

System Gold™ 126 168

HPLC instrument

Qu'est-ce que l'HPLC :

L'HPLC (High Performance Liquid Chromatography) est une technique de séparation analytique de molécules présentes dans un échantillon, ce qui permet leur analyse qualitative et quantitative. Dans cette technique, une phase mobile (éluant) et une phase stationnaire (colonne) permettent la séparation des molécules d'un échantillon en fonction de différents critères. Elle est utilisée par de nombreuses industries, comme la pharmacie et la bio-pharmacie, l'alimentation, la cosmétique...

En fonction de la colonne et de l'éluant choisi pour l'analyse, le type de chromatographie peut différer. Voici certains des différents types de chromatographies que nous pouvons réaliser :

- Chromatographie d'adsorption
- Chromatographie de partage (la plus utilisée):
 - En phase normale. Les phases mobile et stationnaire sont polaires
 - En phase inversée. La phase stationnaire est apolaire mais la phase mobile reste polaire
- Chromatographie par échange d'ions
- Chromatographie d'exclusion stérique (en fonction de la taille des molécules)

Il est important de se renseigner sur la compatibilité des solvants avec les colonnes avant de commencer une manipulation. Il est également nécessaires d'utiliser les bons éluants et colonnes en fonction des espèces pouvant être présentes dans un échantillon.

Description générale

Le chromatographe HPLC que nous utilisons (Beckman Coulter System Gold) est une chaîne composé de plusieurs sous blocs, chacun ayant une fonction qui lui est propre.



System GOLD HPLC

1) Pompe ou "Solvent Module" :

Le rôle de cette pompe est d'envoyer l'éluant (ou les éluants) sélectionné(s) à travers la chaîne de chromatographie. Elle est représentée ici par la "Solvent Module 126". Il permet un mélange de plusieurs solvants et permet également de réaliser des mélanges au préalable.



Pompe "Solvent Module 126"

Les flacons de solvant sont placés en haut de la colonne et sont reliés à des pompes A et B, qui permettent un mélange des solvants avec les rapports qui nous intéressent. Le flux débité par la pompe est ensuite envoyé directement vers le deuxième bloc du système HPLC, c'est-à-dire l'échantillonneur automatique (Autosampler). Tous les paramètres permettant de contrôler la pompe (débit, pressions minimale et maximale, choix des solvants pour les pompes A et B, rapport A:B) sont modifiés depuis l'ordinateur.

Si on ne veut pas envoyer notre éluant vers le reste du système HPLC (échantillonneur et détecteur), il suffit d'ouvrir la valve d'évacuation ("Drain Valve") : elle enverra tous l'éluant dans une bouteille "déchet".

2) Échantillonneur automatique ou "Autosampler 507e"

L'échantillonneur est détecté en tant que "Autosampler 507e" par le logiciel 32 Karat, même s'il se nomme en réalité "Autosampler 508".

Le rôle de l'échantillonneur est de prélever automatiquement les différents échantillons préparés et placés au préalable dans des flacons situés sur une plaque tournante. Chaque emplacement est numéroté, et à chaque nouveau programme, l'échantillonneur commencera son prélèvement au premier flacon. Les flacons utilisés sont de petites tailles et sont tous dotés d'un bouchon spécial doté d'un septum, ce qui permet à l'échantillonneur de le percer avec une aiguille.



Echantillonneur "Autosampler 507e"

L'échantillonneur est aussi doté d'une bouteille qui permet le rinçage de la seringue entre chaque injection : elle peut être remplie avec du méthanol ou un mélange d'eau et isopropanol. Elle est ensuite accrochée à la machine, tout en faisant passer le tube de nettoyage par l'ouverture se trouvant sur le bouchon.

Afin d'envoyer notre échantillon vers la colonne et vers le détecteur, l'Autosampler est doté d'un système spécial INJECT/LOAD, ce qui permet d'envoyer une petite quantité d'échantillon vers la colonne : tant que l'échantillon n'est pas envoyé vers la colonne, il est éliminé ou bien il reste à l'intérieur du système INJECT/LOAD, jusqu'à ce qu'il soit envoyé vers la colonne.

3) Colonnes

La colonne est directement rattachée au système INJECT/LOAD de l'échantillonneur et au détecteur. C'est elle qui permet la séparation des différentes molécules d'un échantillon, dont la présence sera ensuite confirmée par le détecteur. Il en existe différents types, chacune ayant des caractéristiques qui lui sont propres, et plus ou moins adaptés à certaines molécules et éluants.

La colonne est directement rattachée à la sortie 6 de l'échantillonneur, grâce à un tube en plastique fin, et est relié de la même manière au détecteur, vers une entrée qui consiste en un fin tube en métal. La colonne est vissée aux entrées et sorties afin d'éviter toute fuite possible en dehors du système.

4) Détecteur ou "Detector"

Le détecteur (Detector 168) se situe à la fin de la chaîne, et il permet de savoir à quel moment une molécule de l'échantillon sort de la colonne. Ce modèle de détecteur fonctionne à l'aide d'une lampe PDA, qui permet une analyse en 3 dimensions de notre échantillon (temps, longueur d'onde et absorbance), ce qui permet de limiter le nombre de répétitions de manipulation, contrairement à une analyse UV-vis en 2 dimensions, dans laquelle nous sommes limités à une longueur d'onde bien spécifique. Même si cette méthode est simple à utiliser, elle est limitée aux molécules qui absorbent les longueurs d'onde de l'UV ou du visible (complexes métalliques colorés, molécules organiques conjugués, cycles aromatiques...); pour notre détecteur, il s'agit des longueurs d'onde situées entre 190nm et 600nm. C'est pour cela qu'il est préférable d'utiliser comme éluant des composés n'absorbant pas en UV (eau, éthanol...).

Une fois que l'éluant passe à travers la colonne puis le détecteur, il est rejeté par la sortie par un "Back Pressure Regulator", afin d'empêcher l'éluant de sortir avec une pression trop importante à la fin du circuit.

Contrôle depuis l'ordinateur

Tous les différents blocs de la chaîne HPLC peuvent être contrôlés depuis l'ordinateur.

Ouverture de la chaîne

Aucune connaissance informatique n'est requise. L'ordinateur n'a pas de mot de passe.

Avant toute chose, il faut s'assurer que tous les éléments de la chaîne soient allumés. Leurs interrupteurs sont tous placés à l'arrière de chaque bloc (il faut allumer séparément les différents constituants du système HPLC).

Une fois sur le bureau de l'ordinateur, il suffit d'ouvrir le logiciel "32 Karat Software". Une fois lancé, il faut cliquer sur "Chaîne fonctionnelle", qui correspond à la chaîne qui nous intéresse (le

chargement pour l'ouverture de la chaîne peut-être long).

Contrôle de l'HPLC à l'aide de Direct Control :

Une fois la chaîne ouverte, on peut à présent ouvrir "Direct Control". Pour se faire, il faut cliquer sur "Control" puis sélectionner "Direct Control" dans le menu défilant. A ce moment, une nouvelle fenêtre apparaît. Elle permet le contrôle direct de différents réglages sur la pompe, l'échantillonneur et le détecteur.

- La pompe : il est possible de régler le débit de la pompe en appuyant sur Flow Rate, puis en entrant la valeur de débit qui nous intéresse, allant jusqu'à 10 mL/min, et en cochant la checkbox "Flow On". Une fois prêt à lancer la pompe, il suffit d'appuyer sur OK. Si on veut arrêter la pompe, il faut à nouveau cliquer sur Flow Rate, puis décocher la checkbox "Flow ON", et appuyer sur OK. Pour réaliser des mélanges de solvants (A + B), il faut cliquer sur %B, puis choisir le ratio en pourcentage de A et de B en rentrant une valeur pour B, et confirmer notre choix en appuyant sur OK. Il est possible de choisir lequel des 4 solvants possibles les pompes A ou B vont utiliser en cliquant sur les flèches colorées afin qu'elles indiquent la couleur/le chiffre qui nous intéresse pour cette pompe. Enfin, on peut sélectionner les pressions minimales et maximales pour les pompes A et B en cliquant sur les icônes de pompes correspondant à A ou à B, puis en choisissant les valeurs qui nous intéressent en kPSI ou en MPa ; on peut confirmer notre choix en cliquant OK.
- Le détecteur : on peut allumer la lampe en cliquant sur l'icône ressemblant à une lampe et en sélectionnant ON ou OFF. On peut également la calibrer en appuyant sur "Calibrate", puis en cliquant sur ON; il est également possible de choisir les longueurs d'onde de travail qui nous intéressent, en sélectionnant "Ch1"/"Ch2", puis en entrant les valeurs voulues.

Créer sa propre méthode

Le logiciel 32 Karat nous permet d'automatiser le processus d'échantillonnage en créant nos propres méthodes. Pour se faire, il faut se rendre dans le menu déroulant "Files", puis sélectionner "Method" et "New", ce qui ouvrira une nouvelle fenêtre. Depuis cette fenêtre, on peut influencer certains paramètres sur la pompe, le détecteur ou encore l'échantillonneur, et même programmer des temps pour notre méthode.

Dans l'onglet Pumps, on peut configurer le contenu de chaque solvant (A1, A2, B1...), influencer le débit et sa durée, changer les valeurs de pression minimale ainsi que maximale et les mélanges en pourcentage entre A et B.

Dans l'onglet Detector, on peut choisir la plage de longueur d'onde sur laquelle les mesures seront réalisées, ainsi que l'intervalle de scan (2nm par défaut) si l'on veut réaliser des mesures de données en 3D. Si l'on veut réaliser une analyse 2D (intensité + temps), il suffit de décocher la checkbox 3D Data, puis de régler les paramètres dans la partie Channel Definition.

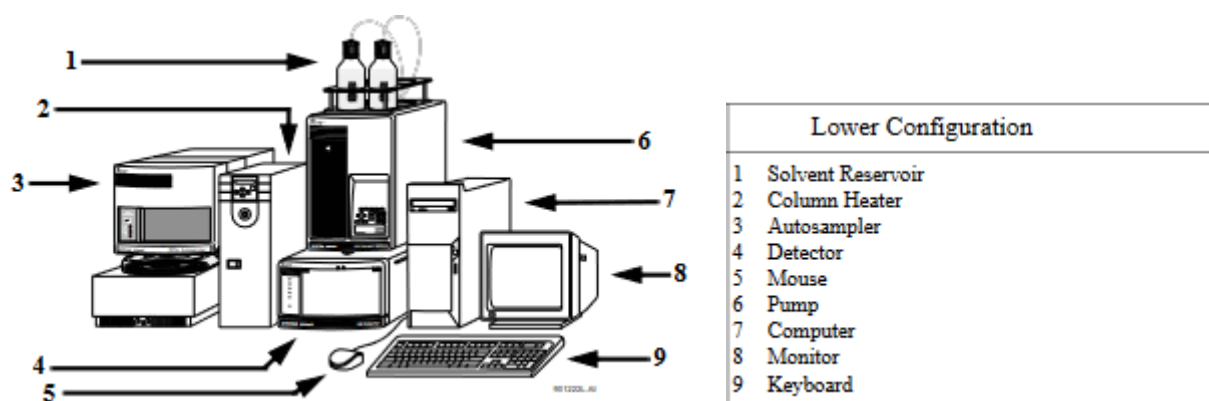
Dans l'onglet Injector, on peut régler l'échantillonneur afin qu'il nettoie l'aiguille entre chaque injection, qu'il permette ou non le uL Pickup, ou qu'il réalise le Tray Cooling, qui permet de garder les échantillon à des certaines températures (on peut également influencer d'autres paramètres, comme le volume de nettoyage "Wash Volume").

L'onglet Time Program nous permet de programmer directement en fonction du temps les actions que les différents blocs de l'HPLC devront réaliser à travers le temps.

Reglages de la pompe :

Une pompe mal réglée peut amener des bulles d'air dans le système, ce qui risque de fausser nos résultats ; c'est pour cela qu'il est primordial de la régler correctement.

- Ouvrir la valve de drain en tournant le robinet dans le sens inverse des aiguilles d'une montre.
- Insérer une seringue dans le port qui nous intéresse (A ou B), tourner I puis retirer le contenu



A) LES UNITÉS

1. L'ordinateur : application 32 KARAT SOFTWARE

NB : Aucune connaissance informatique n'est requise. L'ordinateur n'a pas de mot de passe.

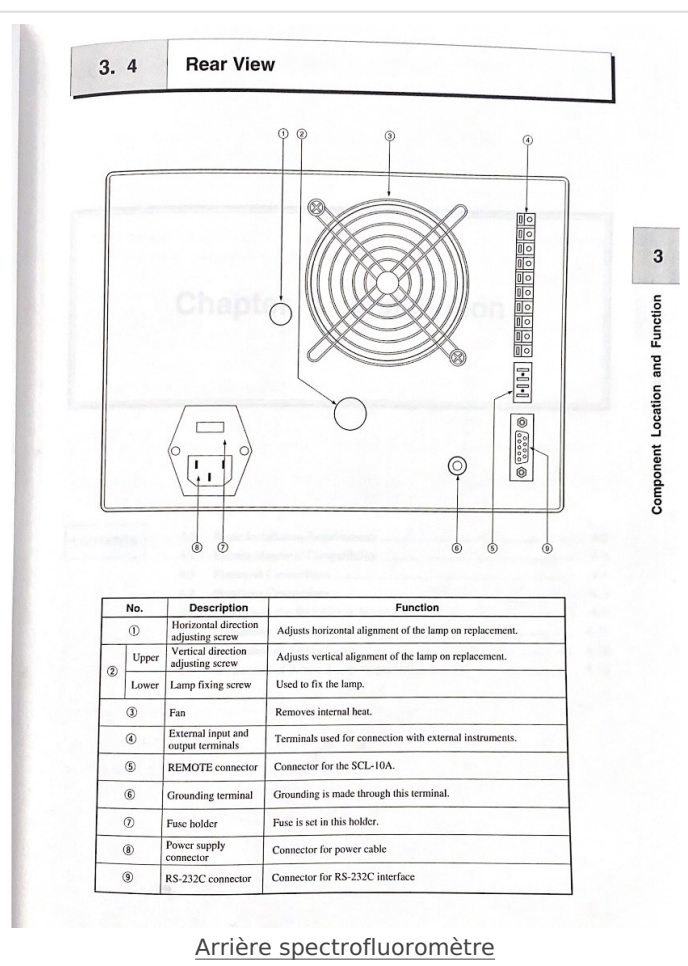
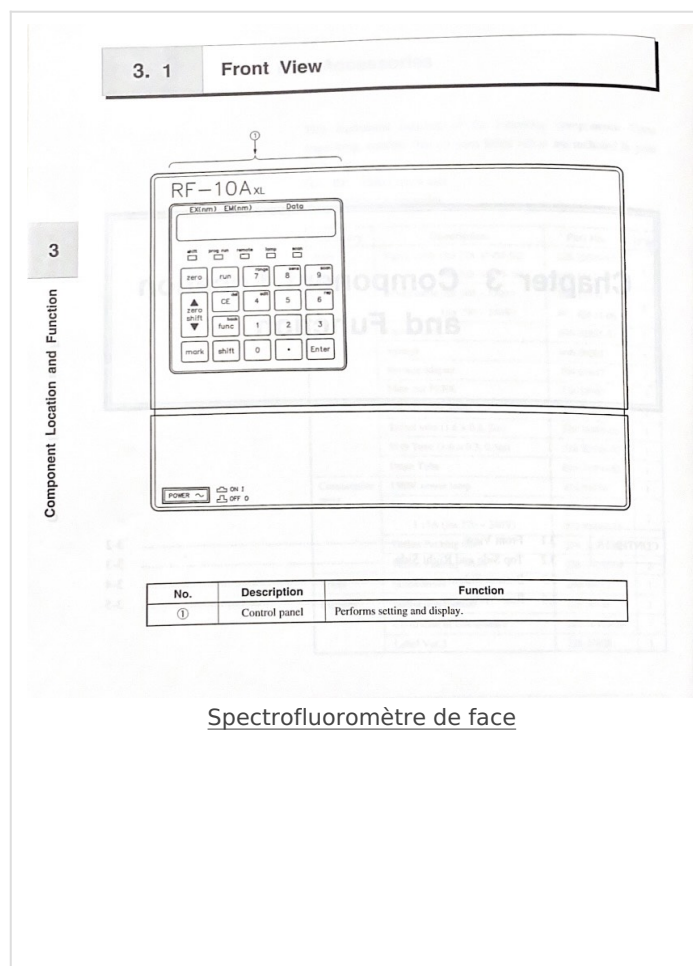


Le logiciel Gold, apporte 3 niveaux d'interaction et de contrôle à la chromatographie haute performance.

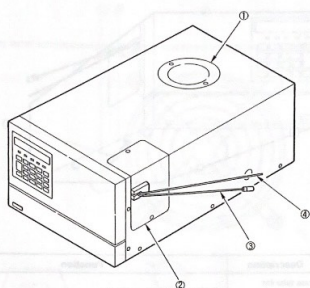
1. **Gestionnaire pour 1 ou 2 systèmes HPLC**, repérés SYSTEM1 (carte PCI1) et SYSTEM2 (carte PCI2) , chaque système pouvant contenir jusqu'à 8 modules (pompes, détecteurs, interfaces etc...). Chaque système peut acquérir le résultat à deux longueurs d'onde, ces deux voies étant appelées CHANNEL A et CHANNEL B. En contrôle direct (direct control), ou en automatique au travers de méthodes (edit method), l'ordinateur coordonne le fonctionnement de chacun des modules HPLC. Bien qu'il soit prévu pour un fonctionnement avec des éléments BECKMAN, il peut être connecté à d'autres éléments au travers d'une interface (modèle 405) permettant des contrôles par des contacts de relais et/ou le traitement du signal d'un détecteur.
2. **Collecte les chromatogrammes des analyses effectuées**, les analyse, les transcrit en un rapport final, et/ou les stock, permettant ainsi un retraitement ultérieur. La calibration et les résultats des échantillons analysés sont réalisés facilement, le rapport final apparaît dans le format et avec les informations qui sont le plus appropriées.
3. **Retrait des résultats** (outil très puissant). Chaque donnée étant stockée en mémoire (sur disque dur ou sur disquette), il permet de réanalyser tout échantillon désiré pour

corriger des erreurs ou déterminer l'effet de calibrations différentes. La puissance des analyses chromatographiques et des fonctions de balayage en longueurs d'onde permet une étude approfondie des résultats obtenus, non possible jusqu'à présent.

3. Spectrofluorometric detector : RF-10 Axl



3. 2 Top Side and Right Side



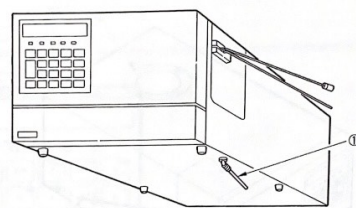
| No. | Description | Function |
|-----|----------------------------|--|
| ① | Light source chamber cover | Remove this cover when replacing the lamp. |
| ② | Cell cover | Remove this cover when replacing the cell. |
| ③ | Cell inlet tubing | Marked with blue cover tubing. |
| ④ | Cell outlet tubing | |

3

Component Location and Function

Côtés spectrofluoromètre

3. 3 Bottom Side



| No. | Description | Function |
|-----|--------------------------------|-------------------------------|
| ① | Drain tube for solvent leakage | Drain tube is connected here. |

3

Component Location and Function

Dessous spectrofluoromètre

Liens

1. Manuel HPLC+software

https://www.artisanng.com/info/Beckman_Coulter_Model_166_Manual.pdf dispo en papier

2. Manuel Foxy 200 https://archive-resources.coleparmer.com/Manual_pdfs/01471-xx.pdf
dispo en papier

3. Manuel Sedex Model 80

https://www.knauer.net/Dokumente/detectors/third_party/manuals/sedere_elsd_80_manual_rev3.0_release.pdf dispo en papier

Autre manuel papier dispo :

1. Installation & Maintenance Guide HPLC

2. P/ACE MDQ Basic Training Workbook

Un forum de FAQ <https://www.labwrench.com/forums/equipment/155/beckman-coulter-system-gold>

Revision #18

Created 10 January 2024 13:33:09 by Benarbia Enora

Updated 19 September 2024 12:15:17 by Zouhir Fatima-Zohra