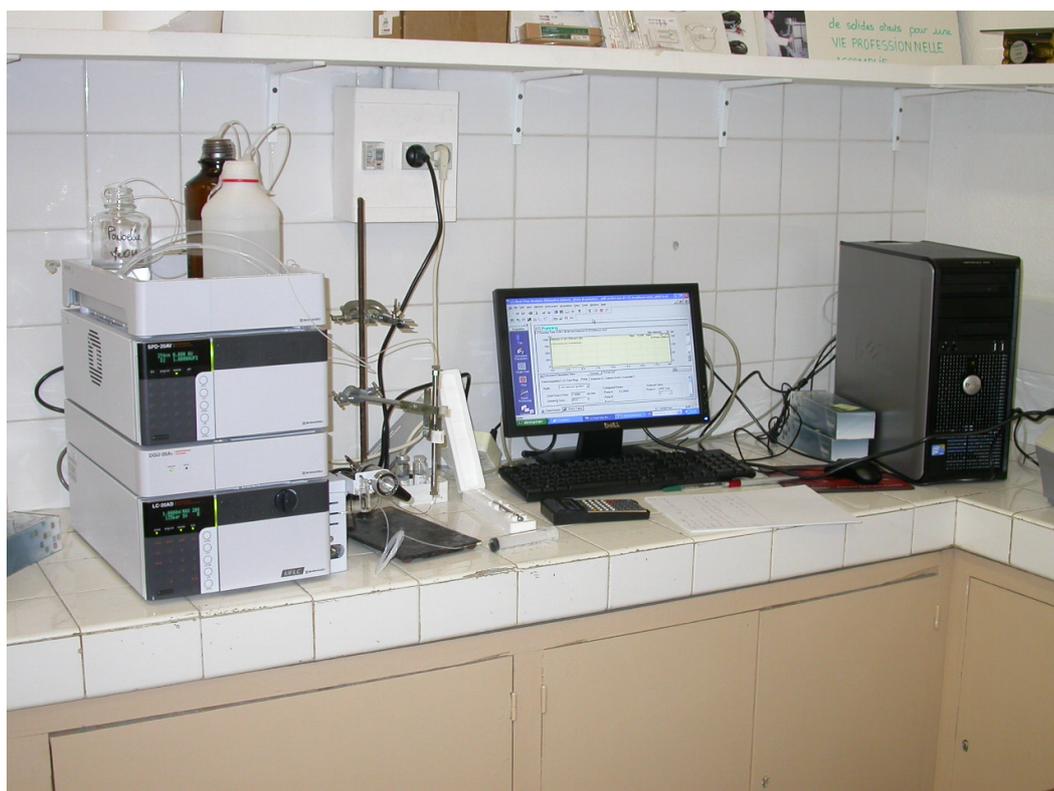


2^{ème} année BTS Bioanalyses
en Laboratoire de Contrôle

Notice Technique Chaîne HPLC Prominence de Shimadzu piloté par Lab Solutions 5.1



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

l.godin@etsl.fr

TP n°8 : QUALIFICATION OPÉRATIONNELLE D'UNE CHAÎNE H.P.L.C Shimadzu

1. PROCEDURE DE MISE EN ROUTE DE LA CHAINE HPLC	2
2. QUALIFICATION DE LA POMPE	5
2.1. Test de stabilité de la pompe	5
2.2. Vérification de l'Exactitude du débit	5
3. QUALIFICATION DU DÉTECTEUR	6
3.1. Vérification de la durée d'utilisation des sources de lumière	6
3.2. Vérification de l'exactitude en longueur d'onde	7
3.3. Étude de la dérive et du bruit de fond	7
3.4. Étude de la répétabilité d'injection en mélange de solvant	9
3.5. Étude de la linéarité par courbe d'étalonnage	13
3.6. Obtention de la droite d'étalonnage via le Browser	14
3.7. Calcul de la concentration des données à l'aide de la courbe d'étalonnage	20
4. EXTINCTION DE LA CHAINE HPLC	22
5. 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 **Lab Solution** de Shimadzu.

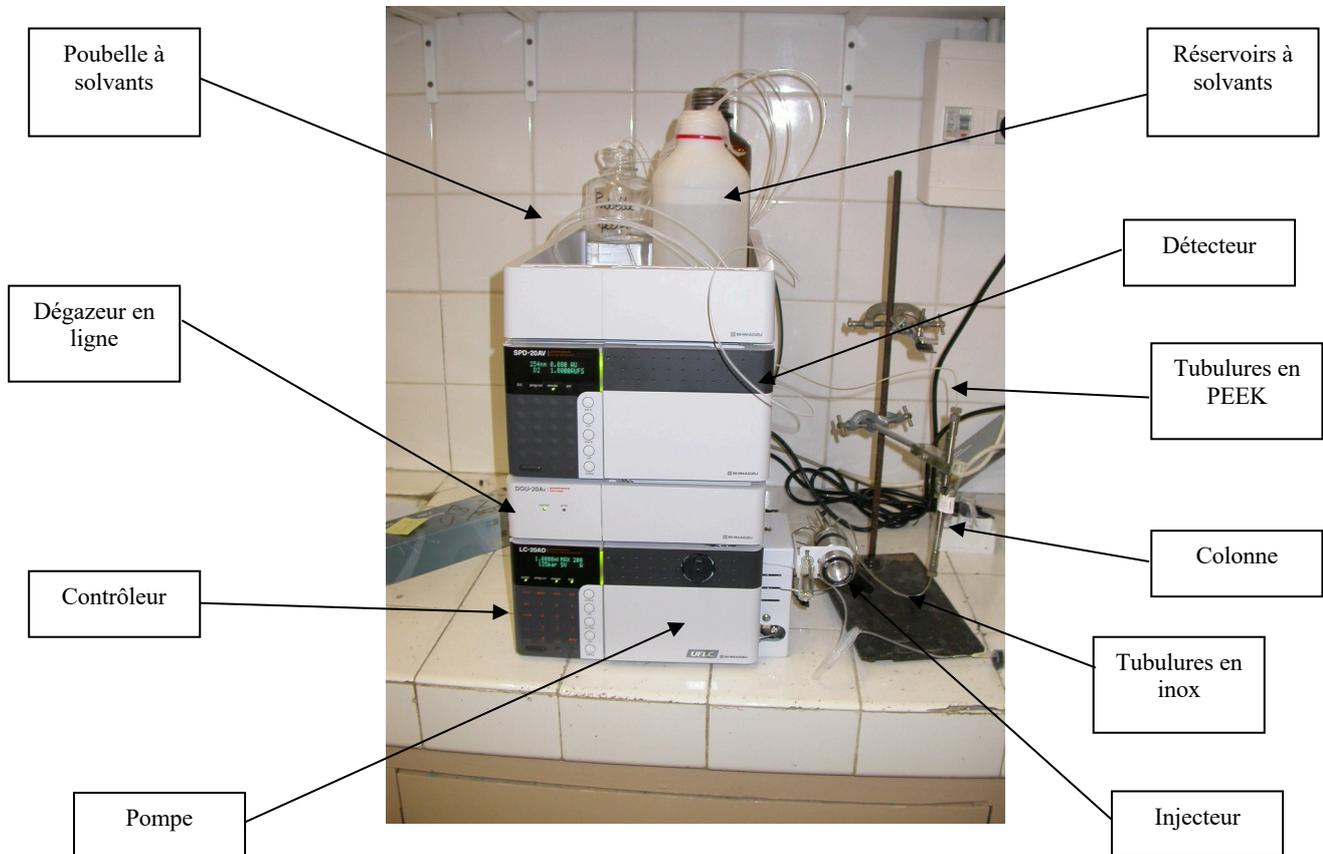


Figure 1 : photo de l'ensemble de la chaîne HPLC utilisée

L'ensemble chromatographique Shimadzu, chaîne gradient, que vous allez utiliser, se présente sous la forme d'un assemblage d'appareils montés en colonne qui comprend, de haut en bas :

- ✓ Les bouteilles de solvants en communication avec l'ensemble pompe + injecteur + colonne et dégazeur ;
- ✓ La bouteille réservée à la récupération des solvants dont il faut régulièrement surveiller le niveau afin d'éviter un éventuel débordement ;
- ✓ Le détecteur spectrophotométrique **Prominence UV/Visible SPD-20AV** ;
- ✓ Le dégazeur en ligne **Prominence DGU 20A5** ;
- ✓ Le contrôleur de la chaîne **CBM 20ALite**, qui est interfacé avec l'ordinateur ;
- ✓ L'ensemble pompe **LC-20AD** + injecteur relié à la colonne, elle-même reliée aux différentes bouteilles de solvants.

Cet appareillage est une chaîne de type gradient, c'est-à-dire qu'elle permet de travailler en mode gradient et présente 4 voies possibles (de A à D) organisées telles que :

- ✓ La voie A est pour l'eau ultrapure ou le tampon ;
- ✓ La voie B, pour le méthanol ;
- ✓ La voie C, pour l'acétonitrile ;
- ✓ La voie D, pour le tétrahydrofurane.

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

1. Allumer le détecteur et laisser chauffer la lampe UV (lecture à 254 nm) pendant au moins 15 minutes.
2. Allumer le contrôleur puis le PC sous WIN10 puis l'écran. ID : **admin**, mot de passe : **Ets193**

Q Quel est l'utilité du dégazeur en ligne ? Quel est son principe de fonctionnement ?

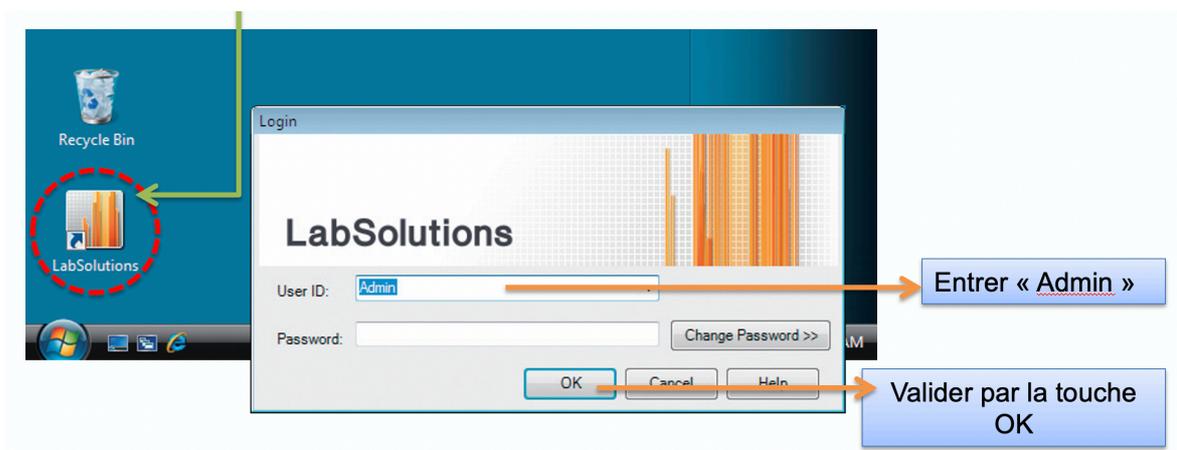
Q Quel autre système peut-on utiliser pour effectuer le même type d'opération ?

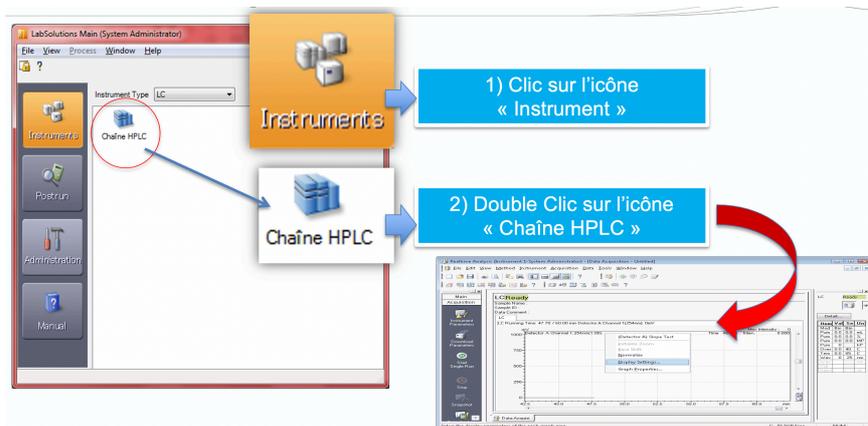
Etape 2 : purge des voies A, et B

1. Plonger la canalisation A dans l'eau UP, et la canalisation B dans le méthanol. Laisser les canalisations C et D 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.

(Les bouteilles commerciales de méthanol et d'acétonitrile se trouve sous la chaîne).

3. Double cliquer sur l'icône du logiciel **LabSolution** :

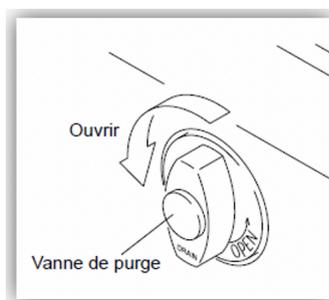




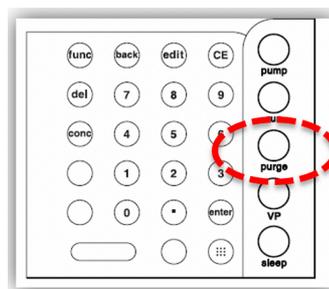
Le logiciel se connecte à la chaîne HPLC (un bip se fait entendre). LC Ready doit apparaître.

4. Cliquer sur « *Advanced* », puis dans File, faire Open Method File, dans le dossier Lab Solutions → Data → Procédures, choisir le fichier : Méthode-Purge-voiesA&B. Downloader la méthode vers la chaîne HPLC, puis Close.

Ouvrir le bouton de purge noir sur la face avant de la pompe (1/4 de tour suffit !),



puis appuyer sur purge (bouton gris en face avant du Contrôleur LC20AD).



5. La purge est terminée lorsque l'on n'observe plus de bulles à travers les circuits des voies (3 minutes doivent suffire, si ce n'est pas le cas, vider les 25 mL de la seringue d'amorçage et purger à nouveau !). **Fermer le bouton de purge noir** et vider la seringue d'amorçage de 25 mL dans la bouteille de récupération de solvants.

2. QUALIFICATION DE LA POMPE

2.1. Test de stabilité de la pompe

Etape 1 : vérifier que le tube de résistance ou l'union soit en place :

Etape 2 : procédure :

- 1 Appuyer sur **func** jusqu'à ce que [PARAMETER] apparaisse puis appuyer sur **enter**
- 2 Appuyer sur **func** ou **back** jusqu'à ce que [COMP] apparaisse.
Noter la valeur indiquée devant COMP
- 3 Remplacer cette valeur par **0.45** puis appuyer sur **enter**.
- 4 Appuyer sur **CE** 2 fois pour revenir à l'écran initial.
- 5 Appuyer sur **VP** jusqu'à ce que [VALIDATION] apparaisse.
- 6 Appuyer sur **func** jusqu'à ce que [PULSE CHECK] apparaisse.
- 7 Rentrer la valeur par **0.2** puis appuyer sur **enter**, pour que [CRITERIA] soit fixé à 0,20 MPa.
- 8 Appuyer sur **enter** pour démarrer la mesure (durée 2 min) :
La pompe fonctionne alors à un débit de 1 mL/min et les mesures démarrent une minute plus tard. Le débit, la mesure de pression, la fluctuation de pression et le temps restant apparaissent à l'écran durant les mesures.

À la fin des mesures, la valeur la plus grande mesurée apparaît :
Relever la valeur.



La mesure de fluctuation de pression ne doit pas excéder 0,20 MPa

Appuyer sur **CE** plusieurs fois pour revenir à l'écran initial.

2.2. Vérification de l'Exactitude du débit

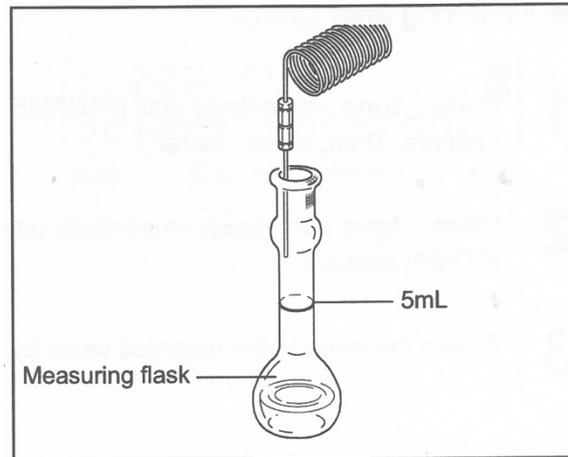
Etape 1 : Ouvrir la méthode : « MéthodeTest »

Procéder comme suit :

☞ Cliquer dans **File Open Method File**, pour ouvrir la méthodeTest. Clic sur Download et Close.

Etape 2 : procédure

- 1 La fiole est à fixer sur le support à colonne de façon à être parfaitement horizontale.
- 2 Un étudiant clique sur **Pump ON** : le débit est fixé à 1 mL/min.
- 3 Le second étudiant démarre le chronomètre dès que la première goutte d'eau émerge de la canalisation.



Relever la pression sur l'écran LC-20AD de l'appareil, et faites une conversion en bar !

- 4 Arrêter le chronomètre dès que la fiole est complétée au trait de jauge.

Noter la valeur obtenue dans le CL

La déviation ne doit pas être à plus de $\pm 5\%$

3. QUALIFICATION DU DÉTECTEUR

3.1. Vérification de la durée d'utilisation des sources de lumière

☞ Procédure :

- 1 Appuyer quatre fois sur **func**.
- 2 Appuyer sur **enter**.
- 3 Appuyer sur **func** : la durée d'utilisation de la lampe D2 apparaît.
- 4 Appuyer de nouveau sur **func** : la durée d'utilisation de la lampe W apparaît

Les deux lampes doivent avoir une durée d'utilisation maximale de 2000 heures.

3.2. Vérification de l'exactitude en longueur d'onde

☞ Procédure :

- 1 Appuyer deux fois sur **back** et une fois sur **CE** : [MONITOR] apparaît.
- 2 Appuyer deux fois sur **func** : [CONTROL] apparaît
- 3 Appuyer sur **enter** : [WAVE CHECK] apparaît.
- 4 Appuyer sur **enter** : l'exactitude en longueur d'onde s'effectue automatiquement.
- 5 Lorsque le test est terminé :



WAVE CHECK
CHECK GOOD doit apparaître à l'écran
L'écran indique ensuite :
WAVE CHECK
Dif 656 : 0,40 nm
WAVE CHECK
Dif 254 : 0,50 nm

On doit obtenir des longueurs d'onde à ± 1 nm

3.3. Étude de la dérive et du bruit de fond

☞ Dans File, faire Open Method File, dans le dossier Lab Solutions → Data → Procédures, choisir le fichier : Qualif-Bruit-Dérive-Détecteur.

☞ Vérifier la méthode : cliquer sur **Edit Instrument Parameters...** : cliquer sur **Advanced**

→ onglet Data Acquisition :

LC Stop Time : 30,00 min, puis cliquer sur Apply to All acquisition time,

→ onglet Pump : Mode Low pressure gradient

**Total Pump A Flow : 1,0 mL/min,
Solvent B conc : 100 %, Solvent C et D conc : 0 %,
Pressure limits (Pump A), Max : 250 bar ;**

→ onglet Detector A :

**Lamp D2
Polarity +
Response 2 sec
Décocher Cell Temperature,
Longueur d'onde de travail à 250 nm**

☞ Charger la méthode dans la Chaîne HPLC, en cliquant sur Download, puis Close.

☞ Cliquer sur **Start Single Run** dans la barre verticale d'assistance :



La fenêtre **Single Run** apparaît, la remplir comme suit :

Sample Name : ligne de base

(Vérifier que le fichier **Method File** se trouve au bon endroit sur le disque dur)

Method File : C:\LabSolutions\Data\Procédures\Derive-Bruit-de-fond

Data File : C:\LabSolutions\Data\numéro du groupe BIO\ligne de base.lcd

Côcher Report, puis aller chercher la feuille de style de rapport selon le chemin informatique :

Lab Solutions → Data → Procédures → Report Format Cafeine, puis décocher Report.

Data Comment : ligne de base sans colonne ; 100% MeOH

à la longueur d'onde de 250 nm pour un débit de 1,0 mL/min.

Injection volume : 20 µL

Cliquer sur OK



Remarque

La courbe bleue indique la pression.

On peut zoomer, en temps réel, sur l'ensemble du chromatogramme en cliquant sur ⊕ ; pour dézoomer, il suffit de faire Initialize Zoom.



Remarque

On peut modifier la durée d'analyse en cours d'analyse, pour cela, sélectionner *Change Analysis Time* dans le menu *Data acquisition*.

Etape 3 : obtention du chromatogramme

☞ Il apparaît une nouvelle fenêtre : **Data Acquisition Start**. (à traduire) **Ne surtout pas cliquer sur START !**

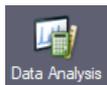
⇒ Si sur la fenêtre de contrôle, la détection n'est pas à zéro : faire un autozéro, en appuyant sur le bouton zéro du détecteur.

⇒ S'assurer que l'injecteur est bien sur LOAD (manette noire vers le haut), basculer l'injecteur sur INJECT (manette noire vers le bas).

☛ Vérifier que le chromatogramme apparaisse en temps réel sur l'écran (courbe noire) ! Noter la pression indiquée.

Etape 4 : traitement du chromatogramme et impression

☞ Cliquer sur l'icône **Data Analysis** dans la barre verticale d'assistance :



⇒ L'application **LC Data Analysis** démarre : le chromatogramme apparaît (la fenêtre du haut correspond au chromatogramme général, et celle du bas permet de choisir les zones de zoom)

⇒ Cliquer sur **Data Report** (dans la barre verticale d'assistance),



Faire un aperçu avant impression, puis **imprimer le chromatogramme** si celui-ci vous convient.

Zoomer sur une partie la plus horizontale possible de la ligne de base sur une durée de 10 min, puis faire un clic droit dans la fenêtre de la ligne de base zoomée en sélectionnant **Print Graph**, puis **Preview**, et si cela vous convient, imprimer.

☞ Fermer toutes les fenêtres (cliquer sur les croix noires et rouges en haut et à droite des fenêtres), pour ne plus voir apparaître que la fenêtre : **LC Real Time Analysis**.

3.4. Étude de la répétabilité d'injection en mélange de solvant

Etape 1 : mise en place de la colonne :

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

1. S'assurer que la pression soit proche de 0 (quelques psi).
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.
4. Faire dépasser légèrement de quelques mm la canalisation en inox à travers la vis et visser l'ensemble sur la colonne à chaque extrémité. Faire de même avec la canalisation en PEEK.

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.

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 ?

Etape 2 : création de la méthode : mode Isocratique – phase mobile : 60/40 Eau/MeOH pendant 5 min à 272 nm

Procéder comme suit :

☞ Dans la fenêtre Realtime Analysis, cliquer sur **Edit Instrument Parameters...** : cliquer sur **Advanced**

→ onglet Time Program :

5,00 min;

→ onglet Pump : Mode Low pressure gradient

Total Pump A Flow : 1,0 mL/min,

Solvent B conc : 40 %,

Pressure limits (Pump A), Max : 250 bar ;

→ onglet Detector A : vérifier que :

Lamp D2

Response : 3 (0,5 s)

Cell Temperature soit décocher,

Indiquer une longueur d'onde de travail de 272 nm.

Intensity Unit : AU

Aux RNG : 2 (1 Au/V)

☞ Charger la méthode dans la Chaîne HPLC, en cliquant sur Download.

☞ **Sauvegarder la méthode, FILE / SAVE / METHOD FILE SAVE AS**, dans le dossier Lab Solutions → Data, dans le dossier du nom de votre groupe 2BIO, sous le nom **Repetabilite-vos_initiales**.

(S'assurer que le titre de la fenêtre générale corresponde bien au nom de la méthode qui vient d'être créée).

Etape 3 : lancement de la méthode

☞ Cliquer sur l'icône **Start Single Run** (dans la barre verticale d'assistance) : une fenêtre apparaît, il suffit d'actualiser :

Sample Name : SolutionFille-n°3

(Vérifier que le fichier Method File se trouve au bon endroit sur le disque dur)

Method File : C:\LabSolutions\Data\numéro du groupe BIO\Repetabilite-vos_initiales

Data File : C:\LabSolutions\Data\numéro du groupe BIO\SolutionFille.lcd

Sélectionner l'incrément 01, 02, ...

Lab Solutions → Data → Procédures → Report Format Cafeine, décocher Report.

Data Comment : Solution fille n° 3 à 20 mg/L en caféine sur Gemini C18 ;
à la longueur d'onde de 272 nm pour un débit de 1,0 mL/min.

Cliquer sur OK

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.

Etape 4 : obtention, traitement du chromatogramme

☞ Il apparaît une nouvelle fenêtre : **Data Acquisition Start**. (à traduire) **Ne surtout pas cliquer sur START !**

⇒ Prérincer la seringue de 100 µL.

⇒ **Attendre que l'équilibration de la colonne soit effective PENDANT 5 MINUTES.**

⇒ Prélever 4 à 5 fois la valeur du volume de la boucle d'injection (c'est indiqué dessus).

POUR LA PREMIÈRE INJECTION APPELER LE PROFESSEUR POUR DÉMONSTRATION ET BONNE UTILISATION DE LA SERINGUE !

⇒ Si sur la fenêtre de contrôle, la détection n'est pas à zéro : faire un autozéro, en appuyant sur le bouton zéro du détecteur.

⇒ S'assurer que l'injecteur est bien sur LOAD (manette noire vers le haut), enfoncer l'aiguille horizontalement, appuyer sur le piston, puis retirer délicatement l'aiguille, et basculer l'injecteur sur INJECT (manette noire vers le bas).

☞ Vérifier que le chromatogramme apparaisse en temps réel sur l'écran (courbe noire) ! **Noter la pression indiquée.**

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

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

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

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

Pour la vérification de la répétabilité, le constructeur indique qu'il faut analyser 6 fois le même échantillon

☞ Pour injecter à nouveau 5 fois la fiole fille n°3, il faut réitérer les **étapes 3 et 4** comme suit :

Étape 3 : lancement de la méthode

☞ Cliquer sur l'icône **Start Single Run** (dans la barre verticale d'assistance) : une fenêtre apparaît, il suffit d'actualiser :

Sample Name : SolutionFille-n°3

(Vérifier que le fichier Method File se trouve au bon endroit sur le disque dur)

Method File : C:\LabSolutions\Data\numéro du groupe BIO\Repetabilite-vos_initiales

Data File : C:\LabSolutions\Data\numéro du groupe BIO\SolutionFille.lcd

Sélectionner l'incrément 01, 02, ...

Data Comment : Solution fille n° 3 à 20 mg/L en caféine sur Gemini C18 ;
à la longueur d'onde de 272 nm pour un débit de 1,0 mL/min.

Cliquer sur OK

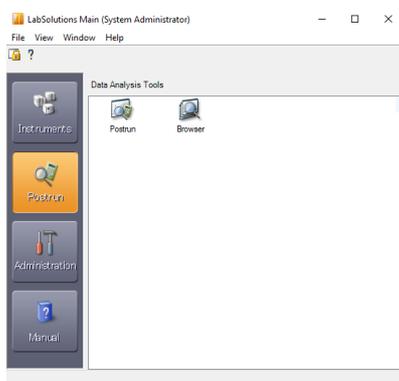
☞ Il apparaît une nouvelle fenêtre : **Data Acquisition Start**. (à traduire) **Ne surtout pas cliquer sur START !**

⇒ Prélever 4 à 5 fois la valeur du volume de la boucle d'injection (c'est indiqué dessus).

⇒ S'assurer que l'injecteur est bien sur LOAD (manette noire vers le haut), enfoncer l'aiguille horizontalement, appuyer sur le piston, puis retirer délicatement l'aiguille, et basculer l'injecteur sur INJECT (manette noire vers le bas).

Étape 4 : impression des chromatogrammes via le Browser

☞ Dans la fenêtre principale de LabSolution, cliquer sur Postrun, puis double-cliquer sur l'icône **Browser** :



- ☞ Glisser déposer les fichiers étalons dans la fenêtre « Quantitative Results View ».
- ☞ Faire un preview avant d'imprimer l'ensemble des 6 chromatogrammes.

3.5. Étude de la linéarité par courbe d'étalonnage

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

Étape 2 : Utiliser la même méthode que celle utilisée précédemment

- ☞ Cliquer sur l'icône **Start Single Run** (dans la barre verticale d'assistance) : une fenêtre apparaît, il suffit d'actualiser :

Sample Name : Etalon

(Vérifier que le fichier Method File se trouve au bon endroit sur le disque dur)

Method File : C:\LabSolutions\Data\numéro du groupe BIO\Repetabilite-vos_initiales

Data File : C:\LabSolutions\Data\numéro du groupe BIO\Etalon.lcd

Sélectionner l'incrément 01, 02, ...

Lab Solutions → Data → Procédures → Courbe-Qualification-cafeine-reports, puis décocher Report.

Data Comment : Etalons de gamme en caféine sur Gemini C18 ; 40-60 MeOH-Eau
à la longueur d'onde de 272 nm pour un débit de 1,0 mL/min.

Cliquer sur OK

Étape 3 : lancement de l'analyse

- ☞ Il apparaît une nouvelle fenêtre : **Data Acquisition Start**. (à traduire) **Ne surtout pas cliquer sur START !**
 - ⇒ Si sur la fenêtre de contrôle, la détection n'est pas à zéro : faire un autozéro, en appuyant sur le bouton zéro du détecteur.
 - ⇒ Prélever 4 à 5 fois la valeur du volume de la boucle d'injection (c'est indiqué dessus).
 - ⇒ S'assurer que l'injecteur est bien sur LOAD (manette noire vers le haut), enfoncez l'aiguille horizontalement, appuyer sur le piston, puis retirer délicatement l'aiguille, et basculer l'injecteur sur INJECT (manette noire vers le bas).

- ☞ Répéter les étapes 2 et 3 pour passer les 4 autres points de gamme.

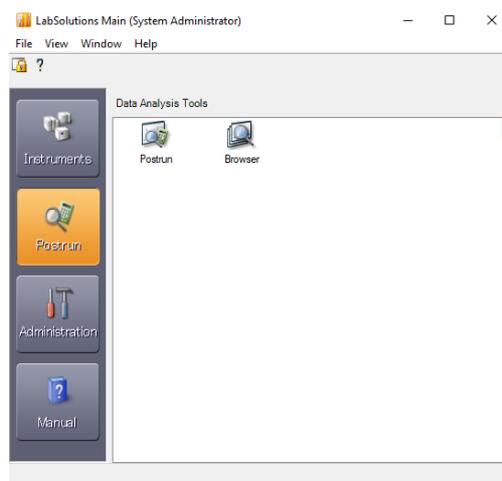
3.6. Obtention de la droite d'étalonnage via le Browser

LabSolution 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 :

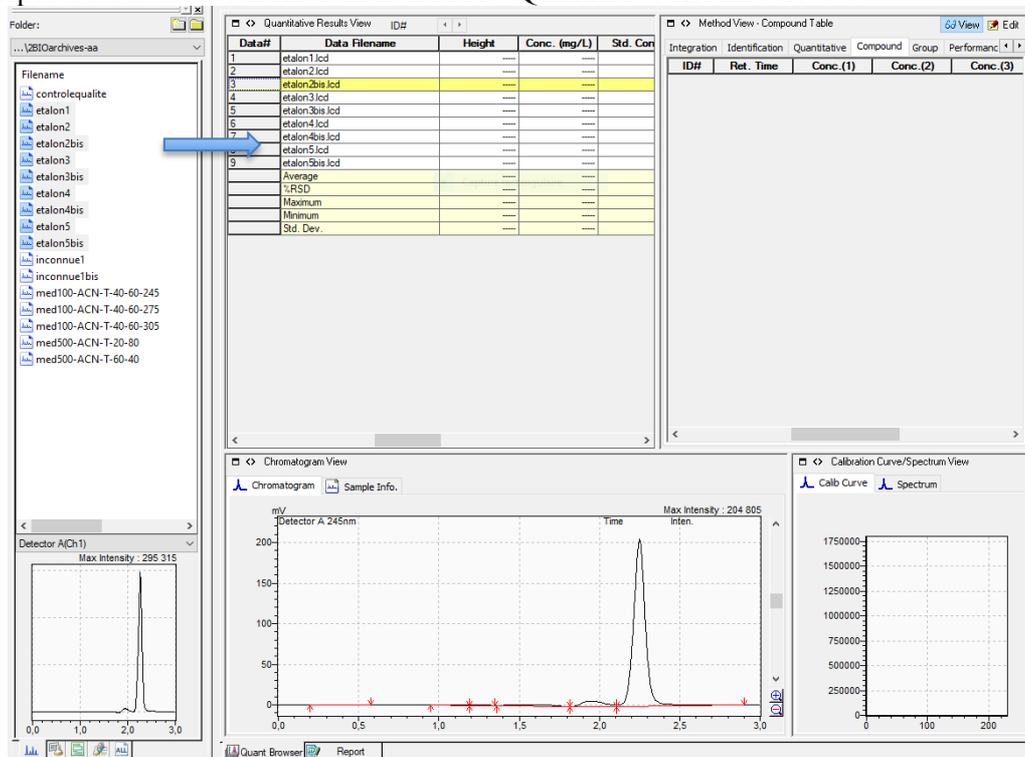
Etape 1 : Création des paramètres d'analyse des données

À partir des données du chromatogramme pré-mesuré, nous allons définir la méthode d'identification du pic d'intérêt, la méthode du calcul quantitatif et le type de courbe d'étalonnage.

☞ Dans la fenêtre principale de LabSolution, cliquer sur Postrun, puis double-cliquer sur l'icône **Browser** :



☞ Glisser déposer les fichiers étalons dans la fenêtre « Quantitative Results View » :



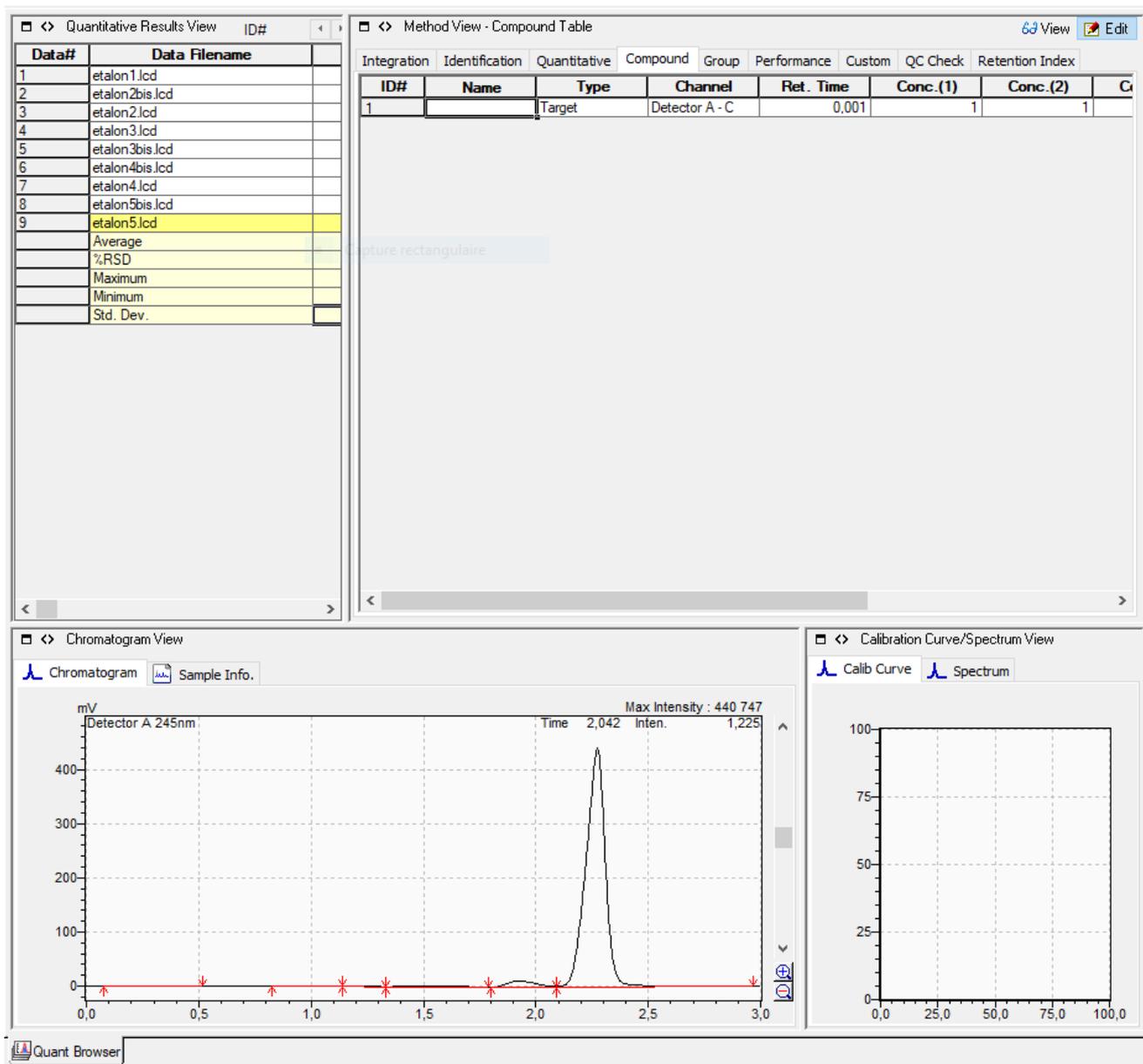
☞ Dans la fenêtre « Quantitative Results View » :

Data#	Data Filename	Sample Type	Level#	r(%)
1	etalon1.lcd	Standard(No Calc. Point)	1	
2	etalon2.lcd	Standard(No Calc. Point)	2	
3	etalon2bis.lcd	Standard(No Calc. Point)	2	
4	etalon3.lcd	Standard(No Calc. Point)	3	
5	etalon3bis.lcd	Standard(No Calc. Point)	3	
6	etalon4.lcd	Standard(No Calc. Point)	4	
7	etalon4bis.lcd	Standard(No Calc. Point)	4	
8	etalon5.lcd	Standard(No Calc. Point)	5	
9	etalon5bis.lcd	Standard(No Calc. Point)	5	
	Average			
	%RSD			
	Maximum			
	Minimum			
	Std. Dev.			

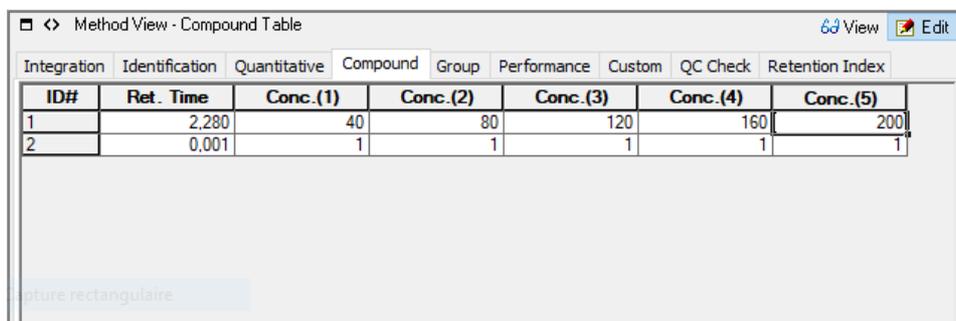
⇒ Dans la colonne « **Sample Type** » : indiquer Standard (Calc Point)

⇒ Dans la colonne « **Level#** » : indiquer le niveau de concentration de chaque étalon (1, 2 jusqu'à 5)

☞ Dans la fenêtre « Method View », cliquer sur le mode **Edit**, pour effectuer des modifications :



☞ Dans l'onglet **Compound** de la fenêtre « Method View », rentrer le nom de la molécule d'intérêt, son temps de rétention, et enfin les concentrations que vous avez calculées (Conc.(1), Conc.(2) jusqu'à Conc.(5)) pour chaque point de gamme :



⇒ Cliquer dans l'onglet **Integration** de la fenêtre « Method View » : cliquer sur l'icône *Program*, pour vérifier l'intégration correcte du pic d'intérêt :

The screenshot shows the 'Method View - Peak Integration Parameters' window with the 'Integration' tab selected. The 'Program' icon is highlighted with a blue arrow pointing to the 'Integration Time Program' window. The 'Integration Time Program' window displays a chromatogram with a peak at 2.265646472167 minutes. The 'R.Time' is 0,848 and 'Inten' is 334609,2. The 'Reference Chrom Ch #' is 'Detector A:245nm'. The 'Max Intensity' is 440 747. The chromatogram shows several peaks with their retention times: 0,3196/0,62, 0,8462/0,69, 1,10439/1,262, 1,38305/1,646, 1,08034/1,1487, and 2,265646472167. The 'Integration Time Program' window also has a table with columns 'Time(min)', 'Command', and 'Value'. The table contains one row: 1, [checked], 0,000, Command, Value, 0. The 'Integration Time Program' window has buttons for 'OK', 'Cancel', 'Load Data...', 'Simulate', and 'Help'.

⇒ Si vous voulez retirer les pics parasites se trouvant généralement dans la ligne de base, il faut cliquer sur l'icône « **Reject Peaks** »



pour encadrer verticalement les zones à pics parasites, puis cliquer sur **Simulate**, puis **OK**.

⇒ Si besoin, **intégrer le pic d'acide acétylsalicylique**, en cliquant sur l'icône « **Insert Peak** »



⇒ Revenez sur la fenêtre « Method View » en cliquant sur OK.

☞ Cliquer dans l'onglet **Identification** de la fenêtre « Method View » : et vérifier les paramètres suivants :

Method View - Identification Parameters

Integration Identification Quantitative Compound Group Performance Custom QC Check Retention Index

Identification

Window/Band: Window Band

Window: %

Default Bandwidth: min

Identification Method:

Peak Selection:

Display not identified peaks as peaks with zero area(height)

Add the peaks with zero area(height) to calibration level

Quantitate the peaks with zero area(height)

Retention Time Update:

None Replace Average

☞ Définir la manière d'identifier les pics : **S'il y a eu une variation sur t_R et/ou w** , modifier comme suit :

- Window** : 10 % ;
- Peak Selection** : largest Peak.

☞ Cliquer dans l'onglet **Quantitative** de la fenêtre « Method View » :

Method View - Quantitative Parameters

Integration Identification Quantitative Compound Group Performance Custom QC Check Retention Index

Quantitative Method:

Unit:

Calculated by: Area Height

Format of Concentration

Decimal Digits Significant Digits

Grouping Type:

Calibration Curve

of Calib. Levels:

Curve Fit Type:

Zero:

Weighting Method:

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

puis modifier comme suit :

☞ Préciser la méthode de calcul quantitatif et le type de courbe d'étalonnage :

Méthode quantitative : External Standard ;

Calculated by : Area ;

X axis of Calib. Curve : Conc. ;

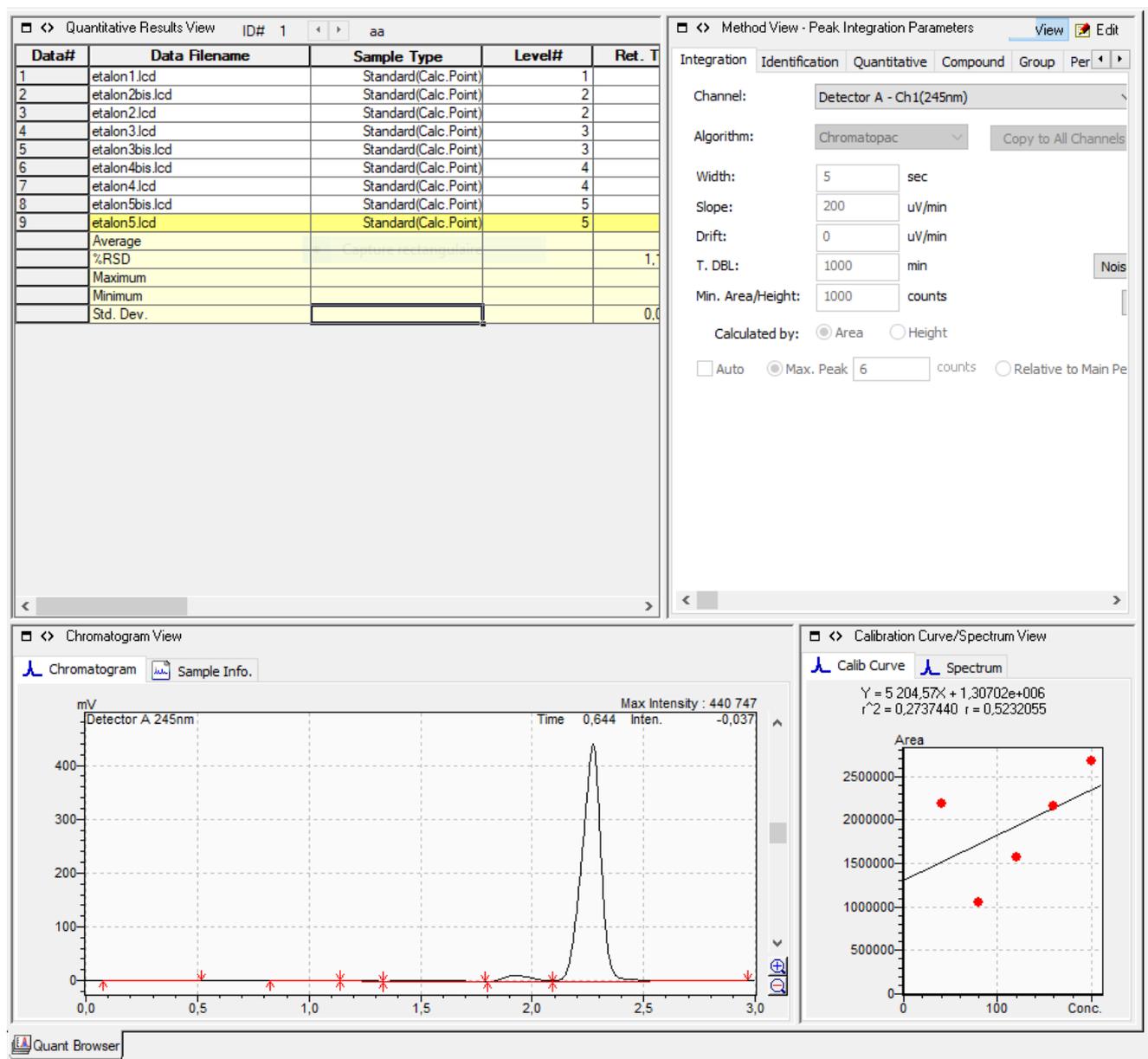
Units : mg/L ; puis cliquer sur Suivant ;

Format of Concentration : côcher Decimals et indiquer 2.

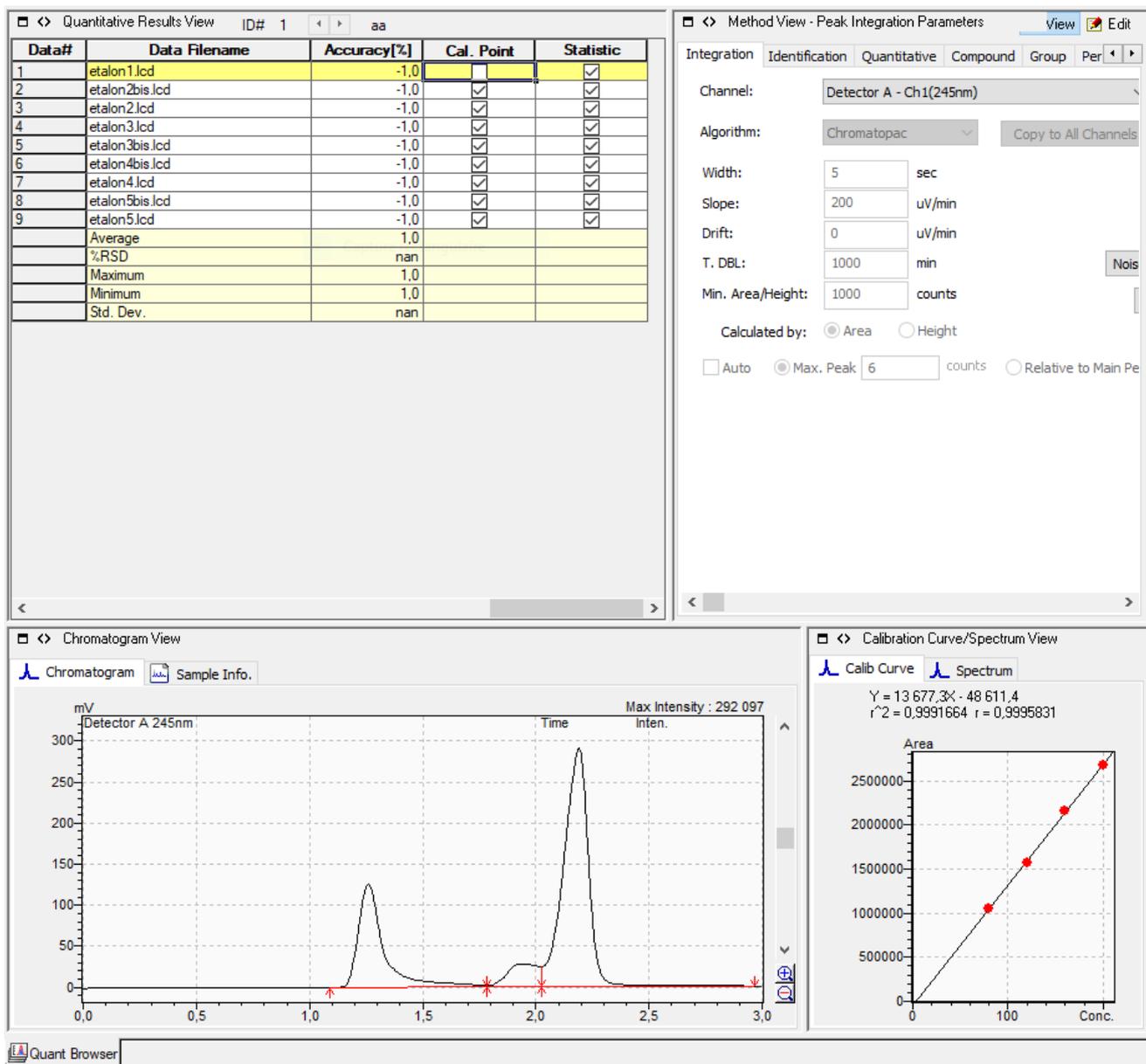
☞ Sauvegarder la méthode de travail : File : Save method

Etape 2 : Modification éventuelle de la courbe d'étalonnage et impression

Si les points ne sont pas alignés, comme dans l'exemple ci-dessous :



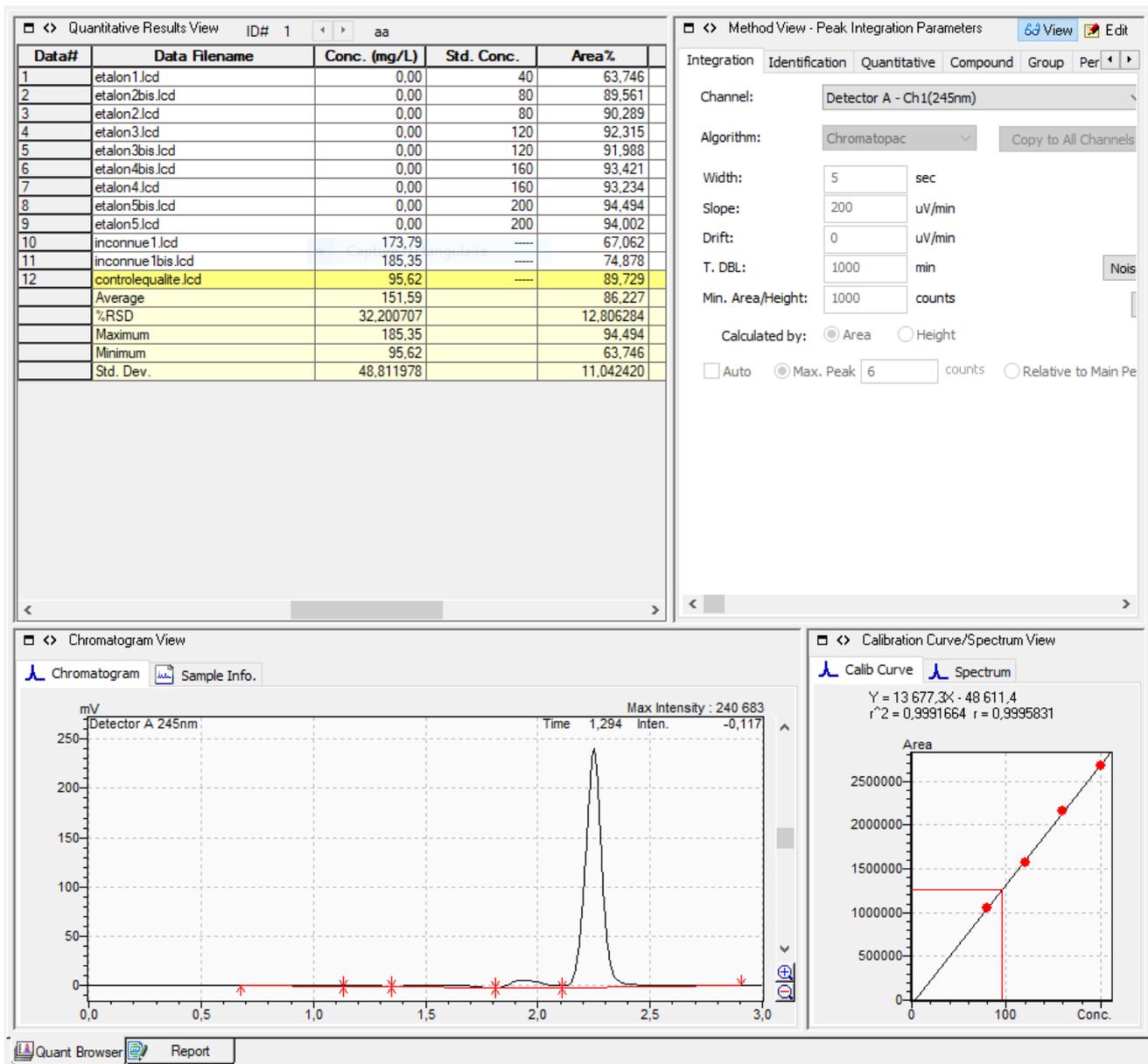
Il suffit de décocher le ou les points de gamme correspondant dans la colonne Cal. Point :



Remarque : Si on veut supprimer tous les traitements de données sur un ou plusieurs chromatogrammes : File : Rollback to original data, permet de supprimer tous les traitements de données. A réaliser fichier par fichier et ne pas oublier de sauvegarder chaque fichier !

3.7. Calcul de la concentration des données à l'aide de la courbe d'étalonnage

Il est possible de calculer la concentration d'un échantillon inconnu-connu (étalon de contrôle) ainsi que celle d'une inconnue à l'aide de la courbe d'étalonnage par simple glisser déposer dans la fenêtre « Quantitative Results View ».



Pour imprimer : File : Data Report for Current Data → preview, puis imprimer.

Remarque : Print Quant Report for Current Data, permet d'imprimer chaque chromatogramme avec son résultat de dosage.

4. EXTINCTION DE LA CHAÎNE HPLC

Étape 0 : rinçage de la colonne avec 100 % d'ACN, pendant 20 min :

1. Cliquer sur l'onglet « *Data Acquisition* », puis dans File, faire Open Method File, dans le dossier Lab Solutions → Data → procédures, choisir le fichier : Méthode-ACN-voieC-100-nettoyagecolonne. Downloader la méthode dans la chaîne HPLC.
2. Cliquer sur l'icône **Instrument On/Off** (dans la barre des menus) :



pour mettre en fonctionnement la pompe

Étape 1 : retrait de la colonne en place :

1. Cliquer sur l'icône **Instrument On/Off** (dans la barre des menus) :



pour couper la pompe, vérifier que la pression est proche de 0 (quelques psi).

2. 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.

Étape 2 : circulation du solvant de repos dans les 4 voies pendant 30 min :

3. Plonger les 4 canalisations des 4 voies dans le mélange de repos H₂O/MeOH 80/20.
4. Cliquer sur l'onglet « *Data Acquisition* », puis dans File, faire Open Method File, dans le dossier Lab Solutions → Data → procédures, choisir le fichier : Méthode-Solvantrepos. Downloader la méthode dans la chaîne HPLC.
5. Cliquer sur **Start Single Run** : une fenêtre apparaît, cliquer sur OK. ATTENDRE 20 minutes avant de passer à l'étape 3 :

Étape 3 : Éteindre la chaîne HPLC :

☞ Cliquer sur l'icône **Instrument On/Off** (dans la barre des menus) :



pour couper la pompe, vérifier que la pression est proche de 0 (quelques psi).

1. L'injecteur doit être sur LOAD. Vider dans la bouteille de récupération adéquate des solvants (sous la hotte) le contenu des bouteilles « poubelle » (celle de la chaîne et celle de l'injecteur).
2. Eteindre l'ensemble de l'appareillage : détecteur, contrôleur-Pompe, PC, et écran.

5. ÉLÉMENTS DE REPOSE AUX QUESTIONS

Q Quel est l'utilité du dégazeur en ligne ? Quel est son principe de fonctionnement ?

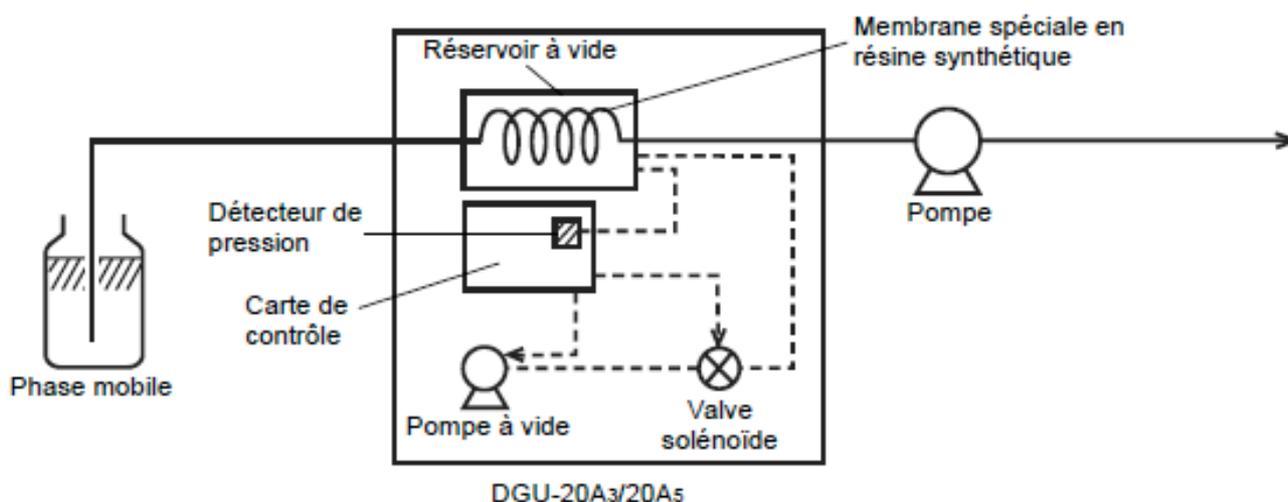
Le dégazeur en ligne permet d'éliminer en continu les gaz dissous dans les liquides à l'aide d'une membrane spéciale en résine synthétique (Téflon).

Grâce au raccordement de ce dégazeur à la pompe pour la chromatographie liquide haute performance, les gaz dissous dans les solvants de phase mobile peuvent être dégazés en continu sans entraîner de changement dans la composition de la phase mobile.

Ceci peut empêcher le dégazage et la formation de bulles dans le système, pouvant provoquer un dysfonctionnement au niveau de la pompe, la formation d'un bruit de fond sur la ligne de base ou des variations importantes de la ligne de base. Le dégazeur en ligne améliore également la stabilité et la reproductibilité de l'analyse HPLC.

Ce dégazeur est muni de trois ou de cinq tubulures indépendantes mais le processus de dégazage et les différentes fonctions sont identiques pour chaque tubulure.

La figure ci-dessous illustre le principe de fonctionnement du dégazeur.



La phase mobile (liquide) à dégazer passe par une membrane spéciale en résine synthétique placée dans la chambre à vide. Le gaz dissous a une taille moléculaire inférieure et une mobilité supérieure à celles du liquide ainsi qu'une affinité plus forte pour la membrane en résine. Il passe à travers la membrane dans la chambre à vide, est évacué du dégazeur et, par conséquent, est éliminé du solvant.

Q Quel autre système peut-on utiliser pour effectuer le même type d'opération ?

On effectue un barbotage dans chaque flacon de solvants à l'aide d'Hélium de haute pureté (4.6), c'est-à-dire à 99,996 %.

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 chromatographie 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 organique (aprotique) 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'analyse (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 interactions avec les silanols libres (lorsque la phase stationnaire est la silice ou les autres phases 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.