

|                                                                                   |                                              |                                                                                     |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
|  | <b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b> |  |
| Data:<br>01/07/2018<br><br>Próxima<br>revisão:<br><br>01/07/2019                  | <b>LABORATÓRIO DE METABOLISMO E LÍPIDES</b>  | Nº: 022<br>Versão: 04<br>Página 1                                                   |

## POP: Cromatografia líquida de alta eficiência

**Equipamento: HPLC**

**Modelo: Detector (SPD-10AV) /Bomba A (LC-10AD)/Bomba B(LC-10AD)/Bomba C (LC-10AD VP)/Controlador(SCL-10)**

**Marca: SHIMADZU**

### A. Objetivo

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

### B. Abrangência

Biólogos, Biomédicos, Farmacêuticos e Técnicos de Laboratório.

### C. Definição

|                                               |                                                     |
|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Elaborado por: Carolina Graziani Vital        | Aprovado por:<br>Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão |
| Verificado por: Priscila Oliveira de Carvalho |                                                     |

|                                                                                   |                                              |                                                                                     |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
|  | <b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b> |  |
| Data:<br>01/07/2018<br><br>Próxima<br>revisão:<br><br>01/07/2019                  | <b>LABORATÓRIO DE METABOLISMO E LÍPIDES</b>  | Nº: 022<br>Versão: 04<br>Página 2                                                   |

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).

#### D. Observações importantes

- ✓ Para cada método é utilizada uma coluna diferente, verifique se a coluna que está no aparelho é a correta para o método que será utilizado, caso não seja, troque pela coluna correta.
- ✓ Verificar se os solventes (duas garrafas de metanol e uma garrafa de acetonitrila, 5) estão em quantidade suficiente para as purgas e corridas, se há isopropanol no erlenmeyer (6) e se as garrafas de resíduos (7) não estão cheias.
- ✓ Caso necessário, descartar os resíduos.
- ✓ Checar se os cabos estão conectados (equipamento+computador).
- ✓ Verificar se não há bolhas no sistema após a purga.
- ✓ Após o uso não se esquecer de desligar as bombas pelo software.

#### E. Operacionalização

- 1) Abra o software na área de trabalho nomeado como “Shimadzu Class VP”, opção “Class VP”.

|                                               |                                                     |
|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Elaborado por: Carolina Graziani Vital        | Aprovado por:<br>Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão |
| Verificado por: Priscila Oliveira de Carvalho |                                                     |

|                                                                                   |                                              |                                                                                     |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
|  | <b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b> |  |
| Data:<br>01/07/2018<br><br>Próxima<br>revisão:<br><br>01/07/2019                  | <b>LABORATÓRIO DE METABOLISMO E LÍPIDES</b>  | Nº: 022<br>Versão: 04<br>Página 3                                                   |

- 2) Ligue, nesta ordem, detector, bombas e o controlador.
- 3) Clique na opção “Method” (pasta azul). Selecione o método e dê **“OK”**
- 4) Clique na opção “Batch” (pasta amarela). Selecione a curva analítica para o composto, de mesmo nome do método, dê **“OK”**.
- 5) Abra as válvulas das bombas (1) e purgue-as (tecla “Purge”), conforme indicado na Figura 1. Após a purga feche as válvulas.
- 6) Clique na caixa amarela na parte superior da tela, que abrirá os parâmetros do método escolhido. Na parte superior da tela terá a opção “Parameters”, clique nele e confira os parâmetros da leitura, que também indicará qual o solvente deverá ser utilizado na diluição da amostra. Faça o “Download” dos parâmetros
- 7) Verifique nos visores das bombas (2) e do detector (3) se houve aumento de pressão e ajuste do comprimento de onda, isto indica que o aparelho fez o download do método. Dê **“OK”** e feche a tela.
- 8) Clique em “Preview” para estabilizar a linha de base. A absorbância deve estar em 0.000 no visor do detector. Se houver outra absorbância ou aparecer a mensagem “Over” na tela do detector, aperte a tecla “Zero”. A leitura da amostra só poderá ser feita após a linha de base estar estável. É possível que seja necessário mais de um Preview.
- 9) Com a linha de base estável, cadastre a amostra em “Run single” (seta azul). Verifique se o método na janela de cadastro da amostra corresponde ao método na janela que aparecerá o cromatograma. Na aba “Save run as” altere apenas os caracteres após a última barra para identificar sua amostra. Clique em **“Start”**.

|                                               |                                                     |
|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Elaborado por: Carolina Graziani Vital        | Aprovado por:<br>Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão |
| Verificado por: Priscila Oliveira de Carvalho |                                                     |

|                                                                                   |                                              |                                                                                     |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
|  | <b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b> |  |
| Data:<br>01/07/2018<br><br>Próxima<br>revisão:<br><br>01/07/2019                  | <b>LABORATÓRIO DE METABOLISMO E LÍPIDES</b>  | Nº: 022<br>Versão: 04<br>Página 4                                                   |

- 10) Aparecerão três mensagens de erro com um breve intervalo de tempo entre elas, clique **“OK”** em todas e cancele a corrida. Cadastre a amostra novamente. Aparecerão então cinco mensagens de erro, uma imediatamente após a outra, clique **“OK”** em todas.
- 11) Lave a seringa de vidro (100µL) e o injetor três vezes com solvente e uma vez com a amostra antes de injetar a mesma no lopping. Assegure-se de que não se formem bolhas de ar na seringa, insira a amostra e gire o injetor (4). O cromatograma começará a correr. Pode acontecer do aparelho não correr a amostra, então será preciso cancelar a corrida e dar “Preview” novamente. Se a amostra correr normalmente, aguarde o final da corrida e analise os dados

|                                               |                                                     |
|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Elaborado por: Carolina Graziani Vital        | Aprovado por:<br>Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão |
| Verificado por: Priscila Oliveira de Carvalho |                                                     |

Data:  
01/07/2018

Próxima  
revisão:

01/07/2019

LABORATÓRIO DE METABOLISMO E LÍPIDES

Nº: 022

Versão: 04

Página 5

**Figura 1.** Foto do HPLC Shimadzu indicando seus principais acessórios



Elaborado por: Carolina Graziani Vital

Verificado por: Priscila Oliveira de Carvalho

Aprovado por:  
Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão