

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

Notice Technique GC450 de Varian



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

l.godin@etsl.fr

TP n°6 : QUALIFICATION d'une CPG

1. PRISE DE TEMPÉRATURE FOUR	2
1.1. Justesse des températures du four	2
1.2. Stabilité des températures du four	3
2. MESURE DES DÉBITS EN SORTIE DE DÉTECTEUR	3
2.1. Contrôle du débit "référence"	3
2.2. Contrôle du débit "make up"	5
3. PROCÉDURE D'ACQUISITION DE LA LIGNE DE BASE	5
3.1. Programmation d'une méthode en isotherme à 100°C	5
3.2. Programmation d'une séquence d'analyse	9
3.3. Obtention du chromatogramme correspondant à la ligne de base	10
4. PROCÉDURE D'ACQUISITION DES CHROMATOGRAMMES POUR L'ETUDE DE LA REPETABILITE	11
4.1. Programmation du gradient de la méthode Test	11
4.2. Injection de la solution Test	11
5. ÉTUDE DE LA LINÉARITÉ DU DÉTECTEUR	12
5.1. Modification du gradient de la méthode Test	12
5.2. Programmation de la séquence d'analyse	13
5.3. Obtention des 3 droites d'étalonnage	14
6. LANCEMENT DE LA MÉTHODE DE COUPURE DU GC	15
7. ÉLÉMENTS DE REPONSE AUX QUESTIONS	16

1. PRISE DE TEMPÉRATURE FOUR

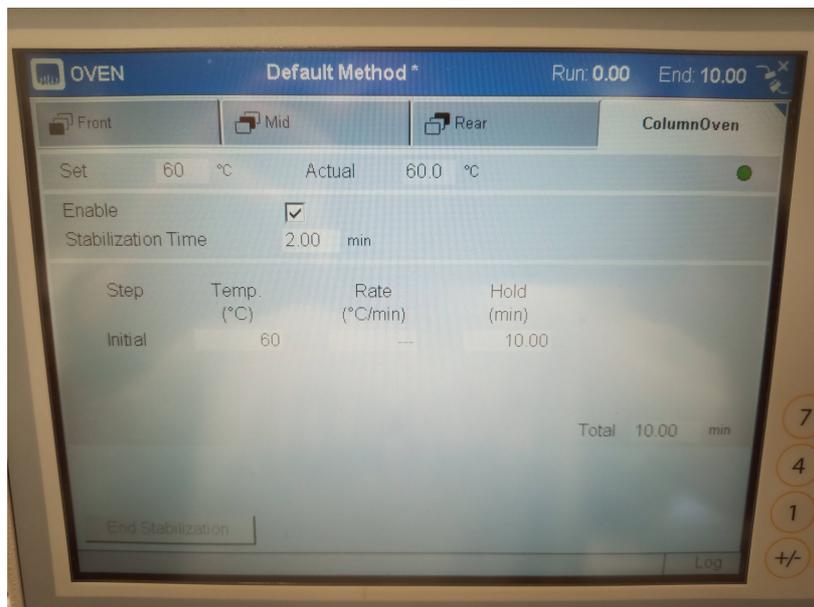
1.1. Justesse des températures du four

- ☞ Brancher la sonde de température filaire en position T1 du thermomètre électronique Peakmeter.
- ☞ Ouvrir la porte du four en appuyant sur le bouton se trouvant en bas à droite, et **placer rapidement** la sonde à l'intérieur du four comme indiqué par la photo ci-dessous :



- ☞ **Refermer rapidement** la porte du four.

- ☞ Sur l'écran de l'appareil, appuyer sur l'icône **Oven** . À l'aide du stylet, régler la température initiale à 60°C.



- ☞ Allumer le thermomètre électronique et attendre environ 30 secondes que la stabilisation grossière de l'affichage s'effectue sur le thermomètre. Prendre les mesures de température toutes les 15 secondes pendant une minute.

1.2. Stabilité des températures du four

- ☛ Prendre les mesures de température toutes les minutes pendant 10 minutes.

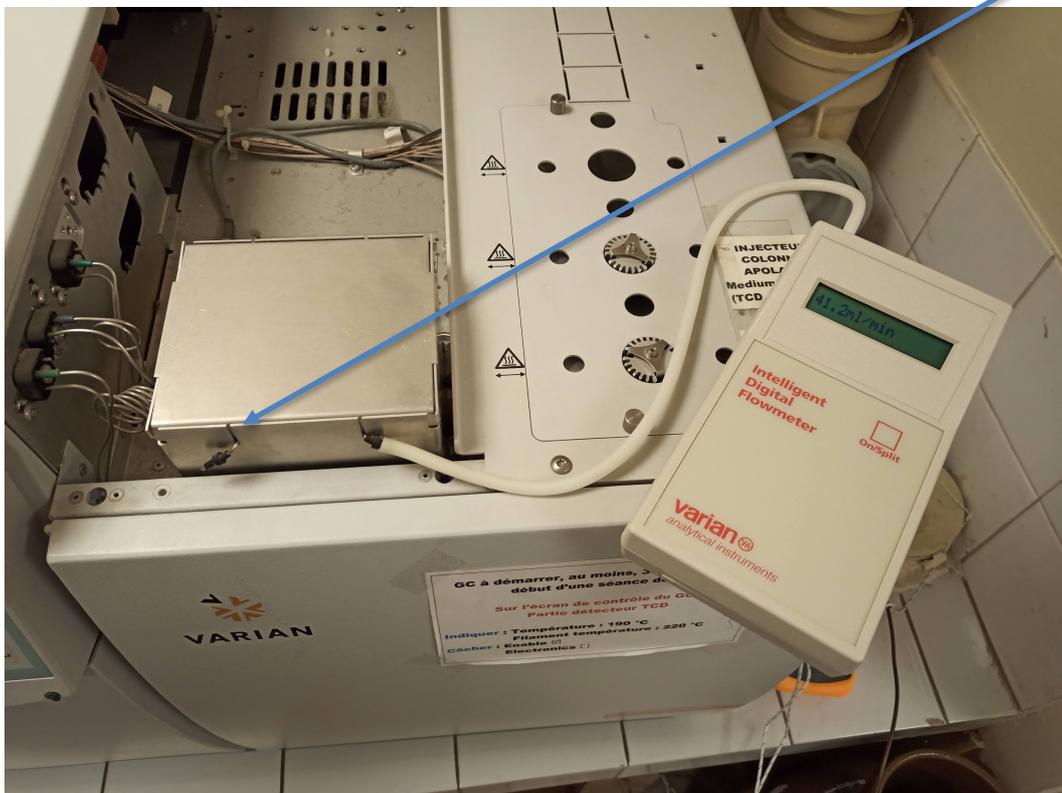
Remarque : le thermomètre électronique est conçu pour s'éteindre au bout de 5 min d'utilisation, lorsque cela arrive, l'allumer de nouveau et continuer la prise de mesure.

- ☞ Sur l'écran Oven de l'appareil, toujours, à l'aide du stylet, régler la température à 140°C.
- ☛ Attendre environ 1 minute que la stabilisation grossière de l'affichage s'effectue sur le thermomètre. Prendre les mesures de température toutes les 15 secondes pendant une minute.
- ☛ Puis, prendre les mesures de température toutes les minutes pendant 10 minutes.
- ☛ Une fois que toutes les mesures sont terminées, **ouvrir rapidement** la porte du four pour retirer la sonde filaire, puis la **refermer rapidement**. Éteindre et ranger le thermomètre électronique.
- ☞ Sur l'écran Oven de l'appareil, à l'aide du stylet, régler la température à 100°C, pour la suite...

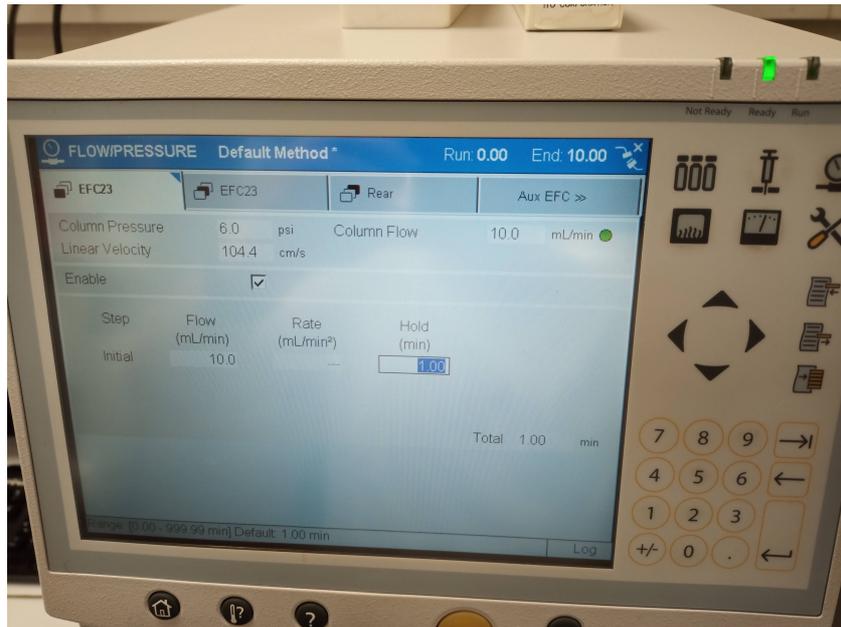
2. MESURE DES DEBITS EN SORTIE DE DETECTEUR

2.1. Contrôle du débit « référence »

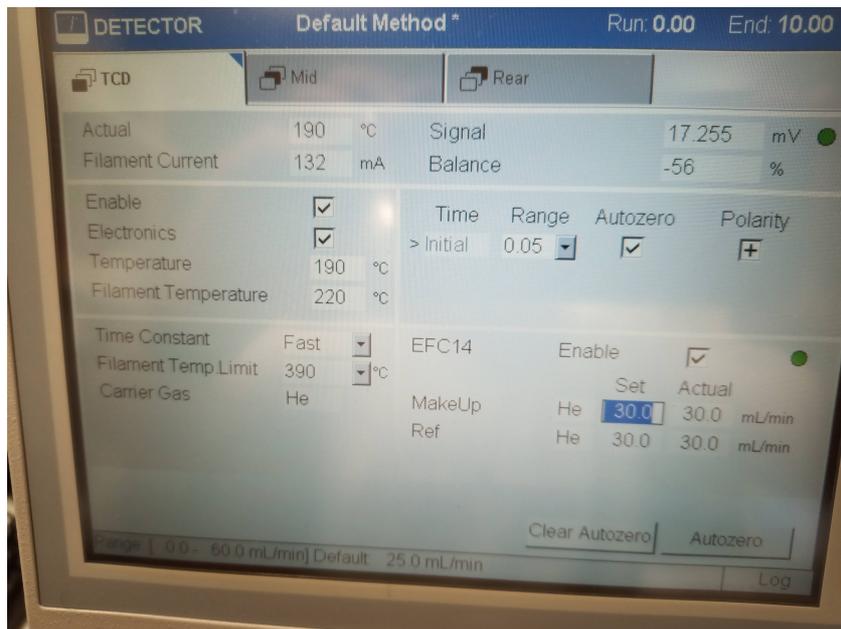
- ☛ Enfoncer le tube en caoutchouc du débitmètre électronique Varian sur la sortie « référence » (sortie gauche) du TCD, comme indiqué sur la photo :



☞ Sur l'écran de l'appareil, appuyer sur l'icône  **Flow/Pressure**. À l'aide du stylet, régler la valeur du débit initial à 10,0 mL/min sur l'EFS23 Front et MIDDLE.



☞ Sur l'écran de l'appareil, appuyer sur l'icône  **Detector**. À l'aide du stylet, régler la valeur des débits MakeUp et Ref à 30,0 mL/min.



☞ Allumer le débitmètre électronique et attendre environ 30 secondes que la stabilisation grossière de l'affichage s'effectue sur le débitmètre. Prendre les mesures de débit toutes les minutes pendant 10 minutes.

Remarque : le débitmètre électronique est conçu pour s'éteindre au bout de 10 min d'utilisation, lorsque cela arrive, l'allumer de nouveau et continuer la prise de mesure.

2.2. Contrôle du débit « make up »

☛ Enfoncer le tube en caoutchouc du débitmètre électronique Varian sur la sortie « make up » (sortie droite) du TCD.

☛ Attendre environ 30 secondes que la stabilisation grossière de l'affichage s'effectue sur le débitmètre. Prendre les mesures de débit toutes les minutes pendant 10 minutes.

3. PROCÉDURE D'ACQUISITION DE LA LIGNE DE BASE

3.1. Programmation d'une méthode en isotherme à 100°C

☛ Ouvrir le logiciel CompassCDS 3.0 (icône sur le bureau) :



Dans User Identification : Eleve

Le groupe : Labo TASS, et le projet GC450, cliquer sur OK,

☛ La création de méthode s'effectue en sélectionnant : **FILE / NEW / NEW METHOD**

Sélectionner dans system name : **GC450**

Cliquer sur NEXT

Donner un nom à la méthode : Isotherme100

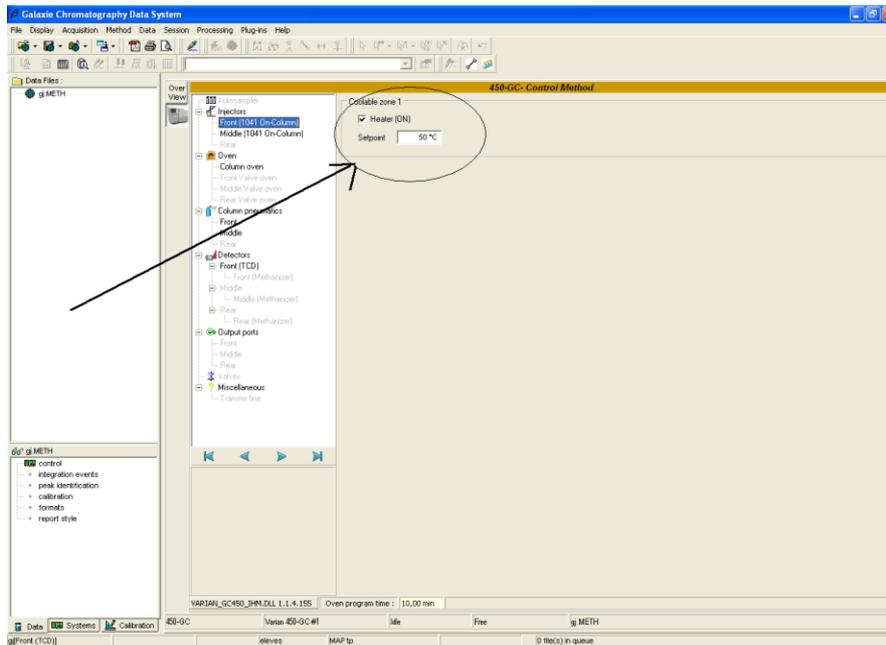
Cliquer sur OK

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

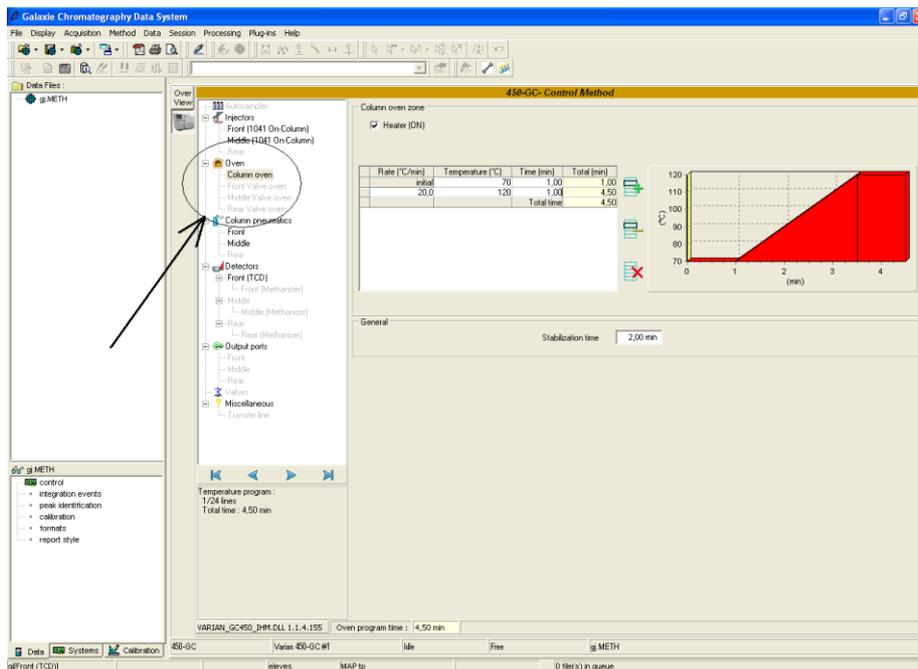
Pour rentrer LES VALEURS DES PARAMÈTRES, à savoir,
La TEMPÉRATURE des INJECTEURS,
La TEMPÉRATURE de travail du FOUR,
Le DÉBIT gazeux à travers les 2 COLONNES,
La TEMPÉRATURE du DÉTECTEUR et de son FILAMENT.

☞ Sur la fenêtre du milieu : cliquer successivement sur :

injectors : indiquer pour les 2 injecteurs **Front** et **Middle** 220°C



oven : isotherme 100°C pendant 10 minute.



Mettre **Stabilization time** à 0,5 min

Column pneumatics : front et middle à 20 mL/min et temps à 0 min

Rate (mL/min)	Flow (mL/min)	Time (min)	Total (min)
10.0	10.0	1.00	1.00
			Total time: 1.00

Detector : setpoint 200°C, filament temperature : 250°C ; Range : 0,05, Polarity : POSITIVE ; make-up flow 30 mL/min, reference flow 30 mL/min ;

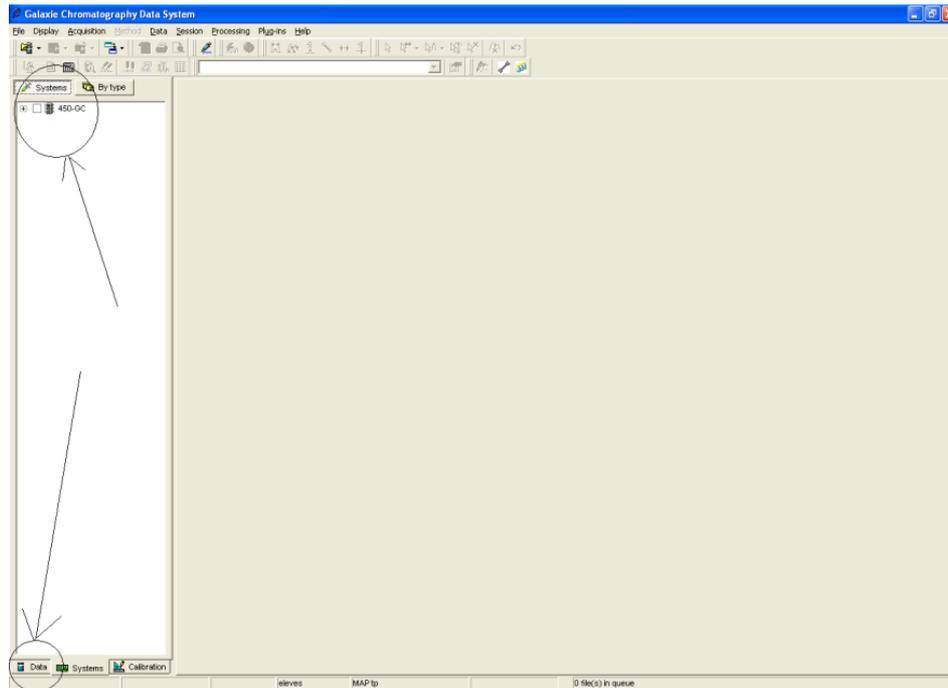
Q Pourquoi choisit-on une polarité "Positive" pour le détecteur ?



Remarque

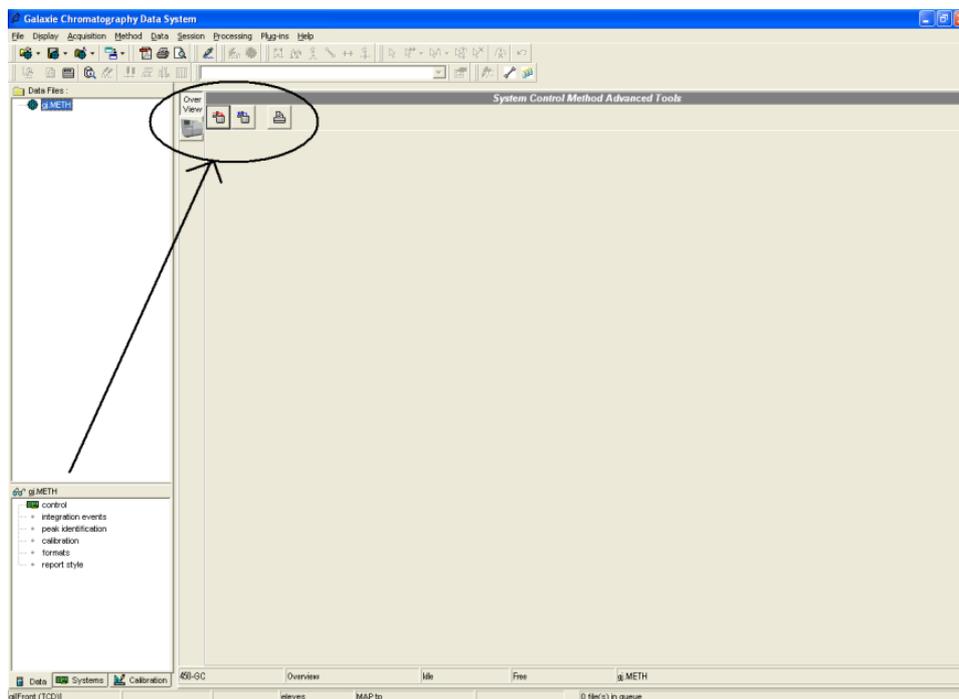
Vérifier que le GC soit sélectionné, et connecté au PC via le câble réseau ; pour cela cliquer dans l'onglet System (en bas à gauche), GC450 doit être coché dans la fenêtre en haut à gauche !

☞ Aller dans l'onglet **system** en bas à gauche et cocher en haut à gauche l'appareil utilisé GC450-HEADSPACE



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

☞ aller dans l'onglet **data** en bas à gauche, puis au milieu en haut cliquer sur overview



☞ Alors, on peut, grâce à **Overview** charger la méthode dans le GC ! pour cela cliquer sur Overview, puis sur l'icône juste à sa droite (flèche rouge du PC vers le GC).

L'appareil est prêt lorsque le voyant Ready (sur le devant de l'appareil) est vert.

3.2. Programmation d'une séquence d'analyse

☞ Pendant que l'appareil chauffe, préparer la séquence d'analyse, pour cela, cliquer dans FILE/NEW/NEW SEQUENCE

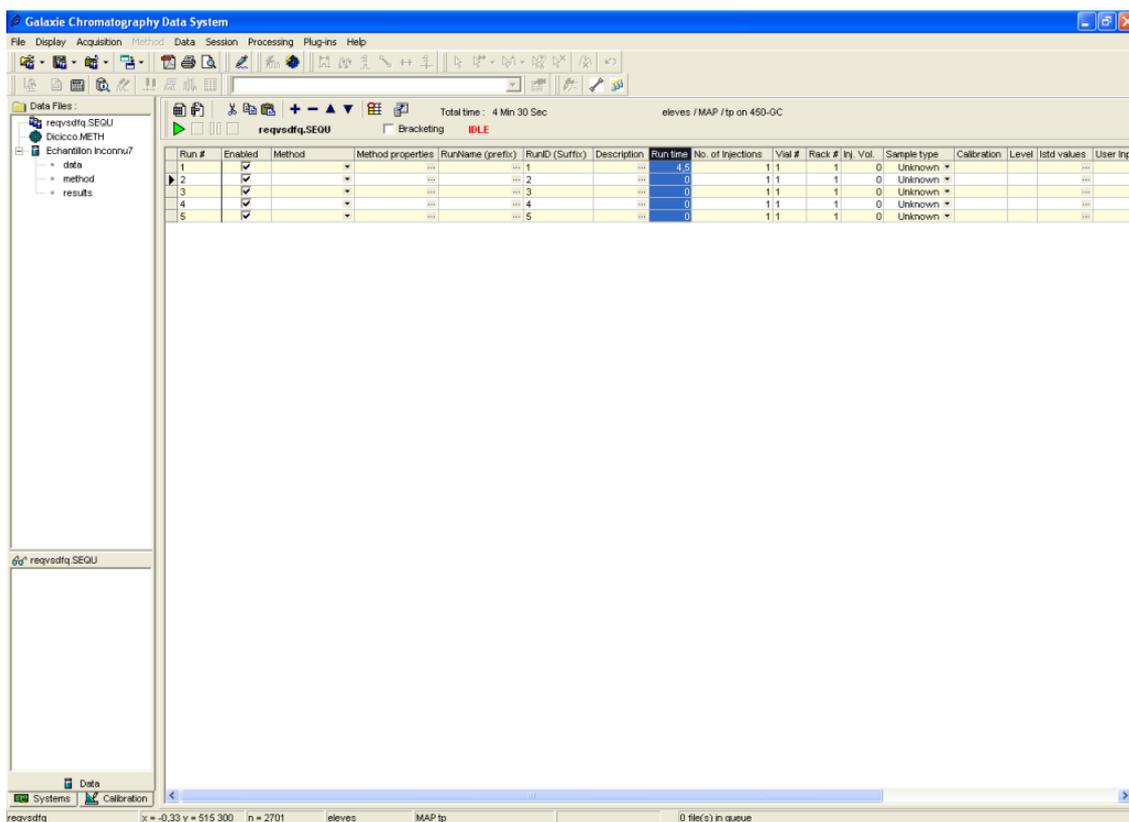
Sélectionner le nom du système ici GC450 puis NEXT

Entrer le nombre de séquences d'analyse dans number of lines : 11, 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



☞ Paramètres de la séquence d'analyse :

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

Method : nom de la méthode (précédente) pour l'analyse

Run Name : le nom de l'échantillon

Suffix : le numéro de l'analyse (de 1 à n)

Run Info : composition exacte de l'échantillon

Run Time : temps d'analyse 10

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

Choisir la méthode précédemment programmée.

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

Run #	Enabled	Method	Method properties	Run Name	Suffix	Run Info	Run Time	No. of Injections	Vial #	Rack #	Inj. Vol.
1	<input checked="" type="checkbox"/>				0		0		1 1		1
2	<input checked="" type="checkbox"/>				0		0		1 1		1
3	<input checked="" type="checkbox"/>				0		0		1 1		1
4	<input checked="" type="checkbox"/>				0		0		1 1		1
5	<input checked="" type="checkbox"/>				0		0		1 1		1
6	<input checked="" type="checkbox"/>				0		0		1 1		1
7	<input checked="" type="checkbox"/>				0		0		1 1		1

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

À remplir le plus exactement possible

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

Vérifier que dans l'onglet System, le GC soit connecté, si ce n'est pas le cas, cocher GC450

3.3. Obtention du chromatogramme correspondant à la ligne de base

☞ Cliquer sur l'icône (flèche verte) pour débuter une séquence d'analyse : start sequence
Aller dans l'onglet system et attendre l'affichage de « **Waiting for injection** » en bas au centre de la fenêtre.

☞ Appuyer rapidement sur l'injecteur de colonne apolaire :



☞ Une fois le « Run » terminé, 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 la méthode locale associée au fichier Chromatogram, puis cliquer sur « report style » et vérifier que c'est bien le fichier **ligne-de-base.STYL** qui est indiqué.

☞ Modifier le threshold au moins à 100 000, puis appuyer sur la touche F5 afin de supprimer toutes les intégrations.

Sauvegarder en cliquant dans **FILE / SAVE / SAVE CHROMATOGRAM**.

☞ **Imprimez** le chromatogramme « ligne de base », 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.

4. PROCÉDURE D'ACQUISITION DES CHROMATOGRAMMES POUR L'ETUDE DE LA REPETABILITE

4.1. Programmation du gradient de la méthode test

Reprendre la méthode précédente et changer la programmation du four comme suit :

Dans la petite fenêtre (en bas à gauche), cliquer sur **control** :

oven : isotherme 80°C pendant 1 minute. Rajouter une ligne et indiquer 20 °C/min jusqu'à 200 °C maintenu pendant 0 min.

Durée totale : 7 min.

detector : make up et reference : flow à 10 mL/min.

Dans la petite fenêtre, cliquer sur **integration events** : modifier le threshold à 100.

Dans la petite fenêtre, cliquer dans **report Style** (petite fenêtre en bas à gauche), aller chercher la feuille de style adéquate : **Test-Report.STYL**.

Cliquer dans **Peak Identification** et indiquer les noms des pics en fonction de leur temps de rétention.

Peak Name : C14 ; **RT** : 4,37 min ; **Peak Name** : C15 ; **RT** : 4,99 min ; **Peak Name** : C16 ; **RT** : 5,57 min.

Sauvegarder la méthode : **FILE/SAVE AS/SAVE METHOD AS**, en modifiant le nom selon GradientTest.

Aller dans la séquence pour décocher la 1^{ère} ligne et cocher la 2nd ligne. La remplir.

4.2. Injection de la solution test

Cliquer sur l'icône (flèche verte) pour débiter la seconde analyse.

Aller dans l'onglet system et attendre l'affichage de « **Waiting for injection** » en bas au centre de la fenêtre.



Remarque

On injecte seulement lorsque apparaît « **Waiting For injection** », en bas de la fenêtre du logiciel, et lorsque **Ready** apparaît sur le GC.

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

☞ Effectuer le prélèvement de **1 µL de solution** à l'aide la seringue de 10 µL :

☞ Injecter le contenu de la seringue dans la colonne apolaire, le départ de l'analyse s'effectue automatiquement.

Q Pourquoi utilise-t-on une colonne apolaire pour séparer les alcanes ?

☞ Lorsque le « run » est terminé, dans la séquence, décocher la seconde ligne, cocher la troisième et la remplir. Cliquer sur l'icône (flèche verte) pour débiter la seconde analyse. Aller dans l'onglet system et attendre l'affichage de « **Waiting for injection** » en bas au centre de la fenêtre. Injecter, à nouveau, le contenu de la seringue dans la colonne apolaire, le départ de l'analyse s'effectue automatiquement. Réitérer le processus 4 fois.

☞ Ouvrir les chromatogrammes un par un, File Open Chromatogram.

Sous le nom de fichier, dans results, supprimer les lignes Unknown en les sélectionnant une par une, puis clic droit Delete.

Les 6 chromatogrammes doivent être superposé à l'écran. Imprimer l'ensemble à l'aide du Work Space, pour cela :

Zoomer sur les trois pics d'intérêt.

Cliquer dans le "WorkSpace" (ou touche F3)

Le "WorkSpace" doit correspondre à l'écran qui est visualisé.

- Dans Print (de la fenêtre "WorkSpace"), choisir la feuille de style précédente.

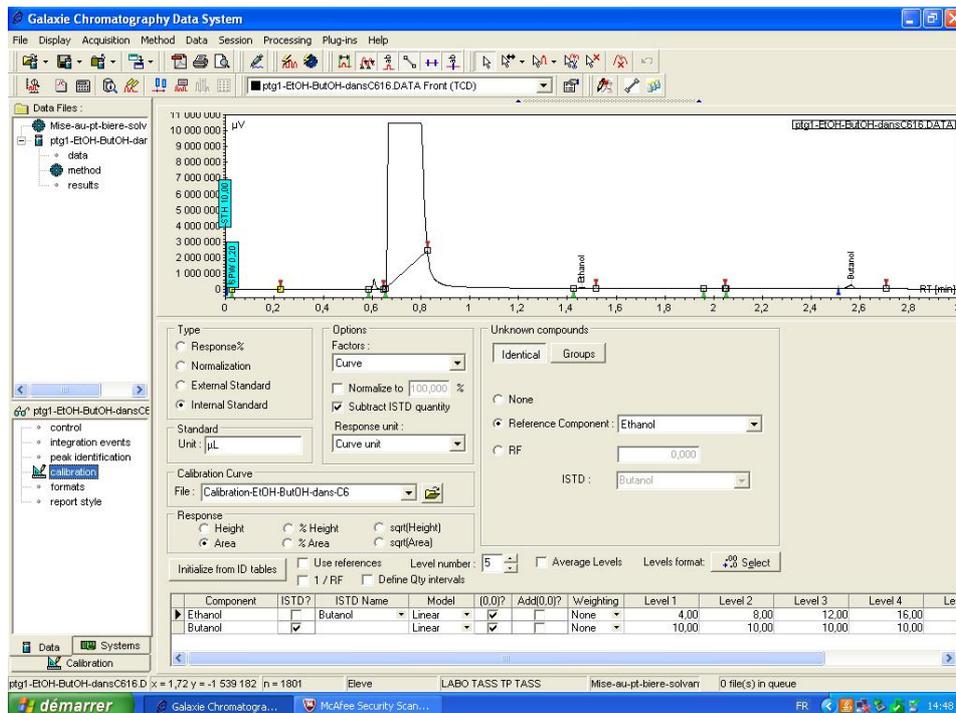
- Faire un Preview, avant d'imprimer les pages ! Si « Data not saved » est visible en travers des feuilles, fermer le WorkSpace, et sauvegarder le ou les fichiers qui ne le sont pas.

Réitérer le processus ci-dessus.

5. ETUDE DE LA LINEARITE DU DÉTECTEUR

5.1. Modification du gradient de la méthode Test

☞ Cliquer sur la méthode GradientTest et sélectionner Calibration en bas à gauche.



- ☛ Dans Type : cocher **External Standard**
- ☛ Cliquer dans File : indiquer un nom de fichier (dans lequel va se trouver vos courbes d'étalonnage) sous le format : **Courbes-datedujour-vosinitiales**
- ☛ Dans Standard Unit : %
- ☛ Dans Response unit : **Curve unit**
- ☛ Cliquer sur **Initialize from ID Tables**. les 3 lignes correspondantes à C14, C15 et C16 doivent apparaître.
- ☛ Côcher **Reference Component**
- ☛ **TRÈS IMPORTANT À REMPLIR : Dans la ligne correspondant à C14 : Indiquer dans level 1 : 5 ; level 2 : 10 ; level 3 : 20 et level 4 : 40 ; (ATTENTION : les " tirets " ne doivent plus apparaître). Faire de même pour les lignes correspondant à C15 et C16.**



Remarque

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

- ☛ Sélectionner report style en bas à gauche, pour modifier la feuille de style : ouvrir la feuille de style **Courbe-calibration-Test.Styl**.

Remarque importante : pour que la prise en compte du nom de la courbe de calibration ait bien lieu, il faut cliquer sur Reprocess du chromatogramme (icône "roue dentée"), puis Close.

On sauvegarde :

FILE / SAVE / SAVE METHOD

5.2. Programmation de la séquence d'analyse

☛ Paramètres de la séquence d'analyse :

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

Method : nom de la méthode optimisée pour l'analyse

Run Name : le nom de l'échantillon : **Etalon1**

Suffix : le numéro de l'analyse : en principe **8**.

Run Info : composition exacte de l'échantillon

Run Time : 7 min

Sample Type : Standard

Level : 1

☛ Répéter le processus pour chaque point de gamme. (Ne pas oublier de changer le **Run Name**, **Suffix**, **Sample Type** et **Level** à chaque fois !)

La méthode reste identique pendant le passage des autres points de gamme.

Remarque : Pour démarrer une séquence d'analyse, il ne faut pas oublier, à chaque fois, de décocher les analyses déjà effectuées.

☛ Rincer la seringue avec le solvant.

Lorsque la séquence est entièrement remplie, cocher la ligne utile, puis cliquer sur l'icône (flèche verte) pour débuter la séquence d'analyse : start sequence.

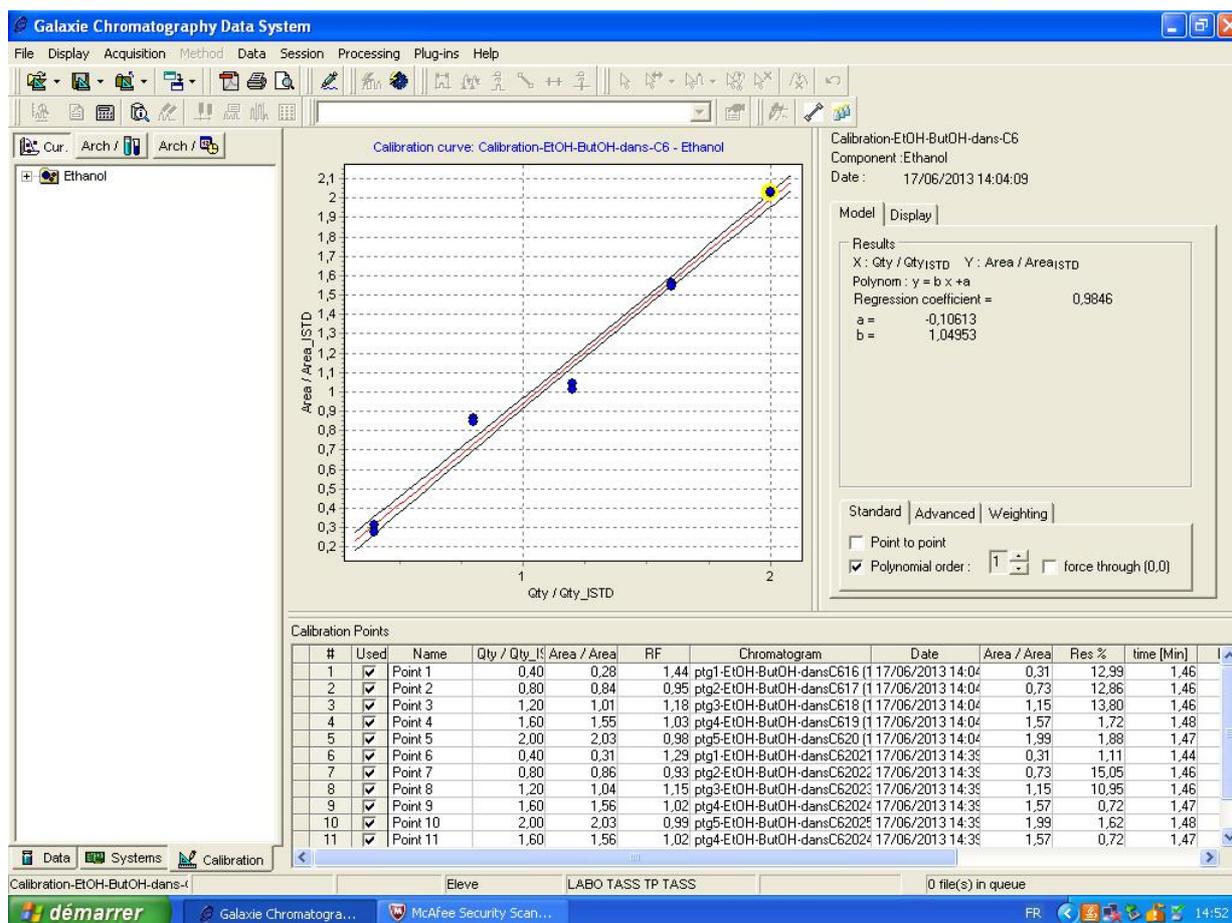
Aller dans l'onglet system et attendre l'affichage de « **Waiting for injection** » en bas au centre de la fenêtre.

☞ Injecter 1 µL de l'étalon 1.

☞ Lorsque le « run est terminé », réitérer les injections pour l'étalon 2, 3 et 4.

5.3. Obtention des 3 droites d'étalonnage

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



☞ **Imprimez les courbes de calibration.** Cliquer dans **Print Preview**, la fenêtre « Print calibration curve » apparaît, cliquer sur OK et **imprimer** si cela vous convient.

6. LANCEMENT DE LA MÉTHODE DE COUPURE DU GC

FILE / OPEN / OPEN METHOD : sélectionner la méthode de coupure du GC et,

☞ Dans la partie **Control** de la méthode, vérifier que les différents paramètres suivants correspondent à ce qui est indiqué ci-dessous :

- **Injecteurs** : OFF 50 °C ;
- **Température four** : ON Isotherme à 30 °C pendant 10 min ; (la stabilisation doit être à 0,5 min).
- **Débit** sur colonnes via EFC23 : 0,2 mL/min ;
- **Détecteur** : OFF 50 °C ;
- **Température du filament** : 50 °C.

☞ Sauvegarder la méthode (FILE / SAVE / SAVE METHOD), puis charger-là dans le GC.

C'EST SEULEMENT LORSQUE LE VOYANT VERT « READY » DU GC APPARAÎT, QUE VOUS POUVEZ ALORS ÉTEINDRE L'APPAREIL.

7. ÉLÉMENTS DE REPONSE AUX QUESTIONS

Q Pourquoi choisit-on une polarité "Positive" pour le détecteur ?

Le détecteur fonctionne par mesure différentielle. Deux colonnes sont connectées sur le détecteur, une colonne polaire en position "Front" et une colonne apolaire en position "Medium". Le constructeur indique que la colonne en position "Front" correspond à une polarité "Négative", et celle en position "Medium" à une polarité "Positive". C'est la raison pour laquelle, il nous faut choisir une polarité "Positive" pour la colonne apolaire, dans le cas contraire tous les pics seraient dirigés vers le bas !

Q Pourquoi utilise-t-on une colonne apolaire pour séparer les alcanes ?

Les alcanes à séparer sont apolaires, étant donné que ces composés appartiennent à une série de composés homologues, leur séparation s'effectuera selon le point d'ébullition des espèces à séparer :

$\theta_{\text{ébullition}}(\text{iso-octane}) = 99 \text{ } ^\circ\text{C}$;

$\theta_{\text{ébullition}}(\text{C14}) = 254 \text{ } ^\circ\text{C}$;

$\theta_{\text{ébullition}}(\text{C15}) = 271 \text{ } ^\circ\text{C}$;

$\theta_{\text{ébullition}}(\text{C16}) = 289 \text{ } ^\circ\text{C}$;

Le 1^{er} pic observé sera celui du solvant qui sature le détecteur, puis on trouvera dans l'ordre C14, C15 et C16.