selecionado.

Inj. Volume	Report Output	Report Format File
20		C:\LabSolutions\System\DEFAULT.lsr 💽
20		C:\LabSolutions\System\DEFAULT.lsr

2- Impressão Manual.

Selecione em **Folder:** a pasta onde estão armazenados os modelos de relatórios, clique na ficha referente aos relatórios e depois clique duas vezes no arquivo referente ao modelo de relatório desejado.

Em seguida selecione em **Folder:** a pasta onde foram armazenados os dados de interesse, clique na ficha referente aos dados (cromatogramas) e depois clique e arraste para cima do relatório.

Elaborado por: Jair	Aprovado por:	37
	Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão	
Revisado por: Priscila Carvalho		

		<u> </u>	
Folder:			A
C:\LabSolutions\Sample\LC		==== Shimadzu LabSolutions Analysis Report ===:	
Filename	Modified Date	-	
BatchTable	26/03/2011 12:07		
CalibrationCurv	26/03/2011 12:07		
CalibrationCurv	26/03/2011 12:07	=	Sample Information
CalibrationCurv	26/03/2011 12:07		=
ColumnPerform	26/03/2011 12:07		
Contour3DReport	26/03/2011 12:07		
FractionCollecti	26/03/2011 12:07		
GroupResults_1	26/03/2011 12:07		
GroupResults_2	26/03/2011 12:07		<chromatogram></chromatogram>
📄 Method	04/10/2012 20:19		
PDADataAnalysi	26/03/2011 12:07		
PeakReport_1	26/03/2011 12:07		
PeakReport_2	26/03/2011 12:07	-	
۰ III		P.	
Comment:			

Verifique se o relatório está adequado e se estiver clique em Print para imprimir.

Elaborado por: Jair	Aprovado por: Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão	38
Revisado por: Priscila Carvalho		