

Handleiding Shimadzu HPLC met Diode Array Detector

HPLC 1

Universiteit Utrecht
Faculteit Bètawetenschappen
Departement Scheikunde
Scheikunde Practica

juli 2009

Inhoudsopgave

1 Opstarten	3
2 Indeling software	3
3 Method	4
3.1 Instrument Parameters	4
3.2 Data Analysis Parameters	6
3.3 Afronden	8
4 Meting	8
5 Postrun Analysis	10
5.1 Schermindeling	10
5.2 Handmatige Integratie	13
5.3 Rapport en afronden	14
6 Afsluiten	14

1 Opstarten

Als het goed is staan de computer en alle modules van het HPLC-apparaat al aan. Zo niet, ga dan als volgt te werk:

- Zet eerst alle modules van de HPLC aan met behulp van de power-knop, maar de CMB-20A module als laatste. Zodra de CMB actief is gaan alle modules op 'remote' (groen lampje).
- Zet nu pas de computer aan. Log in als 'admin_local' met als wachtwoord 'HPLC2009'.

Als de computer is opgestart kan de besturingssoftware van de HPLC gestart worden.

- Open het programma **LCsolution** op het bureaublad van de computer.

Er verschijnt een klein blauw scherm met twee tabbladen aan de linkerkant.



- Kies het tabblad **Operation**.
- Klik op de **HPLC-toren** naast de **1** als je wilt gaan meten. Kies voor de optie **Postrun** als je metingen wilt analyseren, zie Hoofdstuk 5.
- Log in met **User ID** 'student'. Er is geen wachtwoord.

Het openingsscherm verschijnt nu met de titel **LC Real Time Analysis**.

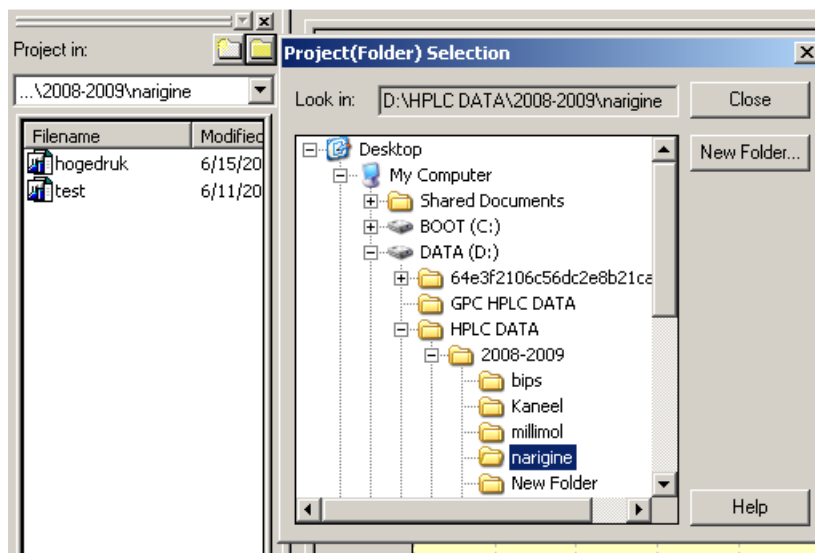
2 Indeling software

De besturing van het HPLC-apparaat gebeurt aan de hand van **Methods**. Hierin staan alle instellingen voor de eluenssamenstelling, temperatuur en de detector. Meetresultaten worden opgeslagen in **Data files** die gekoppeld zijn aan een bepaalde methode. Deze kunnen ook in de Postrun Analysis geanalyseerd worden.

Het schakelen tussen de belangrijkste schermen van de software gebeurt via het blauwpaarse zijmenu aan de linkerkant van het scherm. Dit menu bevat onder andere knoppen voor het starten en stoppen van een meting, het produceren van een rapport en de knoppen om te wisselen tussen de Real Time Analysis en de Postrun Analysis.

Let op! Om de indeling op de computer overzichtelijk te houden moeten alle gegevens opgeslagen worden op de D-schijf in de map "**HPLC DATA**" (de map "GPC HPLC DATA" is voor GPC-metingen). Per jaargang is een submap aanwezig, waarin je een persoonlijke map kunt aanmaken waarin je al je bestanden opslaat. Bijvoorbeeld: "D:\HPLC DATA\2008-2009\KoffieTM\".

Let op! Gebruik de bestandenlijst rechts naast het blauwpaarse zijmenu om naar je persoonlijke map te navigeren. De software gebruikt de map die in dit scherm gekozen is als standaardmap waar bestanden in worden opgeslagen. Als je hier de goede map kiest voorkomt dit veel onnodig zoeken naar bestandslocaties, het opslaan van bestanden in verkeerde mappen en het overschrijven van bestanden van andere gebruikers. Deze mappen zijn via het netwerk ook toegankelijk vanaf de twee uitwerkcomputers.



3 Method


In de methode geef je aan met welke instellingen je wilt gaan meten. Bij het openen van het programma wordt automatisch de laatst geopende methode ingeladen.

- Kies **File** → **New Method File** of **Open Method File...**
- Sla een nieuw gemaakte methode direct op volgens de indeling zoals die besproken is in het vorige hoofdstuk. Kies hiervoor **File** → **Save Method File As...** Geef de methode als volgt een naam: **analyt_matrix_naam**, dus bijvoorbeeld **Cafeïne_Koffie_PietjePuk**.

De naam van de ingeladen methode staat in de titelbalk van het venster gegeven achter de tekst **Data Acquisition**. Hieronder staat een overzicht van de meestgebruikte instelmogelijkheden.

3.1 Instrument Parameters

De instellingen voor de kolom en de oven worden bepaald in het venster **Instrument Parameters**

dat normaal gesproken al zichtbaar is, maar te tonen of te verbergen is met de knop  in zowel het zijmenu als de menubalk.

- Schakel de optie **Advanced** in. Deze optie biedt meer instelmogelijkheden.

Van de belangrijkste tabbladen zullen nu de instellingen besproken worden.

Data Acquisition

Op dit tabblad geef je de tijdsduur van je meting aan onder **LC Time Program**. Aan de parameters onder **Acquisition Time (PDA)** hoef je niets te veranderen.

- Geef de lengte van een meting op in het vakje voor **LC Stop Time**. De meetduur is typisch kleiner dan 10 minuten, maar kan het beste worden vastgesteld door een pilotmeting uit te voeren.
- Klik hierna op **Apply to All acquisition time** om de stoptijd ook voor andere parameters vast te leggen.

LC Time Prog.

Op dit tabblad is het mogelijk om een tijdsprogrammering in te stellen voor de eluentsamenstelling en de oventemperatuur. Hierbij is belangrijk dat de opgegeven tijden binnen de stoptijd van het programma blijven en dat het laatste item in de lijst de **Controller Stop** actie is. Gebruik de knop **Draw curve** om het verloop van de programmering te tekenen in het lichtgele vlak boven de tabel.

Pump

Hier is het mogelijk om de samenstelling van het eluens te variëren en de loopsnelheid van het eluens aan te passen. Het eluens wordt samengesteld uit één of meer van de gelabelde voorraadflessen bovenop het HPLC-apparaat. De verschillende letters op de labels aan de slangen corresponderen met de letters die in de software worden gebruikt. Wanneer je een ander oplosmiddel wilt gebruiken dan er in de flessen zit, moet je dit overleggen met iemand van de practicumleiding.

Je kunt achter **Mode** kiezen voor twee opties:

Isocratic flow

In deze modus wordt het eluens slechts uit één van de voorraadflessen gehaald. Je kunt met de opties **Flow** en **Pressure** aangeven met welke snelheid of druk het eluens door de kolom wordt gepompt. In het vakje **Pressure Limits (Pump A)** kun je de maximumdruk aangeven. Stel deze standaard in op 270 bar. In het vakje **Solenoid Valve** kun je aangeven welke voorraadfles gebruikt moet worden.

Low pressure gradient

In deze modus maak je gebruik van de mogelijkheid om oplosmiddelen uit verschillende voorraadflessen door het apparaat te laten mengen. Geef bij **Total Pump A Flow** aan wat de snelheid is waarmee het eluens door de kolom wordt gepompt (typische waarde is 0.800 mL/min). In de drie vakjes met **Solvent Conc.** kun je aangeven welke percentages van de verschillende oplosmiddelen moeten worden gemengd tot het eluens. Vul niets in bij de vakjes **Solvent Curve**. Het resterende percentage bestaat uit eluens A. Geef ook hier in het vakje **Pressure Limits (Pump A)** de maximumdruk op van 270 bar.

De veranderingen in eluentsamenstelling wordt pas doorgevoerd als je de methode gaat afronden (zie hoofdstuk 3.3).

PDA

Op dit tabblad kun je instellen met welke lamp en in welk golflengtegebied je wilt meten. Het is normaal gesproken niet nodig om hier iets te veranderen.

Column Oven

De temperatuur van de oven kan hier aangepast worden. Geef in het vakje **Oven Temperature** de gewenste temperatuur op. Een minimumtemperatuur van 50 °C is vrijwel altijd noodzakelijk, omdat de druk in de kolom anders te hoog kan oplopen.

3.2 Data Analysis Parameters

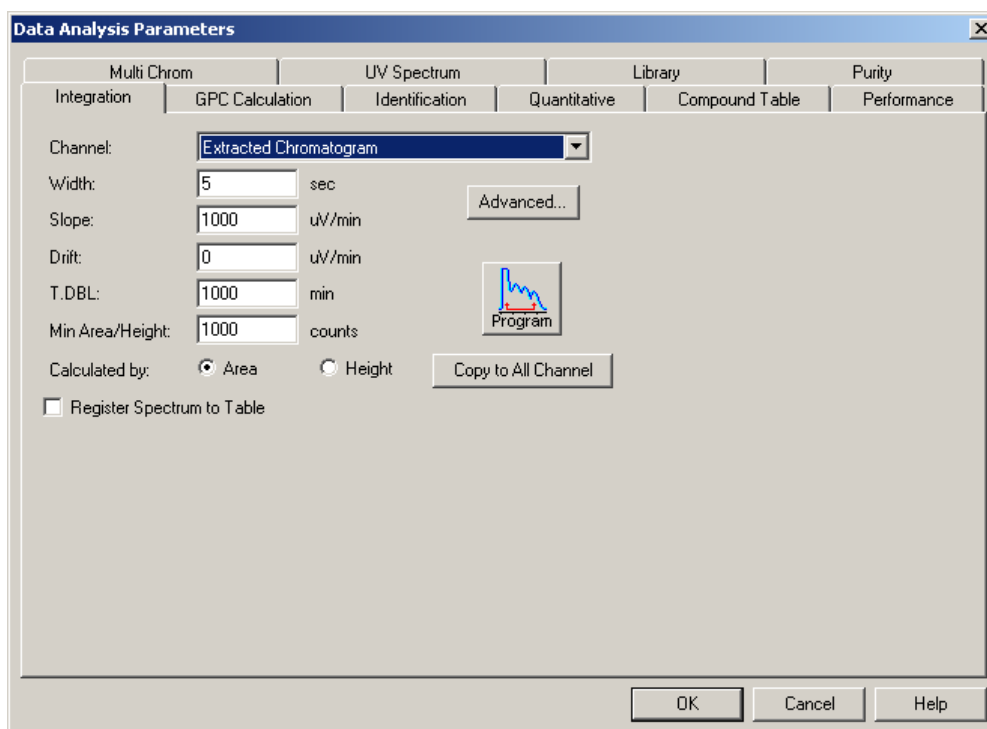
Tijdens de meting wordt met de Diode Array Detector continu een UV-spectrum opgenomen. Dit geeft achteraf de mogelijkheid om voor iedere golflengte het chromatogram te bekijken. De software zal tijdens de meting automatisch het chromatogram tonen waarin het meest intense signaal voorkomt. Dit is het **Extract** of **Extracted Chromatogram**. Er is ook de mogelijkheid om vooraf specifieke golflengtes te kiezen waarbij tijdens je meting het chromatogram getoond wordt (bijvoorbeeld nuttig als je al weet bij welke golflengte je wilt meten). Deze gekozen golflengtes zijn de **Channels**.

- Kies in de taakbalk **Method** → **Data Analysis Parameters(PDA)...** om in het scherm te komen waar de instellingen voor de detector worden bepaald. Deze instellingen kunnen desgewenst na de meting nog veranderd worden.

De belangrijkste instelmogelijkheden worden hieronder per tabblad besproken.

Integration

Op dit tabblad kunnen enkele algemene integratieparameters worden aangegeven per channel. De waarde **Min Area/Height** geeft de gevoeligheid aan waarmee geïntegreerd wordt (typische waarden liggen tussen 1000 en 100000 – bij een hogere waarde worden kleinere pieken nog geïntegreerd, maar misschien ook ruis).



Quantitative

Op dit tabblad kun je onder **Quantitative Method** aangeven welke meetmethode je hanteert:

Area Normalization	Geschikt voor losse metingen zonder het gebruik van een ijkreeks
Internal Standard	Geschikt voor metingen met ijkreeks en een interne standaard
External Standard	Geschikt voor metingen met ijkreeks en zonder interne standaard
Standard Addition	Geschikt voor metingen volgens de standaardadditiemethode

Het automatisch berekenen van een ijklijn wordt nog niet beschreven in deze handleiding. Kies voorlopig **Area Normalization** als meetmethode en teken ijklijnen met andere software.

Data Analysis Parameters

Multi Chrom | UV Spectrum | Library | Purity

Integration | GPC Calculation | Identification | Quantitative | Compound Table | Performance

Quantitative Method: External Standard

Units: mg/L

Calculated by: Area Height

Format of Concentration: Decimals Significant Figures

of Calib. Levels: 5

Curve Fit Type: Linear

Zero: Not Forced

Weighting Method: None

X Axis of Calib. Curve: Conc. Area/Height

Group Type: Not Used

OK Cancel Help

Multi Chrom

Op dit tabblad kies je de channels die je wilt bekijken tijdens je meting. Vink in de kolom **Display** een regel aan en geef onder **Wavelength (nm)** de golflengte aan waarbij je wilt kijken. Laat de overige kolommen en de andere opties onveranderd.

Data Analysis Parameters

Integration | GPC Calculation | Identification | Quantitative | Compound Table | Performance

Multi Chrom | UV Spectrum | Library | Purity

Ch#	Display	Wavelength (nm)	Bandwidth (nm)	Magnification
1	<input checked="" type="checkbox"/>	254	4	1.00
2	<input checked="" type="checkbox"/>	384	4	1.00
3	<input type="checkbox"/>	254	4	1.00
4	<input type="checkbox"/>	254	4	1.00
5	<input type="checkbox"/>	254	4	1.00
6	<input type="checkbox"/>	254	4	1.00
7	<input type="checkbox"/>	254	4	1.00
8	<input type="checkbox"/>	254	4	1.00
9	<input type="checkbox"/>	254	4	1.00
10	<input type="checkbox"/>	254	4	1.00
11	<input type="checkbox"/>	254	4	1.00
12	<input type="checkbox"/>	254	4	1.00
13	<input type="checkbox"/>	254	4	1.00
14	<input type="checkbox"/>	254	4	1.00
15	<input type="checkbox"/>	254	4	1.00
16	<input type="checkbox"/>	254	4	1.00

Reference Correction

Ref. Wavelength: 350 nm

Ref. Bandwidth: 20 nm

Display extracted chromatogram

Extraction Settings:

Bandwidth: 4 nm


Magnification: 1

OK Cancel Help

– Als je alle gegevens hebt ingevuld klik je op **OK**.

3.3 Afronden

Nadat je alle parameters hebt ingesteld moet de methode worden opgeslagen en moeten de instellingen naar het apparaat worden verzonden.

- Sla de methode op door op het diskette-icoontje in de menubalk te klikken.
- Klik op de knop  Download in het scherm **Instrument Parameters View**.

De mededeling **Please wait for setting instrument parameters...** verschijnt. Wanneer de lamp nog niet is ingeschakeld wordt dat op dit moment gedaan (zichtbaar op de SPD-M10Avp-module door een knipperend D₂-lampje).

Let op! Als je de samenstelling van het eluens hebt veranderd, het ongeveer vijf minuten duurt voordat de nieuwe samenstelling stabiel is.

4 Meting

De directe aansturing van het HPLC-apparaat gebeurt door middel van de volgende rij icoontjes in de taakbalk:



Alle onderdelen in één keer aan- of uitschakelen



De lamp aan- of uitschakelen



De pomp aan- of uitschakelen

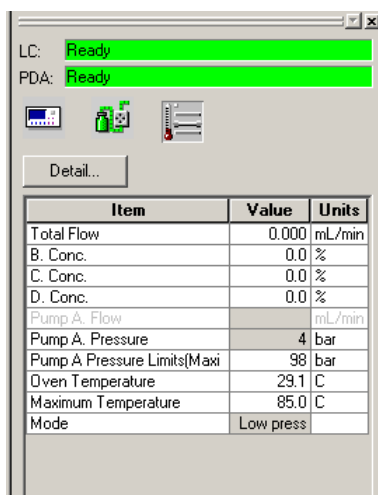


De detector op nul stellen



De oven aan- of uitschakelen

De huidige status van het apparaat is te zien in de rechter kolom, de **Instrument Monitor**. Het is in die balk ook mogelijk om buiten de methode om parameters te veranderen.



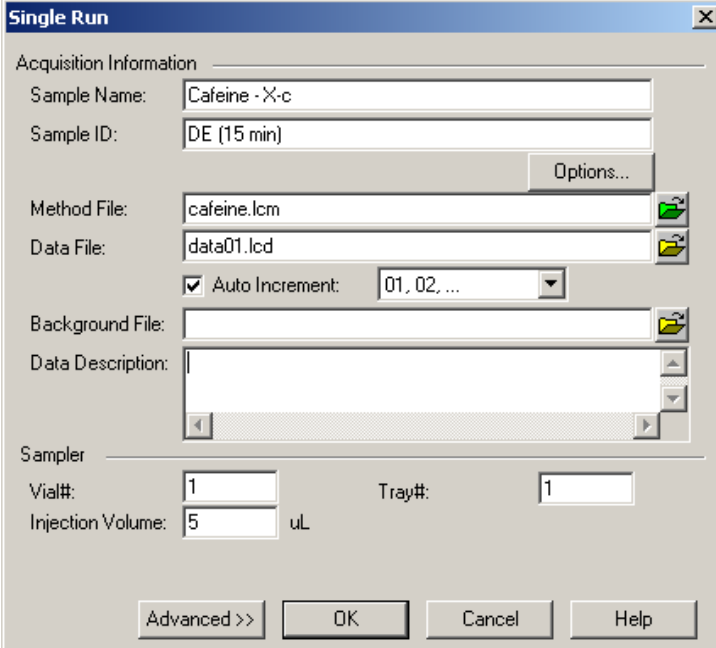
Item	Value	Units
Total Flow	0.000	mL/min
B. Conc.	0.0	%
C. Conc.	0.0	%
D. Conc.	0.0	%
Pump A. Flow		mL/min
Pump A. Pressure	4	bar
Pump A Pressure Limits(Maxi	98	bar
Oven Temperature	29.1	C
Maximum Temperature	85.0	C
Mode	Low press	

Voor dat je kunt meten moet je eerst de oven op temperatuur laten komen.

- Klik op het oven-icoontje. Het vakje **LC** in de **Instrument Monitor** wordt geel en geeft de mededeling "Wait Oven".
- Wacht tot **LC** weer groen is en "Ready" aangeeft voordat je verder gaat.

Nu kun je de meting starten.

- Klik op **Single Start**  in het zijmenu of de taakbalk.

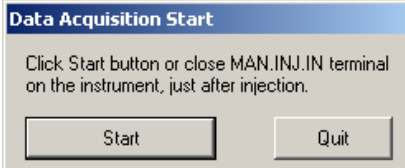


- Geef de volgende gegevens op:

Sample Name	Geef hier aan welke stof je wilt meten en de naam van je groepje. Deze naam gebruik je tijdens je hele experiment.
Sample ID	Geef hier iedere meting een unieke waarde mee, bijvoorbeeld een volgnummer of -letter. Verander deze waarde om duidelijk onderscheid te kunnen maken tussen verschillende metingen.
Method File	Als het goed is heb je de methode die je gaat gebruiken al ingeladen en hoef je hier niets aan te veranderen. Let op dat het programma in de goede map staat (zie de tweede 'Let op' in hoofdstuk 2). Mocht je toch een andere methode willen gebruiken, kun je die hier opzoeken of invullen.
Data File	Geef hier een naam op voor het bestand waarin de meetgegevens worden opgeslagen. Deze bestandsnaam hoef je slechts één keer op te geven. Vink ook het vakje Auto Increment aan, zodat iedere meting in een apart bestand terecht komt.
Data Description	Als je wilt kun je hier extra informatie geven over je sample.

- Verander niets aan de overige invulvelden en klik op **OK**.

Het volgende scherm verschijnt:



- Als één van de vakjes **LC** of **PDA** nog niet groen is, moet je wachten met injecteren tot dat wel het geval is.
- Zet nu de injectiekraan van het HPLC-apparaat in de 'LOAD'-stand (kraan omhoog).
- Leid de spuit volledig in je injectiepoort voordat je deze leegduwt. Injecteer je monster in de loop (enkele tientallen μL , ook nodig om de loop de spoelen). Wanneer de loop vol is komt het restant in het potje naast de injectiekraan terecht. Wees voorzichtig in het gebruik van de injectiespuit, want deze is erg gevoelig.
- Draai de kraan naar de 'INJECT'-stand (kraan omlaag) en laat de spuit in de injectiepoort zitten. Het bovengenoemde scherm op de computer verdwijnt en de meting wordt automatisch gestart.
- Haal de spuit uit de injectiepoort als zowel het vakje **LC** als het vakje **PDA** in de **Instrument Monitor** de melding "Running" aangeven.

Tijdens de meting kun je in de drie lichtgele vlakken in het midden van het scherm de meting bijhouden. Van boven naar onder zie je het volgende: een grafiek die de druk en temperatuur bijhoudt van de oven en de kolom, een grafiek met het gaschromatogram (de verschillende gekozen channels hebben een verschillende kleur), een grafiek met het actuele UV-spectrum.

Door met de muis rechthoeken te trekken kun je in alle grafieken inzoomen. Om weer uit te zoomen gebruik je uit het rechtermuisknopmenu de optie **Initialize Zoom**. Gebruik de optie **Normalize** om de grafiek op een passende manier in het scherm te krijgen.

5 Postrun Analysis

In dit hoofdstuk wordt beschreven hoe je na een meting chromatogrammen verder kunt analyseren.

- Klik in het blauwpaarse zijmenu op de knop **Data Analysis**. Het Postrun Analysis programma wordt nu geopend.
- Navigeer naar de map waarin je data-bestanden zijn opgeslagen (zie hoofdstuk 2).

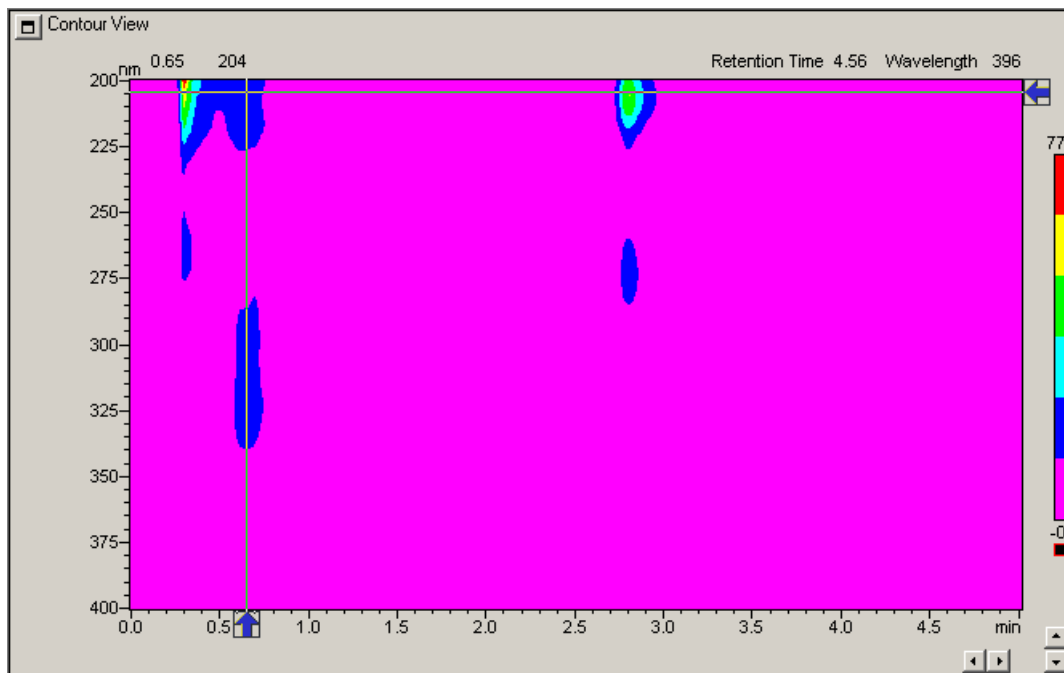
In de bestandenlijst aan de linkerkant van het scherm staan alle data-bestanden van je opgenomen chromatogrammen. Als je dubbelklikt op een bestand uit de lijst wordt deze ingeladen.

5.1 Schermindeling

Het scherm is ingedeeld in vier onderdelen die hieronder besproken zullen worden:

Contour View

In de linker bovenhoek is een contour-weergave van het 2D-UV-spectrum zichtbaar. Dit is een platte weergave van de continu opgenomen UV-spectra van de Diode Array Detector tijdens de meting. Met behulp van de tweede blauwe pijlen aan beide assen is een tijdstip tijdens de meting te kiezen (x-as) en een specifieke golflengte waarbij gemeten wordt (y-as). Bij het veranderen van het tijdstip worden automatisch de overige drie schermdelen bijgewerkt. Bij het veranderen van de golflengte worden de overige schermdelen alleen bijgewerkt als in het schermdeel **Chromatogram View** het **Extract**-channel gekozen is.

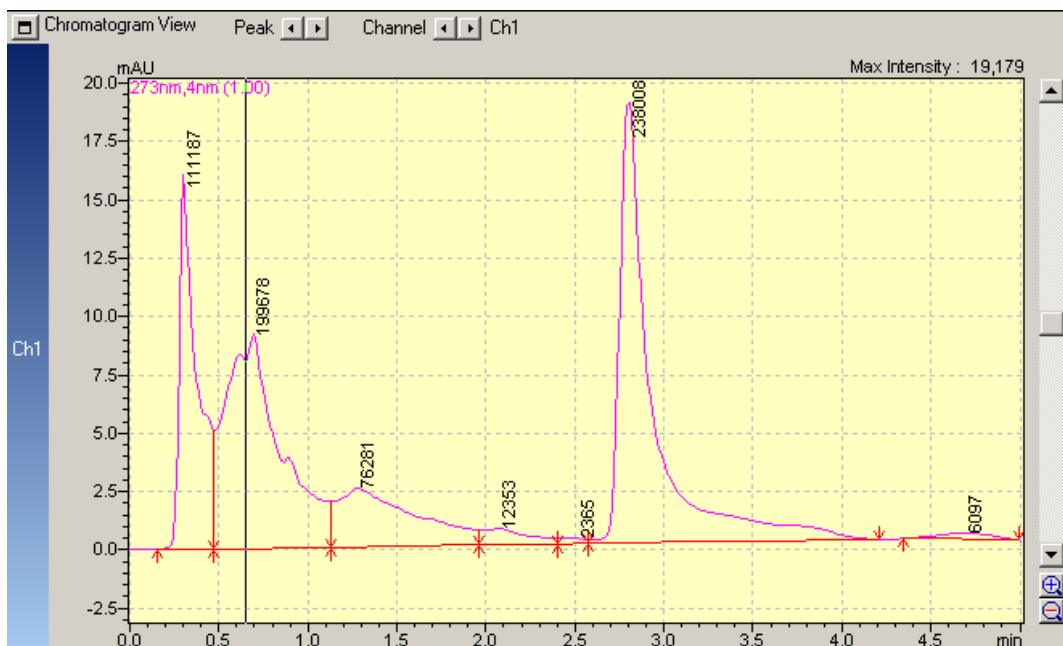


Chromatogram View

In de linker onderhoek is het opgenomen chromatogram zichtbaar. In het chromatogram worden met rode lijnen en pijltjes de grenzen van de geïntegreerde pieken aangegeven. De getallen bij de pieken zijn de piekoppervlakken. Zie hoofdstuk 5.2 als je handmatig pieken wilt integreren.

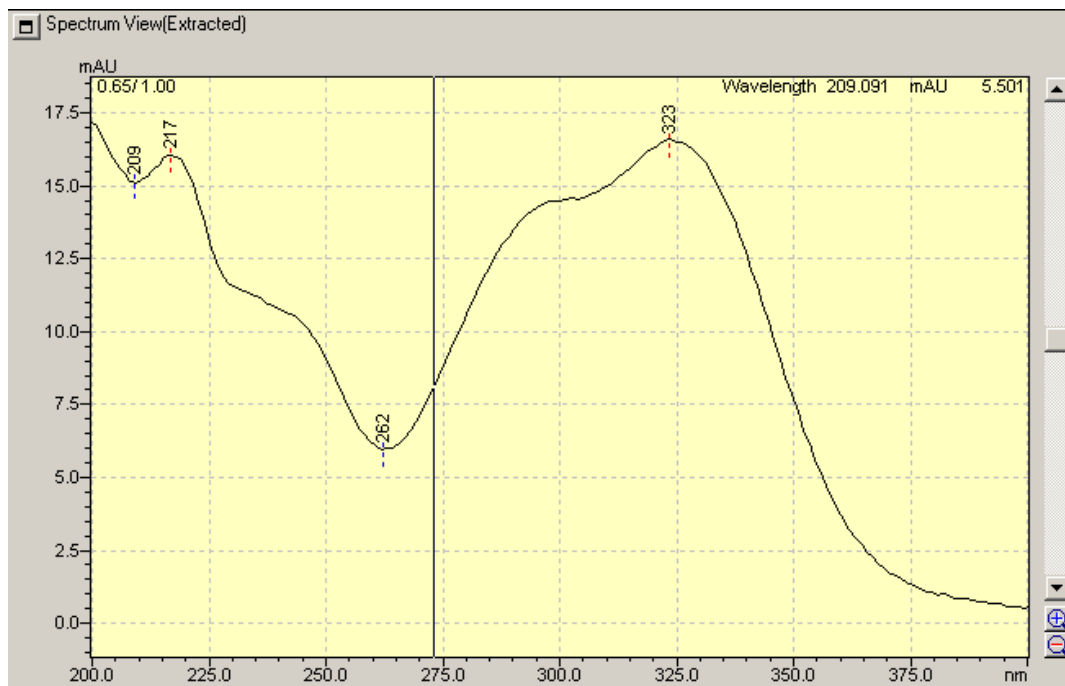
Met de linker set pijltjes bovenaan dit schermdeel kun je de uitleeslijn verplaatsen tussen de geïntegreerde pieken. Met de rechter set wissel je tussen het **Extract** en eventueel opgegeven channels. Na veranderingen worden de overige schermdelen bijgewerkt.

Het is mogelijk om de analyseparameters te veranderen (channel-keuze, integratieparameters, e.d.) door de optie **Data Analysis Parameters...** te kiezen uit het rechtermuisknopmenu. Zie voor die instellingen hoofdstuk 3.2.



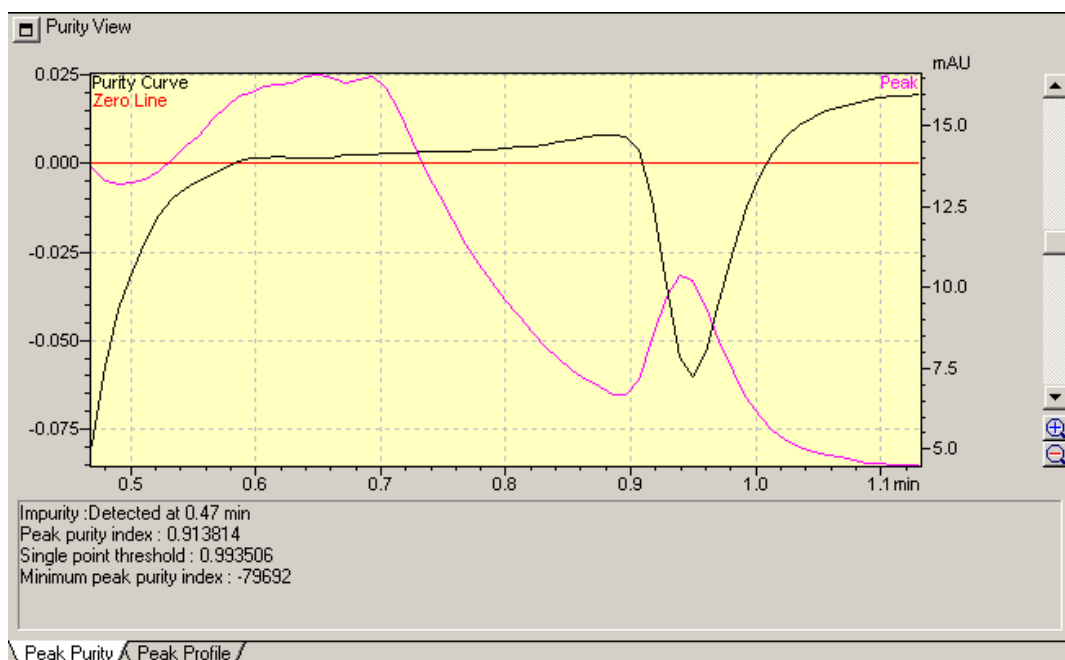
Spectrum View(Extracted)

In de rechter bovenhoek is het geselecteerde UV-spectrum zichtbaar. Pieken worden aangegeven met een rood stippelijntje, dalen met een blauw stippelijntje. Verder worden de golflengtes van de pieken en dalen gegeven. Als je de uitleeslijn verplaatst, worden ook de overige drie schermdelen bijgewerkt.



Purity View

In de rechter onderhoek wordt de zuiverheid van een piek weergegeven. De paarse lijn geeft de geselecteerde piek uit het chromatogram weer, de rode lijn is een nullijn en de zwarte lijn geeft het zuiverheidsprofiel weer dat de software berekent. Onder de grafiek staat een aantal waarden gegeven, waarbij de **Peak purity index** weergeeft hoe zuiver de software de geïntegreerde piek acht (een typische waarde voor een zuivere piek is 0.95 of hoger).



5.2 Handmatige Integratie

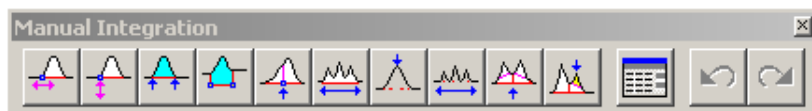
Het kan voorkomen dat je niet tevreden bent met de manier waarop de software bepaalde pieken heeft geïntegreerd. Je hebt dan de mogelijkheid om handmatig het begin en het einde van een piek in te stellen en zelfs de hoogte van de basislijn in te stellen.

- Kies in het schermdeel **Chromatogram View** de juiste channel en vergroot het scherm door op het icoontje in de linker bovenhoek te klikken.



- Klik op de Manual integration knop in de taakbalk.

De knoppenbalk voor handmatige integratie verschijnt.



Van links naar rechts hebben de knoppen de volgende functies:

- De eerste twee knoppen verschuiven de basislijn van een piek in horizontale respectievelijk verticale richting. Klik op één van de knoppen en daarna op één van de uiteinden van een piek (bij de rode pijltjes) om de basislijn te verplaatsen.
- Met de derde en vierde knop kunnen op twee manieren nieuwe pieken worden aangemaakt. Klik op één van de knoppen en geef daarna met de twee volgende muisklikken het begin en het einde van de piek aan.
- Met de vijfde knop kunnen pieken worden gesplitst. Voor het splitsen klik je op knop en daarna op de juiste plek in de piek die je wilt splitsen.
- Met de zesde knop kunnen pieken worden samengevoegd. Klik op de knop, daarna ergens in of voor de eerste piek die moet worden samengevoegd en tot slot ergens in of na de laatste piek die moet worden samengevoegd.
- Met de zevende knop kan een specifieke piek worden verwijderd. Klik op de knop en klik op de piek die je wilt verwijderen.
- Met de achtste knop kunnen meerdere pieken worden verwijderd. Klik op de knop en geef met de volgende twee muisklikken het gebied aan waarbinnen de pieken moeten worden verwijderd.
- Met de negende en tiende knop kan de basislijn van een piek op een geavanceerde manier worden aangepast. Bij goede scheiding van een monster is het gebruik van deze knoppen niet nodig.
- De elfde knop opent een tabel waarin alle wijzigingen ten opzichte van de oorspronkelijke integratie worden weergegeven.
- Met de laatste twee knoppen is het mogelijk bewerkingen ongedaan te maken of opnieuw uit te voeren.

Nadat je het chromatogram opnieuw hebt geïntegreerd is het verstandig om het data-bestand opnieuw op te slaan.

- Klik op het floppy-icoontje in de taakbalk om de wijzigingen op te slaan.

5.3 Rapport en afronden

Nadat je je chromatogram hebt bijgewerkt tot een presentabel geheel, kan er een overzichtelijk rapport van worden geprint.

- Klik in het paarse zijmenu op de knop **Data Report** .

Er verschijnt nu een overzichtspagina met hierin je chromatogram, een samenvatting van de meetmethode en tabellen met piekoppervlakken en retentietijden per channel. Merk op dat met deze standaardindeling het aantal printbare pieken beperkt is tot 10 per pagina en dat er maximaal gegevens van vier kanalen wordt weergegeven.

Mochten je gegevens niet passen op de pagina, dan zijn er alternatieve rapportindelingen beschikbaar. Ga hiervoor als volgt te werk:

- Navigeer in de bestandenlijst aan de linkerkant van het scherm naar de map "D:\ HPLC templates\".
- Sleep (niet dubbelklik!) de rapportindeling naar keuze naar je huidige rapportweergave.

De indeling wordt dan bijgewerkt.

Tot slot kun je het rapport printen:

- Klik op het printer-icoontje in de taakbalk.
- Geef onder **Print range** aan dat je alleen pagina 1 tot 1 wilt printen. De software print anders bij iedere uitdraai een leeg, extra vel papier.
- Klik op OK.

Als je terug wilt naar het scherm om je chromatogram te bewerken klik je op de **Return**-knop in het paarse zijmenu. Als je de **Postrun Analysis** wilt verlaten kun je deze afsluiten met het kruisje in de rechter bovenhoek.

6 Afsluiten

- Laat geen oplossingen/labjournaals/tissues achter bij het apparaat.
- Zorg dat de injectiespuit gespoeld is met methanol, ethanol of water en dat deze weer in het opbergdoosje zit.
- Laat het apparaat aan staan en sluit de **Real Time Analysis**-software niet af.