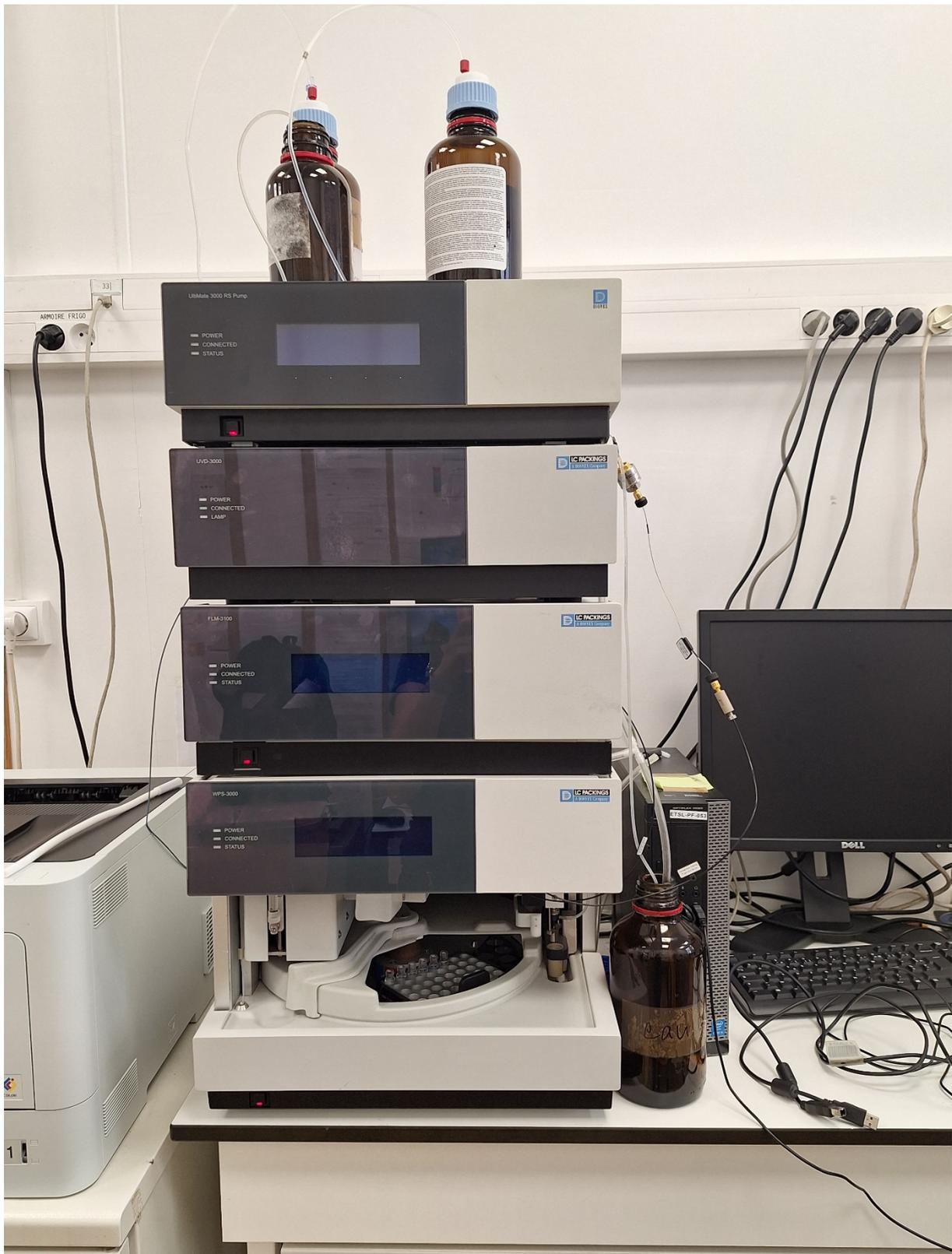


# Notice Technique Chaîne HPLC ULTIMATE U3000

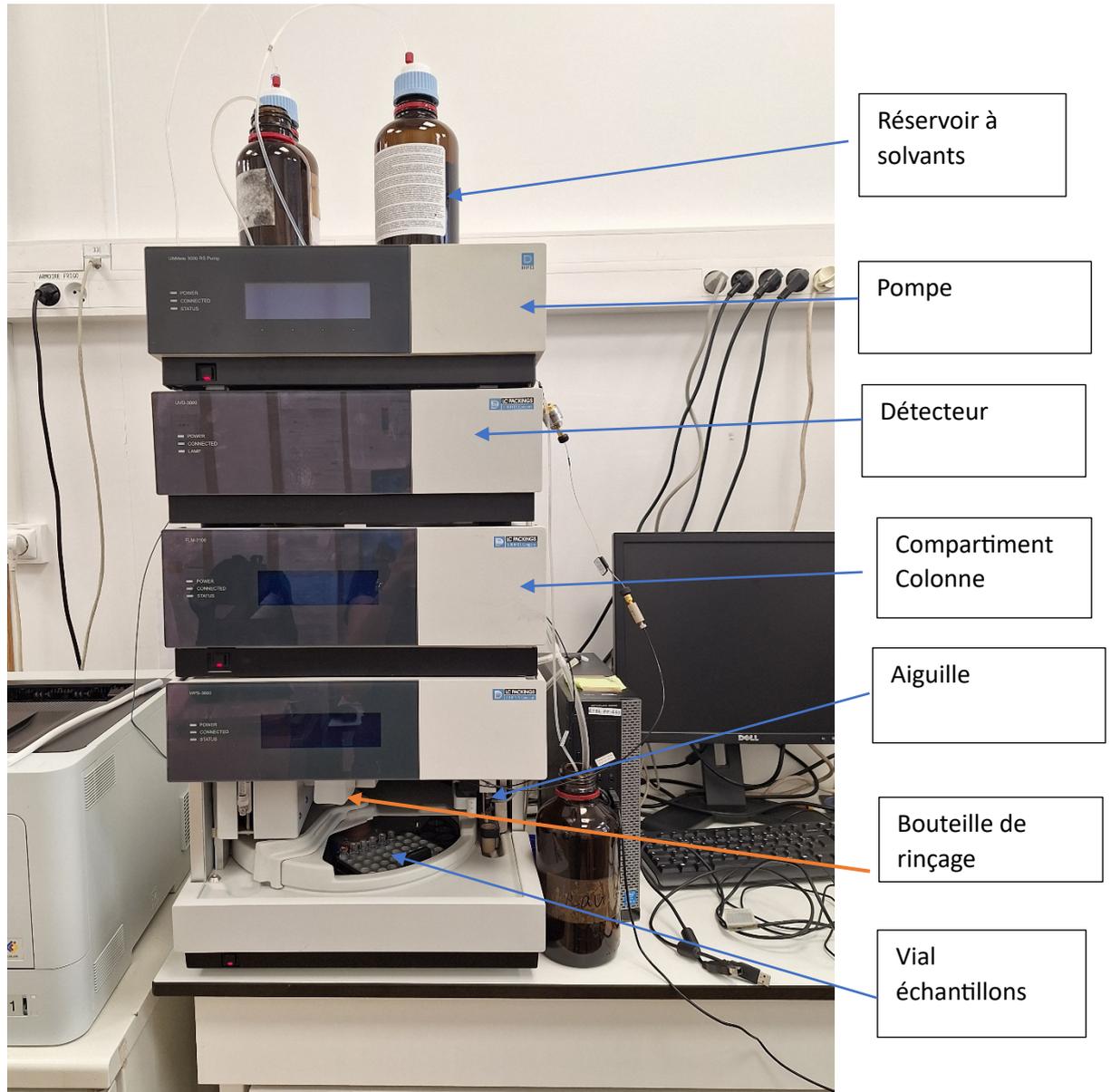


L. GODIN

S. HEUCLIN

## 1. PROCÉDURE DE MISE EN ROUTE DE LA CHAÎNE HPLC

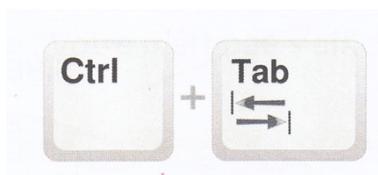
La chaîne HPLC est pilotée informatiquement grâce au logiciel **Chroméléon**



- 1) Allumer les différents modules (boutons à l'arrière)
- 2) Allumer le PC
- 3) Vérifier que l'icône chroméléon en bas à droite près de l'heure est idle sinon cliquer sur l'icône Server Monitor et cliquer sur start
- 4) Cliquer sur le bureau Chroméléon

Le logiciel s'ouvre

**Remarque :** pour passer d'une fenêtre à l'autre du logiciel, appuyer simultanément sur Ctrl et Tab :



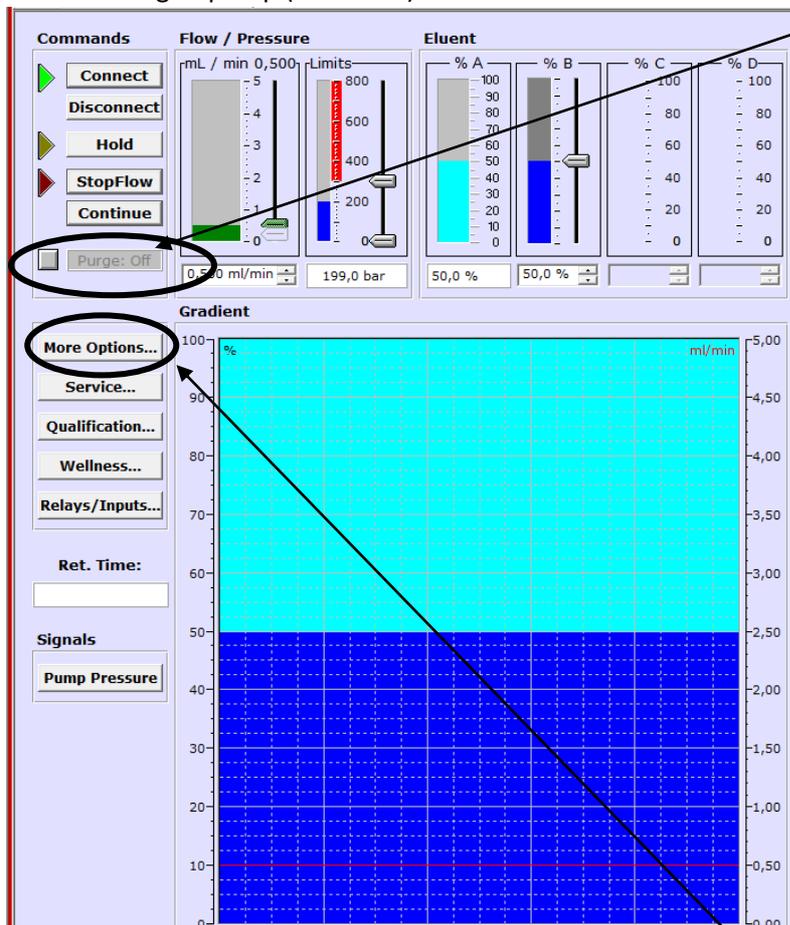
### Connexion des modules via Chromeleon :

Dans l'onglet Home, connecter les 4 modules (accéder par les onglets) en cliquant sur Connect.

### Purger les voies :

Ouvrir la vanne dorée sur le module du haut

Aller sur l'onglet pump (xPG-3x00) et mettre un solvant à 0 l'autre a 100 et cocher purge



Arrêter la purge dès qu'il n'y a plus de bulles d'air

Inverser les pourcentages de solvant et relancer la purge

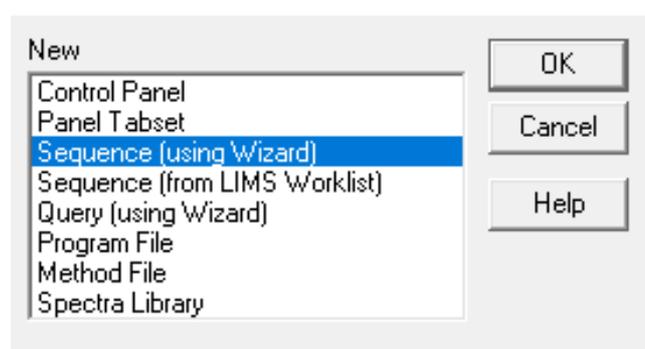
### Rinçage pompe :

À faire en début de journée, toujours dans l'onglet pump, cliquer sur More Options..., et dans Rear Seal wash, sélectionner le mode Active puis cliquer sur Override'Dry' Blocking.

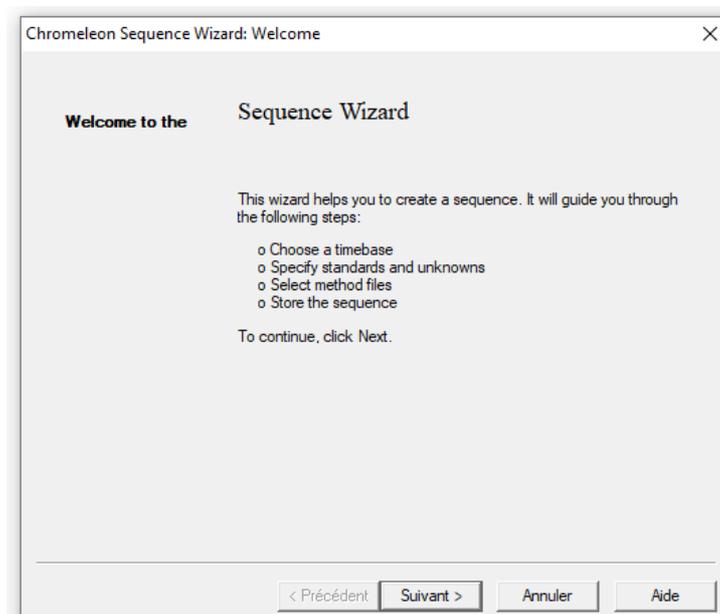
La machine est prête à être utilisée il faut donc préparer la séquence, le programme (pour l'analyse) et la méthode (pour la quanti.) pour pouvoir injecter. Attention de faire les étapes dans l'ordre ci-dessous.

## I) Création d'une séquence

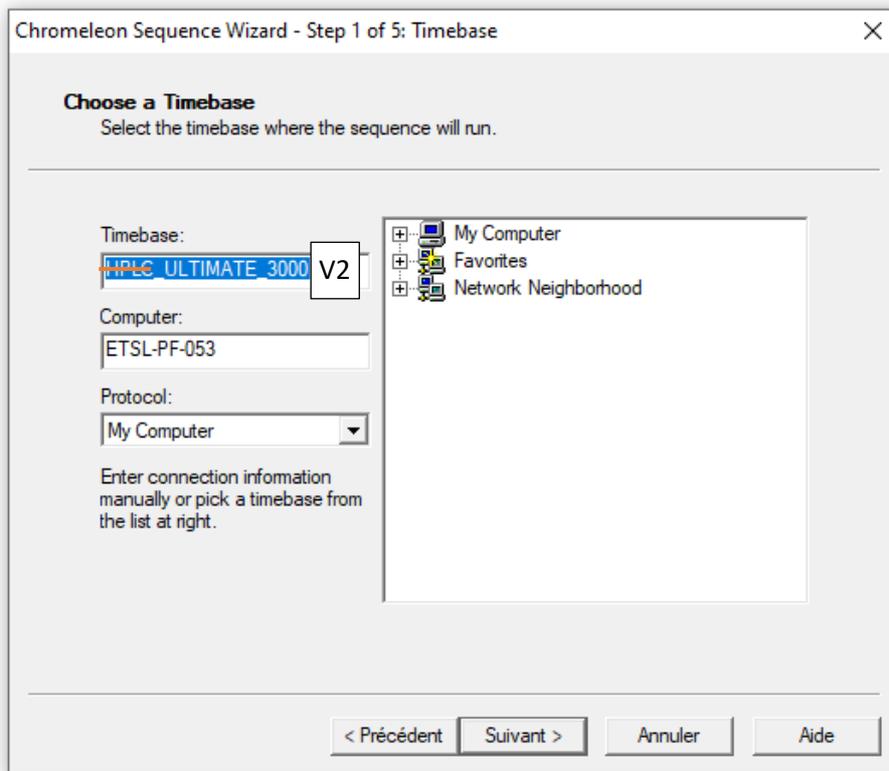
File -> New -> Sequence (using Wizard)



Une fenêtre s'affiche -> Cliquer sur Suivant :



Ne rien changer au paramètre et cliquer sur suivant



Remplir la fenêtre pour l'inconnu :

Laisser Use Template

Dans Template for Sample Name : Rentrer le nom inconnu, blanc...

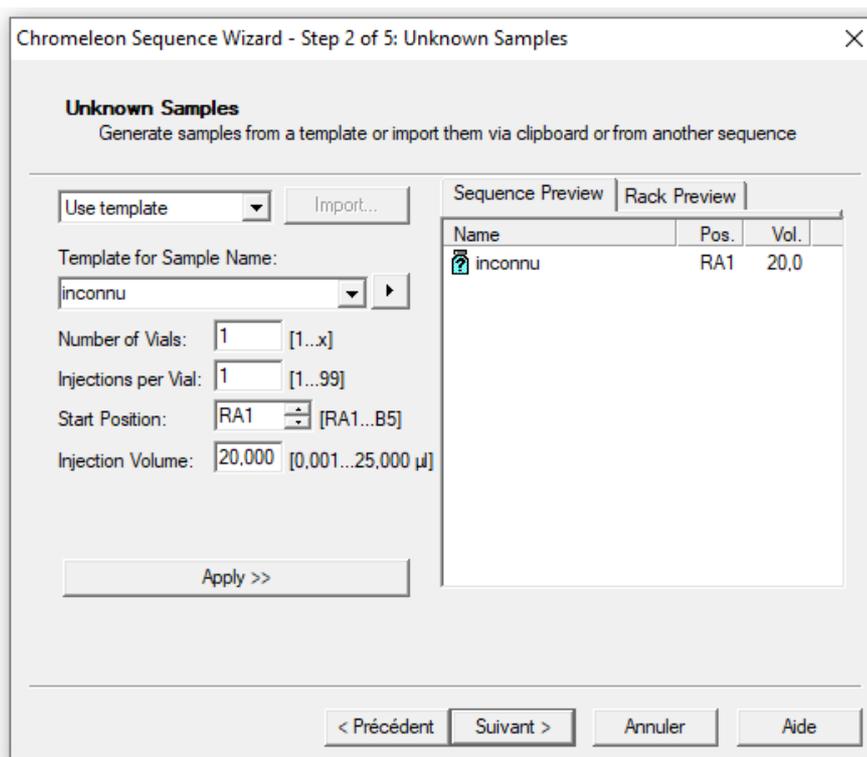
Number of vials : nombre d'inconnu

Injections per Vial : Le nombre de fois d'injection par vial

Start Position : R pour rouge RA1 RA2 RC3...

Injection Volume : 20

Puis cliquer sur Apply, puis suivant



Création de la gamme d'étalonnage :

Laisser Use template

Template for Sample Name : Nom de l'échantillon#n #n permet d'incrémenter les échantillons

Number of vials : nombre de vials

Injection per Vial : Nombre d'injection par vial

Start position : Position de depart RA2 RC1 ...

Injection Volume : 20

Cliquer sur Apply puis suivant

**Standard Samples**  
Generate standards from a template or import them via clipboard or from another sequence

Use template

Template for Sample Name:  
CAL#n

Number of Vials: 5 [1...x]

Injections per Vial: 1 [1...99]

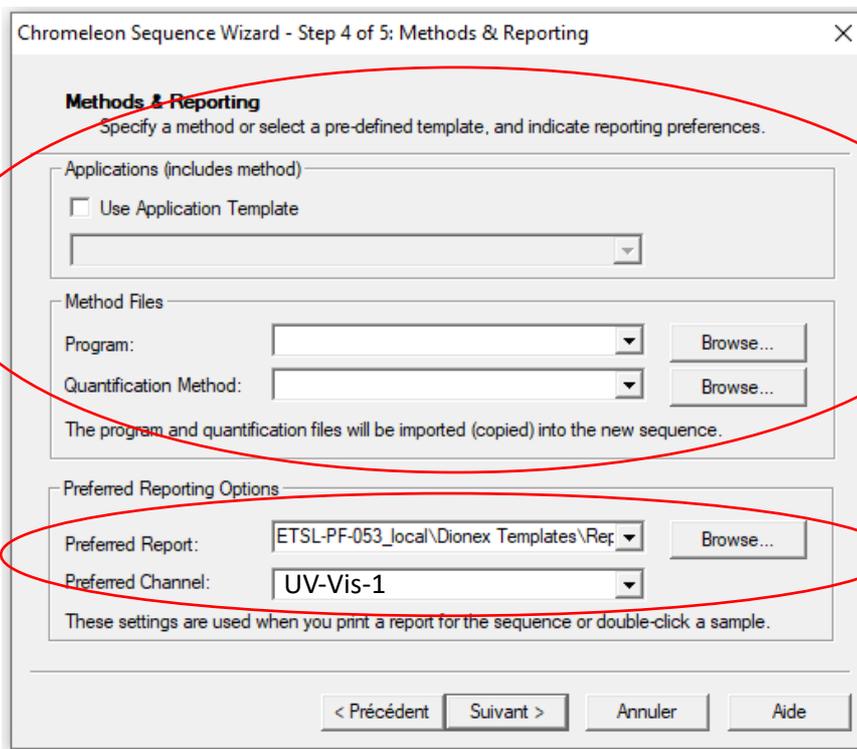
Start Position: RA2 [RA1...B5]

Injection Volume: 20,000 [0,001...25,000 µ]

Variation: 1 Standard(s)  
after each 1 Unknown(s)

Sequence Preview		Rack Preview	
Name	Pos.	Vol.	
CAL1	RA2	20,0	
CAL2	RA3	20,0	
CAL3	RA4	20,0	
CAL4	RA5	20,0	
CAL5	RA6	20,0	
BLANC	RA1	20,0	

< Précédent   Suivant >   Annuler   Aide



Ne rien remplir

Cliquer sur  
Browse

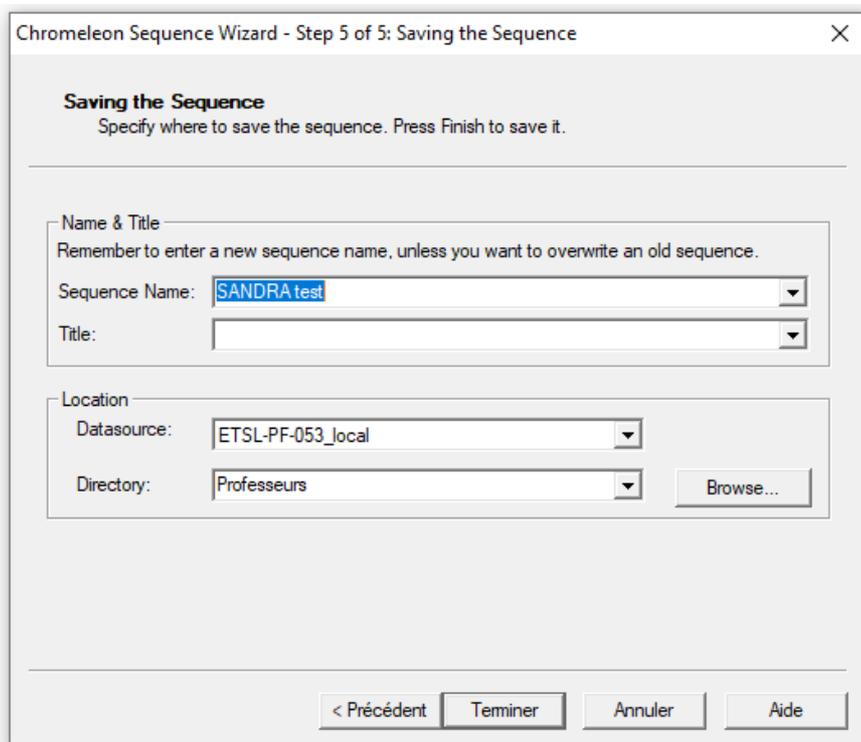
Et choisir le  
report par défaut

Puis cliquer sur Suivant

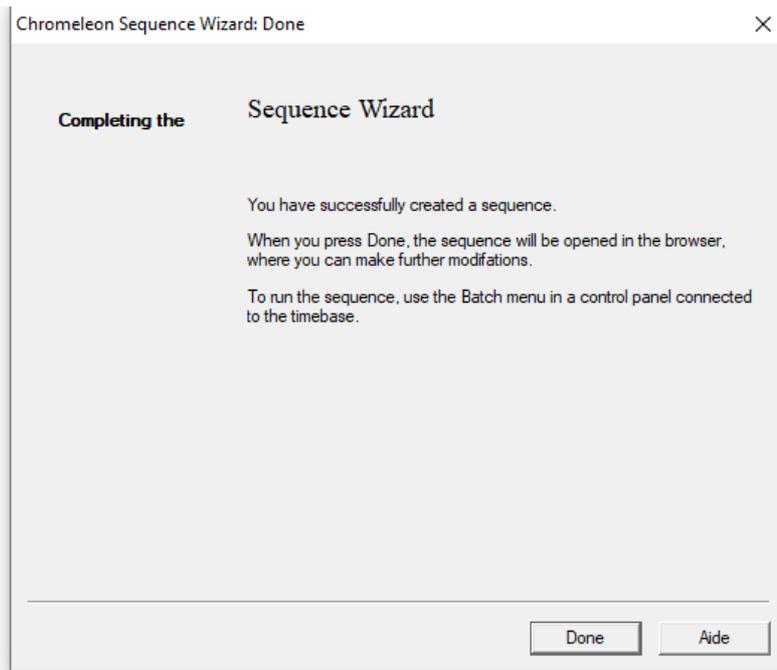
Remplir Sequence Name : mettre un nom

Title : Mettre un titre (optionnel)

Vérifier que le Directory est le bon

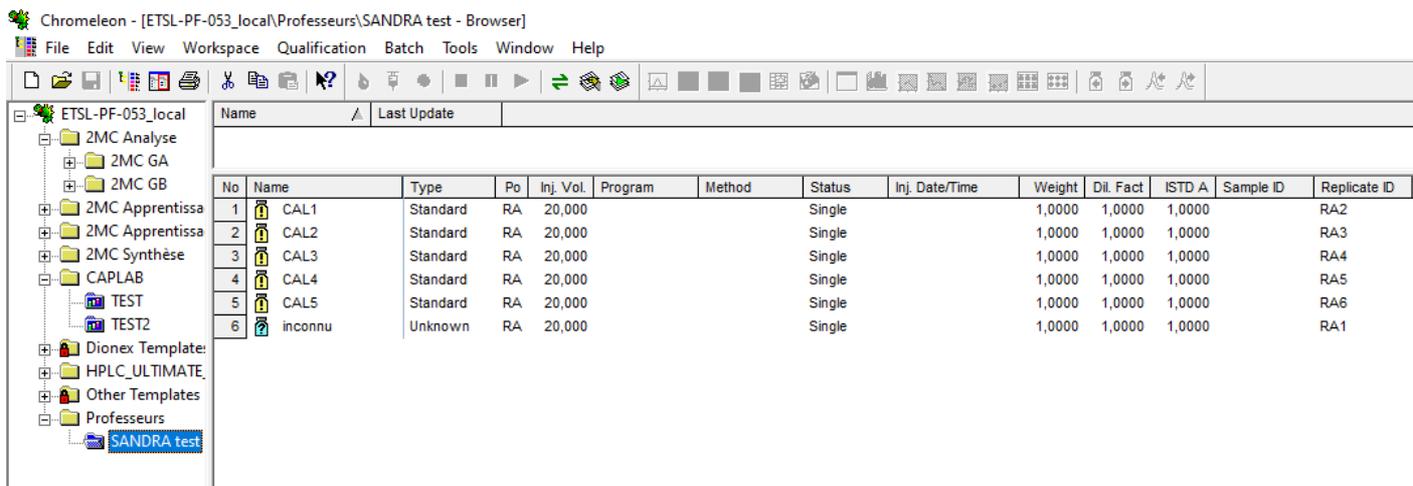


Cliquer sur Terminer



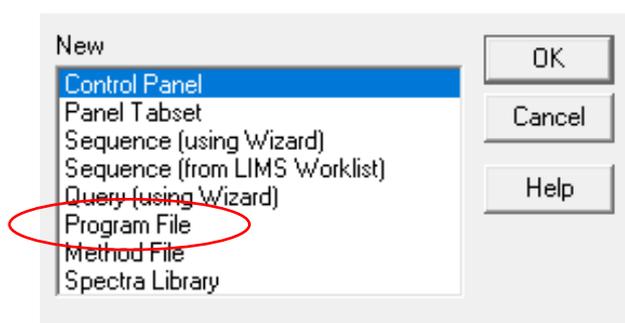
Cliquer sur Done

La séquence s'affiche comme ci-dessous

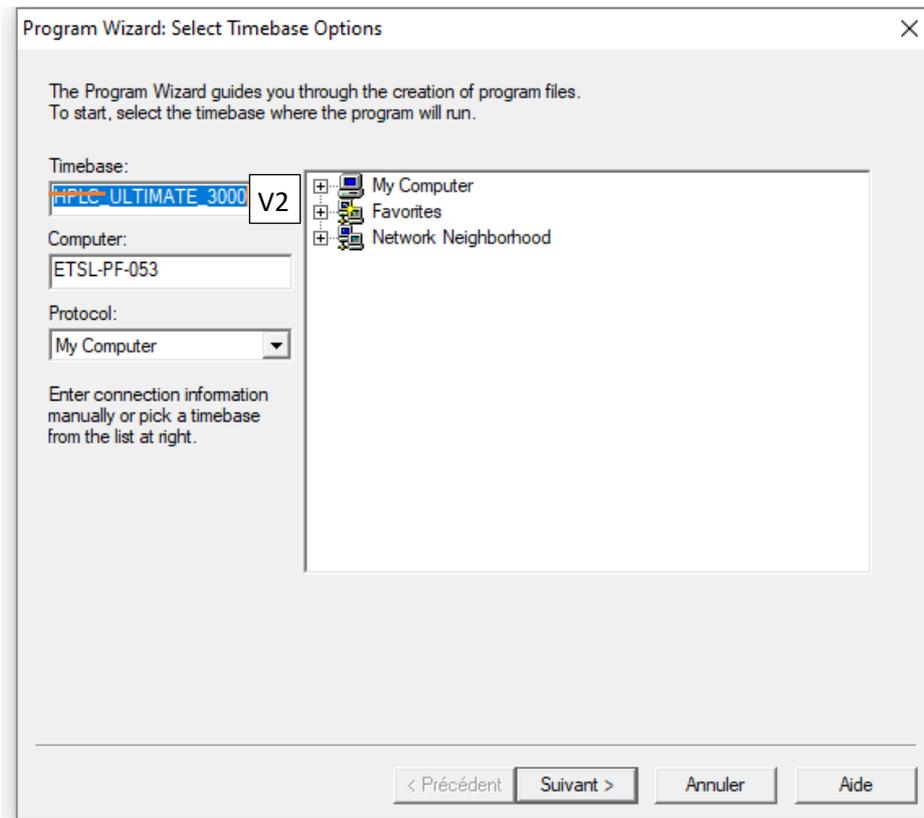


## II) Création du programme

Cliquer sur File/New/Program File puis OK

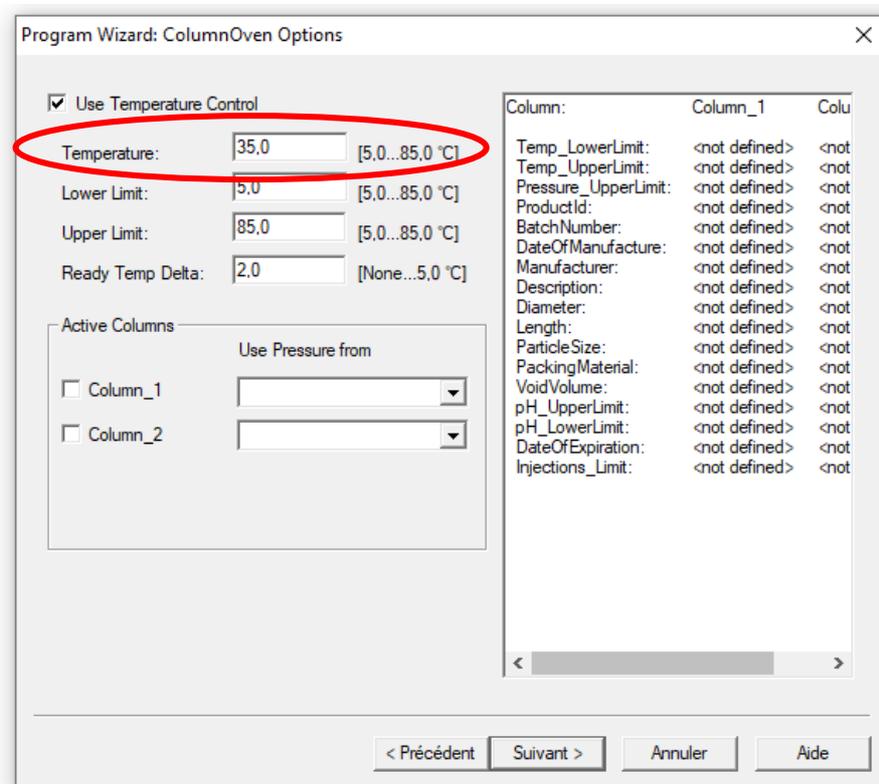


Ne rien toucher à la fenêtre ci-dessous puis cliquer sur suivant



Ne rien toucher à la fenêtre ci-dessus puis cliquer sur suivant

Programmation de la température de la colonne : indiquer 30 °C



Puis cliquer sur suivant

Ne rien toucher à la fenêtre suivante et cliquer sur suivant

No.	Time [min]	Left Valve	Right Valve
1	Init	<do not switch>	<do not switch>
2	0,000	<do not switch>	<do not switch>

Vérifier que la température soit à 23 °C, mais que « Use Temperature Control » soit décoché :

Use Temperature Control

Temperature:  [4,0..45,0 °C]

Max. Deviation:  [None..10,0 °C]

Safety Limits

Lower Limit:  [4,0..45,0 °C]

Upper Limit:  [4,0..45,0 °C]

Choisir le type de fonctionnement isocratique ou Ramp

Définir les noms des solvants

Program Wizard: Pump Options

Gradient Type: Ramp

Solvents	Name	Type	Start	End
%A:	EAU			
%B:	%B		10,0 %	10,0 %
%C:				
%D:				

Pressure Limits  
 Lower Limit: 0 [0...800 bar]  
 Upper Limit: 300 [0...800 bar]

Column Flow  
 Start: 0,000 [0,000...5,000 ml/min]  
 End: 0,000 [0,000...5,000 ml/min]

Maximum Flow Acceleration / Deceleration  
 Up: 6,000 [Infinite...9999,999 ml/min<sup>2</sup>]  
 Down: 6,000 [Infinite...9999,999 ml/min<sup>2</sup>]

Ne rien toucher

< Précédent   Suivant >   Annuler   Aide

Cliquer sur suivant

Program Wizard: Sampler Options

Draw Speed: 1000 [10...8333 nl/s]  
 Draw Delay: 10000 [0...300000 ms]  
 Dispense Speed: 2000 [10...8333 nl/s]  
 Dispense Delay: 2000 [0...300000 ms]  
 Dispense to Waste Speed: 4000 [10...8333 nl/s]  
 Sample Height: 4,000 [0,000...30,000 mm]  
 Puncture Depth: 7,000 [0,000...11,000 mm]  
 Wash Volume: 75,000 [0,000...5000,000 µl]  
 Wash Speed: 4000 [10...8333 nl/s]  
 Loop Wash Factor: 2,000 [0,000...10,000]

Synchronize injection with pump Pump  Rinse between Rejections

Low Dispersion Mode

LD Flow: 7,0 [0,0...99,9 µl/min]  
 LD Factor: 1,10 [0,01...100,00]

< Précédent   Suivant >   Annuler   Aide

Indiquer 25 µL pour gagner du temps de rinçage !

Ne rien toucher, et cliquer sur suivant

Program Wizard: Sampler Options

Inject Mode: FullLoop

---

Transport Vials (µPickUp): G2 To: G2

Transport Vial Capacity: 10000 [0...99999]

Transport Liquid Height: 3,000 [0,000...30,000 mm]

Transport Vial Puncture Depth: 7,500 [0,000...11,000 mm]

---

Flush Volume (FullLoop/Partial): 5,000 [2,400...10000,000 µl]

Flush Volume 2: 3,000 [0,000...10000,000 µl]

Loop Overfill: 2,000 [1,000...10,000]

< Précédent    Suivant >    Annuler    Aide

Ne rien toucher et cliquer sur suivant :

Program Wizard: Acquisition Options

Acquisition Time: From: 0,000 min To: 30,000 min

Select data acquisition channels / devices:

- ColumnOven\_FC\_BridgeFlow
- ColumnOven\_FC\_Stepper
- ColumnOven\_Temp
- ColumnPressure
- Pump\_Pressure
- UV

Select All    Deselect All

< Précédent    Suivant >    Annuler    Aide

Choisir le temps d'acquisition vérifier que la pump et UV sont cochés puis cliquer sur suivant.

Program Wizard: Pump\_Pressure Options ×

Step:  Auto  
 Fixed at:  [0,01...4,80 s]

Average:

---

Ne rien toucher et cliquer sur suivant :

Data Collection Rate:  [1...10 Hz]      Response Time:  [0,1...10,0 s]

Start settings and data acquisition times:

No	Channel name	AcqOn[min]	AcqOff[min]	Wavel.[nm]	Step[s]	Average
1	<input checked="" type="checkbox"/> UV_VIS_1	0,000	30,000	272	0,50	<input checked="" type="checkbox"/>
2	<input checked="" type="checkbox"/> UV_VIS_2	0,000	30,000	190	0,50	<input checked="" type="checkbox"/>
3	<input checked="" type="checkbox"/> UV_VIS_3	0,000	30,000	190	0,50	<input checked="" type="checkbox"/>
4	<input checked="" type="checkbox"/> UV_VIS_4	0,000	30,000	190	0,50	<input checked="" type="checkbox"/>

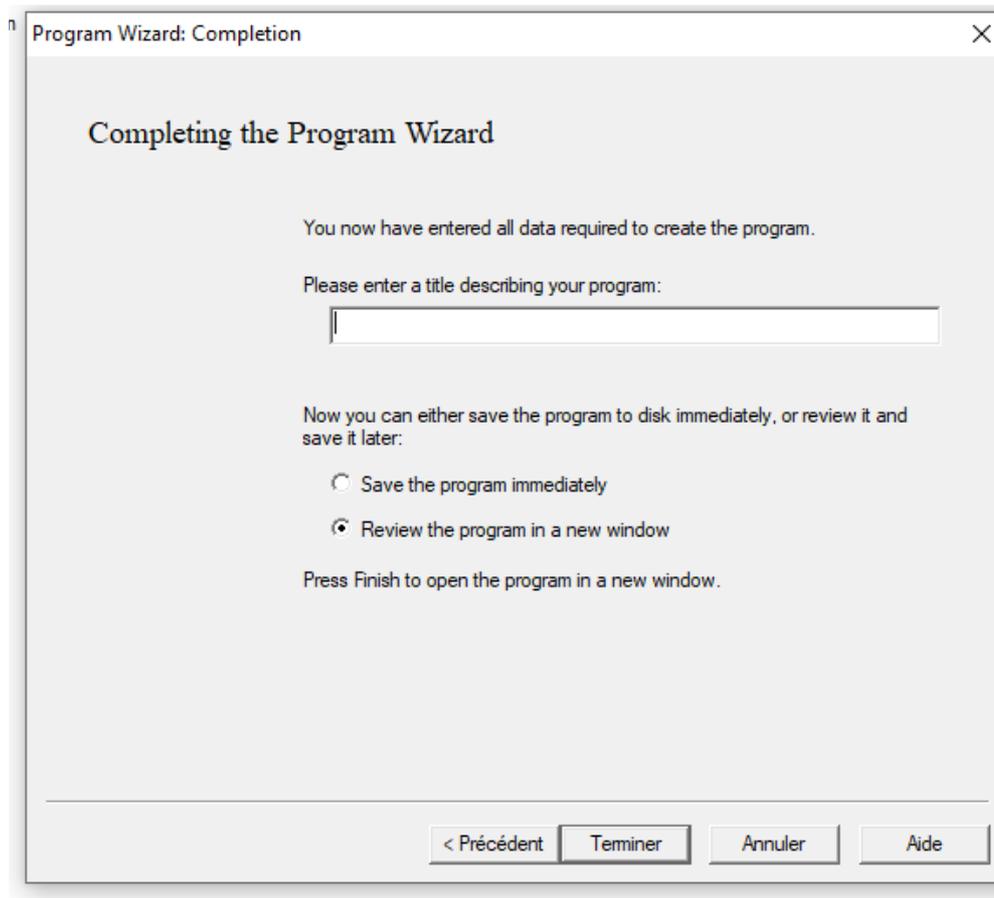
< Précédent    Suivant >    Annuler    Aide

Si vous voulez travailler avec une seule longueur d'onde, décocher les channel 2,3 et 4

Mettre votre temps d'acquisition sur AcqOff[min]

Choisir la longueur d'onde dans Wave

Puis cliquer sur Suivant :



Vous avez terminé votre programme, il suffit de lui donner un nom puis cliquer sur Terminer.

Votre programme apparaît sous la ligne ci-dessous

Name	Title	Timebase	Last Update	Operator	Siz
SANDRA test	pgm test	HPLC_ULTIMAT	05/10/2023 16:04:1	ETSL	2 KB

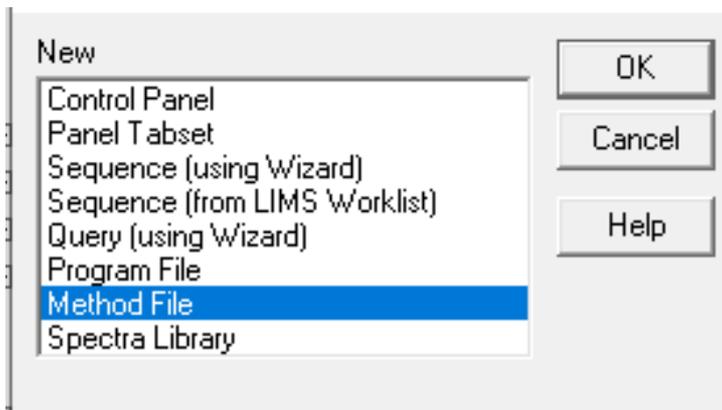
No	Name	Type	Po	Inj. Vol.	Program	Method	Status	Inj. Date/Time	Weight	Dil. Fact	ISTD A	Sa
1	CAL1	Standard	RA	20,000	SANDRA te		Single		1,0000	1,0000	1,0000	
2	CAL2	Standard	RA	20,000	SANDRA te		Single		1,0000	1,0000	1,0000	
3	CAL3	Standard	RA	20,000	SANDRA te		Single		1,0000	1,0000	1,0000	
4	CAL4	Standard	RA	20,000	SANDRA te		Single		1,0000	1,0000	1,0000	
5	CAL5	Standard	RA	20,000	SANDRA te		Single		1,0000	1,0000	1,0000	
6	inconnu	Unknown	RA	20,000	ANDRA test		Single		1,0000	1,0000	1,0000	

Remplir la 1<sup>ère</sup> ligne de la colonne Program puis F9 pour remplir toute la colonne automatiquement, puis faire un Save.

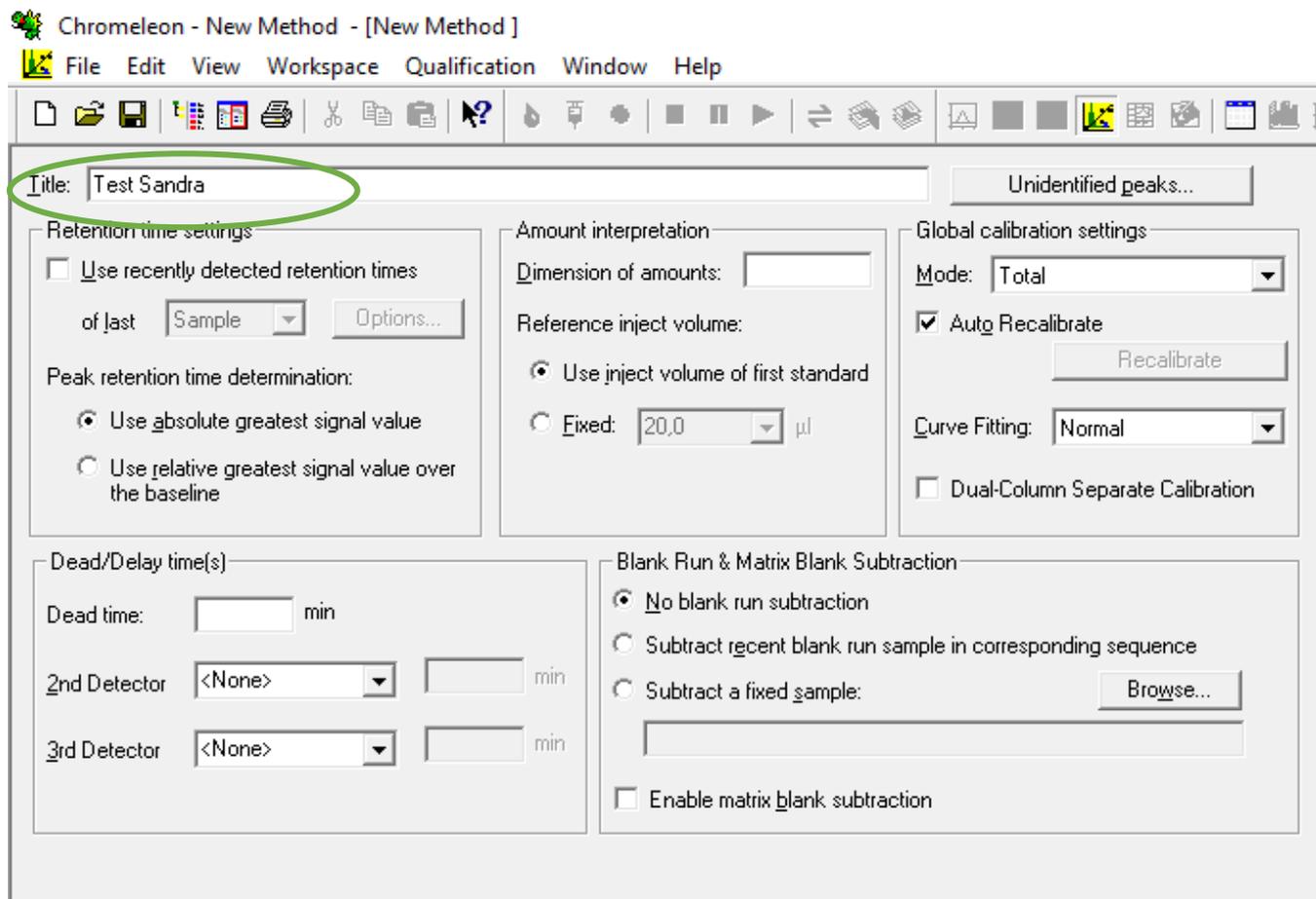
Remarque : Pour que le programme créer ne soit plus modifiable, faire un clic droit sur son nom, puis Properties, cocher Block.

### III) Création de la méthode

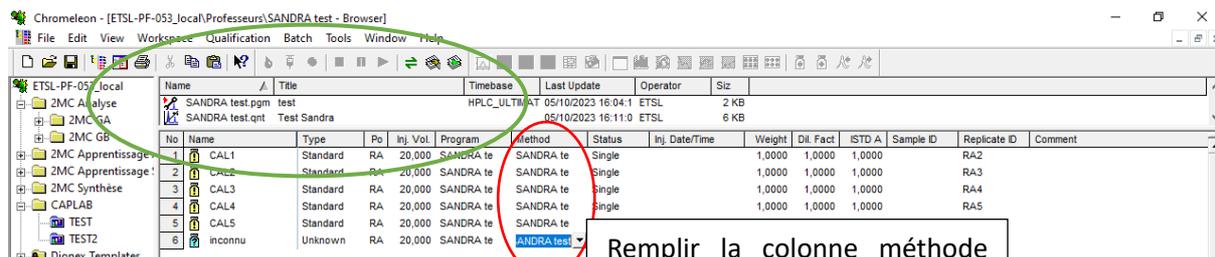
Files/New/Method File



### Mettre un titre

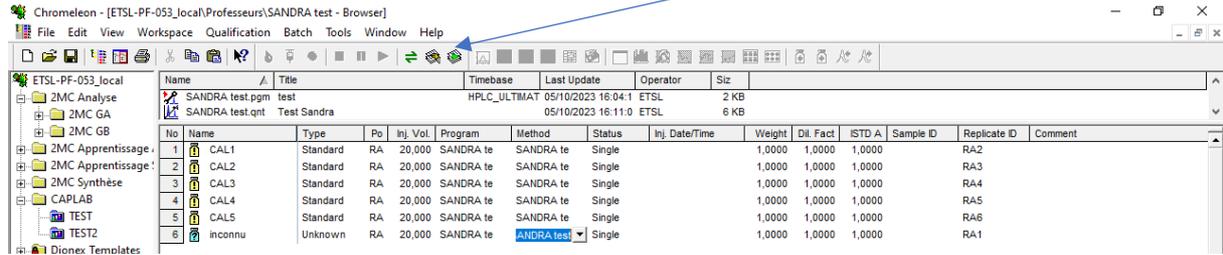


Ensuite clique sur file Save. Votre méthode s'affiche ci-dessous :



Remplir la colonne méthode pour chaque ligne (F9 pour toutes les lignes, puis Save).

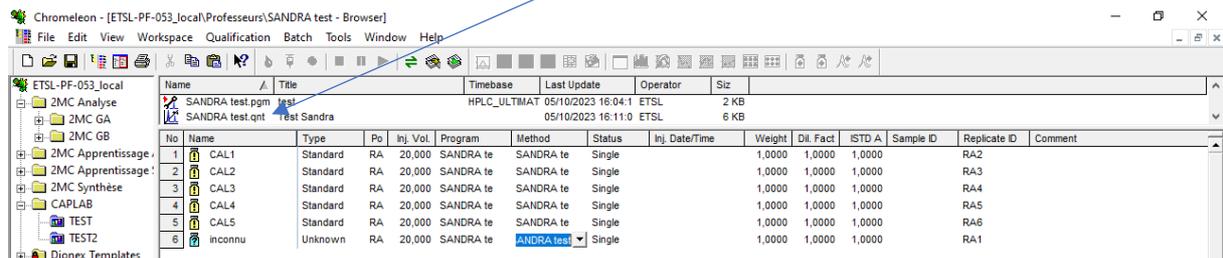
## Pour lancer la séquence (batch), cliquer sur l'icône Star/Stop Batch



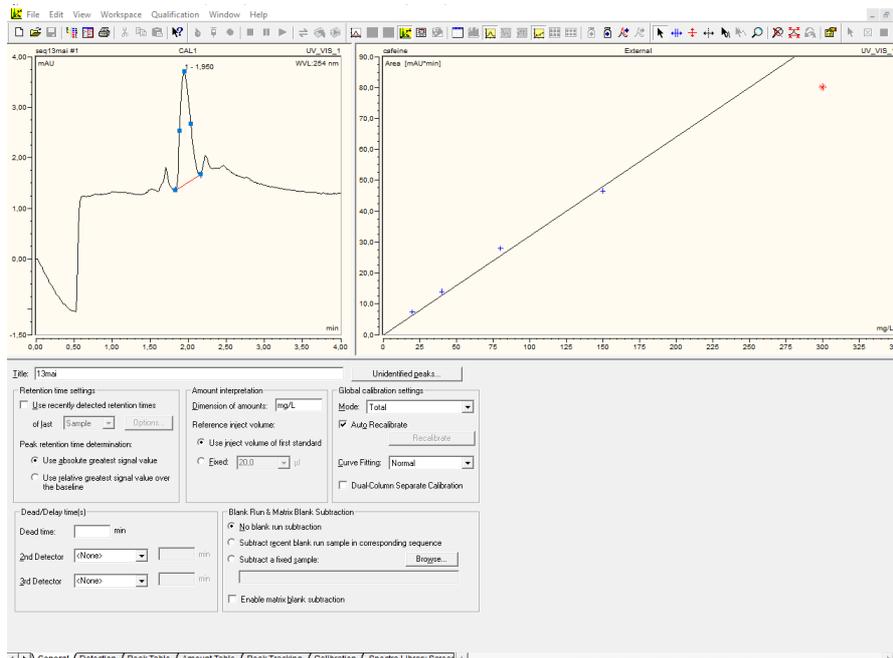
Une fenêtre s'ouvre : remove toutes les batch, puis add celle que vous venez de créer, puis cliquer sur Ready Check, pour vérifier qu'il n'y a pas de problèmes particuliers, et enfin sur Start, répondre Oui, puis OK.

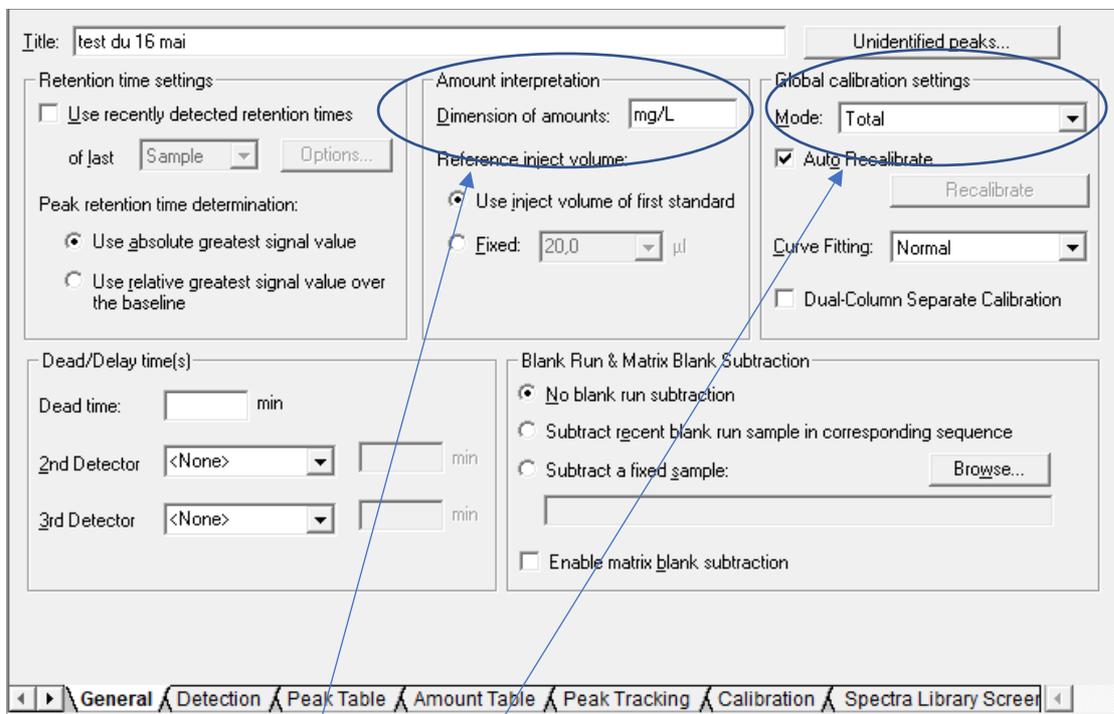
## IV) Obtention des résultats chromatographiques

Il faut cliquer directement sur la méthode .qtn :



Une fenêtre s'ouvre, cliquer dans l'onglet General, si ce n'est déjà fait :



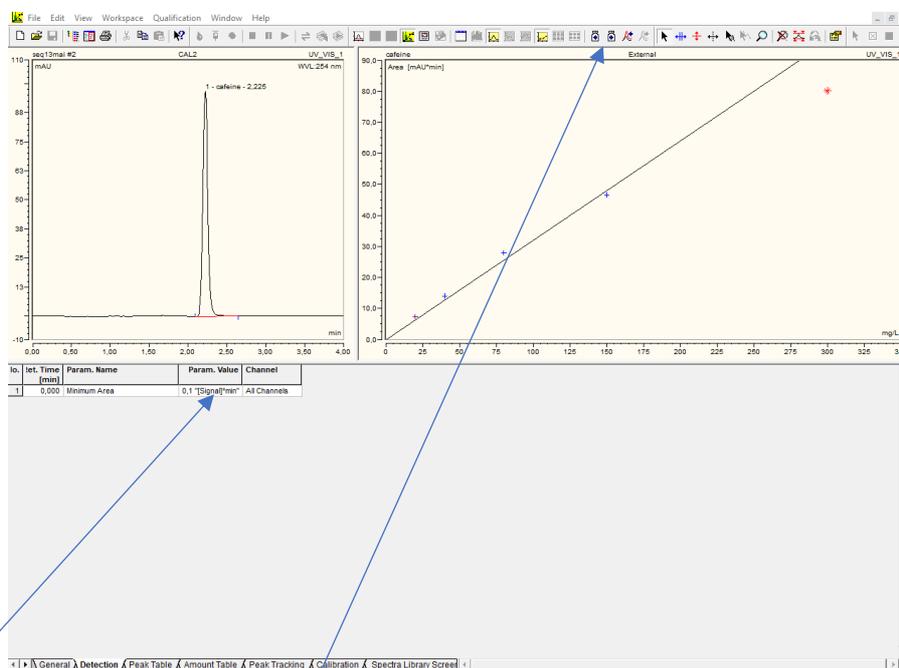


Dans Global calibration settings : Mode Total (prise en compte des étalons et des inconnues).

Remarque : si vous voulez réutiliser une calibration antérieure, alors choisir Mode Fixed, qui permettra de ne doser que des inconnues

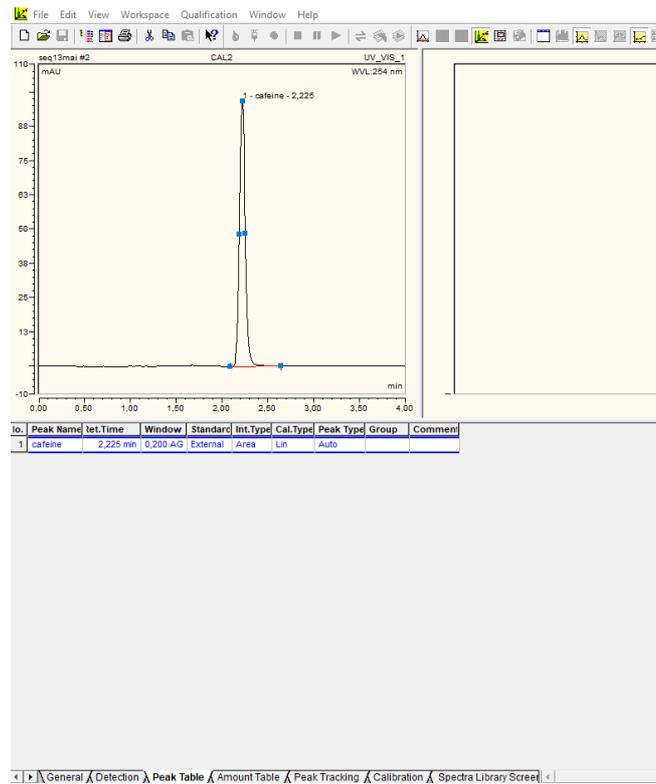
Dans Amount interpretation, indiquer l'unité utilisée.

**Dans l'onglet Detection :**



Choisir le chromatogramme jugé utile, puis modifier le seuil d'intégration en augmentant la Param. Value. Afin que seul le ou les pics d'intérêts soient intégrés.

## Dans l'onglet Peak Table :



Dans Peak Name, indiquer le nom de l'espèce chimique, faire un clic droit en choisissant Autogenerate Peak Table (lorsque vous avez plusieurs pics à nommer).

Dans Window : on peut augmenter la valeur, dans le cas où les temps de rétention auraient légèrement variés, lors des acquisitions !

Dans l'onglet Amount Table :

Faire un clic droit : columns : Edit Amount Columns, une fenêtre s'ouvre, Cliquer sur Auto-Generate :

Choisir Name

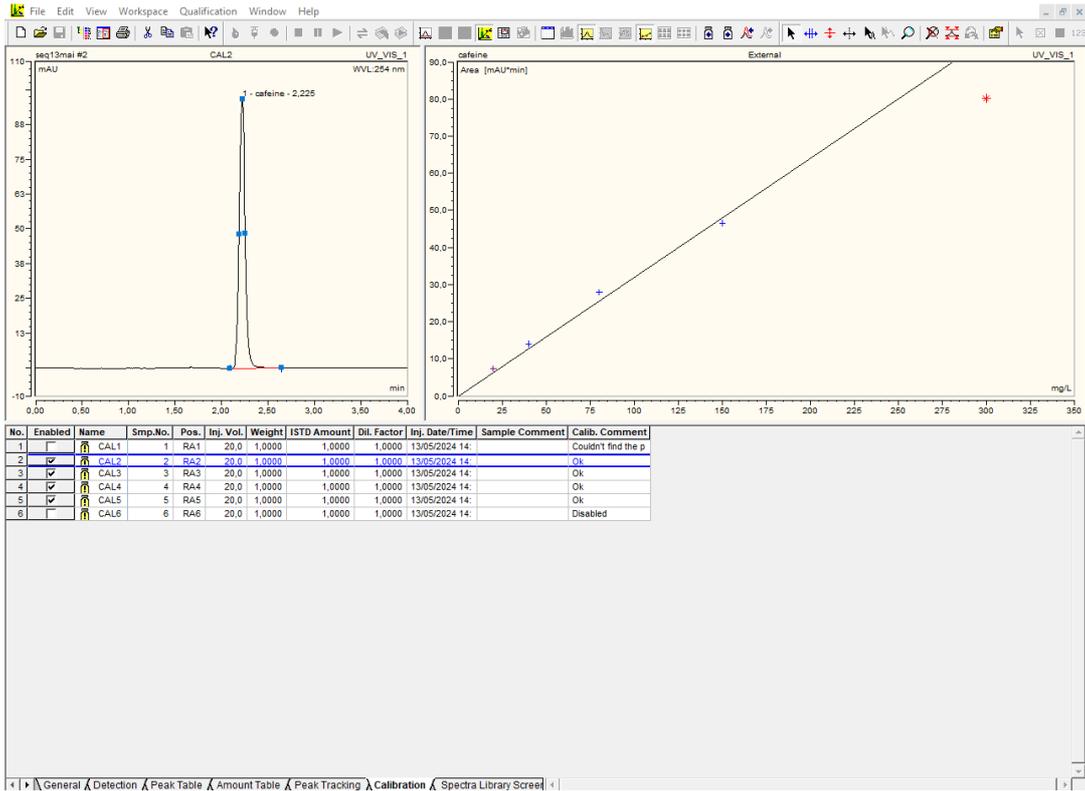
Choisir "Generate a separate amount column for EACH standard" Pour l'obtention d'une seule courbe de calibration, sinon choisir "Generate a separate amount column for ALL standard" pour plusieurs courbes. Cliquer sur Apply

lo.	Peak Name	Ret.Time	Resp.Fact.	Amount CAL1	Amount CAL2	Amount CAL3	Amount CAL4	Amount CAL5	Amount CAL6	Comments
1	cafeine	2,225 min	1,000000	0,000000	20,00000	40,00000	80,00000			

Mettre les concentrations des différents échantillons.

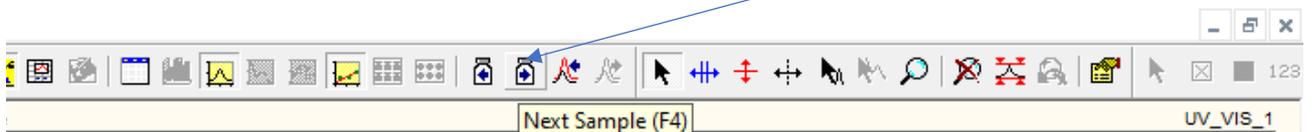
lo.	Peak Name	Ret.Time	Resp.Fact.	Amount CAL1	Amount CAL2	Amount CAL3	Amount CAL4	Amount CAL5	Amount CAL6	Comments
1	Caféine	2,200 min	1,000000	0,000000	20,00000	40,00000	80,00000	150,0000	300,0000	

## Dans l'onglet Calibration :

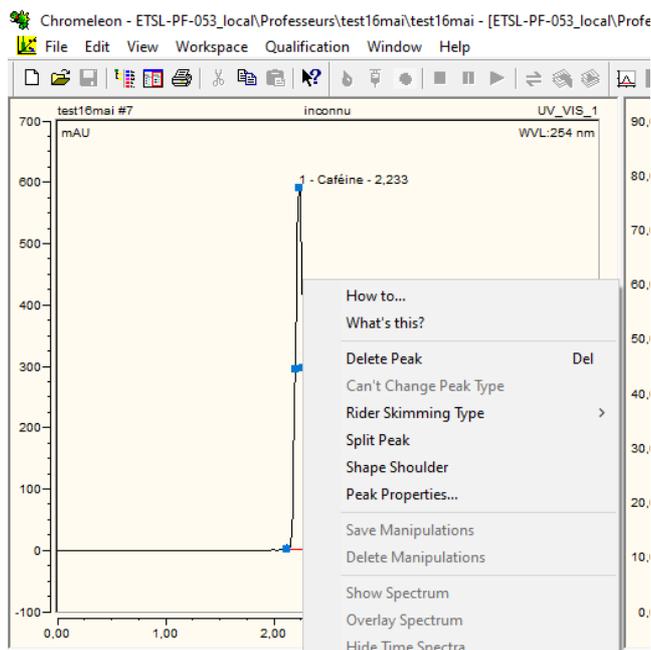


Vous pouvez voir les résultats de calibration, éventuellement enlever un point de gamme aberrant en le décochant dans le tableau.

Pour connaître la valeur de l'inconnu aller sur l'inconnu à l'aide de



Cliquer sur peak properties



Chromeleon - ETSL-PF-053\_local\Professeurs\test16mai\test16m

File Edit View Workspace Qualification Window Help

Properties of Peak No. 1

Component:	Caféine
Retention:	2,27 min
Width:	0,15 min
Peak Type:	BMB <sup>^</sup>
Height:	501,23 mAU
Area:	50,78 mAU*min
Amount:	147,250 mg/L

200

Valeur de la concentration de l'inconnu

## V) Élaboration d'un rapport pour impression

Ouvrir un chromatogramme en cliquant sur son nom

Name	Title	Timebase	Last Update	Operator	Siz
seq13mai.pgm	prog13mai	ULTIMATE_300	13/05/2024 13:37:5	ETSL	2 KB
seq13mai.qnt	13mai		13/05/2024 14:53:5	ETSL	12 KB

No	Name	Type	Po	Inj. Vol	Program	Method	Status	Inj Date/Time	Weight	Dil. Fact	ISTD A	Sample
1	CAL1	Standard	RA	20,000	seq13mai	seq13mai	Finished	13/05/2024 14:08:3	1,0000	1,0000	1,0000	
2	CAL2	Standard	RA	20,000	seq13mai	seq13mai	Finished	13/05/2024 14:15:0	1,0000	1,0000	1,0000	
3	CAL3	Standard	RA	20,000	seq13mai	seq13mai	Finished	13/05/2024 14:21:3	1,0000	1,0000	1,0000	
4	CAL4	Standard	RA	20,000	seq13mai	seq13mai	Finished	13/05/2024 14:28:1	1,0000	1,0000	1,0000	
5	CAL5	Standard	RA	20,000	seq13mai	seq13mai	Finished	13/05/2024 14:34:4	1,0000	1,0000	1,0000	
6	CAL6	Standard	RA	20,000	seq13mai	seq13mai	Finished	13/05/2024 14:41:1	1,0000	1,0000	1,0000	
7	inconnu	Unknown	RA	20,000	seq13mai	seq13mai	Finished	13/05/2024 14:47:4	1,0000	1,0000	1,0000	

Chromatogram showing a single peak at 2.392 minutes. The y-axis is mAU (0 to 700) and the x-axis is minutes (0.00 to 4.00). The peak is labeled 'cafeine - 2.392'.

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R
No.	Peakname	Ret.Time	Area	Amount	Type	Height	Rel.Area	Resolution									
		min	mAU*min	mg/L		mAU	%										
1	cafeine	2.392	48.5808	151.7125	BMB*	594.496	100.00	n.a									
<b>Total:</b>			<b>48.5808</b>	<b>151.7125</b>		<b>594.496</b>	<b>100.00</b>										

Cliquer sur l'icône Rapport, dans la barre des menus

Une fenêtre Rapport s'ouvre :

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
1	7	inconnu												
2														
3	Sample Name:	inconnu				Injection Volume:	20,0							
4	Vial Number:	RA7				Channel:	UV_VIS_1							
5	Sample Type:	unknown				Wavelength:	254							
6	Control Program:	seq13mai				Bandwidth:	n.a.							
7	Quantif. Method:	seq13mai				Dilution Factor:	1,0000							
8	Recording Time:	13/5/2024 14:47				Sample Weight:	1,0000							
9	Run Time (min):	4,00				Sample Amount:	1,0000							
10														
11											UV_VIS_1 WVL: 254 nm			
12														
13														
14														
15														
16														
17														
18														
19														
20														
21														
22														
23														
24														
25														
26														
27	No.	Ret. Time	Peak Name	Height	Area	Rel. Area	Amount	Type						
28		min		mAU	mAU*min	%	mg/L							
29	1	2.39	cafeine	594.496	48.581	100.00	151.712	BMB <sup>A</sup>						
31	Total:			594.496	48.581	100.00	151.712							
32														
33														
34														
35														
36														
37														
38														
39														

Integration
  Calibration(Curr.Peak)
  Calibration(Batch)
  Peak Analysis
  SST
  Summary
  Wellness Trending
  Audit Trail
  Overlay Print

Remarque : pour déprotéger un rapport (afin de le modifier), cliquer sur Edit : Layout Mode.

Lorsqu'un tableau ou un chromatogramme est modifiable, on observe des triangles rouges, il faut alors double-cliquer dessus afin d'effectuer les modifications que l'on veut faire.

S'il n'y a pas de triangles rouges, ce n'est que du texte modifiable en cliquant dessus.

Pour sauvegarder un rapport, il faut faire un clic droit dans une des cellules du rapport, puis « Save report definition ».