

## MANUAL DE USO DEL CROMATÓGRAFO PERKIN-ELMER HPLC FLEXAR

- Se enciende el equipo, la regleta y todos los módulos del equipo HPLC.
- Se enciende el switch.
- Se enciende el ordenador.

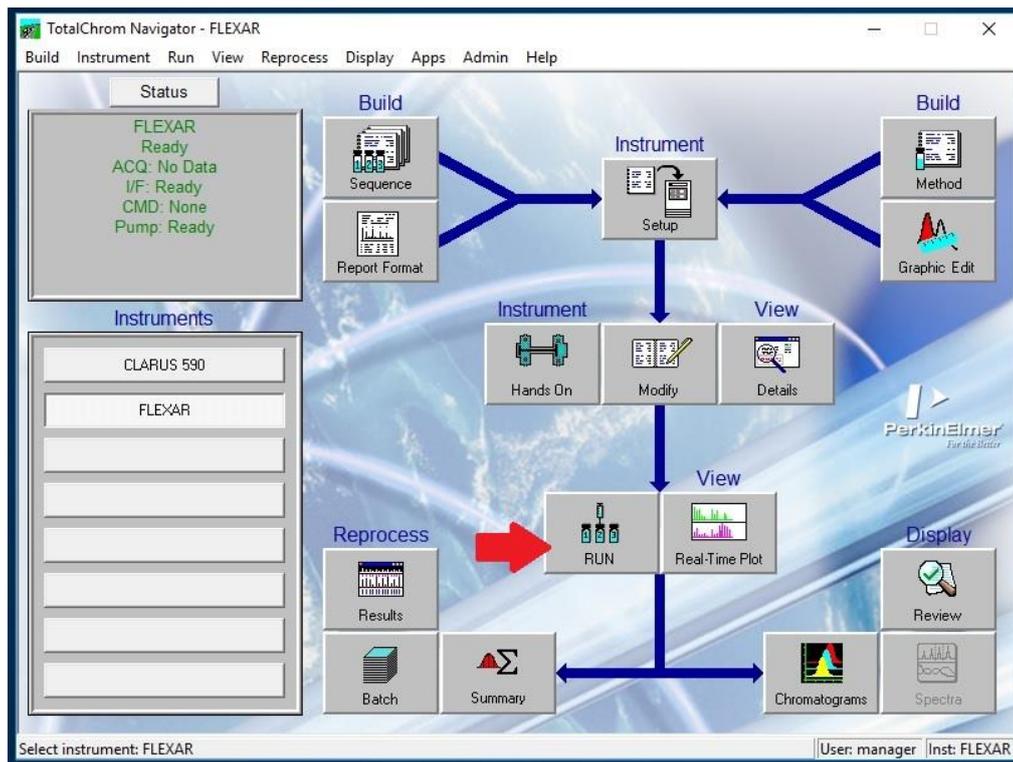
### PURGAR EL EQUIPO.

1. Se quita la tapa de la bomba.
2. Se afloja el tornillo de la boca de purga (situado a la izquierda de la bomba).
3. Se coloca la jeringa en la boca de purga con el émbolo hacia la mitad.
4. Se pulsa el botón (A o B) donde tengamos la fase móvil que vamos a usar. (Al pulsar el botón la bomba empieza la purga y se escucha el ruido de la purga) Comienza a salir líquido de la boca de purga. Lo dejamos un poquito hasta cuando consideremos que es suficiente.
5. Se cierra el tornillo de la boca de purga.
6. Se retira la jeringa de la boca de purga.

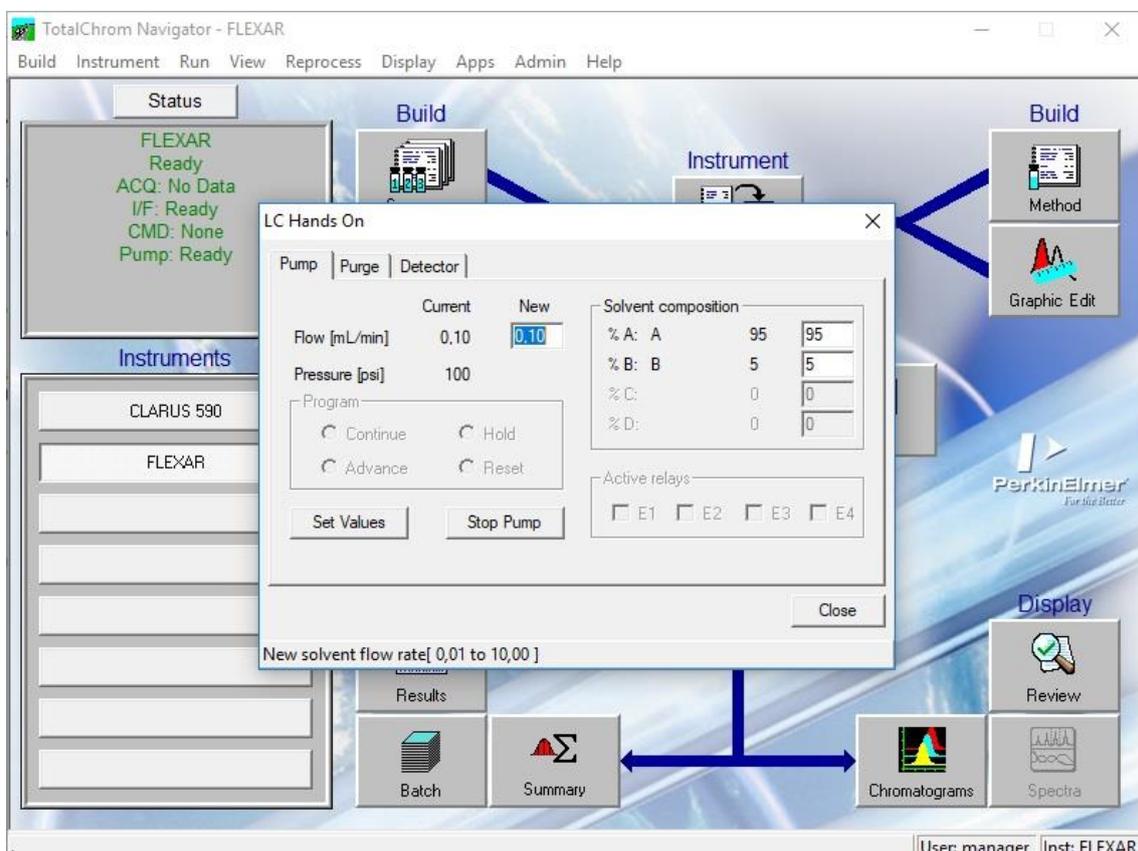


### ARRANCAR BOMBA:

- Se pica en “RUN” y en “TAKE CONTROL” (de esta forma controlamos el equipo de manera manual). Se encenderá “HAND ON” (control manual).

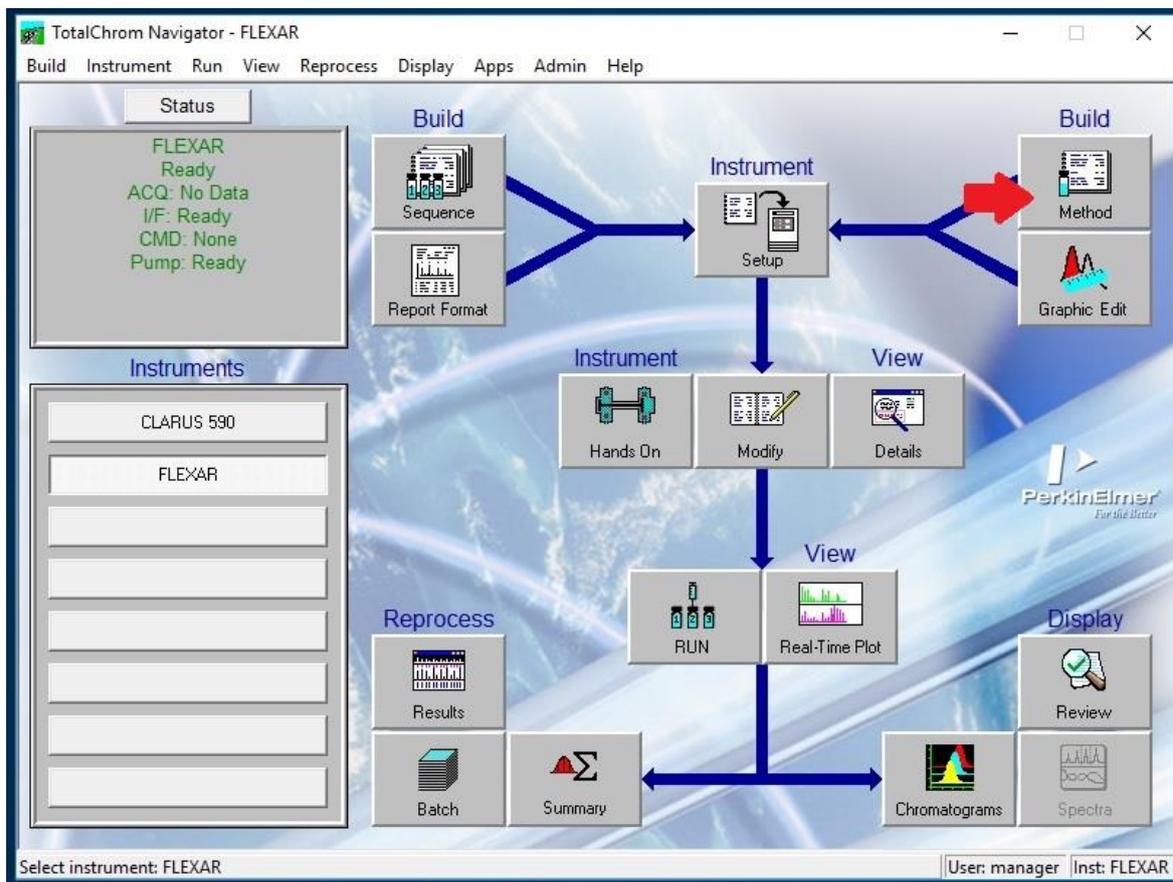


Se pincha y en “PUMP” se selecciona “FLOW 1 mL”. Si trabajamos con gradiente de concentraciones, en la misma ventana se indican los porcentajes de cada disolvente (A y B) Así se enciende la bomba que comienza a hacer pasar fase móvil por la columna.

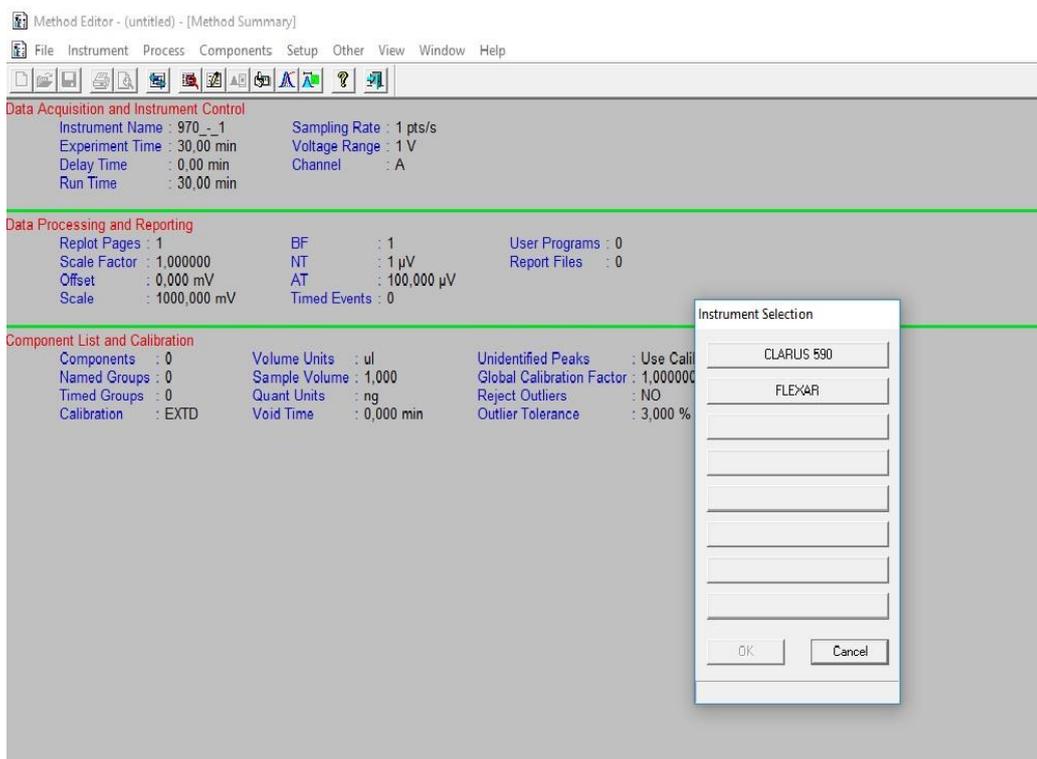


## CONSTRUIR UN MÉTODO:

- Se pica en “BUILD METHOD”.



- Seleccionar “FLEXAR”, que es el instrumento que queremos usar: HPLC.



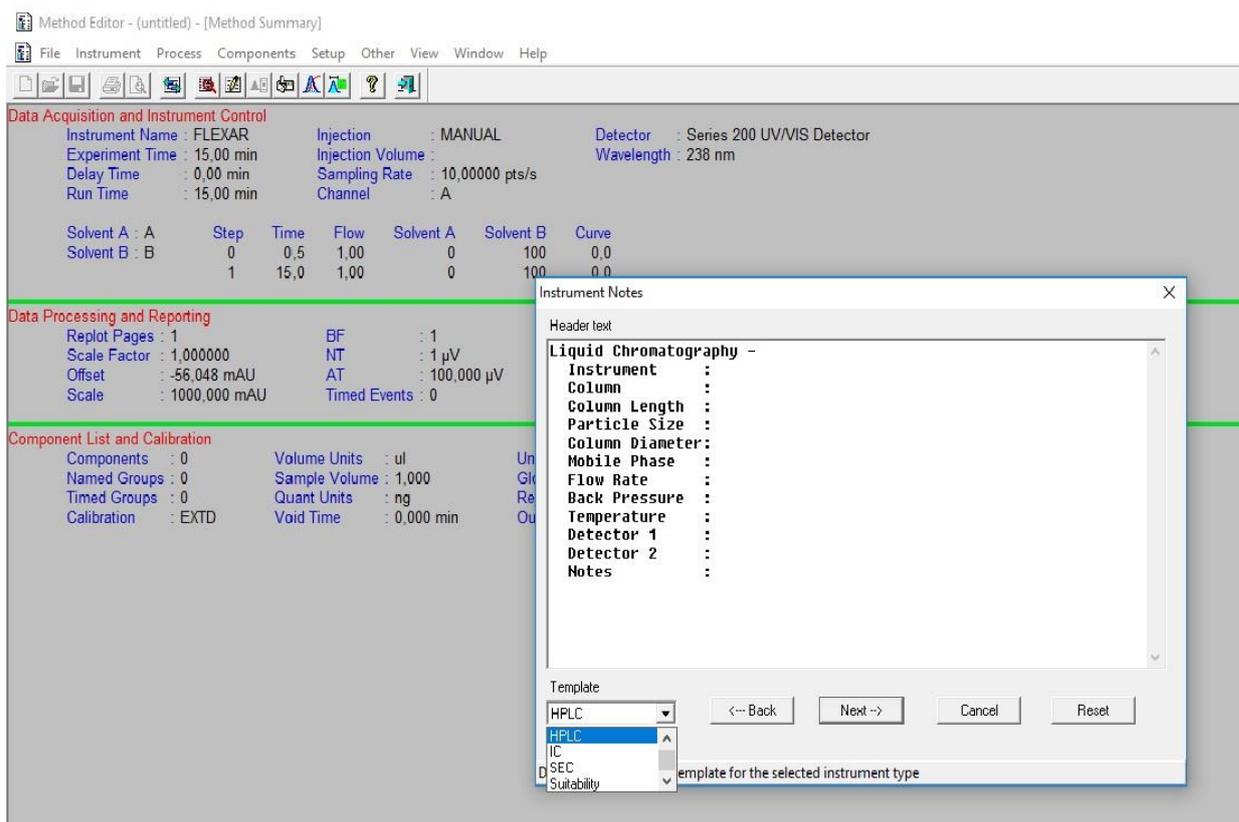
- Se abre una ventana donde se pondrá la descripción. Ejemplo: vitamina C grado medio (no poner muchos espacios y no poner tildes).

Next

Se abre ventana: Header Text

Template.

Seleccionar HPLC (abajo a la izquierda de la ventana)



Next

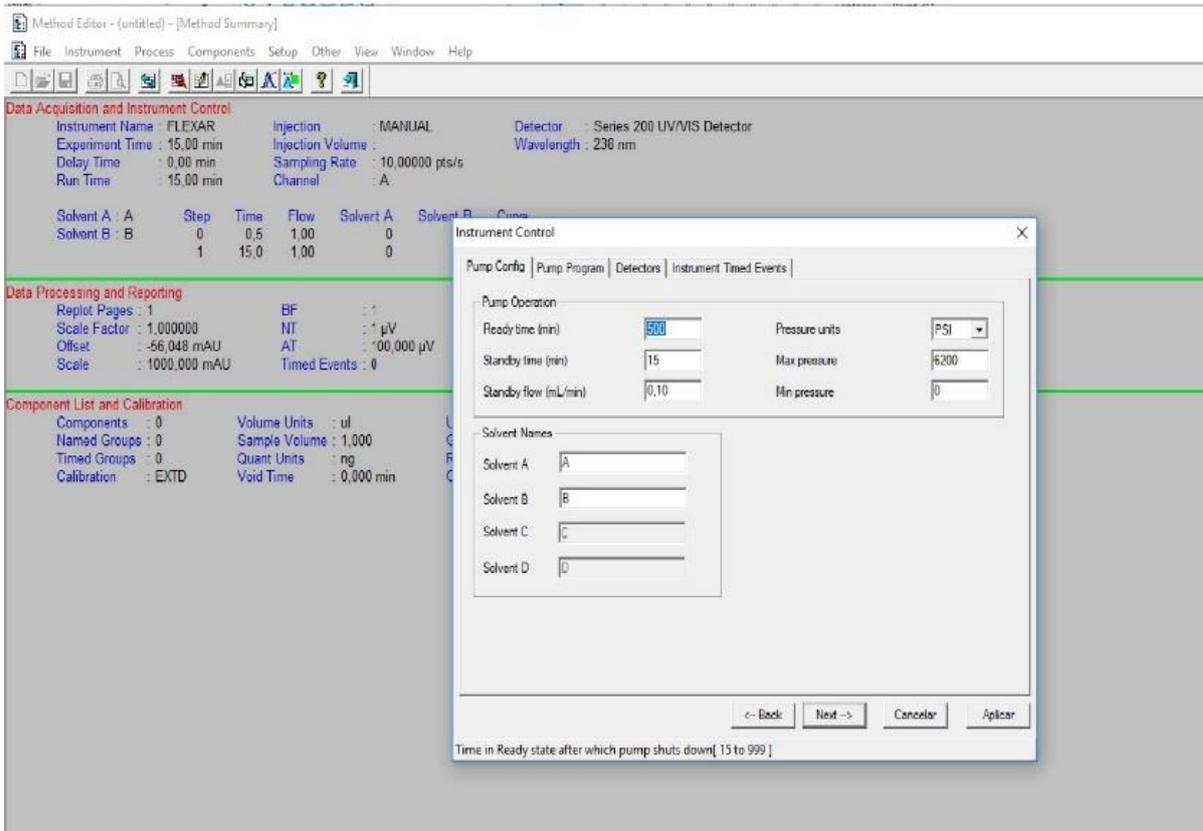
Se abre ventana Data Acquisition:

Data Channel (No tocar)

Read Time Plot (Escala) Poner en offset -80, el resto no tocar.

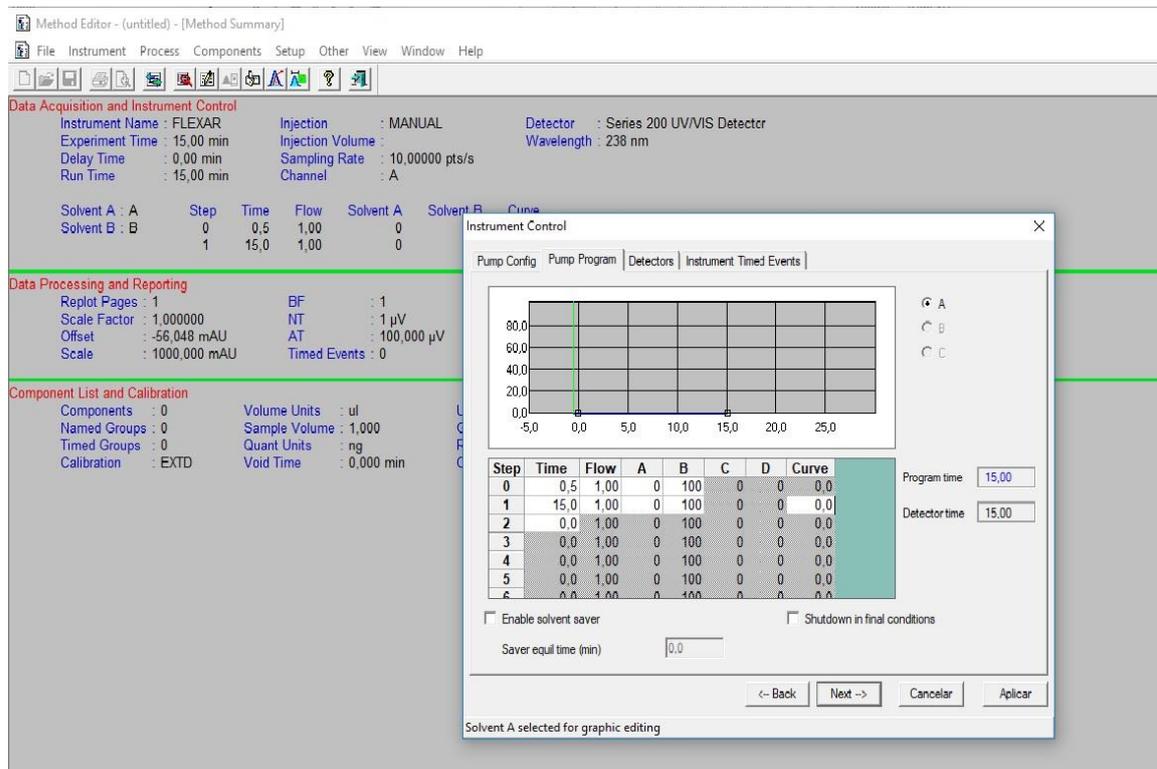
Next

Se abre ventana Instrument Control:



### Pump Configuration (No tocar)

Pump Program - se despliega una tabla donde se debe establecer el Flow (flujo) y el time (tiempo). Por ejemplo: 1 mL/min y 5 minutos.



## Detectors – Cambiar wavelenght (longitud de onda) de medida.

Method Editor - (untitled) - [Method Summary]

File Instrument Process Components Setup Other View Window Help

Data Acquisition and Instrument Control  
 Instrument Name : FLEXAR Injection : MANUAL Detector : Series 200 UV/VIS Detector  
 Experiment Time : 15.00 min Injection Volume : Wavelength : 238 nm  
 Delay Time : 0.00 min Sampling Rate : 10,00000 pts/s  
 Run Time : 15.00 min Channel : A

Solvent A : A Step Time Flow Solvent A Solvent B  
 Solvent B : B 0 0.5 1.00 0  
 1 15.0 1.00 0

Data Processing and Reporting  
 Replot Pages : 1 BF : 1  
 Scale Factor : 1,000000 NT : 1 µV  
 Offset : -56,048 mAU AT : 100,000 µV  
 Scale : 1000,000 mAU Timed Events : 0

Component List and Calibration  
 Components : 0 Volume Units : µl  
 Named Groups : 0 Sample Volume : 1,000  
 Timed Groups : 0 Quant Units : ng  
 Calibration : EXTD Void Time : 0,000 min

Instrument Control

Pump Config Pump Program Detectors Instrument Timed Events

Program

Step	Time	Wavelength	Autozero
1	15.0	238	NO
2	0.0	238	NO
3	0.0	238	NO
4	0.0	238	NO
5	0.0	238	NO
6	0.0	238	NO
7	0.0	238	NO
8	0.0	238	NO
9	0.0	238	NO
10	0.0	238	NO
11	0.0	238	NO
12	0.0	238	NO

Program time : 15,00  
 Detector time : 15,00

Lamp OFF at end of run

<- Back Next -> Cancel Aplicar

Select to turn lamp off when the run ends

## Instrument timed (No tocar)

Next

Se abre ventana Process:

Method Editor - (untitled) - [Method Summary]

File Instrument Process Components Setup Other View Window Help

Data Acquisition and Instrument Control  
 Instrument Name : FLEXAR Injection : MANUAL Detector : Series 200 UV/VIS Detector  
 Experiment Time : 15.00 min Injection Volume : Wavelength : 238 nm  
 Delay Time : 0.00 min Sampling Rate : 10,00000 pts/s  
 Run Time : 15.00 min Channel : A

Solvent A : A Step Time Flow Solvent A Solvent B  
 Solvent B : B 0 0.5 1.00 0  
 1 15.0 1.00 0

Data Processing and Reporting  
 Replot Pages : 1 BF : 1  
 Scale Factor : 1,000000 NT : 1 µV  
 Offset : -56,048 mAU AT : 100,000 µV  
 Scale : 1000,000 mAU Timed Events : 0

Component List and Calibration  
 Components : 0 Volume Units : µl  
 Named Groups : 0 Sample Volume : 1,000  
 Timed Groups : 0 Quant Units : ng  
 Calibration : EXTD Void Time : 0,000 min

Process

Integration Baseline Timed Events Optional Reports Replot User Programs

Basic Parameters

Bunching factor (pts) : 1  
 Noise threshold (µV) : 1  
 Area threshold (µV) : 100,000

Advanced Parameters

Peak Separation Criteria

Width ratio : 0,200  
 Valley-to-peak ratio : 0,010

Exponential Skim Criteria

Peak height ratio : 5,000  
 Adjusted height ratio : 4,000  
 Valley height ratio : 3,000

Defaults

<- Back Next -> Cancel Aplicar

Number of points to average for peak detection [ 1 to 99 ]

Integration (No tocar)

Timed Events (No tocar)

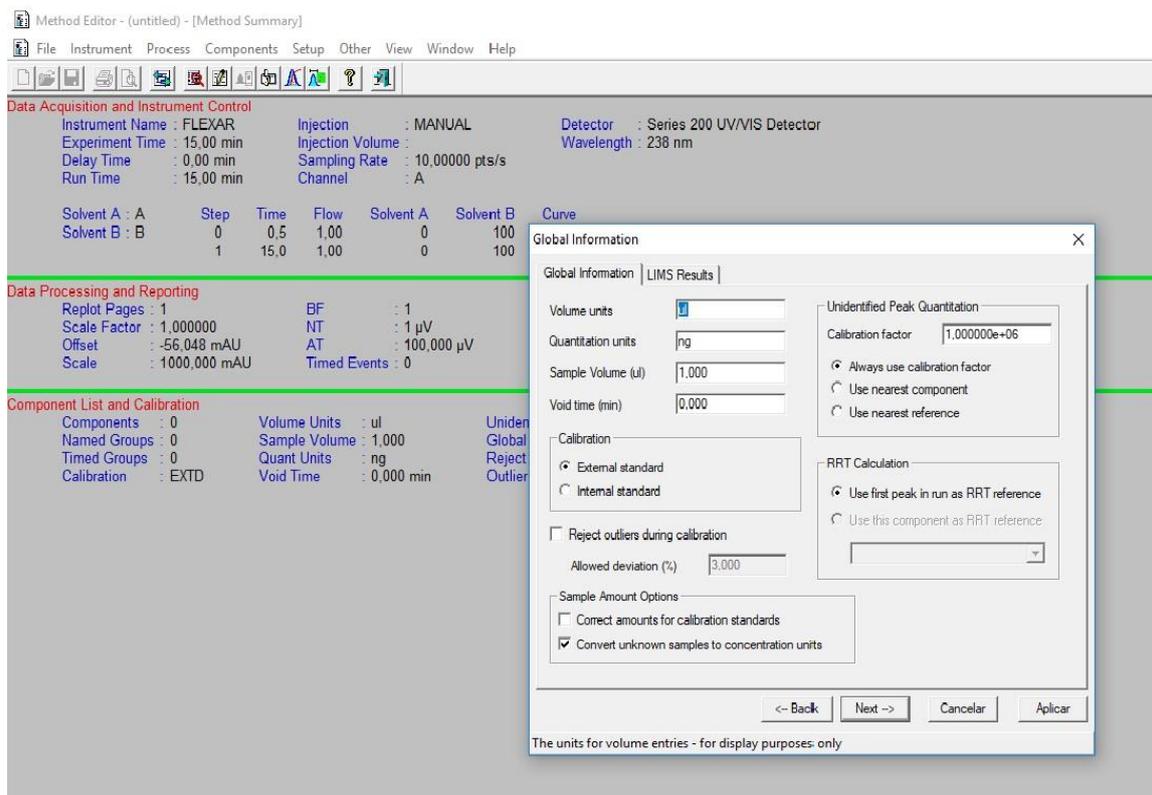
Optional Reports. Este paso es opcional, no es necesario realizarlo:

Se pica en “Browse” para elegir dónde guardar. Se elige “Métodos” y le se da un nombre (por ejemplo, HPLC ascórbico GM).

Se pica en “impresora” y se elige “PDF” y “select”.

Next

Se abre ventana Global Information:

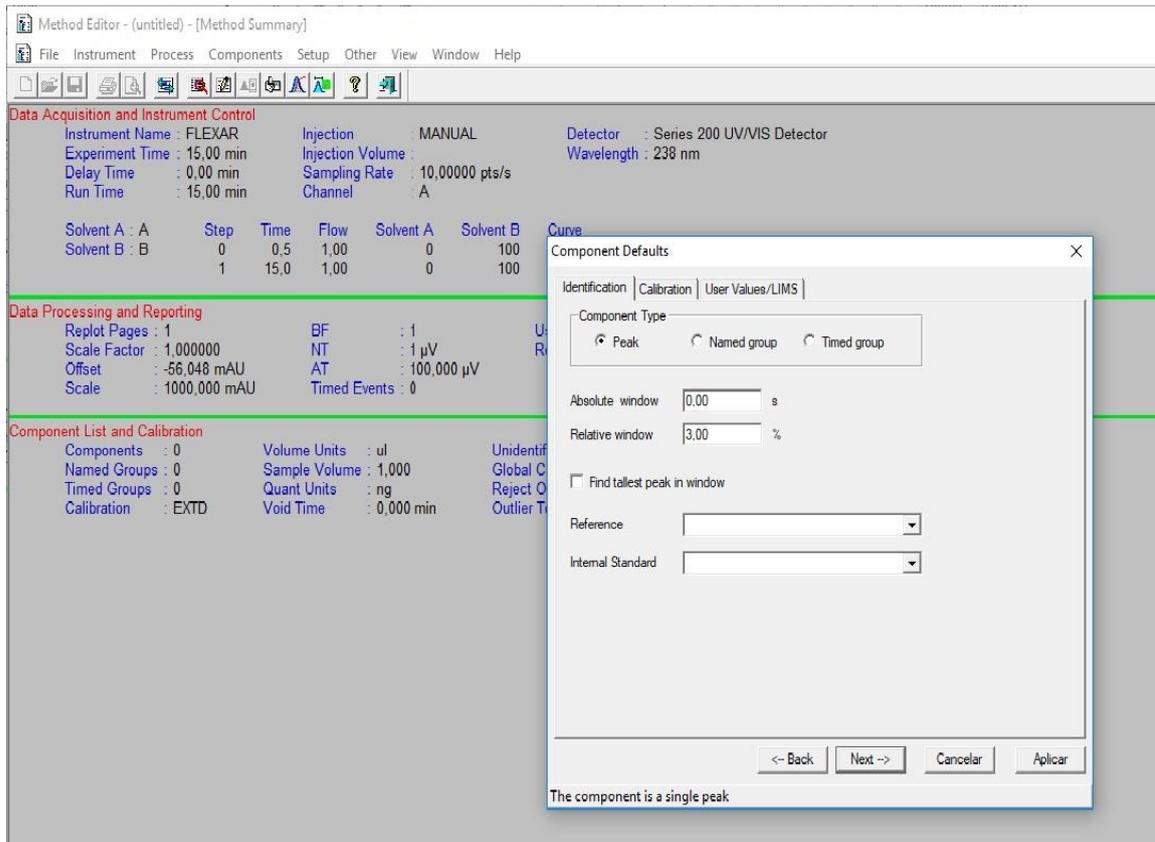


Global Information. Se cambia, en sample volumen, el volumen de inyección, 20 µL.

LIMS Results (No tocar)

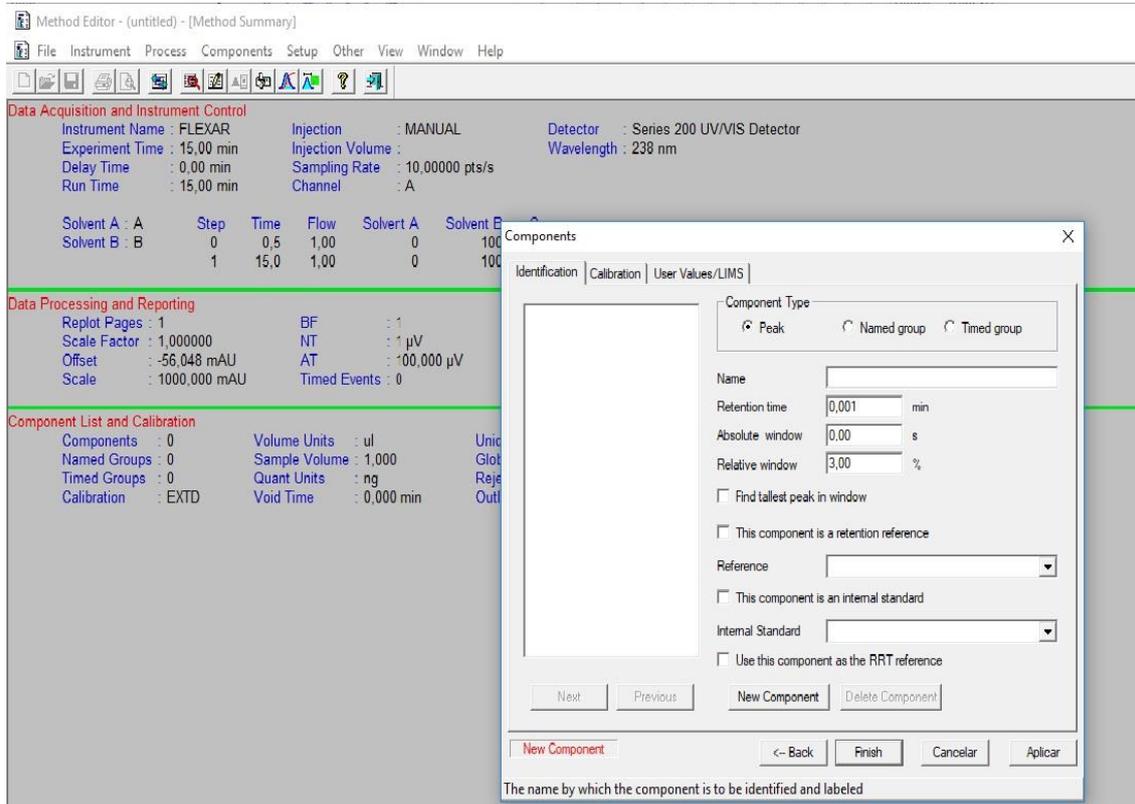
Next

Se abre ventana Component Defaults (No tocar nada)



Next

Se abre ventana Components:



Identification. En name se da nombre (por ejemplo vitamina C)

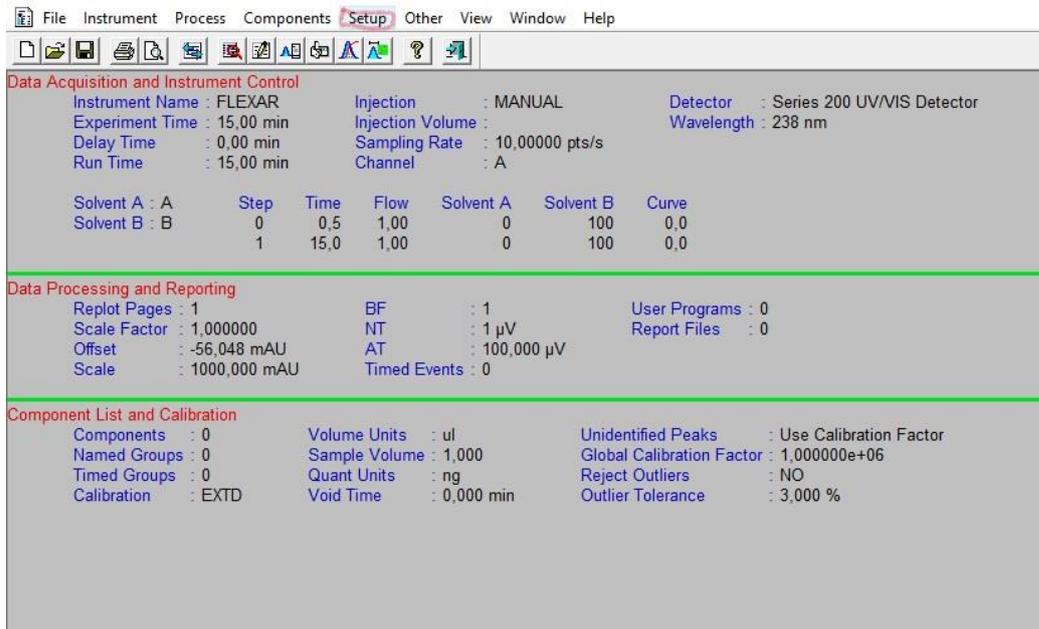
Calibration (No tocar)

User Values /LIMS (No tocar)

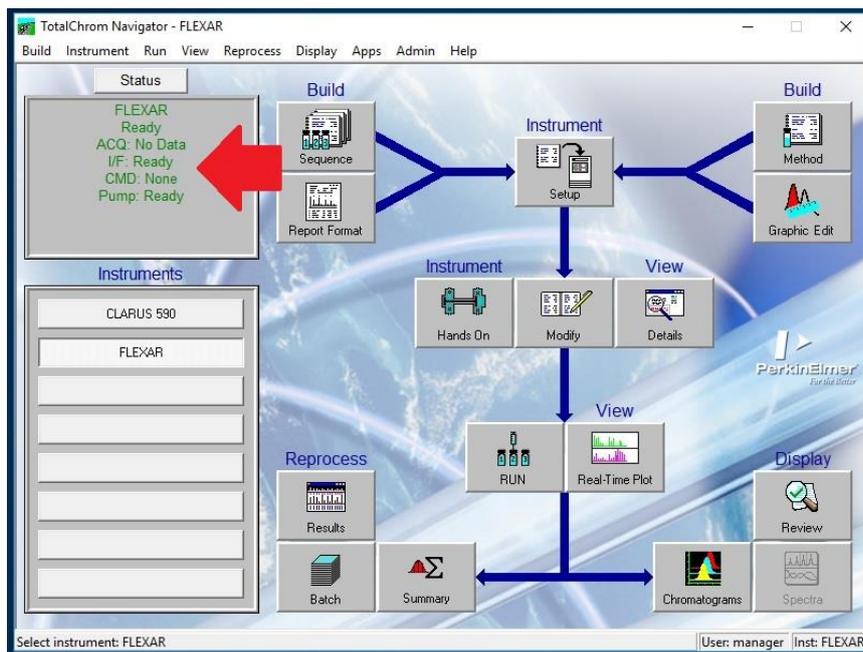
Next

Aparece un cuadro grande con todos los datos que hemos puesto en el método. Se pica en “File” y “Save as” y se da un nombre al método, con el que se quiere guardar. Guardar.

Se pica en “Set Up” y el método que hemos creado se envía al equipo (HPLC). Se abre una ventana “Setup Instrument” y en ella se pica en “Base file name” y se da nombre: se elige sample name. OK

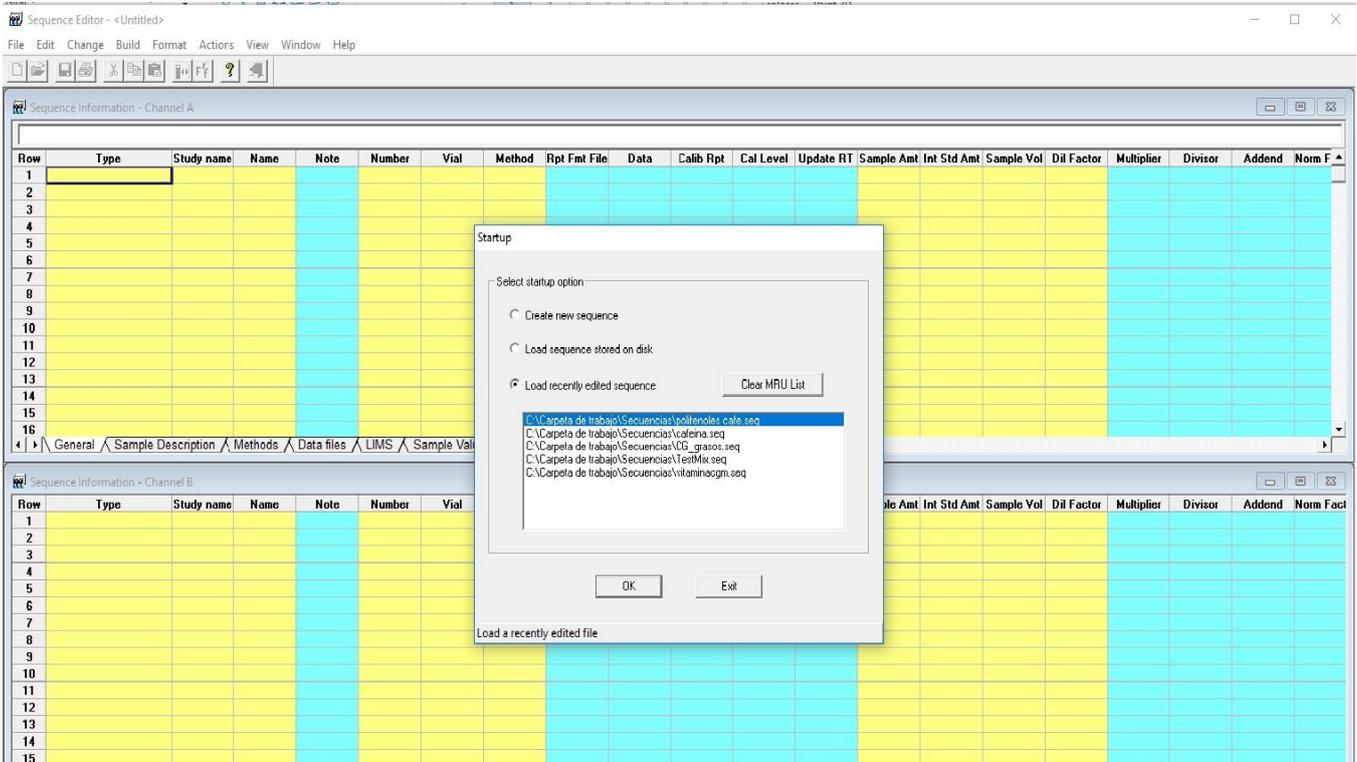


El método estará cargado cuando las letras aparezcan en verde en la pantalla de inicio.

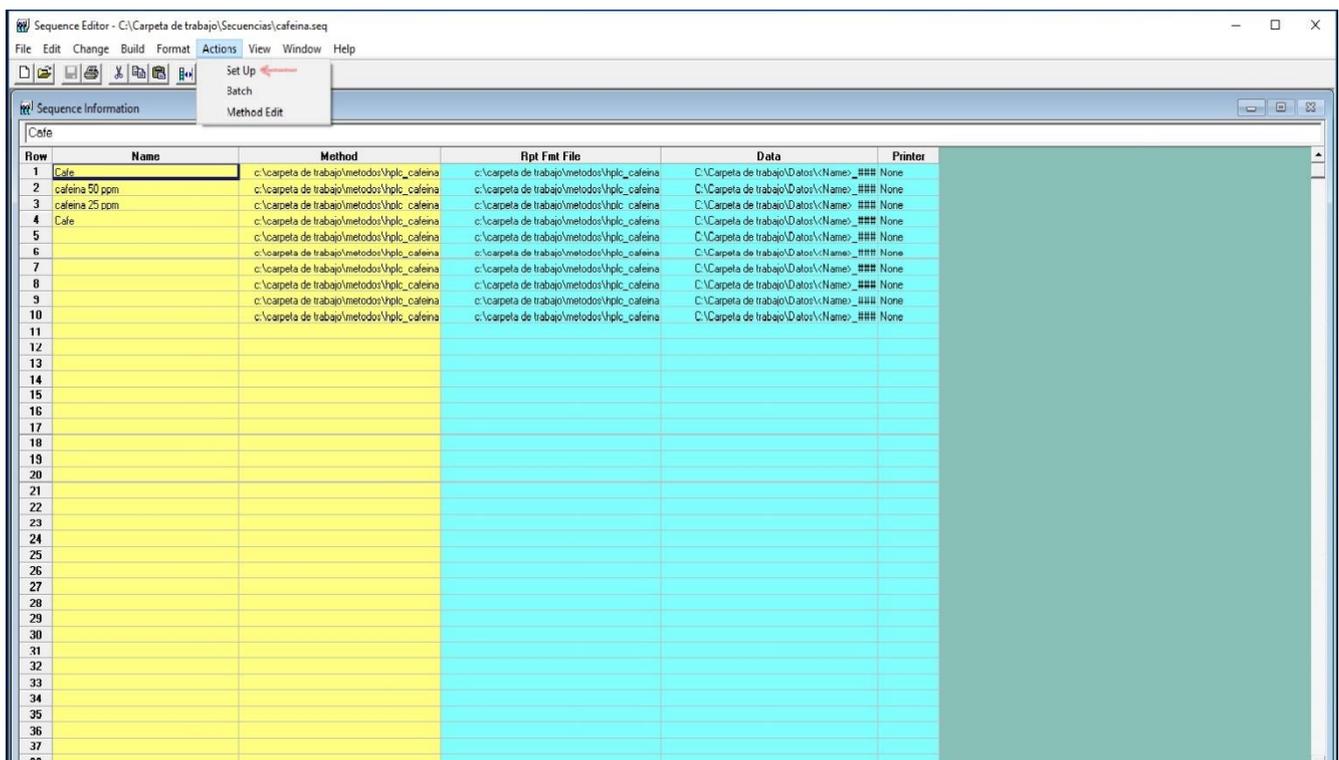


Se puede trabajar con el método creado o crear una secuencia.

Se puede reutilizar una secuencia ya creada. Para ello, se abre en "Sequence" y se cambia lo que se va a inyectar en cada momento (serie de patrones y muestras). Después se pica en "File" y "Save As" y se da nombre (por ejemplo, ascórbico gm). Aceptar.



Se pica en "Actions". "Set up" y la secuencia se envía al equipo (HPLC). Se abre ventana y se pincha en "Sequence" y se selecciona la que se ha creado. Select. Aceptar.



La secuencia estará cargada cuando las letras aparecen en verde, al igual que al cargar un método.

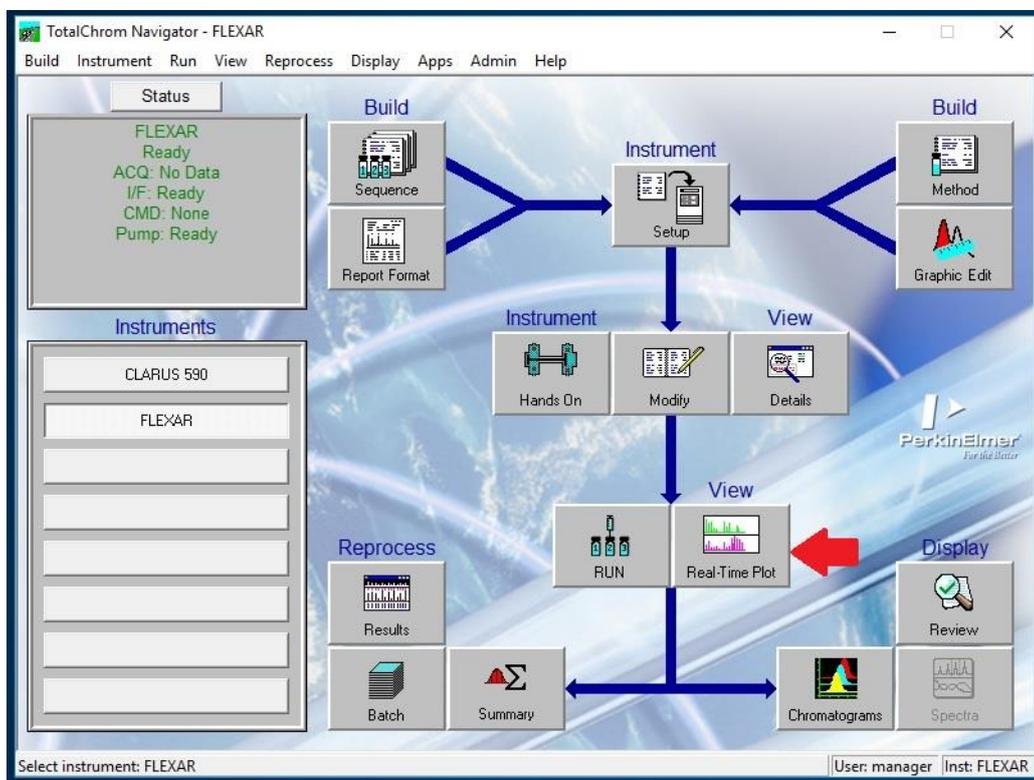
En este momento el equipo está preparado para inyectar.

### INYECCIÓN:

Se carga el loop inyectando más de 20 µL para asegurarnos que el loop se llena de patrón o muestra que se va a inyectar.

Cuando las letras estén en verdes, se gira el mecanismo de inyección hacia la derecha. El equipo comenzará a adquirir datos. Las letras cambiarán a azul.

Se sigue el avance del cromatograma, a tiempo real, en “VIEW” (Real Time Plot).



## VER Y GUARDAR EL CROMATOGRAMA:

Al terminar se pica en “Graphic Edit”. Ahí se puede modificar la forma en que se toma la base del pico y se miden las áreas.

Para guardar el cromatograma, se pica en “Print Report”. “Report”. Aceptar. Elegir como PDF y marcar dónde se quiere guardar (por ejemplo, en un pen para trabajar con los datos).

