

2^{ème} année BTS Bioanalyses et Contrôles

Notice Technique Chaîne HPLC ProStar VARIAN



L. GODIN
<http://ligodin.free.fr>

ligodin@free.fr

TP n°2 : DOSAGE PAR H.P.L.C du BACLOFÈNE dans une SPÉCIALITÉ PHARMACEUTIQUE

1. PROCEDURE DE MISE EN ROUTE DE LA CHAINE HPLC	3
2. MODIFICATION DE LA PHASE MOBILE : EFFET DU POURCENTAGE D'ACN DANS L'EAU UP ACIDIFIEE	5
Utilisation d'une colonne Waters Atlantis HILIC 5 μ m : phase mobile : débit de 1,0 mL/min	
2.1. Phase mobile : 55/45 ACN/Eau acidifiée	5
2.2. Phase mobile : 55/45 ACN/Eau acidifiée	13
2.3. Phase mobile : 55/45 ACN/Eau acidifiée	14
3. EFFET DU DEBIT	14
Utilisation d'une colonne Atlantis HILIC 5 μ m : phase mobile : 65/35 ACN/eau acidifiée	
3.1. Débit à 1,2 mL/min	14
3.2. Débit à 0,8 mL/min	16
4. DOSAGE PAR COURBE D'ETALONNAGE	16
4.1. Utilisation de la méthode optimale et passage de la gamme (deux fois), de l'étalon de contrôle et de l'inconnue (deux fois)	16
4.2. Obtention de la droite d'étalonnage	17
4.2.1. Identification du pic d'intérêt	17
4.2.2. Transfert des données d'identification dans la méthode globale	17
4.2.3. Utilisation d'une liste de re-calcul pour obtenir la courbe de calibration	19
4.3. Utilisation d'une liste de re-calcul pour obtenir la quantité recherchée pour l'étalon de contrôle et les inconnues	21
5. EXTINCTION DE LA CHAINE HPLC	22
6. ÉLÉMENTS DE REPONSE AUX QUESTIONS	23

1. PROCÉDURE DE MISE EN ROUTE DE LA CHAÎNE HPLC

La chaîne HPLC que vous allez utiliser aujourd'hui peut être pilotée manuellement ou informatiquement grâce à un logiciel spécifique de la chaîne. Dans notre cas, il s'agit du logiciel **Galaxie** de chez Agilent.

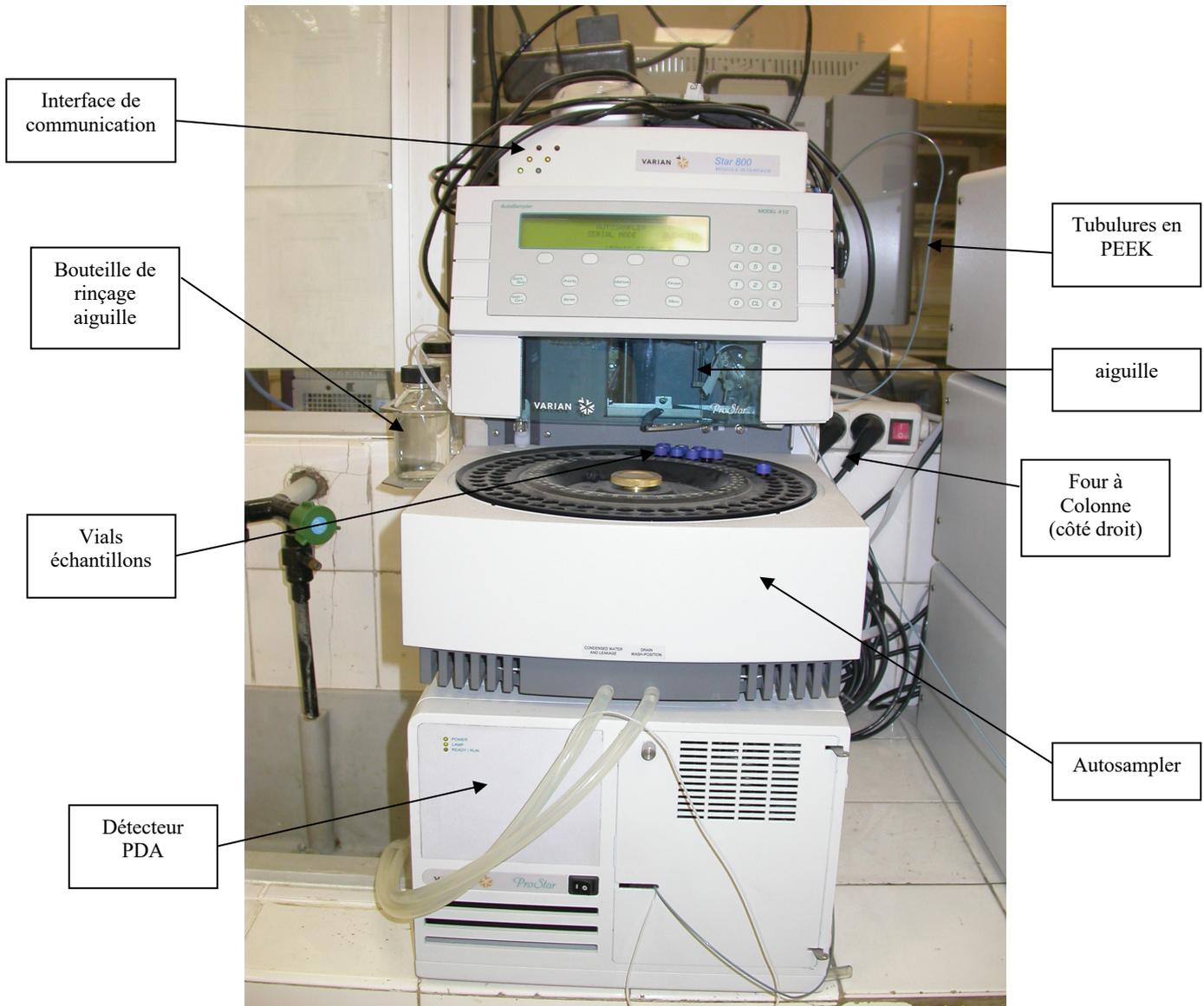


Figure 1 : photo d'ensemble de la 1^{ère} partie de la chaîne HPLC utilisée

L'ensemble chromatographique Varian, que vous allez utiliser, se présente sous la forme de deux assemblages d'appareils montés en colonne. Le premier assemblage comprend, de haut en bas :

- ✓ Le système de communication entre la chaîne HPLC et le PC (**Interface Varian Star 800 année 2004**) ;
- ✓ L'autosamplereur (**Auto sampler Pro Star AS 410 année 2004**) ;
- ✓ La bouteille de rinçage de l'aiguille ;

- ✓ le détecteur spectrophotométrique UV/Visible PDA (**PDA Pro Star 335 année 2004**) ;
- ✓ Le four à colonne (non visible sur la photo) ;

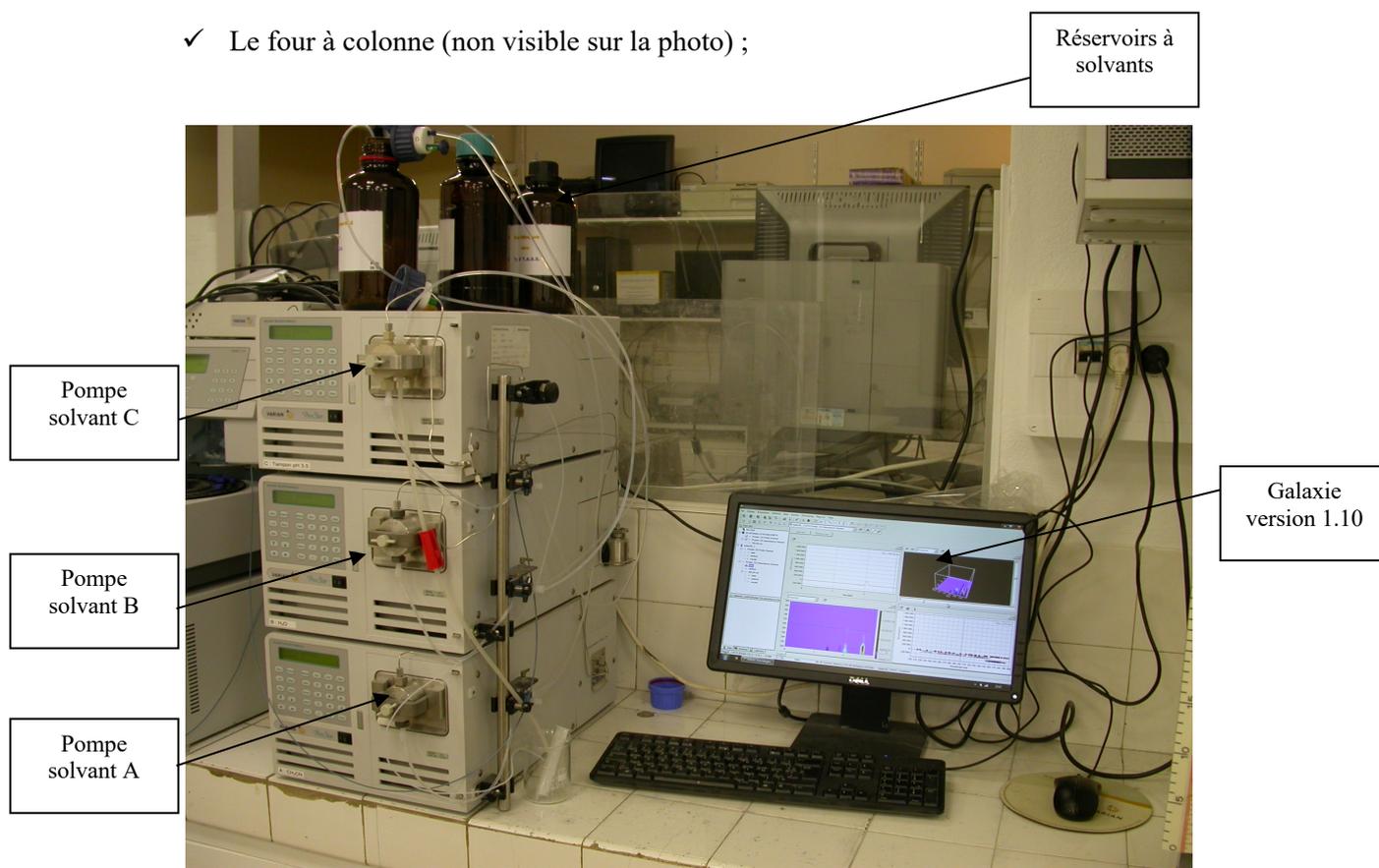


Figure 2 : photo d'ensemble de la 2nde partie de la chaîne HPLC utilisée

Le second assemblage comprend, de haut en bas, et de gauche à droite :

- ✓ Le bûcher réservé à la récupération du solvant de rinçage de la pompe C, dont il faut régulièrement surveiller le niveau afin d'éviter un éventuel débordement ;
- ✓ Les bouteilles de solvants A (ACN), B (MeOH) et C (Tampon) en communication avec l'ensemble des 3 pompes ;
- ✓ L'ensemble des 3 pompes relié à la colonne, elle-même reliée aux différentes bouteilles de solvants (**Pompe Pro Star 210 année 2004 sauf la pompe en PEEK année 2006**).
- ✓ PC équipé du **logiciel Agilent Galaxie v. 1.10 année 2011** qui tourne sous **Windows 7 année 2015**.

Cet appareillage est une chaîne de type gradient, c'est-à-dire qu'elle permet de travailler en mode gradient et présente 3 voies possibles (de A à C) organisées telles que :

- ✓ La voie C est réservée pour l'eau ultrapure acidifiée ;
- ✓ La voie B, pour le méthanol ;
- ✓ La voie A, pour l'acétonitrile ;

Etape 1 : allumage des appareils (en principe déjà réalisé)

1. Allumer les 3 pompes, le détecteur et l'autosampler (bouton arrière).
2. Effectuer un « wash » de la seringue, en appuyant directement sur **wash** de l'autosampler, puis régler la température à 30°C, appuyer sur **Escape** pour sortir de la température four.

Etape 2 : purge des voies A, B, et C : **Respecter l'ordre des étapes**

1. Plonger la canalisation C dans le tampon, et la canalisation A dans l'acétonitrile. Laisser la canalisation B dans le solvant de repos.
2. Vérifier le niveau des bouteilles de solvants que vous allez utiliser pendant la séance. Il faut un minimum de 0,5 litres par réservoir. Remplir si nécessaire.
3. Pour chaque voie, effectuer un **prime** (directement sur les pompes) jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de bulles dans les canalisations (on peut aussi en manuel, insérer la seringue de purge, et tourner le robinet en regard de la seringue, tirer sur celle-ci afin d'éliminer les bulles dans les canalisations, tourner le robinet de 90° avant d'enlever la seringue. Recommencer si besoin, pour chaque voie).
4. Sur l'autosampler, appuyer sur **Serial** (ne surtout pas appuyer sur **Escape**, auquel cas la liaison entre l'autosampler et le reste de la chaîne serait interrompue).
5. Allumer le PC puis l'écran, le mot de passe est **arielci**.

2. MODIFICATION DE LA PHASE MOBILE : EFFET DU POURCENTAGE D'ACN DANS L'EAU UP ACIDIFIEE

UTILISATION D'UNE COLONNE Waters Atlantis HILIC 5 μm :
Débit de 1,0 mL/min

2.1. Phase mobile : 55/45 ACN/Eau acidifiée

Etape 1 : mise en place de la colonne :

POUR LA PREMIÈRE MISE EN PLACE, APPELER LE PROFESSEUR POUR DÉMONSTRATION ET BON POSITIONNEMENT DE LA COLONNE !

1. S'assurer que la pression soit proche de 0.
2. La colonne possède un sens pour son installation. Celui-ci est indiqué par une flèche sur le corps de la colonne. Installer alors la colonne selon le sens logique.

Q D'après vous, quelle est la position et quel est le sens logique de la colonne ?

3. Desserrer les deux vis (en PEEK ou en inox selon la colonne) qui sont localisées soit aux extrémités d'une colonne soit à celles d'une union⁶⁹.



Remarque

Dans le cas de vis en inox, il faut utiliser une pince multiprise.

4. Faire dépasser légèrement de quelques mm la canalisation en PEEK à travers la vis et visser l'ensemble sur la colonne à chaque extrémité.

Q Selon vous, quel critère peut vous permettre de suspecter une éventuelle fuite de la phase mobile ??



Remarque

Après chaque changement de colonne, on doit procéder, avant toute injection, à une phase d'équilibration dans les conditions de travail souhaitées.

Q Quel est le but de l'équilibration ?

Q Selon la colonne utilisée et les conditions de travail choisies, la pression dans la colonne peut être différente. À votre avis, si cette pression est instable, c'est-à-dire qu'elle présente des fluctuations, quels problèmes cela traduit-il ?

⁶⁹ Quand une chaîne est au repos pendant au minimum 2 jours, il vaut mieux installer une union entre deux vis et stocker la colonne fermée à ses 2 extrémités par des vis spéciales voire du parafilm afin d'éviter toute contamination ou dégradation de la phase stationnaire de la colonne.

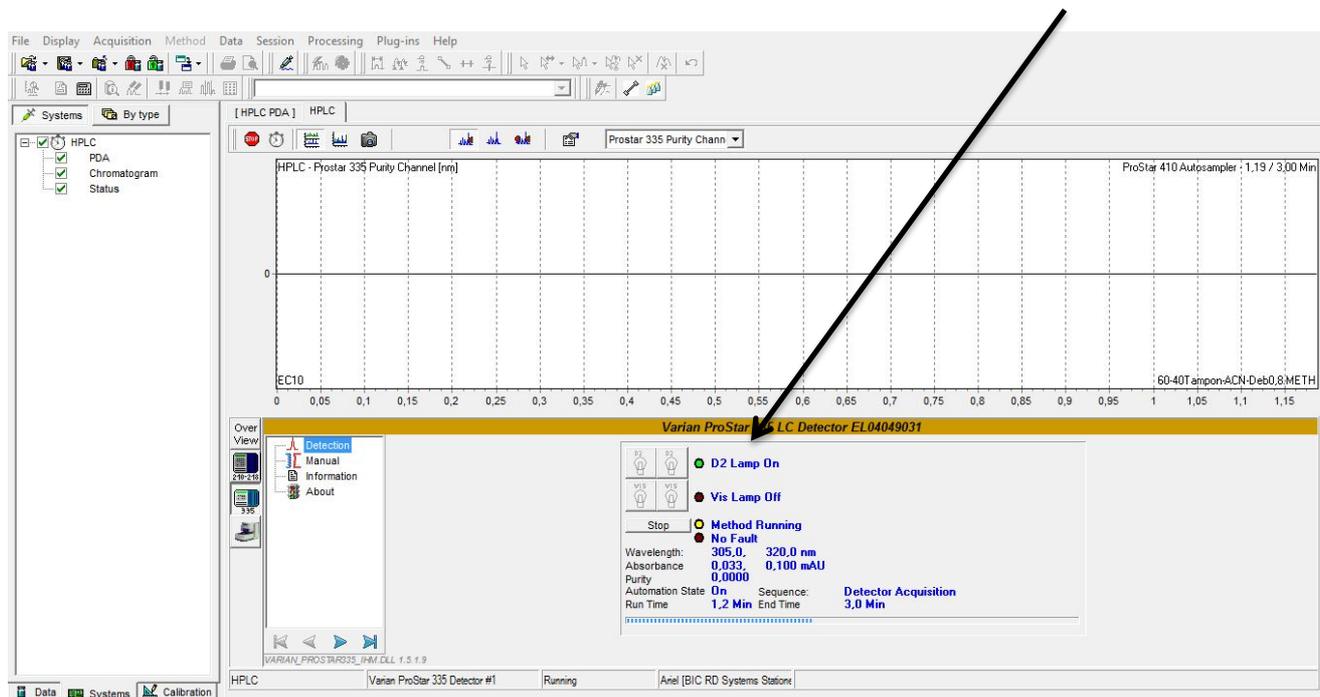
Etape 2 : création de la méthode : mode Isocratique – phase mobile : 55/45 Eau acidifiée pendant 3 min

Procéder comme suit : ouvrir le logiciel Galaxie en cliquant sur son icône :

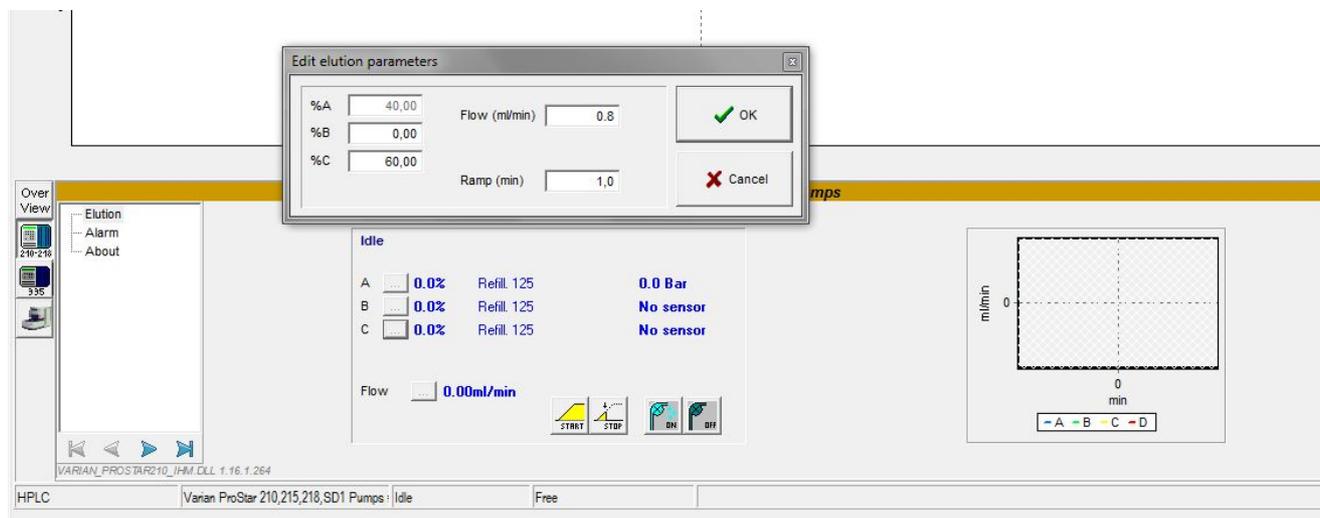


☞ Cliquer sur OK, puis cocher HPLC dans l'onglet (en bas à gauche) Systems.

☞ Dans la fenêtre de droite, onglet HPLC, sélectionner **Détecteur 335**, puis mettre D2 lamp on.



☞ Dans la fenêtre de droite, onglet HPLC, sélectionner **Pompe 210-218**, cliquer sur C dans Idle, une fenêtre s'ouvre : rentrer le débit de **1,0 mL/min**, le % de solvant C à **45 (Eau acidifiée)**, comme indiqué sur la copie d'écran ci-dessous :



☞ Cliquer sur l'onglet (en bas à droite) Data, pour la création de méthode qui s'effectue en sélectionnant : **FILE / NEW / NEW METHOD**

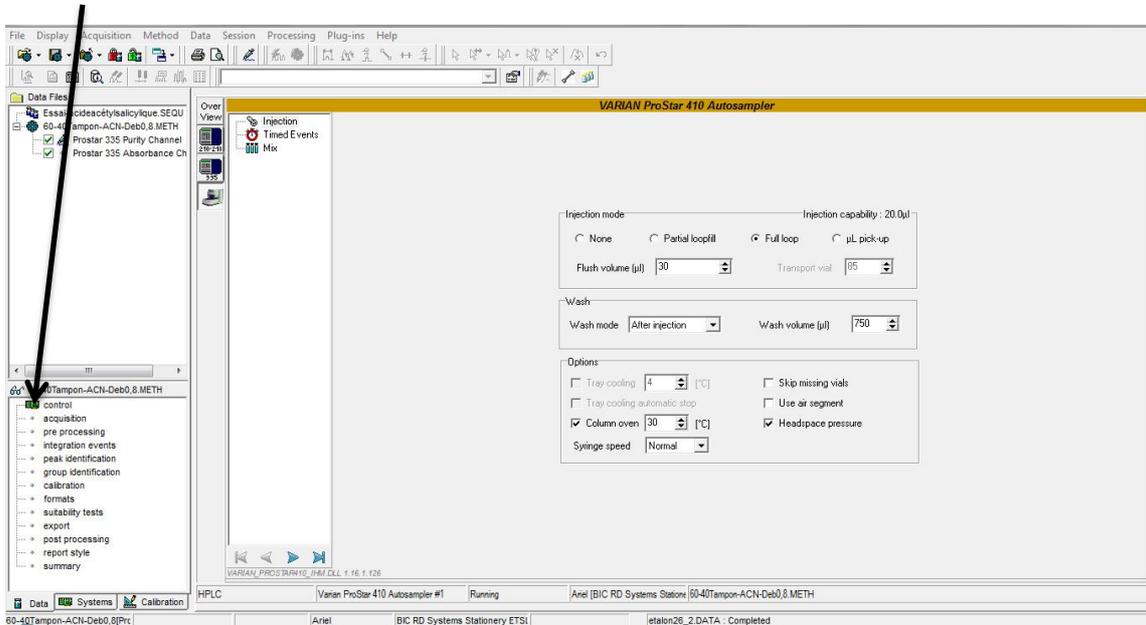
Sélectionner dans system name : **HPLC**

Cliquer sur **NEXT**

Donner un nom à la méthode : **55-45-ACN-EAU**

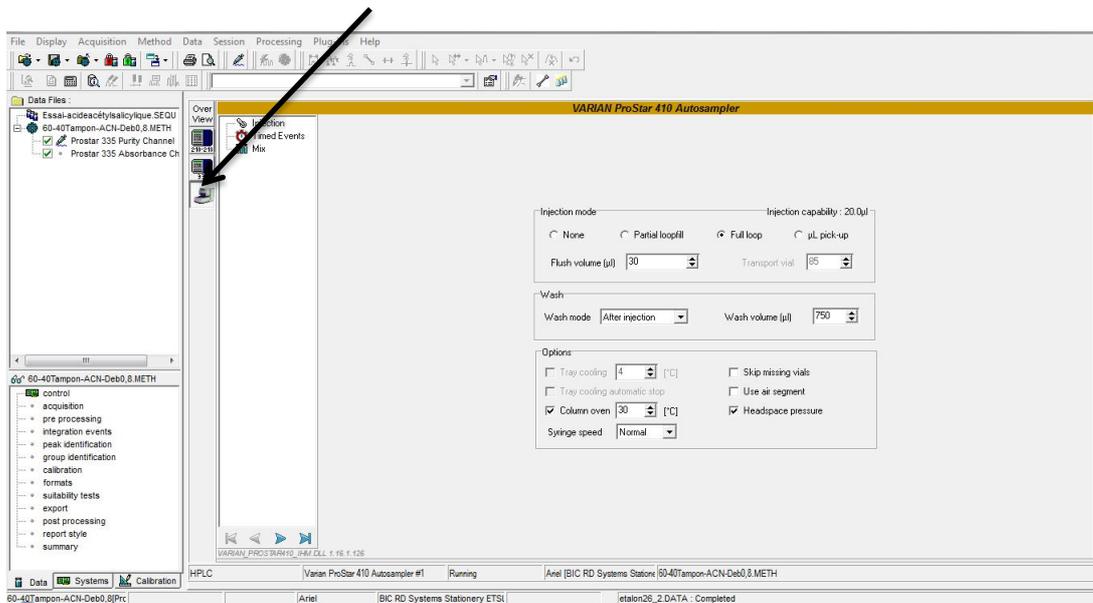
Cliquer sur **OK**

☞ Cliquer sur **Control** (dans l'onglet **Data** en bas à gauche), cela permet de paramétrer les différentes parties de la chaîne HPLC (TRÈS IMPORTANT POUR L'OPTIMISATION D'UNE MÉTHODE),

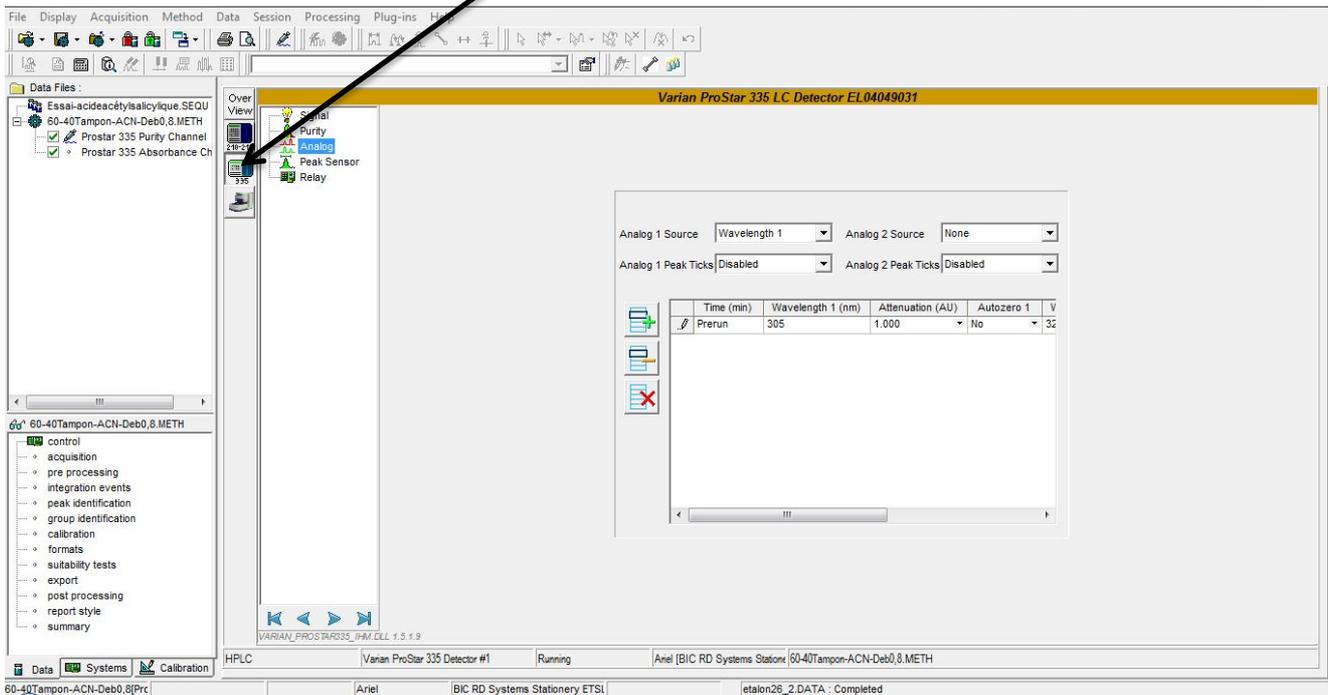


**Pour rentrer LES VALEURS DES PARAMÈTRES, à savoir,
La PROPORTION de SOLVANTS, le DÉBIT et la DURÉE D'ANALYSE,
La LONGUEUR D'ONDE de TRAVAIL du PDA,
La TEMPÉRATURE du FOUR,**

☞ Cliquer sur l'icône représentant l'autosampler : dans la rubrique **Injection** : fixer la température du four à 30°C et cocher **Full loop**. Ne rien changer dans les rubriques **Timed Events** et **Mix**.

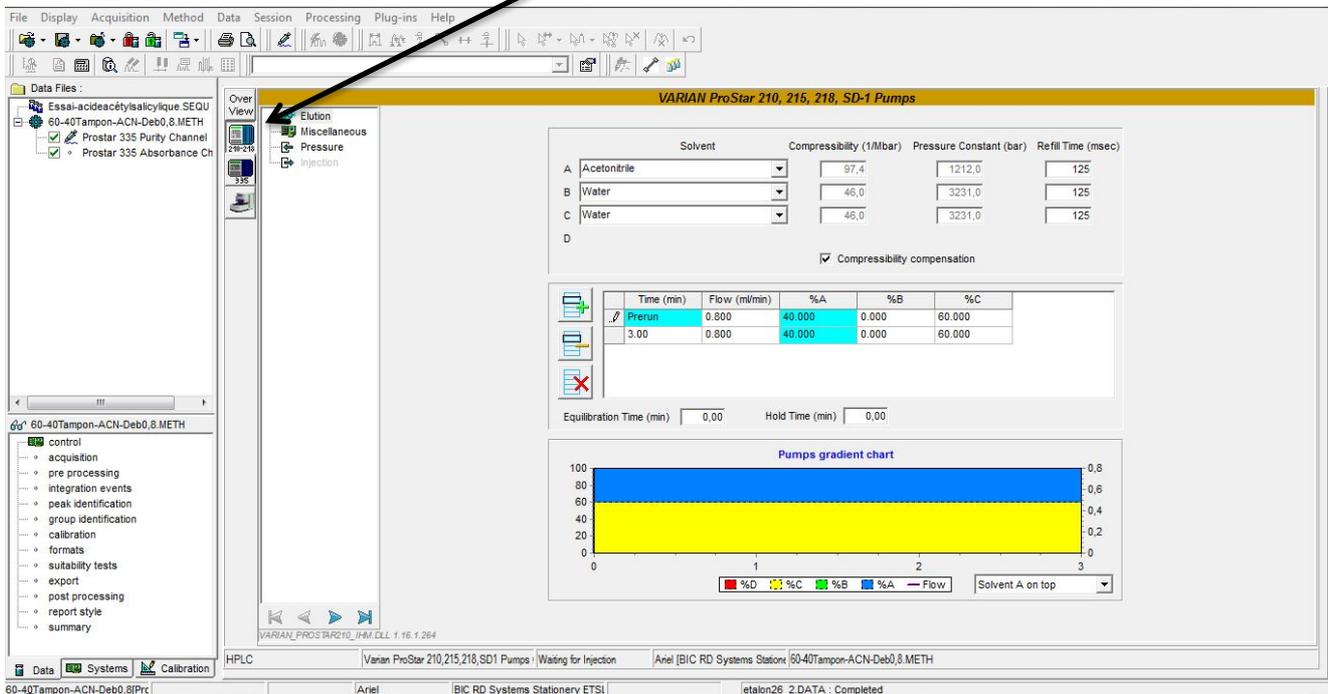


☞ Cliquer sur l'icône représentant du **détecteur 335** :



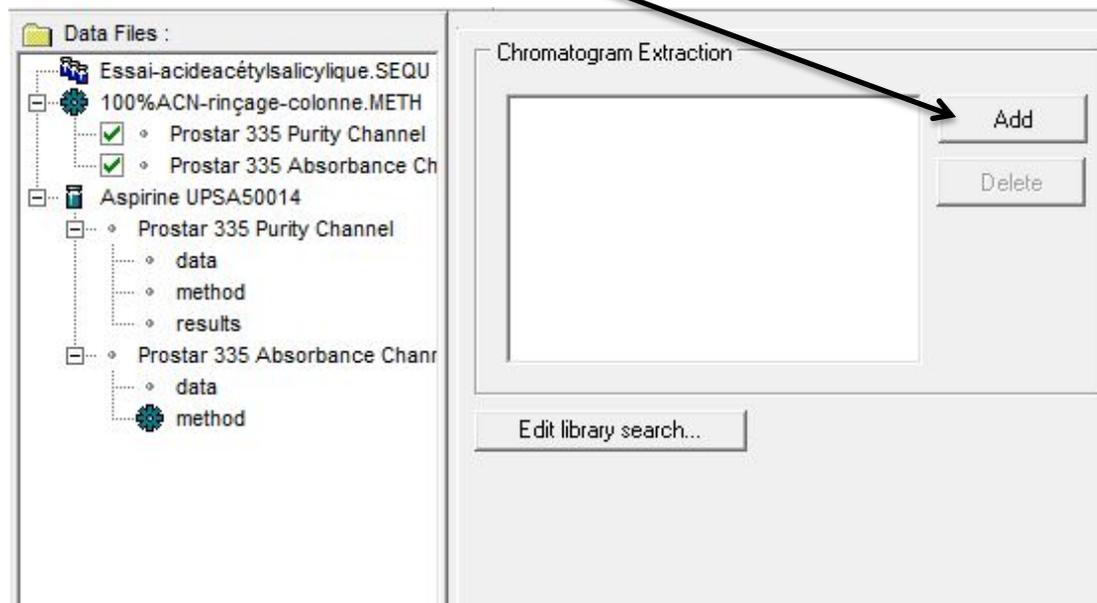
☞ Dans la rubrique **Analog** : rentrer la longueur d'onde de travail à 220 nm dans wavelength 1. Ne rien changer dans les rubriques **Signal, Purity, Peak Sensor et Relay**.

☞ Cliquer sur l'icône représentant les **pompes 210-218** :



☞ Dans la rubrique **Elution** : rentrer le débit de **1,0 mL/min**, les proportions de solvant **55/45 ACN/Eau acidifiée**, cliquer sur +, pour rajouter une ligne afin d'indiquer la durée d'analyse de **3 min et les proportions de solvant**, comme indiqué sur la copie d'écran ci-dessus. Ne rien changer dans les rubriques **Miscellaneous et Pressure**.

☞ Dans la fenêtre en haut à gauche : cliquer sur Prostar 335 Absorbance Channel, et rajouter la longueur d'onde d'absorption à **220 nm** en cliquant sur **Add**. Le chromatogramme à cette longueur d'onde apparaît automatiquement lors de l'analyse :



Sauvegarder la méthode : **FILE/SAVE/SAVE METHOD**

Étape 3 : Création d'une séquence d'analyse

☞ Pendant que l'appareil s'équilibre en pression, préparer la séquence d'analyse, pour cela, cliquer dans **FILE/NEW/NEW SEQUENCE**

Sélectionner le nom du système ici HPLC puis NEXT

Entrer le nombre de séquences d'analyse dans number of lines : 12, puis NEXT

Remarque : on peut toujours par la suite rajouter des lignes dans la séquence d'analyse.

Une ligne correspond à une analyse, c'est-à-dire à une injection !

Entrer le nom de sauvegarde de la séquence d'analyse puis OK

Choisir la méthode précédemment programmée.

Durée de l'analyse (doit être la même que celle, programmée dans la méthode)

Run #	Enabled	Method	RunName (prefix)	RunID (Sur)	Description	Run time	No. of Injections	Vial #	Rack #
1	<input checked="" type="checkbox"/>	60-20Eau-ACN.METH	Aspegic1000	1	Aspegic1000 dissoud dans une fi	10	10	1	1
2	<input checked="" type="checkbox"/>	60-20Eau-ACN.METH	acide acetylsalicylique	2	11.8 mg d'acide acetylsalicylique	10	10	1	2
3	<input checked="" type="checkbox"/>	60-20Eau-ACN.METH	acide acetylsalicylique	3	11.8 mg d'acide acetylsalicylique	10	10	1	2
4	<input checked="" type="checkbox"/>	60-40Tampon-ACN-Deb0,8.METH	acide acetylsalicylique	1	11.8 mg d'acide acetylsalicylique	3	3	1	1
5	<input checked="" type="checkbox"/>	60-40Tampon-ACN-Deb0,8.METH	acide acetylsalicylique	2	11.8 mg d'acide acetylsalicylique	3	3	1	1
6	<input checked="" type="checkbox"/>	60-40Tampon-ACN-Deb0,8.METH	Aspirine UPSA500	3	comprimé effervescent aspirine U	3	3	1	2
7	<input checked="" type="checkbox"/>	60-40Tampon-ACN-Deb0,8.METH	Aspirine UPSA500	4	comprimé effervescent aspirine U	3	3	1	2
8	<input checked="" type="checkbox"/>	60-40Tampon-ACN-Deb0,8.METH	etalon1	5	98.4 mg d'aa dissoud dans une fi...	3	3	2	3
9	<input checked="" type="checkbox"/>	60-40Tampon-ACN-Deb0,8.METH	etalon2	6	98.4 mg d'aa dissoud dans une fi...	3	3	2	4
10	<input checked="" type="checkbox"/>	60-40Tampon-ACN-Deb0,8.METH	etalon3	7	98.4 mg d'aa dissoud dans une fi...	3	3	2	5
11	<input checked="" type="checkbox"/>	60-40Tampon-ACN-Deb0,8.METH	etalon4	8	98.4 mg d'aa dissoud dans une fi...	3	3	2	6
12	<input checked="" type="checkbox"/>	60-40Tampon-ACN-Deb0,8.METH	etalon5	9	98.4 mg d'aa dissoud dans une fi...	3	3	2	7
13	<input checked="" type="checkbox"/>	60-40Tampon-ACN-Deb0,8.METH	EC	10	98.4 mg d'aa dissoud dans une fi...	3	3	1	8

Identification de l'analyse :
Run Name : nom de l'échantillon
RunID : numéro de l'analyse

À remplir le plus exactement possible

☞ Paramètres de la séquence d'analyse :

- Enabled** : cocher seulement l'analyse à faire (à changer à chaque injection)
- Method** : **55-45-ACN-Eau**
- Run Name** : le nom de l'échantillon
- RunID** : 1
- Description** : composition exacte de l'échantillon
- Run Time** : temps d'analyse : 3
- Nb of Injections** : le nombre de fois que l'on veut injecter l'échantillon : 1
- Vial #** : la position du vial inconnu : 1
- Inj.Vol** : indiquer le volume de solution : 20 µL

Remarque : Pour démarrer une séquence d'analyse, il ne faut pas oublier, à chaque fois, de décocher les lignes déjà effectuées, puis il faut faire un « Start » (flèche verte) sur la séquence utilisée.

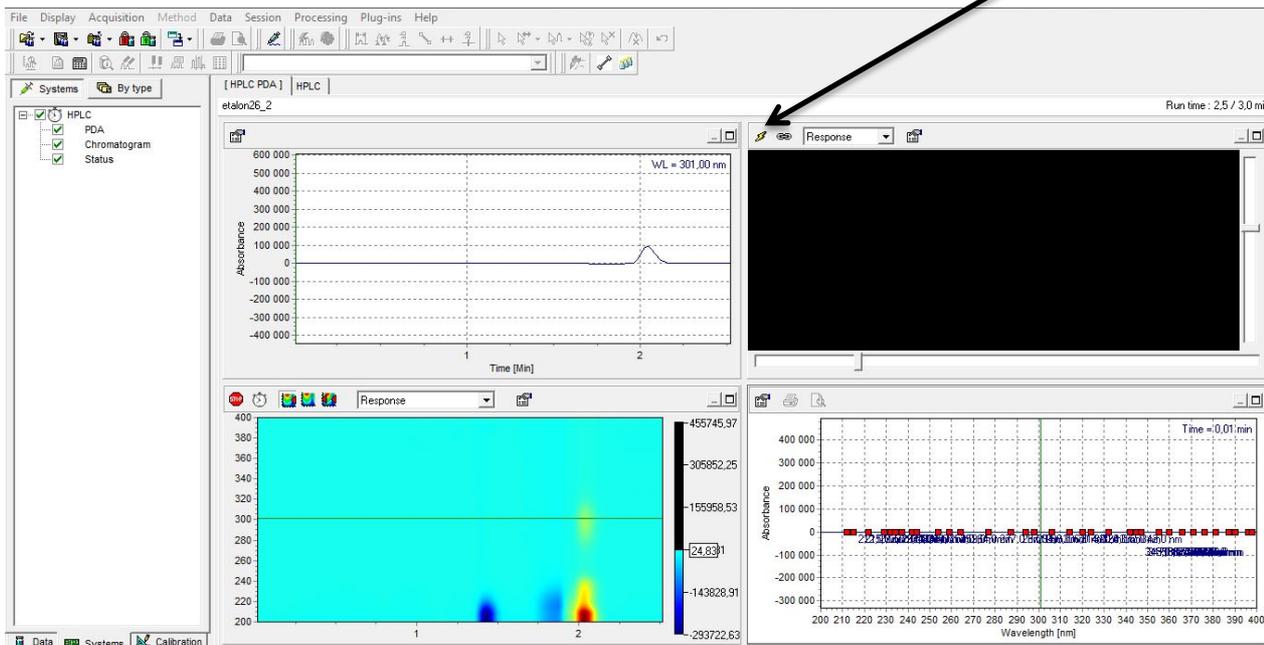
☞ Sauvegarder la séquence d'analyse : FILE/SAVE/SAVE SEQUENCE

Etape 4 : obtention du chromatogramme

☞ Cliquer sur l'icône (flèche verte) pour débiter une séquence d'analyse : start sequence

☞ Le prélèvement via la seringue s'effectue automatiquement au bout d'une trentaine de secondes. L'écran de contrôle HPLC PDA, permet d'avoir un aperçu à l'aide de 4 fenêtres, la fenêtre la plus importante est la **fenêtre chromatographique** (en haut à gauche), celle qui se trouve en bas à droite, représente le **spectre UV** de l'échantillon qui a été injecté.

La fenêtre noire permet d'obtenir une **vue 3D** des deux précédentes en cliquant sur l'icône :

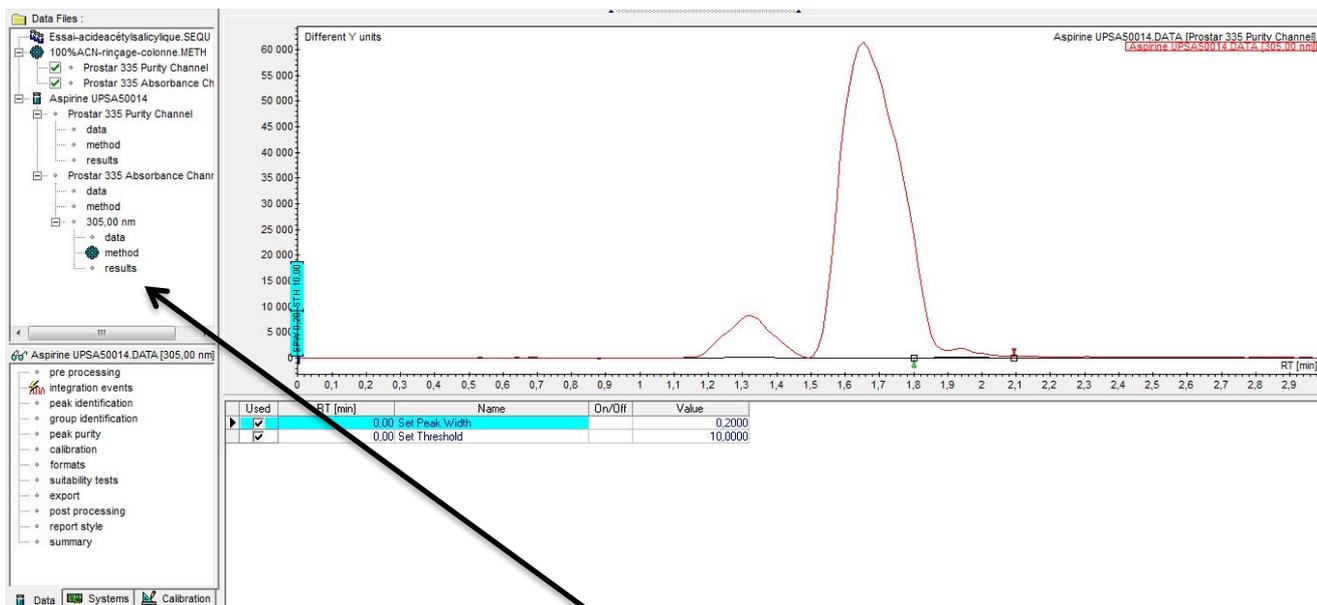


Attendre la fin de l'analyse

Etape 5 : traitement du chromatogramme et impression

Cliquer dans data

☞ Ouvrir le chromatogramme via File/Open/Open Chromatogram (le chromatogramme se trouve dans le dossier du jour de la semaine de réalisation du TP)



☞ Cliquer sur les résultats du fichier « **Results** » et dans la fenêtre en bas à droite, faire un clic droit pour faire apparaître un menu contextuel et cliquer sur *Report library* afin de choisir Baclofene Library dans la liste de droite et le rajouter à la bibliothèque afin de faire apparaître la colonne correspondante.

- ☛ Changer le seuil de détection « **Set Threshold** » en indiquant une valeur de 100.

	Used	RT [min]	Name	On/Off	Value
	<input checked="" type="checkbox"/>	0,00	Set Peak Width		0,2000
	<input checked="" type="checkbox"/>	0,00	Set Threshold		100,0000

puis **intégrer** en cliquant sur F5.

- ☛ Cliquer sur la méthode locale associée au fichier Chromatogram, puis cliquer sur « **report style** » et ouvrir en double-cliquant sur ETSL, puis choisir le fichier **TASS.STYL**.

Sauvegarder :

FILE / SAVE / SAVE CHROMATOGRAM

☞ **Imprimez** le premier chromatogramme, pour cela cliquer sur Print Preview : n'imprimer qu'à la condition que n'apparaisse pas en travers du chromatogramme : DATA NOT SAVED.

Q Connaissant les caractéristiques géométriques de la colonne, déterminer son volume de phase mobile sachant que la phase stationnaire occupe environ 30 % du volume. Connaissant le débit, faire une estimation du temps de remplissage de la colonne par la phase mobile.

On estime qu'il faut multiplier par un facteur 25 cette dernière valeur pour obtenir la durée d'équilibration (ce facteur prend en compte, le temps de passage de la phase mobile dans toutes les canalisations, de la bouteille de solvant jusqu'à celle de récupération, ainsi que de la durée mise par les équilibres chimiques entre les deux phases).

Déterminer la durée d'équilibration.

Q Selon vous, quels critères, peuvent vous permettre de suspecter une éventuelle fuite de la phase mobile ?

Q Quelle est la différence entre chromatographie en phase inverse, normale et hilic ?

2.2. Phase mobile : 65/35 ACN/Eau acidifiée

Etape 1 : mise en place de la colonne : déjà réalisé !

Etape 2 : création de la méthode : mode Isocratique – phase mobile : 65/35 ACN/Eau pendant 3 min

☞ Dans la fenêtre de gauche, cliquer sur la méthode, puis cliquer sur l'icône représentant les **pompes 210-218** : et modifier les proportions de solvant sur les deux lignes.

The screenshot displays the VARIAN ProStar 210, 215, 218, SD-1 Pumps software interface. The 'Data Files' tree on the left shows the method '60-40Tampon-ACN-Deb0,8.METH'. The 'Miscellaneous' and 'Pressure' sections are visible. The 'Solvent' table is as follows:

Solvent	Compressibility (1/MPa)	Pressure Constant (bar)	Refill Time (msec)
A Acetonitrile	97,4	1212,0	125
B Water	46,0	3231,0	125
C Water	46,0	3231,0	125
D			

The 'Pumps gradient chart' shows a step change in solvent composition over time, with a legend for %D, %C, %B, %A, and Flow. The chart shows a step change from 0% to 100% for solvent A at approximately 1.5 minutes.

☞ Dans la rubrique **Elution** : rentrer les nouvelles proportions de solvant **%C à 35**, et la durée d'analyse reste inchangée. Ne rien changer dans les rubriques **Miscellaneous** et **Pressure**.

Sauvegarder la méthode : **FILE/SAVE/SAVE METHOD AS**, selon **65-35-ACN-Eau**

Modifier la proportion de C en direct, pour cela cliquer sur l'onglet Systems (en bas à gauche), puis sur l'onglet HPLC (en haut centré)

ATTENDRE 10 min que la PRESSION soit STABILISÉE

Etape 3 : remplir la ligne 2 de la séquence d'analyse

☞ Cliquer sur la séquence

☞ Paramètres de la séquence d'analyse :

Enabled : cocher seulement l'analyse à faire (à changer à chaque injection)

Method : **65-35-ACN-Eau**

Run Name : le nom de l'échantillon

RunID : **2**

Description : composition exacte de l'échantillon

Run Time : 3

Nb of Injections : le nombre de fois que l'on veut injecter l'échantillon : 1

Vial # : la position du vial inconnu : 1

Inj.Vol : indiquer le volume de solution : 20 µL

Lancer la nouvelle analyse si la pression est STABLE

Etape 4 et 5 : cf procédure en page 10 à 12 !

2.3. Phase mobile : 75/25 ACN/Eau acidifiée

Etape 1 : mise en place de la colonne : déjà réalisé !

Etape 2 : création de la méthode : mode Isocratique – phase mobile : 75/25 ACN/Eau pendant 4 min

☞ Dans la fenêtre de gauche, cliquer sur la méthode, puis cliquer sur l'icône représentant les **pompes 210-218** : et modifier les proportions de solvant sur les deux lignes.

☞ Dans la rubrique **Elution** : rentrer les nouvelles proportions de solvant **%C à 25**, et la durée d'analyse à **4 min**. Ne rien changer dans les rubriques **Miscellaneous** et **Pressure**.

Sauvegarder la méthode : **FILE/SAVE/SAVE METHOD AS**, selon **75-25-ACN-Eau**

Modifier la proportion de C en direct, pour cela cliquer sur l'onglet Systems (en bas à gauche), puis sur l'onglet HPLC (en haut centré)

ATTENDRE 10 min que la PRESSION soit STABILISÉE

Etape 3 : remplir la ligne 2 de la séquence d'analyse

☞ Cliquer sur la séquence

☞ Paramètres de la séquence d'analyse :

Enabled : cocher seulement l'analyse à faire (à changer à chaque injection)

Method : **75-25-ACN-Eau**

Run Name : le nom de l'échantillon

RunID : **3**

Description : composition exacte de l'échantillon

Run Time : **4**

Nb of Injections : le nombre de fois que l'on veut injecter l'échantillon : **1**

Vial # : la position du vial inconnu : **1**

Inj.Vol : indiquer le volume de solution : **20 µL**

Lancer la nouvelle analyse si la pression est STABLE

Etape 4 et 5 : cf procédure en p. 10 à 12 !

3. EFFETS DU DÉBIT

3.1. Débit à 1,2 mL/min

Etape 1 : mise en place de la colonne : déjà réalisé !

Etape 2 : création de la méthode : mode Isocratique – phase mobile : 65/35 ACN/Eau avec un débit de 1,2 mL/min pendant 3 min

☞ Cliquer sur l'icône représentant les pompes 210-218 :

The screenshot shows the VARIAN ProStar software interface. The 'Elution' tab is selected, and the 'Flow' parameter is set to 1.2 mL/min. The solvent composition is 65% ACN and 35% Water. The analysis time is 3.00 minutes. A 'Pumps gradient chart' is visible at the bottom, showing a constant flow rate of 1.2 mL/min over the 3-minute run.

Time (min)	Flow (ml/min)	%A	%B	%C
Prerun	0.800	40.000	0.000	60.000
3.00	0.800	40.000	0.000	60.000

Equilibration Time (min) 0,00 Hold Time (min) 0,00

Pumps gradient chart

100 80 60 40 20 0

0 1 2 3

%D %C %B %A Flow Solvent A. on top

☞ Dans la rubrique **Elution** : rentrer le débit de **1,2 mL/min**, les proportions de solvant sont celles de la méthode idéale, et la durée d'analyse de **3 min**. Ne rien changer dans les rubriques **Miscellaneous** et **Pressure**.

Sauvegarder la méthode : **FILE/SAVE/SAVE METHOD AS**, selon **65-35-ACN-Eau-Deb1,2**

Modifier le débit et la proportion de C en direct, pour cela cliquer sur l'onglet Systems (en bas à gauche), puis sur l'onglet HPLC (en haut centré)

Etape 3 : remplir la ligne 2 de la séquence d'analyse

- ☞ Cliquer sur la séquence
- ☞ Paramètres de la séquence d'analyse :

Enabled : cocher seulement l'analyse à faire (à changer à chaque injection)

Method : **65-35-ACN-Eau-Deb1,2**

Run Name : le nom de l'échantillon

RunID : **4**

Description : composition exacte de l'échantillon

Run Time : **3**

Nb of Injections : le nombre de fois que l'on veut injecter l'échantillon : 1

Vial # : la position du vial inconnu : 1

Inj.Vol : indiquer le volume de solution : 20 µL

Lancer la nouvelle analyse si la pression est STABLE

**Etape 4 & 5 : obtention et traitement du chromatogramme : cf
procédure en page 10 à 12 !**

3.2. Débit à 0,8 mL/min

Etape 1 : mise en place de la colonne : déjà réalisé !

**Etape 2 : création de la méthode : mode Isocratique – phase mobile :
65/35 ACN/Eau avec un débit de 0,8 mL/min pendant 4 min**

Procéder comme précédemment :

- ☞ Cliquer sur l'icône représentant les **pompes 210-218** :

☞ Dans la rubrique **Elution** : rentrer le débit de **0,8 mL/min**, les proportions de solvant restent inchangées, et la durée d'analyse de **4 min**. Ne rien changer dans les rubriques **Miscellaneous** et **Pressure**.

Sauvegarder la méthode : **FILE/SAVE/SAVE METHOD AS**, selon **65-35-ACN-Eau-Deb0,8**

**Modifier le débit en direct, pour cela cliquer sur l'onglet Systems
(en bas à gauche), puis sur l'onglet HPLC (en haut centré)**

Etape 3 : remplir la ligne 3 de la séquence d'analyse

☞ Cliquer sur la séquence

☞ Paramètres de la séquence d'analyse :

Enabled : cocher seulement l'analyse à faire (à changer à chaque injection)

Method : **65-35-ACN-Eau-Deb0,8**

Run Name : le nom de l'échantillon

RunID : **5**

Description : composition exacte de l'échantillon

Run Time : **4**

Nb of Injections : le nombre de fois que l'on veut injecter l'échantillon : 1

Vial # : la position du vial inconnu : 1

Inj.Vol : indiquer le volume de solution : 20 µL

**Etape 4 & 5 : obtention et traitement du chromatogramme : cf
procédure en page 10 et 11 !**

4. DOSAGE PAR COURBE D'ETALONNAGE

4.1. Utilisation de la méthode optimale et passage de la gamme (deux fois) de l'étalon de contrôle (une seule fois) et de l'inconnue (deux fois)

Etape 1 : mise en place de la colonne : déjà réalisée !

Etape 2 : n'a pas lieu d'être !

Modifier le débit en direct, pour cela cliquer sur l'onglet Systems (en bas à gauche), puis sur l'onglet HPLC (en haut centré)

Etape 3 : remplir les lignes 6 à 12 de la séquence d'analyse

☞ Paramètres de la séquence d'analyse :

Enabled : cocher les lignes 6 à 12 (toutes les autres doivent être décochées).

Method : 65-35-ACN-Eau.

Run Name : Etalon pour les lignes 6 à 10, EC pour la ligne 11 et inconnue pour la ligne 12.

RunID : de 6 à 12

Description : composition exacte de chaque étalon, EC et inconnue.

Run Time : 3

Nb of Injections : pour les étalons et l'inconnue : 2 ; pour EC : 1.

Vial # : position des vials étalon : 1 à 5 ; position du vial EC : 6 ; position du vial inconnue : 7.

Inj.Vol : indiquer le volume de solution : 20 µL

Etape 4 : analyse de tous les échantillons

☞ Cliquer sur l'icône (flèche verte) pour débiter une séquence d'analyse : start sequence

☞ Le prélèvement via la seringue s'effectue automatiquement, chaque échantillon est analysé séquentiellement deux fois, sauf pour l'étalon de contrôle.

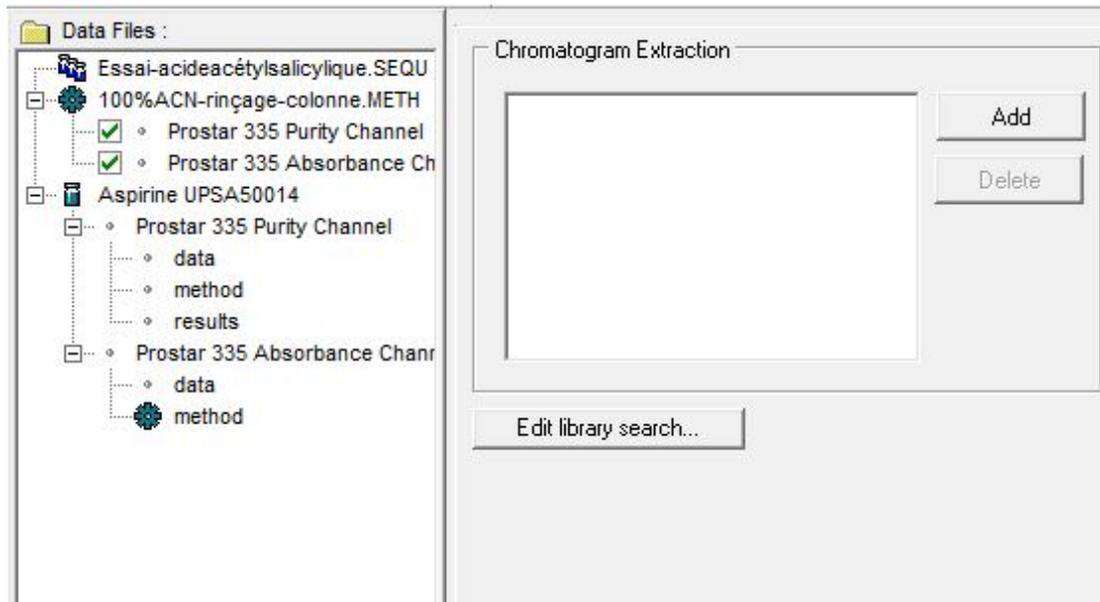
Attendre la fin de l'analyse, qui devrait durer 39 min, en dehors du temps d'injection.

4.2. Obtention de la droite d'étalonnage

Galaxie permet de créer des courbes d'étalonnage en réalisant un traitement par lot. La procédure permettant la création d'une courbe d'étalonnage est la suivante :

4.2.1 Identification du pic d'intérêt

- ☞ Ouvrir le fichier chromatogramme correspondant au premier point de gamme, via File/Open/Open Chromatogram (le chromatogramme se trouve dans le dossier du jour de la semaine de réalisation du TP)
- ☞ Cliquer sur la méthode locale associée à Prostar 335 Absorbance Channel.



- ☞ Changer le seuil de détection « **Set Threshold** » en indiquant une valeur de 100. puis **intégrer** en cliquant sur F5. Noter la valeur du temps de rétention RT pour le composé d'intérêt.

Il faut ensuite le télécharger sans sauvegarder, en le sélectionnant, en faisant un clic droit, puis CLOSE CHROMATOGRAM

4.2.2 Transfert des données d'identification dans la méthode globale

- ☞ Dans la fenêtre (en bas à gauche), sélectionner **Integration Events** :

- ☞ Changer le seuil de détection « **Set Threshold** » en indiquant une valeur de 100.

	Used	RT [min]	Name	On/Off	Value
	<input checked="" type="checkbox"/>	0,00	Set Peak Width		0,2000
	<input checked="" type="checkbox"/>	0,00	Set Threshold		100,0000

- ☞ Sélectionner **Peak identification**. Dans la fenêtre vierge de droite, faire un clic droit puis **Add** : rentrer Le nom de la molécule d'intérêt dans Peak Name et le temps de rétention dans RT que vous aviez noté précédemment.

☞ Sélectionner **Calibration**, et remplir la feuille correspondante :

Component	Model	(0,0)?	Add(0,0)?	Weighting	Level 1	Level 2	Level 3	Level 4	Level 5	Control sample
acide acétylsalicylique	Linear	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	None	39,36	78,72	118,08	157,44	196,80	98,40

- ☞ Dans Type : côcher **External Standard**
- ☞ Dans Response unit : **Curve unit**
- ☞ Dans Standard Unit : **mg/L**
- ☞ Dans File : indiquer un nom de fichier (dans lequel va se trouver votre courbe d'étalonnage) sous le format : **courbe-etalonnage-jj-mm-année**
- ☞ Cliquer sur **Initialize from ID tables** puis :
- ☞ **TRÈS IMPORTANT À REMPLIR : Dans la ligne correspondant au Baclofène** : le nombre de Level **Level number** (un Level correspond à un point de gamme), ici 5. Indiquer dans chaque level : les concentrations réelles de chaque point de gamme (les " tirets " ne doivent plus apparaître). Dans **Control Sample**, indiquer la concentration réelle de l'étalon de contrôle.
- ☞ Côcher **Average levels** puis **Reference Component** : le nom de la molécule d'intérêt doit apparaître !



Remarque

Les « level » se remplissent en bas de la fenêtre, si vous ne les voyez pas, il faut agrandir la fenêtre.

☞ Sélectionner **Report Style** et ouvrir en double-cliquant sur ETSL, puis choisir le fichier **TASS.STYL**.

Sauvegarder :

FILE / SAVE / SAVE METHOD

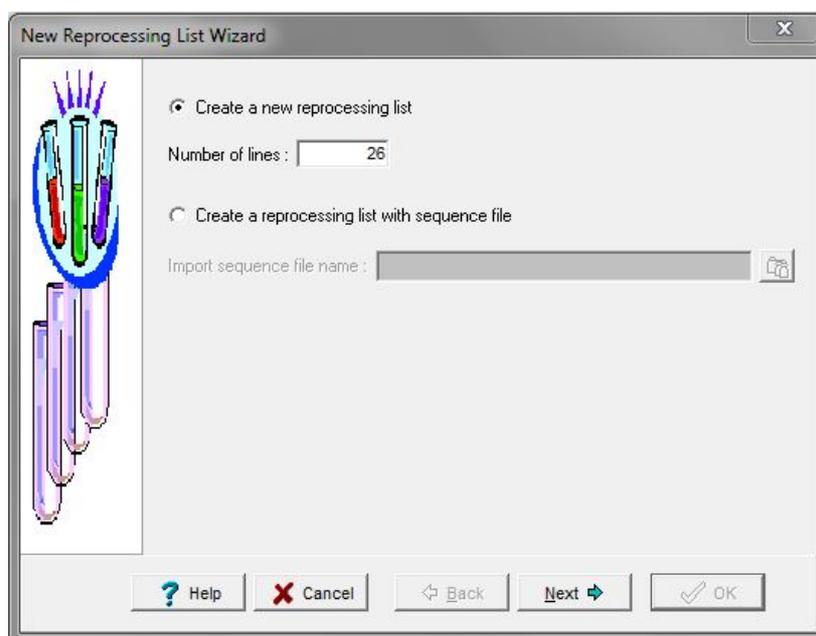
On pourrait faire toutes ces opérations pour chaque chromatogramme (gamme + inconnus), il est plus rapide et plus simple d'utiliser une feuille de re-calcul (**Reprocessing List**).

4.2.3 Utilisation d'une liste de re-calcul pour obtenir la courbe de calibration

Ensuite, on traite les chromatogrammes (afin d'obtenir les résultats de l'étalonnage externe, c'est-à-dire la courbe Aire pics Baclofène = f(cc en Baclofène). Il existe une méthode qui permet d'effectuer cette opération sur tous les chromatogrammes en même temps (très utile, lorsqu'il y a beaucoup de chromatogrammes à traiter), en créant, au préalable, une liste de re-calcul, pour cela :

FILE / NEW / NEW REPROCESSING LIST

La fenêtre suivante doit apparaître :



Dans Number of Lines : laisser la valeur par défaut, clic sur NEXT, rentrer un nom de liste de reprocess, puis cliquer sur OK.

Run #	Enabled	Chromatogram name	Chromatogram channel	Descriptor	Method	Method channel	Method	Sample type	Calibration	Calibration L
1	<input checked="" type="checkbox"/>	ETSLmardi03072018\etalon59_2.DATA	Prostar 335 Absorbance Cf	98.4 mg	ETSL60-40Tampon	Prostar 335 Absorba	...	Standard	Add	5
2	<input checked="" type="checkbox"/>	ETSLmardi03072018\etalon59_1.DATA	Prostar 335 Absorbance Cf	98.4 mg	ETSL60-40Tampon	Prostar 335 Absorba	...	Standard	Add	5
3	<input checked="" type="checkbox"/>	ETSLmardi03072018\etalon48_2.DATA	Prostar 335 Absorbance Cf	98.4 mg	ETSL60-40Tampon	Prostar 335 Absorba	...	Standard	Add	4
4	<input checked="" type="checkbox"/>	ETSLmardi03072018\etalon48_1.DATA	Prostar 335 Absorbance Cf	98.4 mg	ETSL60-40Tampon	Prostar 335 Absorba	...	Standard	Add	4
5	<input type="checkbox"/>	ETSLmardi03072018\etalon37_2.DATA	Prostar 335 Absorbance Cf	98.4 mg	ETSL60-40Tampon	Prostar 335 Absorba	...	Standard	Add	3
6	<input checked="" type="checkbox"/>	ETSLmardi03072018\etalon37_1.DATA	Prostar 335 Absorbance Cf	98.4 mg	ETSL60-40Tampon	Prostar 335 Absorba	...	Standard	Add	3
7	<input checked="" type="checkbox"/>	ETSLmardi03072018\etalon26_2.DATA	Prostar 335 Absorbance Cf	98.4 mg	ETSL60-40Tampon	Prostar 335 Absorba	...	Standard	Add	2
8	<input checked="" type="checkbox"/>	ETSLmardi03072018\etalon26_1.DATA	Prostar 335 Absorbance Cf	98.4 mg	ETSL60-40Tampon	Prostar 335 Absorba	...	Standard	Add	2
9	<input checked="" type="checkbox"/>	ETSLmardi03072018\etalon15_2.DATA	Prostar 335 Absorbance Cf	98.4 mg	ETSL60-40Tampon	Prostar 335 Absorba	...	Standard	Add	1
10	<input checked="" type="checkbox"/>	ETSLmardi03072018\etalon15_1.DATA	Prostar 335 Absorbance Cf	98.4 mg	ETSL60-40Tampon	Prostar 335 Absorba	...	Standard	Add	1
11	<input checked="" type="checkbox"/>	ETSLmardi03072018\EC10.DATA	Prostar 335 Absorbance Cf	98.4 mg	ETSL60-40Tampon	Prostar 335 Absorba	...	Control sample		
12	<input checked="" type="checkbox"/>	ETSLmardi03072018\Aspirine UPSA5004.DATA	Prostar 335 Absorbance Cf	comprin	ETSL60-40Tampon	Prostar 335 Absorba	...	Unknown		
13	<input checked="" type="checkbox"/>	ETSLmardi03072018\Aspirine UPSA5003.DATA	Prostar 335 Absorbance Cf	comprin	ETSL60-40Tampon	Prostar 335 Absorba	...	Unknown		

Remplir la colonne « **Chromatogram name** » en cherchant les fichiers data utiles de la gamme d'étalonnage, avec l'étalon de contrôle et les inconnues (**ATTENTION : dans un premier temps : ces trois derniers fichiers devront être décochés**).

Dans un premier temps, supprimer toutes les lignes **Prostar 335 Purity Channel**.

On indique pour les rubriques des étalons :

- « **Sample type** » : **Standard** ; (pour les points de gamme)
- « **Calibration** » : **Add** ;
- « **Calibration level** » : **1** (correspond au premier point de gamme, **2** pour le second point, et ainsi de suite...) ;

On indique pour les rubriques des inconnues et de l'étalon de contrôle :

- « **Sample type** » : **Unknown** ou **Control Sample**
- « **Calibration** » : **Rien** ;
- « **Calibration level** » : **Rien** ;

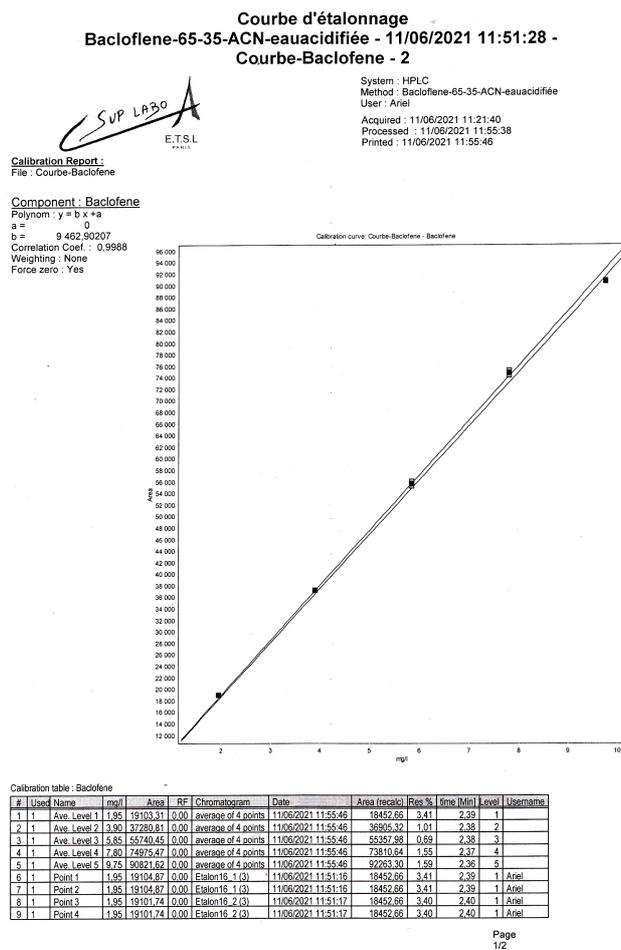
On sauvegarde la liste :

SAVE / SAVE REPROCESSING LIST

ATTENTION : TOUS LES CHROMATOGRAMMES DOIVENT ÊTRE FERMÉS POUR QUE LE RETRAITEMENT PUISSE AVOIR LIEU !

Appuyer sur la flèche verte pour démarrer le calcul, puis cliquer sur YES au message de signature.

☞ Cliquer dans l'onglet Calibration (en bas à droite) puis observer les résultats de l'étalonnage : FILE / OPEN CALIBRATION CURVE

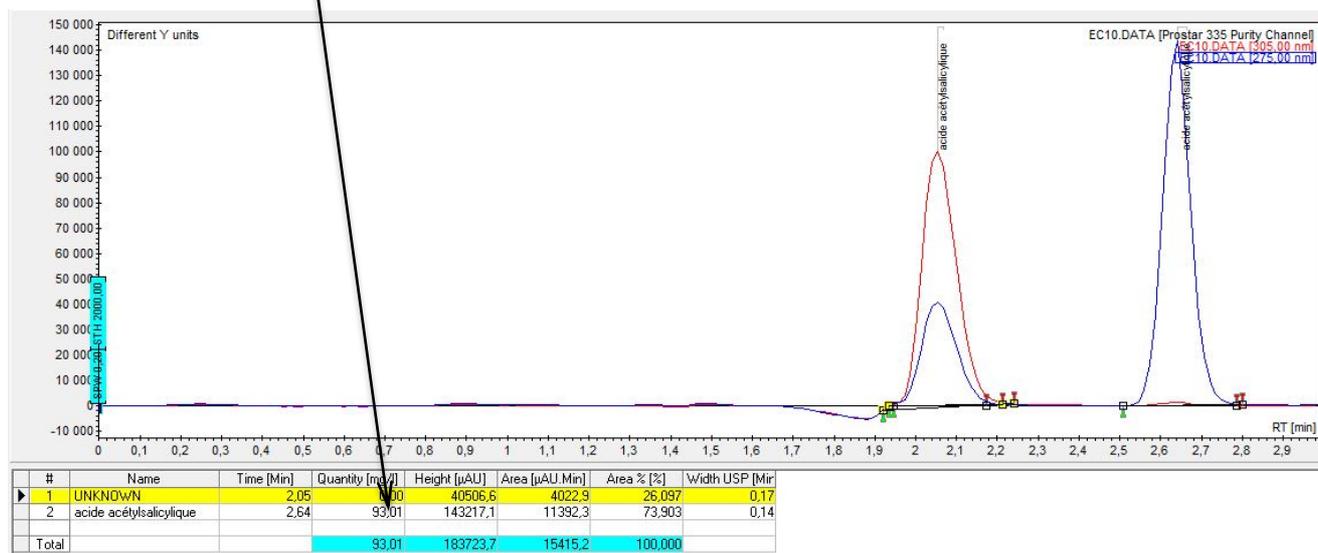


Ensuite, il faut recalculer l'étalon de contrôle et les inconnues, pour cela il suffit de décocher les points de gamme, et de cocher l'étalon de contrôle et les inconnues.

et appuyer sur la flèche verte pour démarrer le calcul, puis cliquer sur YES au message de signature.

4.3. Utilisation d'une liste de re-calcul pour obtenir la quantité recherchée pour l'étalon de contrôle et les inconnues

☞ Double-cliquer sur le fichier Chromatogramme de l'étalon de contrôle pour l'ouvrir, le résultat s'affiche dans « **Result** » colonne Quantity :



☞ Cliquer sur la méthode locale associée au fichier Chromatogram, puis cliquer sur « report style » et dans l'onglet data, ouvrir le fichier TASS.STYL.

☞ Cliquer sur les résultats du fichier « Results » et supprimer les pics inconnus (s'il y a lieu), en sélectionnant la ligne correspondante puis à l'aide du clic droit de la souris, faites « Delete Current Peak ».

Sauvegarder :

FILE / SAVE / SAVE CHROMATOGRAM

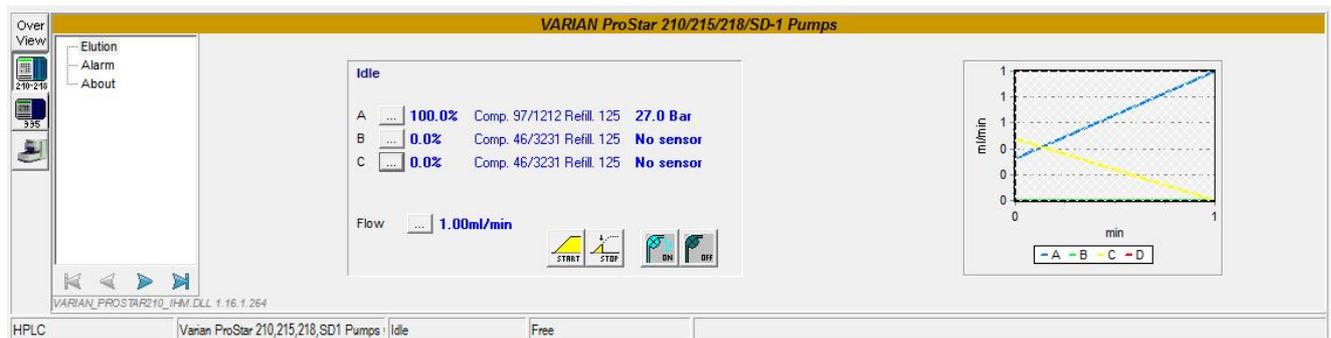
☞ **Imprimez** les résultats de l'étalon de contrôle, pour cela cliquer sur Print Preview : n'imprimer qu'à la condition que n'apparaisse pas en travers du chromatogramme : DATA NOT SAVED ; dans le cas contraire, sauvegarder le chromatogramme et recommencer.

☞ **Imprimez** les résultats des inconnues, de la même façon, en ayant fermé au préalable, le chromatogramme précédent. **Imprimez enfin la courbe de calibration.** Pour cela cliquer sur la méthode locale associée au fichier Chromatogram, puis cliquer sur " report style" et dans l'onglet data, remplacer le fichier TASS.STYL par Courbe-calibration.STYL.

5. EXTINCTION DE LA CHAÎNE HPLC

Etape 0 : rinçage de la colonne avec 100 % d'ACN, pendant 30 min :

1. Dans l'onglet Systems (en bas à gauche), sélectionner l'onglet HPLC (en haut au centre).
2. Sélectionner **Pompe 210-218**.
3. Cliquer sur C dans Idle pour régler la fenêtre comme indiqué ci-dessous :

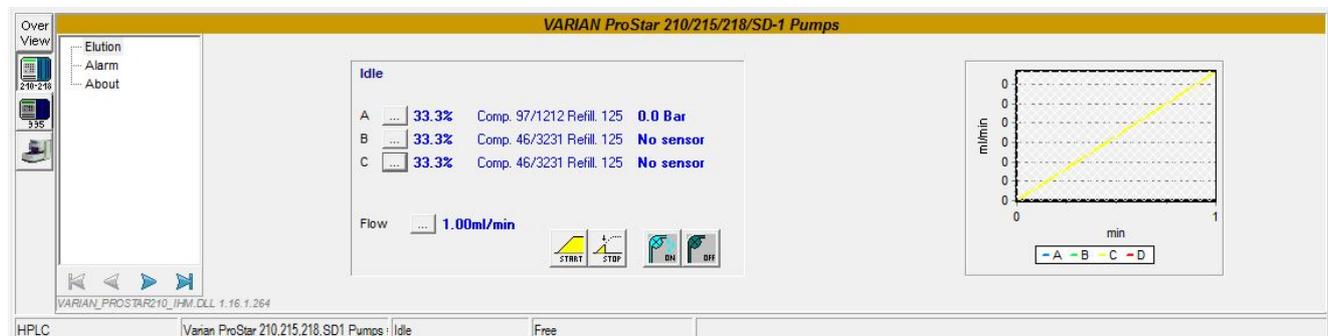


Etape 1 : retrait de la colonne en place :

1. Cliquer sur Flow pour mettre le débit à 0 mL/min.
2. Lorsque la pression est à 0, enlever le capot du four, puis desserrer les deux vis (en PEEK ou en inox selon la colonne) qui sont localisées aux extrémités de la colonne pour la remplacer par l'union.

Etape 2 : circulation du solvant de repos dans les 3 voies pendant 30 min :

1. Plonger les 3 canalisations des 3 voies dans le mélange de repos H₂O/MeOH 80/20.
2. Cliquer sur C dans Idle pour régler la fenêtre comme indiqué ci-dessous :



Etape 3 : Éteindre la chaîne HPLC :

1. Cliquer sur Flow pour mettre le débit à 0 mL/min.
2. Quitter le logiciel et éteindre le PC.
3. Lorsque la pression est à 0 éteindre l'ensemble de l'appareillage : les 3 Pompes, le détecteur et l'autosampler.

6. ÉLÉMENTS DE REPONSE AUX QUESTIONS

Q D'après vous, quelle est la position et quel est le sens logique de la colonne ?

La colonne doit être positionnée entre l'injecteur et le détecteur dans le sens du flux indiqué par le constructeur de la colonne.

Remarque : les colonnes sont remplies et tassées selon un sens bien déterminé par le constructeur.

Q Selon vous, quel critère peut vous permettre de suspecter une éventuelle fuite de la phase mobile ?

Une chute brutale de la pression nous indiquera une fuite importante.

Q Selon la colonne utilisée et les conditions de travail choisies, la pression dans la colonne peut être différente. À votre avis, si cette pression est instable, c'est-à-dire qu'elle présente des fluctuations, quels problèmes cela traduit-il ?

Cela traduit un problème de fuites.

Q Quel est le but de l'équilibration ?

Le but de l'équilibration est la durée nécessaire pour que les équilibres chimiques entre les phases stationnaires et les phases mobiles soient tout à fait effectives.

Q Connaissant les caractéristiques géométriques de la colonne, déterminer son volume de phase mobile sachant que la phase stationnaire occupe environ 30 % du volume. Connaissant le débit, faire une estimation du temps de remplissage de la colonne par la phase mobile.

On estime qu'il faut multiplier par un facteur 25 cette dernière valeur pour obtenir la durée d'équilibration (ce facteur prend en compte, le temps de passage de la phase mobile dans toutes les canalisations, de la bouteille de solvant jusqu'à celle de récupération, ainsi que de la durée mise par les équilibres chimiques entre les deux phases).

Déterminer la durée d'équilibration.

Les colonnes utilisées ont une longueur de 150 mm pour un diamètre intérieur de 3,9 mm.

Le volume de la colonne est donc de $V_{\text{colonne}} = 150 \times \frac{3,9^2}{4} = 570 \text{ mm}^3 = 0,57 \text{ mL}$, d'où le

volume de phase mobile : $V_{\text{phase mobile}} = 70 \% V_{\text{colonne}} = 0,40 \text{ mL}$.

Le débit utilisé est $D = 1 \text{ mL/min}$, d'où la durée de remplissage : $t_{\text{remplissage}} = V_{\text{phase mobile}}/D = 0,40 \text{ min}$.

Finalement, on estime que la durée d'équilibration est de 10 minutes.

Q Quel est le facteur de conversion entre les bars et les psi ?

Facteurs de conversion : 1 psi = 0,06895 bar et 1 bar = 14,50326 psi.

Remarque : Le **p.s.i.**, pour « *pound per square inch* » (« **livre** par **pouce** carré », lb/in²), est une **unité de mesure** de **contrainte** et de **pression** anglo-saxonne.

Q Pourquoi doit-on prélever un volume 4 à 5 fois plus important que celui de la boucle d'échantillonnage ?

Pour être certain que la boucle ne délivrera que le volume indiqué par cette dernière, et donc pour obtenir une bonne reproductibilité de l'injection. C'est important, surtout pour les mesures quantitatives.

Q Quelle est la différence entre chromatographie en phase inverse, normale et hilic ?

En chromatographie en phase inverse : on effectue la séparation de **composés apolaires**, avec une phase mobile polaire et une phase stationnaire apolaire (greffée en C18 par ex, on peut parler de chromato liquide-liquide), où les interactions sont des interactions faibles type Van der Waals entre solutés et phase stationnaire.

En chromatographie en phase normale : on effectue la séparation de **composés polaires**, avec une phase mobile apolaire aprotique et une phase stationnaire polaire (type silanols greffés avec amine), où les interactions sont des interactions de faibles énergie type liaison H.

En chromatographie hilic : on effectue la séparation de [composés polaires](#), avec phase mobile contenant un solvant orga (aprotic) et de l'eau, donc de nature plutôt polaire.

D'après J. Alpert (celui qui a donné ce nom à ce type de chromatographie en 1990), la séparation est basée sur le partage de la molécule entre une couche d'eau immobilisée à la surface de la phase stationnaire (étant polaire, elle peut adsorber une quantité d'eau par liaison hydrogène) et la phase mobile riche en solvant organique.

La présence de cette couche d'eau a été vérifiée par plusieurs chercheurs et différentes méthodes d'analyses (thermogravimétrie, IR...)

Le partage est le mécanisme, mais l'existence d'autres mécanisme est prouvés : l'adsorption : dans le cas des petites molécules qui peuvent pénétrer et traverser la couche d'eau

l'échange ionique : dans le cas des molécules ioniques ou ionisables sur des colonnes ioniques (IC-hilic et ZIC-HILIC) ou des interaction avec les silanols libres (lorsque la phase stationnaire est la silice ou les autres phase qui ne sont pas endcapped) interaction hydrophobique avec les siloxane : lorsque les molécules sont de grande taille avec des groupements hydrophobes liaison hydrogène : comme la phase stationnaire est polaire, elle peut établir des ponts hydrogènes avec l'eau et les composés à analyser.

Q Définir la notion de viscosité. Quelle est l'unité du système international de la viscosité dynamique ? Quelle est celle communément employée en HPLC ?

La **viscosité** (du latin *viscum*, gui) peut être définie comme la résistance à l'écoulement uniforme et sans turbulence se produisant dans la masse d'une matière. La viscosité dynamique μ (**mu**) correspond à la contrainte de cisaillement qui accompagne l'existence d'un gradient de vitesse d'écoulement dans la matière.

Lorsque la *viscosité* augmente, la capacité du fluide à s'écouler diminue.

La **viscosité dynamique** μ (ou encore η (**éthha**)) se mesure en pascal-seconde (Pa.s), cette unité ayant remplacé le **poiseuille** (Pl) qui a la même valeur. On trouve encore parfois l'ancienne unité du **système CGS**, la **poise** (Po) : $1 \text{ Pa} \cdot \text{s} = 10 \text{ Po}$.

Remarque : La viscosité cinématique ν (**nu**) s'obtient en divisant la viscosité dynamique par la **masse volumique** ρ .

Elle s'exprime en m^2/s . Dans le système CGS la viscosité cinématique était exprimée en **stokes** (St) ou en centistokes (cSt).

La conversion est immédiate, puisque $1 \text{ St} = 1 \text{ cm}^2/\text{s} = 10^{-4} \text{ m}^2/\text{s}$ et $1 \text{ cSt} = 1 \text{ mm}^2/\text{s} = 10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$.

Q Quelle est la conséquence d'une augmentation de la viscosité de la phase mobile ?

Pour une colonne donnée et un débit donné, la pression en tête de colonne est directement proportionnelle à la viscosité η (d'après la loi de Darcy). Une augmentation de la viscosité entraînera nécessairement une augmentation de la pression.