

Systeme CPL Agilent 1290 Infinity

Manuel du systeme et guide de
reference rapide



Agilent Technologies

Avertissements

© Agilent Technologies, Inc. 2009-2011, 2012

Conformément aux lois nationales et internationales relatives à la propriété intellectuelle, toute reproduction totale ou partielle de ce manuel sous quelque forme que ce soit, par quelque moyen que ce soit, voie électronique ou traduction, est interdite sans le consentement écrit préalable de la société Agilent Technologies, Inc.

Référence du manuel

G4220-93301

Edition

05/2012

Imprimé en Allemagne

Agilent Technologies
Hewlett-Packard-Strasse 8
76337 Waldbronn

Ce produit peut être utilisé en tant que composant d'un dispositif de diagnostic in vitro, si ce dernier est enregistré auprès des autorités compétentes et est conforme aux directives correspondantes. Faute de quoi, il est exclusivement réservé à un usage général en laboratoire.

Garantie

Les informations contenues dans ce document sont fournies "en l'état" et pourront faire l'objet de modifications sans préavis dans les éditions ultérieures. Dans les limites de la législation en vigueur, Agilent exclut en outre toute garantie, expresse ou implicite, quant à ce manuel et aux informations contenues dans ce dernier, notamment, mais sans s'y restreindre, toute garantie marchande et aptitude à un but particulier. En aucun cas, Agilent ne peut être tenu responsable des éventuelles erreurs contenues dans ce document, ni des dommages directs ou indirects pouvant découler des informations contenues dans ce document, de la fourniture, de l'usage ou de la qualité de ce document. Si Agilent et l'utilisateur ont souscrit un contrat écrit distinct dont les conditions de garantie relatives au produit couvert par ce document entrent en conflit avec les présentes conditions, les conditions de garantie du contrat distinct se substituent aux conditions stipulées dans le présent document.

Licences technologiques

Le matériel et le logiciel décrits dans ce document sont protégés par un accord de licence et leur utilisation ou reproduction sont soumises aux termes et conditions de ladite licence.

Mentions de sécurité

ATTENTION

Une mention **ATTENTION** signale un danger. Si la procédure, le procédé ou les consignes ne sont pas exécutés correctement, le produit risque d'être endommagé ou les données d'être perdues. En présence d'une mention **ATTENTION**, vous devez continuer votre opération uniquement si vous avez totalement assimilé et respecté les conditions mentionnées.

AVERTISSEMENT

Une mention **AVERTISSEMENT** signale un danger. Si la procédure, le procédé ou les consignes ne sont pas exécutés correctement, les personnes risquent de s'exposer à des lésions graves. En présence d'une mention **AVERTISSEMENT**, vous devez continuer votre opération uniquement si vous avez totalement assimilé et respecté les conditions mentionnées.

Contenu de ce manuel

Ce manuel décrit le système CPL Agilent 1290 Infinity.

1 Introduction à la chromatographie en phase liquide à ultra haute performance

Ce chapitre présente le système CPL Agilent 1290 Infinity et ses principes de fonctionnement.

2 Le système CPL Agilent 1290 Infinity - Description du produit

Ce chapitre présente les caractéristiques du système CPL 1290 Infinity.

3 Optimisation du système CPL Agilent 1290 Infinity

Ce chapitre traite de l'application des notions théoriques et de l'utilisation des caractéristiques du système CPL pour développer des séparations optimisées.

4 Configuration et installation du système

Ce chapitre décrit l'installation du logiciel, les configurations de pile et la préparation du système avant fonctionnement.

5 Guide de démarrage rapide

Ce chapitre traite de l'acquisition de données et de l'analyse des données avec le système CPL 1290 Infinity.

6 Annexe

Ce chapitre apporte des informations complémentaires concernant la sécurité, les aspects juridiques, l'Internet et la configuration d'une méthode.

Sommaire

- 1 Introduction à la chromatographie en phase liquide à ultra haute performance 7**
 - Théorie de l'utilisation de particules plus fines pour la chromatographie en phase liquide 8
 - Avantages des colonnes contenant des particules sub-2-microniques 15
 - Échauffement par frottement 19

- 2 Le système CPL Agilent 1290 Infinity - Description du produit 23**
 - Nouvelles fonctionnalités du système CPL Agilent 1290 Infinity 24
 - Composants du système 28

- 3 Optimisation du système CPL Agilent 1290 Infinity 41**
 - Volume de retard et volume hors colonne 42
 - Configuration d'un volume de retard optimal 44
 - Comment augmenter le volume d'injection 53
 - Comment améliorer la capacité d'analyse 55
 - Comment améliorer la résolution 58
 - Comment améliorer la sensibilité 61
 - Comment minimiser le transfert 70
 - Comment empêcher les obstructions de colonne 72

- 4 Configuration et installation du système 75**
 - Installation du logiciel 76
 - Installation du module 78

- 5 Guide de démarrage rapide 95**
 - À propos du guide de démarrage rapide 96
 - Préparation du système 97
 - Acquisition de données dans la vue Contrôle de méthode et d'analyse 103
 - Analyse des données 111

6 Annexe 117

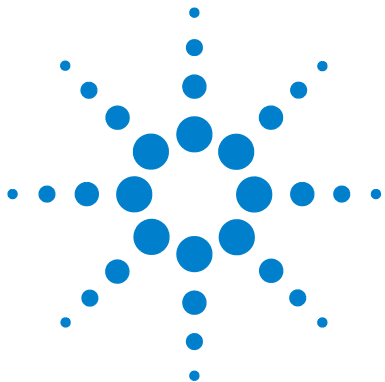
Informations relatives à la sécurité 118

Informations sur les solvants 121

Agilent Technologies sur Internet 122

Configuration d'une méthode à l'aide de la fonction Edit Entire Method 123

Sommaire



1 Introduction à la chromatographie en phase liquide à ultra haute performance

Théorie de l'utilisation de particules plus fines pour la chromatographie en phase liquide 8

Avantages des colonnes contenant des particules sub-2-microniques 15

Échauffement par frottement 19

Ce chapitre présente le système CPL Agilent 1290 Infinity et ses principes de fonctionnement.



Théorie de l'utilisation de particules plus fines pour la chromatographie en phase liquide

Introduction

En 2003, Agilent a commercialisé ses premières colonnes en silice poreuse avec des particules de 1,8 μm . Ces colonnes étaient les premières d'une catégorie de colonnes appelées par la suite les colonnes STM ou « sub-2-microniques » (inférieures à deux microns). Ces matériaux de remplissage ont été introduits dans des colonnes ZORBAX RRHT capables de résister à une pression de 600 bar lorsque le système de résolution rapide CPL Agilent série 1200 a été lancé en 2006. En 2009, la gamme a été étendue pour inclure les colonnes RRHD pouvant être utilisées couramment à une pression de 1200 bar lors de la commercialisation du système CPL Agilent 1290 Infinity dont la plage de fonctionnement comprend des pressions allant jusqu'à 1200 bar et des débits allant jusqu'à 5 ml/min.

Ces deux colonnes à particules d'une taille sub-2-micronique (1,8 μm) peuvent être utilisées pour atteindre deux objectifs principaux :

1 Une chromatographie plus rapide

Des colonnes courtes contenant des particules sub-2-microniques permettent de réduire de manière dramatique la durée de l'analyse en augmentant le débit sans toutefois perdre au niveau de la performance.

2 Une résolution plus élevée

Des colonnes longues contenant des particules sub-2-microniques offrent une meilleure efficacité et donc la résolution plus élevée nécessaire pour la séparation d'échantillons complexes. La plus faible dispersion aboutit aussi à l'obtention de pics d'analyte moins dilués et donc une sensibilité améliorée, notamment pour les analyses CPL/MS.

La pression requise pour faire avancer le solvant à travers une colonne contenant des particules STM s'accroît rapidement lorsque le débit est augmenté dans le but d'accélérer une séparation, et très rapidement lorsque la longueur de la colonne est augmentée dans le but d'améliorer la résolution. Ainsi, le développement de systèmes UHPLC a accompagné la commercialisation des colonnes STM. Ces systèmes ultra-HPLC permettent d'appliquer des pressions supérieures à 400 bar, valeur qui représentait un seuil non franchi depuis les

débuts de la technique HPLC. Les systèmes CPL à ultra haute performance (ou ultra haute pression) ont également des faibles volumes de retard et des dispositifs d'acquisition des données rapides nécessaires pour analyser les pics étroits générés par la chromatographie rapide ou à résolution élevée. Le système CPL Agilent 1290 Infinity constitue un jalon en UHPLC car il s'agit du premier système qui englobe entièrement et améliore les plages de performance disparates de tous les systèmes UHPLC disponibles jusqu'à ce jour sur le marché.

La théorie

L'efficacité de séparation en HPLC peut être décrite par l'équation de van Deemter (Figure 1, page 10). Cette équation découle du modèle de hauteur de plateau utilisé pour mesurer la dispersion des analytes lors de leur progression à l'intérieur de la colonne. H est la hauteur équivalente à un plateau théorique (appelée parfois HETP), d_p est la taille des particules de remplissage de la colonne, u_0 est la vitesse linéaire de la phase mobile et A , B et C sont des constantes associées aux différentes forces de dispersion. La constante A correspond à la diffusion turbulente ou les multiples trajets d'écoulement à travers la colonne ; B correspond à la diffusion moléculaire (longitudinale) le long de l'axe de la colonne ; C correspond au transfert de masse de l'analyte entre les phases mobile et stationnaire. La séparation est la plus efficace lorsque H atteint sa valeur minimale. Les effets de chacune des variables et de l'équation combinée sont illustrés dans la Figure 1, page 10 où la hauteur du plateau est fonction du débit linéaire à travers la colonne. Ce type de graphique est connu sous le nom de Courbe de van Deemter et est utilisé pour déterminer le débit optimal (au point le plus bas de la courbe) permettant d'obtenir la meilleure efficacité de séparation d'une colonne.

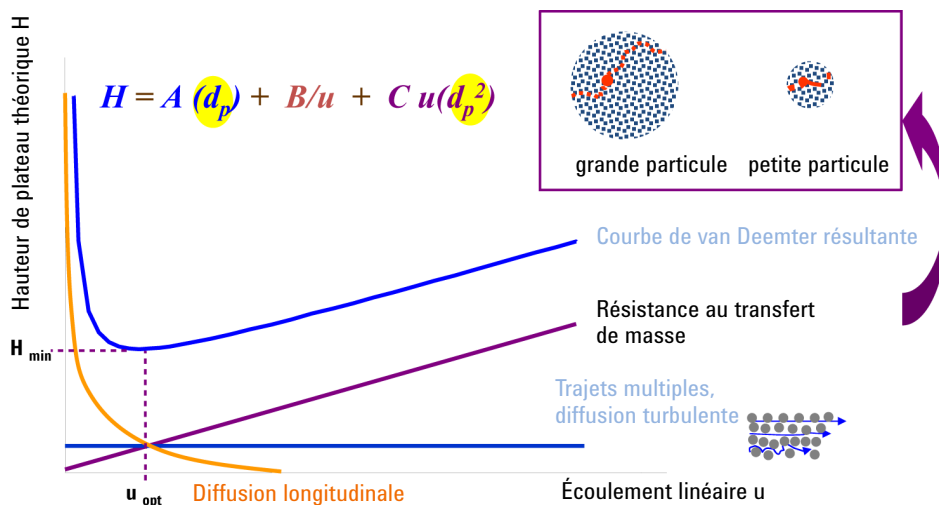


Figure 1 Courbe de van Deemter hypothétique

Les courbes de van Deemter de la Figure 2, page 11 montrent comment la réduction de la taille des particules améliore l'efficacité. Le fait de passer d'une taille de particules habituelle telle que 3,5 μm ou 5,0 μm à des particules de 1,8 μm permet d'améliorer les performances de façon significative. Les valeurs de hauteur du plateau sont deux à trois fois plus petites avec des particules de 1,8 μm , et ce avec une efficacité proportionnellement plus élevée. Cela permet l'utilisation d'une colonne plus courte sans perdre en résolution ; ainsi la durée de l'analyse est également divisée par un facteur deux à trois. L'augmentation de l'efficacité est en grande partie due au nombre réduit de trajets d'écoulement différents en raison de la taille réduite des particules : la valeur de la constante A est plus petite (diffusion turbulente). De surcroît, une taille de particules plus petite signifie que les durées de transfert de masse sont plus courtes, diminuant ainsi la valeur de la constante C. L'effet global est une réduction importante de la perte de l'efficacité lorsque le débit augmente (la pente de la courbe est moins forte). Cela signifie que l'utilisation de particules plus fines permet d'accélérer encore la séparation en augmentant le débit sans toutefois perdre significativement en efficacité.

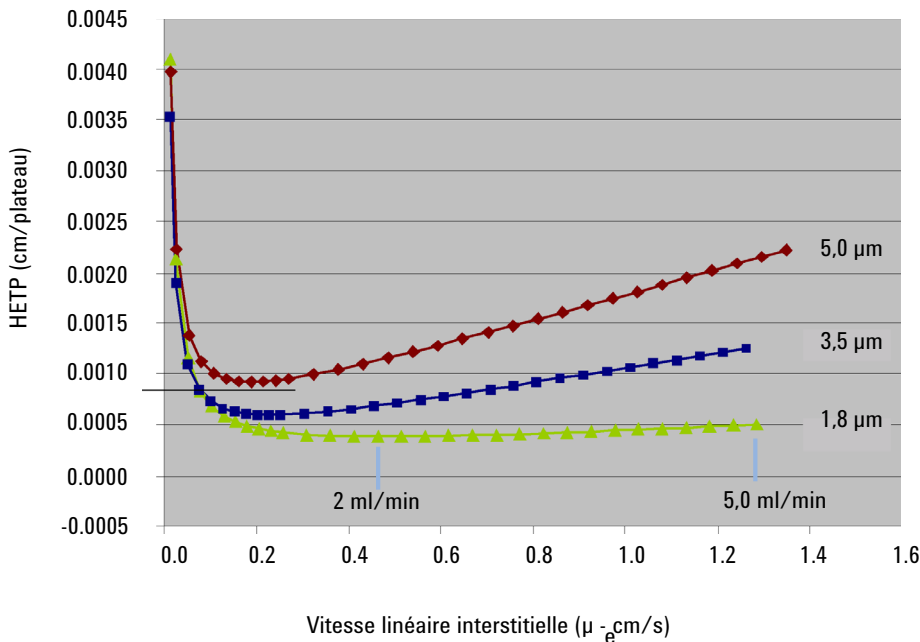


Figure 2 Courbe de van Deemter pour des tailles de particules différentes

1 Introduction à la chromatographie en phase liquide à ultra haute performance

Théorie de l'utilisation de particules plus fines pour la chromatographie en phase liquide

La séparation chromatographique peut être optimisée sur la base des caractéristiques physiques de la colonne HPLC telles que la taille des particules, le diamètre des pores, la morphologie des particules, la longueur et le diamètre de la colonne, la vitesse du solvant et la température. De surcroît, la thermodynamique d'une séparation chromatographique peut être prise en compte afin de modifier les propriétés du soluté et des phases mobile et stationnaire (pourcentage de solvant organique, force ionique, pH) pour obtenir le temps de rétention le plus court possible et la sélectivité la plus élevée.

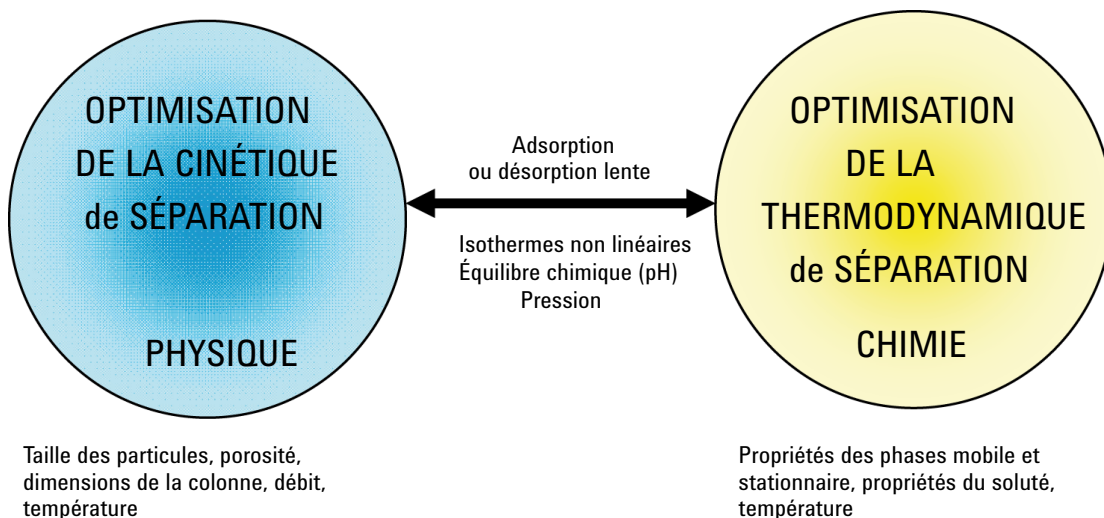


Figure 3 Sélection des conditions de HPLC optimales

La résolution peut être décrite dépendant de trois paramètres :

- l'efficacité ou les plateaux théoriques (N) de la colonne,
- la sélectivité (α),
- le facteur de rétention (k).

D'après l'équation de la résolution (Figure 4, page 13), la sélectivité est le paramètre ayant l'influence la plus forte sur la résolution (Figure 5, page 13). Cela signifie qu'il est indispensable de choisir des propriétés de phase mobile et de phase stationnaire ainsi qu'une température adéquates pour réussir la séparation.

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \left[\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right] \cdot \left[\frac{k_2'}{k_2' + 1} \right]$$

Figure 4 Équation de résolution

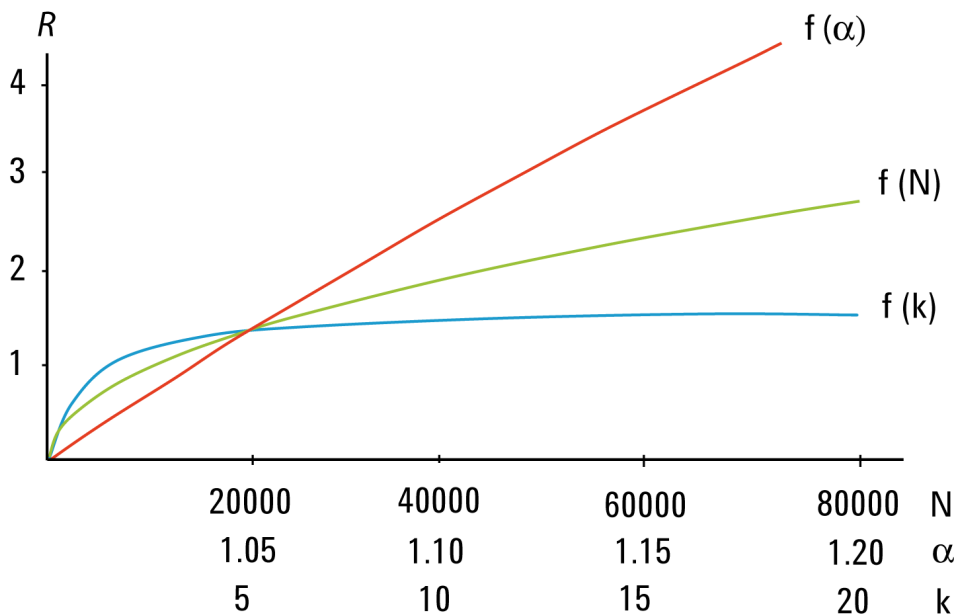


Figure 5 Effet du nombre de plateaux, du facteur de séparation et du facteur de rétention sur R

Que la méthode de séparation à résolution rapide soit nouvelle ou simplement transférée à partir d'un protocole conventionnel existant, il est clair qu'il est nécessaire de disposer d'une gamme étendue de phases stationnaires aux propriétés différentes avec de nombreux formats de colonne.

Agilent proposait déjà une gamme de plus de 140 colonnes 1,8 µm ZORBAX à résolution rapide et haut débit (RRHT) (14 niveaux de sélectivité, longueur de 15 à 150 mm et diamètre interne de 2,1, 3,0 et 4,6 mm). À présent, avec le lancement du système CPL Agilent 1290 Infinity, la gamme de produits STM est étendue pour inclure les colonnes à résolution rapide et haute définition (RRHD) résistants à 1200 bar. Cela permet de sélectionner la phase stationnaire optimale pour atteindre une sélectivité maximale. La résolution, le débit et la durée d'analyse peuvent être optimisés en choisissant une longueur et un

1 Introduction à la chromatographie en phase liquide à ultra haute performance

Théorie de l'utilisation de particules plus fines pour la chromatographie en phase liquide

diamètre de colonne appropriés rendant l'utilisation des colonnes STM encore plus facile qu'avant.

De nombreux laboratoires réalisent un processus de sélection approfondi pour définir la meilleure combinaison de phase stationnaire, de phase mobile et la température optimale pour leurs séparations chromatographiques. Avec les systèmes de série 1200 et CPL 1290 Infinity, Agilent propose des solutions de développement de méthodes. Ces solutions permettent d'automatiser l'intégralité de ce processus de sélection très long, ce qui facilite et rend plus fiable le développement ou le transfert de méthodes chromatographiques.

Les colonnes ZORBAX RRHD et RRHT de 1,8 μm ont les mêmes propriétés chimiques que les colonnes ZORBAX avec des particules de 3,5 et 5 μm . En conséquence, pour toute phase ZORBAX donnée, la sélectivité des particules de 5,0, 3,5 et 1,8 μm est identique, permettant ainsi un transfert de méthodes bidirectionnel aisé, rapide et sécurisé entre la CPL conventionnelle, l'UHPLC et la CPL préparative.

Avantages des colonnes contenant des particules sub-2-microniques

Une chromatographie plus rapide

Le fait d'avoir des durées d'analyse plus courtes présente plusieurs avantages. La capacité d'analyse des laboratoires utilisant des systèmes à haut débit s'en trouve améliorée et plus d'échantillons peuvent être analysés dans un temps moins long. Plus d'échantillons en moins de temps signifie aussi des coûts moins élevés. Par exemple, en diminuant le temps d'analyse de 20 min par échantillon à 5 min, le coût pour 700 échantillons est réduit de 79 % (Tableau 1, page 15).

Tableau 1 Économies de temps et de coût sur plus de 700 analyses

Durée de cycle	Durée de cycle de 20 min	Durée de cycle de 5 min
Analyses	700	700
Coût approx. par analyse ¹	\$ 10.58	\$ 2.24
Coût approx. pour 700 analyses ¹	\$ 7400	\$ 1570
Économies de coûts	-	\$ 5830
Temps ²	10 jours	2,5 jours

¹ solvants = \$ 27/l, élimination des déchets = \$ 2/l, main d'œuvre = \$ 30/h

² 24 heures/jour

Le calculateur d'économies Agilent représente un outil d'utilisation facile pour calculer les économies générées par le passage d'un système HPLC conventionnel à un système UHPLC équipé de colonnes contenant des particules de 1,8 µm. Le calculateur, ainsi qu'un calculateur de transfert de méthode, est accessible sur le site Internet d'Agilent Technologies – www.chem.agilent.com. Les résultats sont présentés sous forme de graphique et de tableau.

Des durées d'analyse plus courtes permettent également d'obtenir des plus réponses plus rapides. Ceci est important lors du contrôle du processus et des

1 Introduction à la chromatographie en phase liquide à ultra haute performance

Avantages des colonnes contenant des particules sub-2-microniques

analyses de libération rapide. Au lieu d'attendre des heures pour libérer un lot unique de médicament, toutes les analyses concernant l'adéquation du système, l'étalonnage et l'échantillon peuvent être effectuées en moins d'une heure. Des réponses rapides sont importantes également pour les chercheurs en chimie de synthèse utilisant des systèmes CPL/MS en libre accès pour valider l'identité de leurs composés et contrôler leurs réactions. Des durées d'analyse plus courtes permettent aussi d'accélérer de façon significative le processus de développement des méthodes.

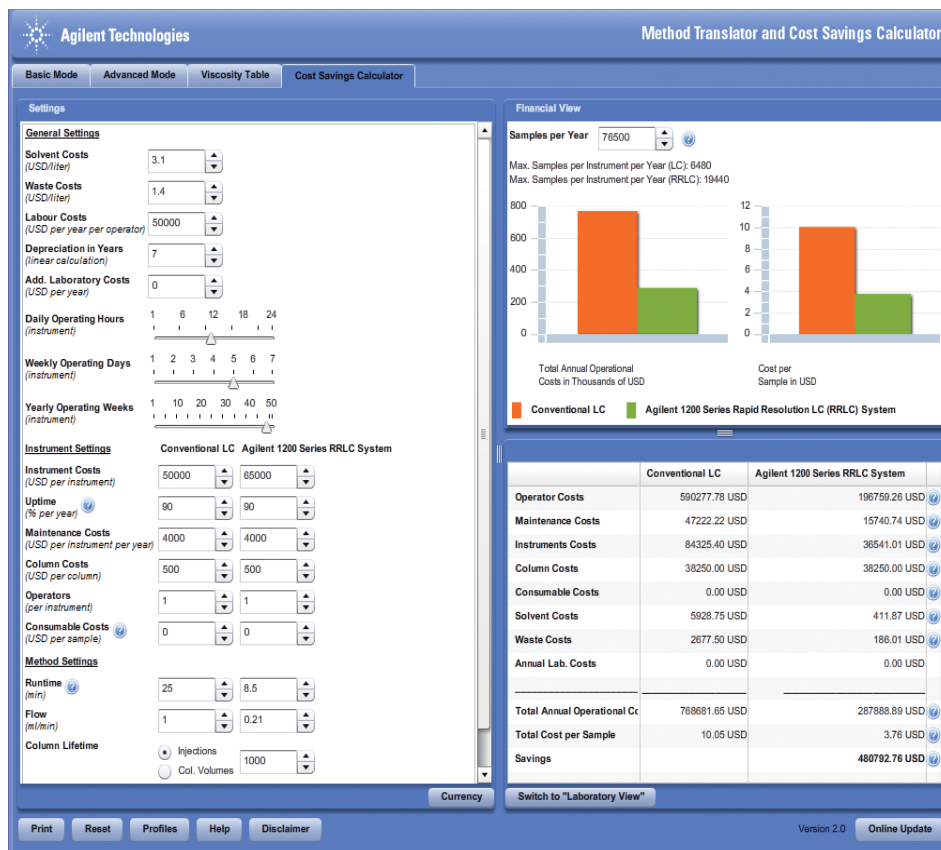


Figure 6 Calculateur d'économies de coûts

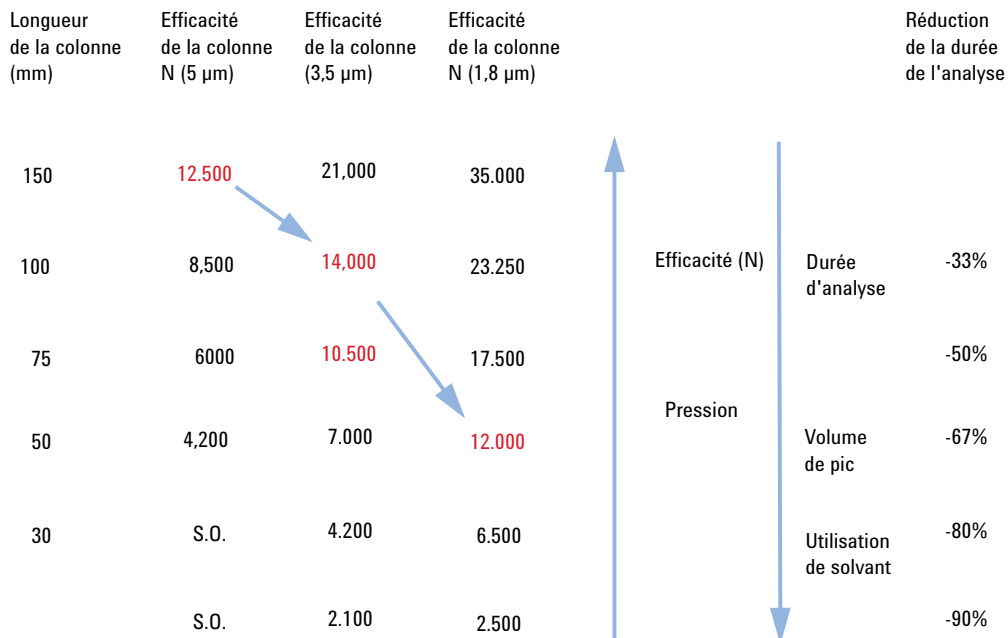


Figure 7 Relation entre la taille des particules, l'efficacité et la durée d'analyse

Une résolution plus élevée

L'utilisation de colonnes longues remplies de particules plus fines aboutit à une efficacité et une résolution plus élevées. Cela est essentiel pour l'analyse des échantillons complexes provenant d'études métabolomiques ou protéomiques. De même, des applications comme la détermination du profil des impuretés bénéficient d'un pouvoir de séparation plus élevé. Une capacité de pics plus élevée est avantageuse même pour l'analyse CPL/MS de médicaments dans les liquides biologiques en raison d'interférences réduites dues à la suppression ionique. D'une manière générale, un pouvoir de séparation accru apporte une plus grande confiance dans les résultats analytiques.

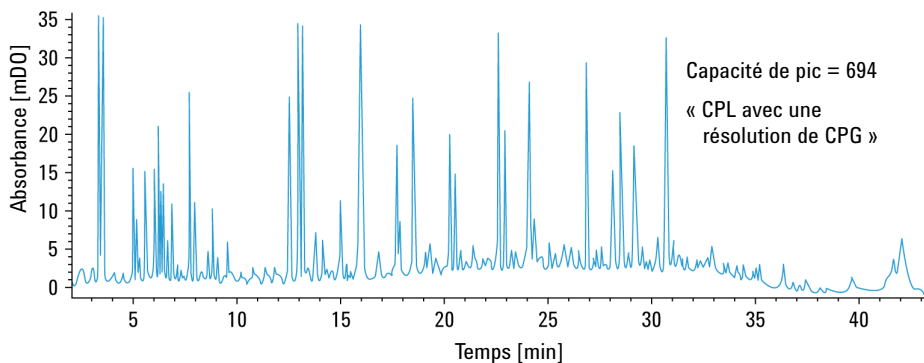


Figure 8 Une capacité de pics de plus de 700 peut être atteinte avec une colonne ZORBAX RRHT SB-C18 (2,1 x 150 mm, 1,8 μ m) pour l'analyse de BSA digérée par la trypsine.

Échauffement par frottement

Faire progresser une phase mobile à travers une colonne à des pressions et débits plus élevés génère de la chaleur. Les gradients de température ainsi créés (radial et longitudinal) peuvent influencer l'efficacité de la colonne.

$$Power = F * p$$

où F est le débit et p est la pression.

Des dispositifs de thermostatisation puissants (par exemple l'immersion de la colonne dans un bain marie) génèrent un fort gradient de température radial, ce qui conduit à une baisse significative de l'efficacité de la colonne. La thermostatisation de la colonne à l'air non ventilé réduit le gradient de température radial et donc la baisse d'efficacité, mais la température de sortie de la colonne s'en trouve augmentée. Cette élévation de température peut avoir un effet sur la sélectivité. À contre-pression inférieure, les pertes en performance dues à l'échauffement par frottement sont minimisées de façon à ce que les efficacités des colonnes sub-2-microniques de diamètre interne de 4,6 ou 3 mm restent toujours supérieures à celles des colonnes correspondantes de diamètre interne de 2,1 mm.

Un exemple de transfert d'une méthode à gradient vers une colonne de diamètre interne de 2,1 mm pour laquelle la séparation a été accélérée est présenté dans la [Figure 9](#), page 20. L'analyse initiale sur la colonne de 2,1 mm a été réalisée à un débit de 0,22 ml/min ce qui génèrait une pression de 380 bar pour un réglage de la température à 37 °C ; tous les pics étaient séparés en 12,5 min (chromatogramme non illustré). Le débit a été augmenté à 0,66 ml/min et les temps de gradient réduits par un facteur trois ce qui génèrait une pression de 1020 bar ; tous les pics ont été élués en 4,2 min ([Figure 9](#), page 20, en haut). Cela aurait dû permettre une séparation identique ; cependant, une perte de résolution a été observée entre les pics 7 et 8 et entre le pic 5 et le pic principal. L'origine de cette perte de résolution était l'échauffement de la colonne qui modifiait sa sélectivité pour ces composés. Il a été constaté qu'une thermostatisation à une température de 5 °C de moins était suffisante pour compenser l'échauffement à l'intérieur de la colonne et restaurer la séparation ([Figure 9](#), page 20, en bas). La pression a augmenté jusqu'à 1070 bar, indiquant également que la température à l'intérieur de la colonne était plus basse.

1 Introduction à la chromatographie en phase liquide à ultra haute performance

Échauffement par frottement

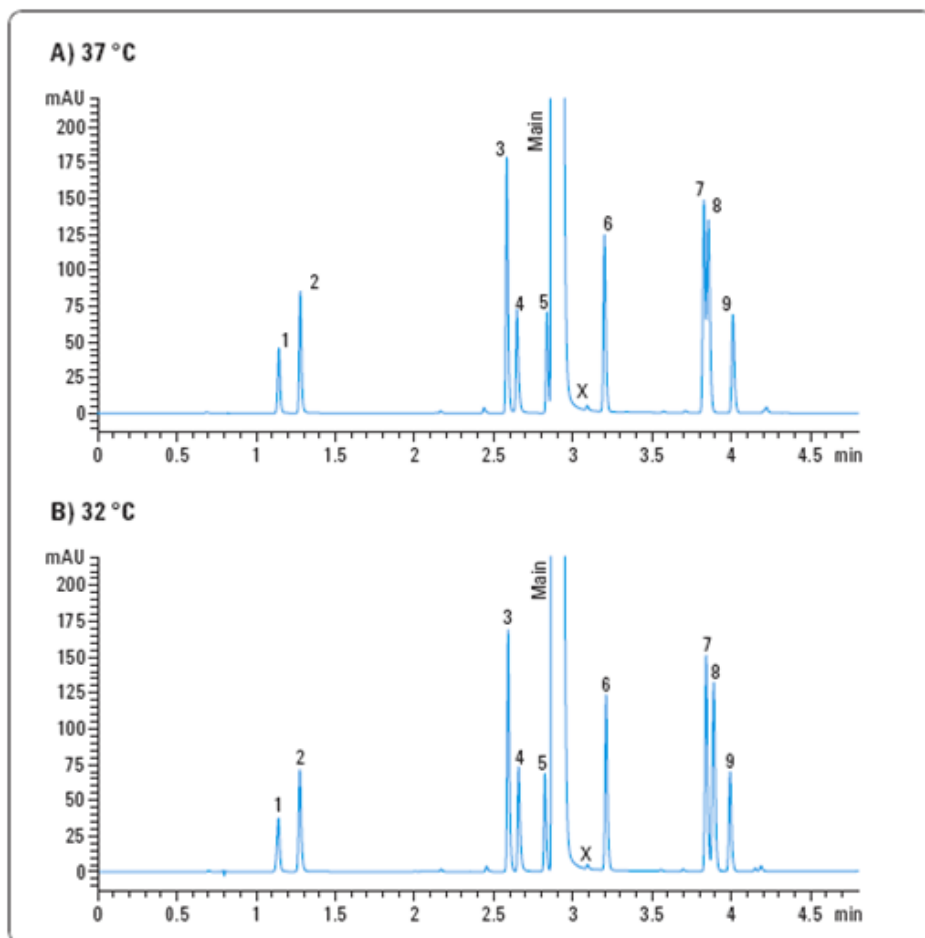


Figure 9 Influence de l'échauffement par frottement sur la sélectivité et effet de la réduction de la température de la colonne

En résumé, l'utilisation d'un matériau de remplissage sub-2-micronique permet d'améliorer l'efficacité et la résolution, et d'accélérer les séparations. Le système CPL Agilent 1290 Infinity et les colonnes RRHD augmentent l'espace de séparation disponible et permettent d'accéder à ces avantages. Les caractéristiques du système CPL 1290 Infinity sont décrites à la section « [Le système CPL Agilent 1290 Infinity - Description du produit](#) », page 23, et la section « [Optimisation du système CPL Agilent 1290 Infinity](#) », page 41 traite de la

mise en application des données théoriques et de l'utilisation de ces caractéristiques pour développer des séparations optimisées.

1 Introduction à la chromatographie en phase liquide à ultra haute performance

Échauffement par frottement



2

Le système CPL Agilent 1290 Infinity - Description du produit

Nouvelles fonctionnalités du système CPL Agilent 1290 Infinity 24

Composants du système 28

Ce chapitre présente les caractéristiques du système CPL 1290 Infinity.



Nouvelles fonctionnalités du système CPL Agilent 1290 Infinity

Le système CPL Agilent 1290 Infinity a été conçu pour apporter la plus grande flexibilité pour l'analyse par chromatographie en phase liquide à l'aide de toutes les technologies de colonnes actuelles et émergentes. Le système CPL 1290 Infinity propose la plage la plus étendue de paramètres de fonctionnement ; il peut donc reproduire tous les paramètres des méthodes transférés à partir de tout système analytique HPLC ou UHPLC existant actuellement disponible sur le marché. Certains aspects de la conception du système CPL Agilent 1290 Infinity ont été modifiés de manière radicale afin d'atteindre cet objectif sans toutefois perdre la fiabilité et la qualité qui sont à l'origine de la réussite des systèmes HPLC Agilent.

Ce système offre :

- Des débits de 0,05 ml/min à 5 ml/min pour des analyses chromatographiques conventionnelles ou rapides avec toute colonne analytique de diamètre interne de 1 à 5 mm et tout type de matériau de remplissage.
- Une plage de pression de jusqu'à 1200 bar (> 17400 psi) permettant d'utiliser un matériau de remplissage sub-2-micronique pour réaliser des analyses chromatographiques rapides avec des colonnes courtes et d'obtenir une résolution élevée avec des colonnes longues, et ce avec un plus grand choix de viscosités de la phase mobile.
- Des volumes de retard ultra faibles pour les gradients les plus rapides couplés à une détection par spectrométrie de masse ou spectrophotométrie UV/visible.
- La possibilité d'exécuter toutes les méthodes transférées à partir d'un autre système HPLC ou UHPLC analytique.
- Une commande de pompe sophistiquée avec un bruit de fond chromatographique et un bruit acoustique très faibles, permettant d'améliorer simultanément les résultats et l'environnement de travail.
- Un dégazeur et un clapet de purge automatique intégrés au module de la pompe.
- Un échantillonneur automatique à volume variable avec un volume de retard faible et un transfert réduit, qui peut fonctionner en tant qu'échantillonneur automatique en boucle fixe.

- Le nouveau module Flexible Cube pour rendre l'échantillonneur automatique plus performant avec de nouvelles fonctions telles que le rétrolavage du siège de l'aiguille et le fonctionnement en boucle fixe.
- Un compartiment à colonne thermostaté plus facile à utiliser avec des solutions de vanne intégrées et une plage de pression allant jusqu'à 1200 bars (17 400 psi).
- Un détecteur à barrette de diodes avec une sensibilité et une stabilité de la ligne de base grandement améliorées grâce un système de cuve de type car touche munie de guides d'ondes optofluidiques.
- Des vitesses d'acquisition de données comprenant l'intégralité des informations spectrales de jusqu'à 160 Hz.
- Une nouvelle gamme de colonnes ZORBAX RRHD à particules sub-2-micro-niques fonctionnant à des pressions allant jusqu'à 1200 bar.
- Un mélange assisté permettant un tamponnement automatique et un mélange additif au niveau de la pompe quaternaire 1290 Infinity.

L'amélioration la plus significative est la plage de pressions et de débits qui peuvent être utilisés par le système. Ce champ d'application de l'instrument correspond à sa puissance (débit x pression) ; il est facile à appréhender sous une forme graphique ([Figure 10](#), page 26). Comme illustré dans le schéma, la puissance de la pompe 1290 Infinity permet un fonctionnement à 1200 bar à un débit de jusqu'à 2 ml/min, pression qui diminue jusqu'à 800 bar lorsque le débit est augmenté à 5 ml/min. Cela couvre tous les champs d'application de tous les systèmes UHPLC actuellement commercialisés permettant ainsi le transfert direct sur le système 1290 Infinity de toutes les méthodes utilisées sur ces autres systèmes.

2 Le système CPL Agilent 1290 Infinity - Description du produit

Nouvelles fonctionnalités du système CPL Agilent 1290 Infinity

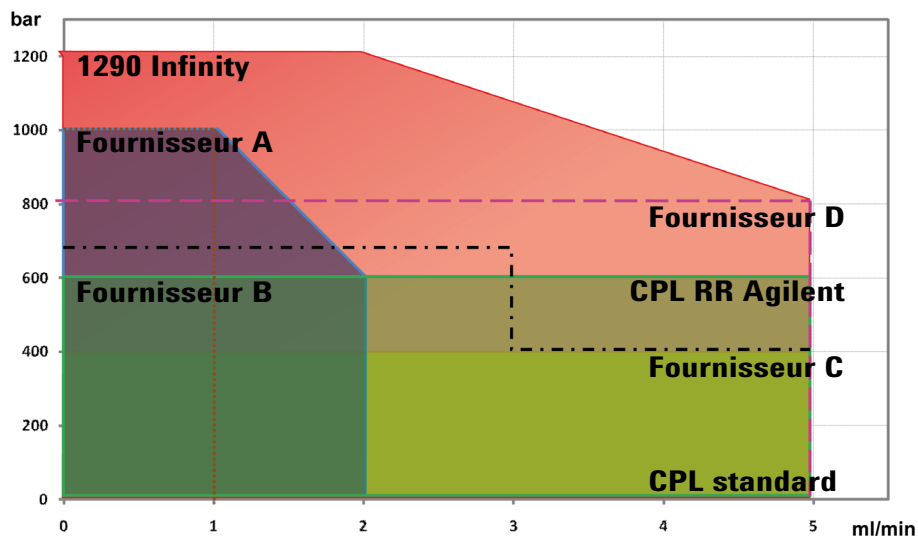


Figure 10 Puissance des systèmes UHPLC (plage de fonctionnement pression x débit)

La plage de pression permet l'utilisation des dernières particules sub-2-micro-
niques dans des colonnes longues pour obtenir une résolution élevée et dans
des colonnes courtes pour des séparations rapides à fort débit. La plage de
débit permet l'utilisation non seulement de méthodes traditionnelles mais éga-
lement de matériaux de remplissage à pores superficielles (ou pelliculaires,
par exemple Poroshell) à des débits élevés. Récemment un regain d'intérêt a
été observé pour ces types de matériau de remplissage qui constituent une
alternative aux matériaux STM pour des séparations hautement efficaces. La
plage de débit permet de choisir le diamètre de colonne la plus approprié, que
ce soit de 2 mm pour les applications à faible débit nécessaires à certains sys-
tèmes MS, ou d'un diamètre interne de jusqu'à 5 mm (typiquement 4,6 mm)
pour des CPL plus traditionnelles ou à capacité de charge accrue. L'étendue de
la plage de débit est aussi en accord avec de récents travaux de recherche qui
ont démontré qu'il était avantageux d'utiliser un débit maximum pour aug-
menter l'efficacité des séparations par gradient. (Voir *Petersson et al.,
J.Sep.Sci, 31, 2346-2357, 2008, Maximizing peak capacity and separation
speed in liquid chromatography*).

Le nouveau détecteur à barrette de diodes propose une sensibilité améliorée
associée à des caractéristiques de ligne de base exceptionnelles et une facilité
d'utilisation en raison de la conception innovante de sa cuve.

L'échantillonneur automatique fonctionne selon le principe d'écoulement en continu bien-établi d'Agilent qui permet une injection à volume variable associée à un faible transfert ; l'ensemble a été revu et amélioré pour supporter des applications à pressions plus élevées et à volumes plus faibles. Un tout nouveau module, le Flexible Cube, peut être ajouté à l'échantillonneur automatique pour bénéficier du plus petit volume de retard possible grâce à l'injection en boucle fixe ainsi que d'autres améliorations telles que le rétrolavage du siège de l'aiguille.

Composants du système

Pompe binaire Agilent 1290 Infinity

La pompe binaire Agilent 1290 Infinity intègre de nouveaux apports technologiques pour surmonter les problèmes rencontrés lors du pompage de solvants CPL à des pressions ultra hautes et des débits élevés : des systèmes d'entraînement des pistons robustes ; un nouveau matériel pour les pistons pour résister non seulement à la charge de travail mais également pour assurer le transfert actif de la chaleur des joints ; des échangeurs de chaleur microfluidiques et le Jet Weaver, un dispositif de mélange microfluidique. La pompe peut fournir un débit compris dans la plage 0,05 – 5 mL/min à des pressions allant jusqu'à 1200 bar.

Le module de la pompe binaire Agilent 1290 Infinity comprend deux pompes haute pression (1200 bar) identiques, un dégazeur à solvant à deux voies et une vanne de sélection de solvant à quatre voies d'entrée, un clapet de purge automatique et un dispositif de mélange à faible volume, le Jet Weaver, le tout dans un seul boîtier. Le dégazeur augmente la stabilité du débit, particulièrement à des débits faibles, et la sensibilité du détecteur.

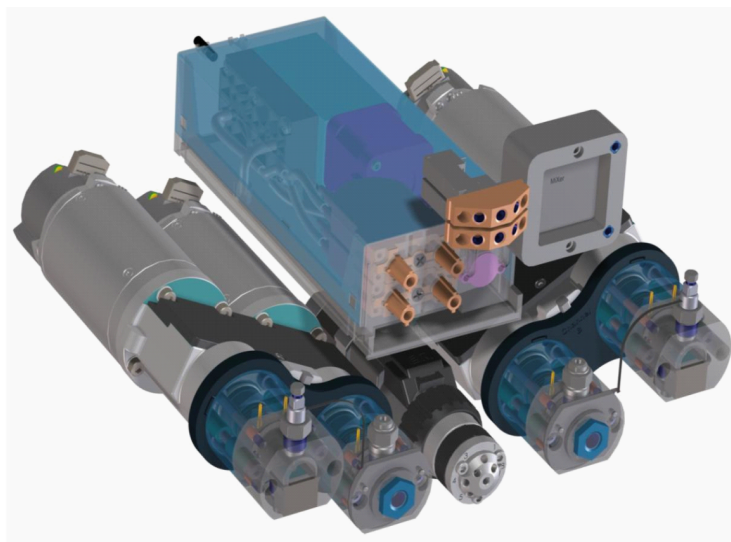


Figure 11 Pompe binaire Agilent 1290 Infinity

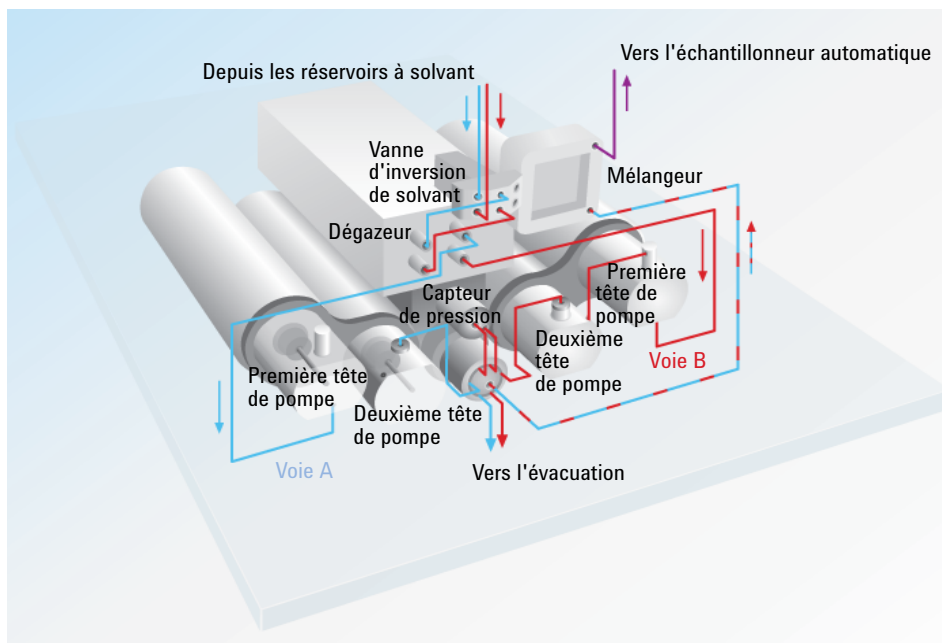


Figure 12 Identification des pièces et schéma de la pompe binaire 1290 Infinity

Chaque tête de pompe comprend à deux pistons en série et est commandée par un nouveau micrologiciel. Les pistons sont fabriqués dans un nouveau matériau, le carbure de silicium, qui permet d'éliminer la chaleur de la pompe de façon efficace. Le capillaire qui relie le premier piston au deuxième piston comprend un échangeur de chaleur intégré pour éliminer la chaleur générée par les pressions et les débits élevés. Chaque tête de pompe a un clapet d'entrée passif et un clapet de sortie passif sur la chambre du premier piston. Les pistons sont indépendants et entraînés de manière précise à l'aide d'un moteur à 65000 pas déplaçant un volume de 300 picolitres par pas.

Le mouvement des pistons est assuré par un système de commande intelligente doté d'une boucle de rétroaction pour vérifier que l'amortissement actif des pulsations de pression fournit un débit sans fluctuations. L'entraînement des pistons se règle de manière autonome pour intégrer les caractéristiques de compressibilité du solvant et les caractéristiques hydrauliques du système afin prévenir toute fluctuation. En association avec le contrôle de la fluidité du mouvement qui réduit les pulsations de pression provoquées par le mouvement des pistons, et l'efficacité du mélange de volumes faibles, cela garantit un bruit de fond de la pompe le plus bas possible sur les spectres UV. Dans la

2 Le système CPL Agilent 1290 Infinity - Description du produit

Composants du système

pompe, un microprocesseur est dédié au contrôle de la fluidité du mouvement et à l'optimisation en temps réel du déplacement des pistons en fonction des paramètres statiques et dynamiques. En outre d'améliorer les performances chromatographiques, ces fonctions contribuent à rendre le fonctionnement de la pompe très peu bruyant.

Lorsque la phase mobile est composée de solutions tampons concentrées, l'accessoire de rinçage actif des joints est disponible pour rallonger la durée de vie des joints de la pompe.

Une vanne de sélection de solvant permet de générer des mélanges binaires (isocratiques ou à gradient) à partir d'un ou deux solvants par voie. Les gradients binaires sont générés au niveau du clapet de purge par le mélange sous haute pression des solvants de la pompe A et de la pompe B. Le clapet de purge permet, sous commande logicielle, de basculer l'écoulement vers l'évacuation afin de purger les nouveaux solvants à travers la tête de pompe. Un capteur est relié au clapet de purge pour contrôler la pression du système.

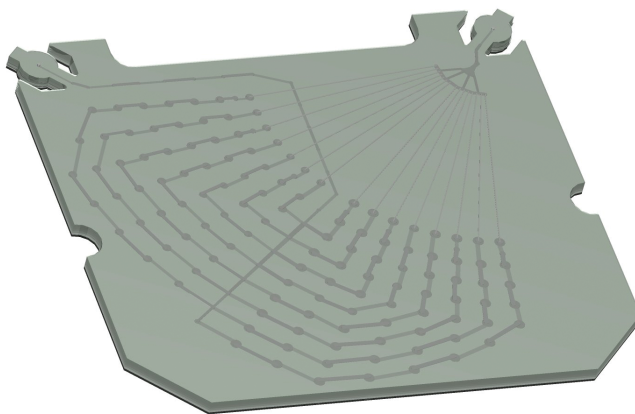


Figure 13 Le mélangeur Jet Weaver

Le circuit de la pompe a été optimisé pour minimiser le retard des gradients et intègre un système de mélange innovant utilisant la technologie microfluidique. Le dispositif de mélange, appelé le Jet Weaver, utilise un réseau de voies microfluidiques ($120\ \mu\text{m} \times 120\ \mu\text{m}$) à plusieurs couches pour garantir que les solvants sont complètement mélangés. Il existe deux volumes standard pour le Jet Weaver : $35\ \mu\text{l}$ pour des applications classiques à détection UV et $100\ \mu\text{l}$ pour des applications exigeantes telles que lorsque du TFA est utilisé avec une détection UV. Pour obtenir un bruit de ligne de base résolument des plus faibles lors de ces applications exigeantes, un Jet Weaver de $380\ \mu\text{L}$ est également

disponible. Lorsque la détection est effectuée par MS, il est souvent possible de travailler sans le Jet Weaver car un niveau de mélange suffisant est obtenu avec juste le volume de base de 10 µl du circuit de la pompe. Les applications habituelles sont des méthodes à haut débit d'analyses, avec des gradients rapides sur des colonnes haute résolution de 2,1 mm.

La pompe binaire 1290 Infinity est conçue et fournie pour que des rails à vanne supplémentaires puissent être installés à droite ou à gauche de la pompe. Jusqu'à deux vannes de sélection de solvant à 12 voies supplémentaires peuvent être installées sur ces rails. Cela permet d'utiliser un maximum de 26 solvants différents pour le développement de méthodes analytiques à gradients binaires. Une carte de commande « groupé » est disponible pour intégrer les vannes de sélection de solvant extérieures à l'interface utilisateur de la pompe ; par conséquent la sélection des solvants est facilitée par l'utilisation de leur nom.

Pompe quaternaire 1290 Infinity

En revanche, la pompe quaternaire 1290 Infinity ne comprend qu'une tête de pompe mais dispose d'une vanne à gradient multivoie (MCGV) en plus pour fractionner les éluants conformément au gradient programmé. Selon le principe de ce mélange à faible pression, les solvants se rejoignent dans le mélangeur d'entrée et sont donc mélangés aussi bien avant que dans la tête de pompe.

La tête de pompe est identique à celle de la pompe binaire 1290 Infinity ; ses caractéristiques techniques et ses performances sont donc les mêmes. Elle peut également être équipée de l'accessoire de rinçage actif des joints lorsque des solutions tampons concentrées sont utilisées pour rallonger la durée de vie des joints de la pompe.

Un capteur de pression contrôle la pression pendant l'analyse avant que les solvants pénètrent dans la vanne de sélection de flux à 4 voies dont la fonction est polyvalente, comme illustré dans les figures ci-dessous. La vanne polyvalente est équipée d'un filtre en ligne, utilisé quelque soit l'analyse, d'un mélangeur Jet Weaver de 380 µL qui peut être installé en option pour garantir un mélange optimal des solvants, d'un capillaire réducteur (facultatif) et d'une connexion vers le système d'évacuation.

Tableau 2 Fonctionnalités de la vanne

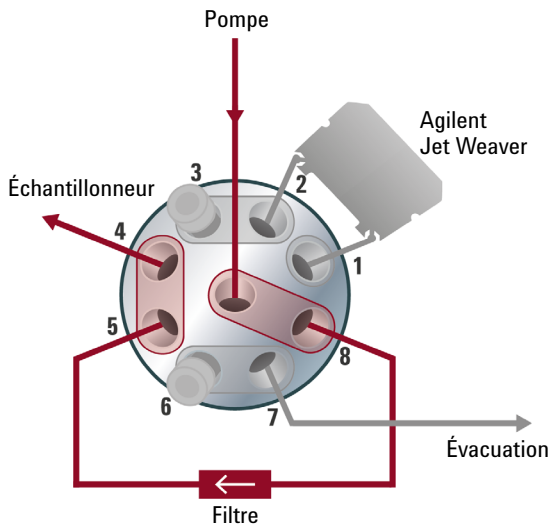


Figure 14 Configuration standard

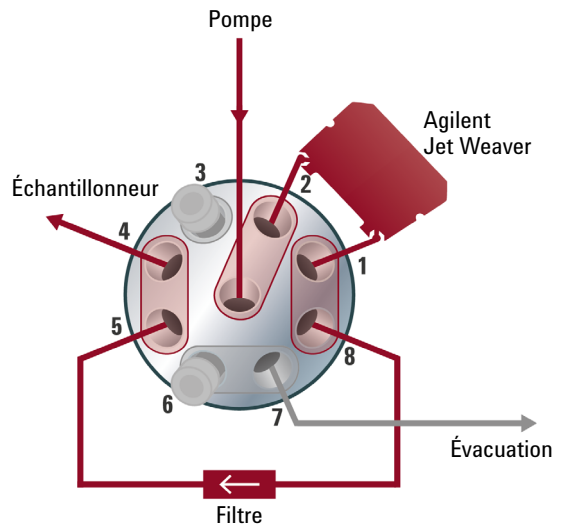


Figure 15 Configuration à volume de mélange accru

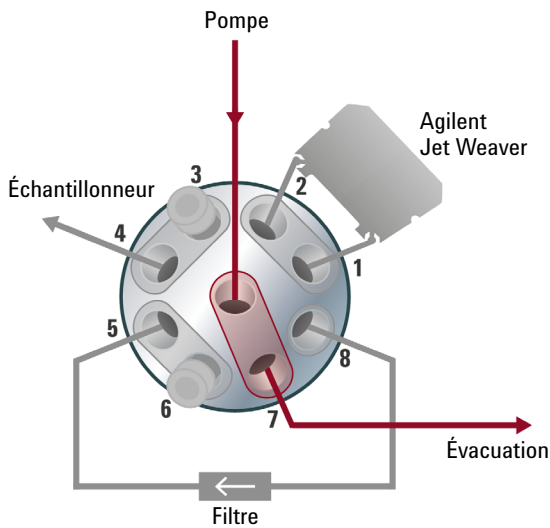


Figure 16 Fonction de purge automatique

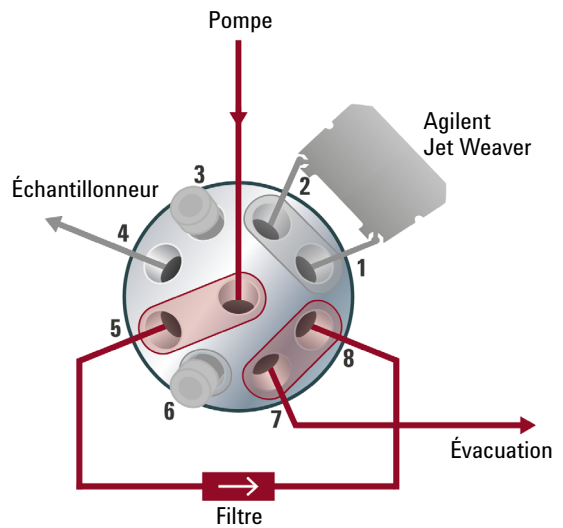


Figure 17 Rétrolavage du filtre en ligne

2 Le système CPL Agilent 1290 Infinity - Description du produit

Composants du système

La configuration standard (1) est utilisée pour la plupart des analyses, alors que la configuration à volume de mélange accru (2) sert aux applications exigeantes pour ce qui est de la ligne de base ; pour ces dernières les performances de mélange et la ligne de base UV peuvent être améliorées significativement par l'utilisation du mélangeur Jet Weaver Agilent. Une fonction de purge automatique (3) est installée, ainsi qu'une fonction de rétrolavage du filtre en ligne (4). Cela vous permet de nettoyer le filtre et de prolonger sa durée de vie.

L'échantillonneur automatique Agilent 1290 Infinity

L'échantillonneur automatique Agilent 1290 Infinity fonctionne selon le principe d'écoulement en continu bien-établi d'Agilent qui permet une injection à volume variable et perfectionne encore ses performances. Des nouveaux matériaux inertes ont été utilisés pour les joints du dispositif doseur et le siège de l'aiguille et contribuent à maintenir un transfert de niveau extrêmement faible. Le volume hydraulique réduit du circuit est mieux adapté à des gradients plus rapides, et la possibilité de réaliser des injections chevauchantes et la fonction de réduction automatique du volume de retard (ADVR) permet de raccourcir la durée des cycles et la distribution du gradient vers la colonne. Le système aspire le volume exact de solution d'échantillon défini sans déchets et atteint une reproductibilité élevée sur toute la plage allant d'un volume d'injection inférieur au microlitre à un maximum de 40 μl . Le capillaire d'injection standard permet des injections d'un volume allant jusqu'à 20 μl .

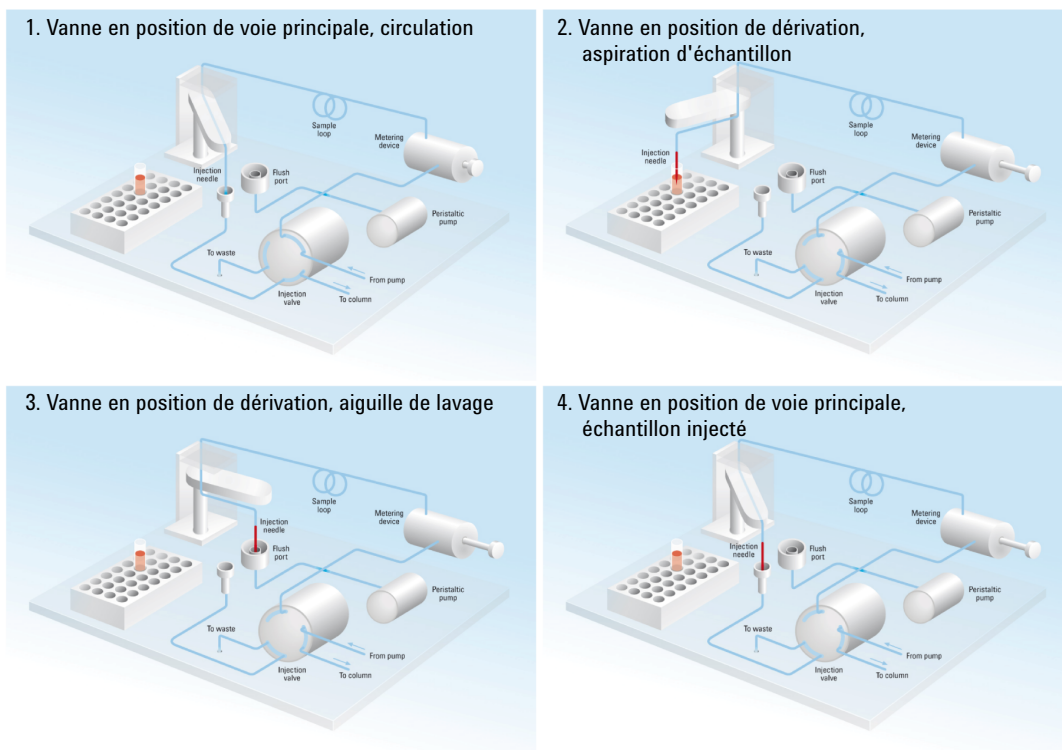


Figure 18 Schéma des étapes d'injection pour l'échantillonneur automatique 1290 Infinity

2 Le système CPL Agilent 1290 Infinity - Description du produit

Composants du système

Un module facultatif complémentaire tout neuf, le Flexible Cube, s'intègre à l'échantillonneur automatique de manière transparente pour offrir des fonctions supplémentaires. En cas d'ajout du nouveau module Flexible Cube qui inclut une pompe à seringue de 500 µl, il devient possible d'installer en option une vanne basse pression et deux vannes d'inversion haute pression. Par exemple, le système d'injection à écoulement continu peut être remplacé par une boucle d'injection fixe qui utilise la pompe à seringue et les vannes du module Flexible Cube pour remplir la boucle d'échantillonnage. L'avantage de cette configuration est d'éliminer le volume de retard de l'échantillonneur automatique ; elle convient donc bien à certaines applications haut débit à gradient rapide. L'inconvénient est que la flexibilité de l'injection à volume variable est désactivée et qu'une partie de l'échantillon est perdue lors du rinçage de la boucle. D'autres fonctions, telles que le rétrolavage automatique du siège de l'aiguille d'injection après l'injection, sont disponibles avec le module Flexible Cube et permettent de rassurer l'utilisateur en évitant le transfert de composés difficiles ou les obstructions provoquées par des échantillons sales.

Le portoir d'échantillons de l'échantillonneur automatique propose dix positions fixes pour des flacons de 2 ml et deux plateaux amovibles, qui peuvent être identiques ou non, sélectionnés parmi les choix suivants :

- Plateau 54 positions pour flacons de 2 ml,
- Plaque de microtitrage à 96 puits (plusieurs hauteurs possibles),
- Plaque de microtitrage à 384 puits (plusieurs hauteurs possibles).

S'il y a lieu, l'échantillonneur automatique peut être thermostaté à une température comprise entre 4 °C et 40 °C par ajout du module de contrôle de la température de l'échantillonneur automatique.

Le compartiment à colonnes thermostaté Agilent Infinity 1290

Le compartiment à colonnes thermostaté Agilent Infinity 1290 (TCC) maintient une température comprise entre 10 °C en dessous de la température ambiante et 100 °C à un débit de 2,5 ml/min, et 80 °C à un débit de 5 ml/min. La stabilité de la température est de $\pm 0,05$ °C et la précision de la température est de $\pm 0,5$ °C (avec étalonnage).¹ La thermostatisation est atteinte par l'action combinée de la conduction par contact avec les ailettes du thermostat, de la température de l'air non ventilé du compartiment et surtout du préchauffage (ou refroidissement) de la phase mobile lors de son passage à travers un échangeur de chaleur avant de pénétrer dans la colonne. Il existe deux zones de température indépendantes dans chaque TCC qui peuvent fonctionner de concert pour des colonnes longues jusqu'à 300 mm ou à des températures distinctes pour des colonnes courtes de 100 mm ou moins.

Le module est fourni avec un échangeur de chaleur à faible dispersion de 1,6 µl. Chaque kit de vannes comprend des échangeurs de température à faible dispersion supplémentaire pour chaque colonne. Un maximum de quatre échangeurs de température à faible dispersion peuvent être installés de façon flexible à l'intérieur du TCC. Pour un fonctionnement HPLC conventionnel, des échangeurs de température intégrés de 3 µl et de 6 µl sont également disponibles.

Chaque TCC peut accueillir une commande de vanne interne pour faciliter les opérations de permutation entre différents types d'applications : permutation entre deux colonnes, régénération de colonne automatique, préparation d'échantillons ou rétrolavage de colonne. Chaque tête de vanne est fournie sous la forme d'un kit complet contenant tous les capillaires nécessaires, des échangeurs de température à faible dispersion supplémentaires et d'autres pièces.

Les vannes d'inversion sont d'une facilité d'utilisation exceptionnelle et offrent une grande flexibilité pour les raccordements : sur simple pression, l'unité de commande de la vanne à remplacement rapide se coulisse vers l'avant permettant un accès facile (voir [Figure 19](#), page 38, à gauche). Les différentes têtes de vanne peuvent être échangées par l'utilisateur et positionnées sur le mécanisme de commande en fonction du type d'application souhaité (voir [Figure 19](#), page 38, à droite). Une étiquette RFID identifie chaque tête de vanne.

¹ Ces spécifications ont été validées avec de l'eau distillée à une température ambiante de 25 °C, un point de consigne de 40 °C et une plage de débit de 0,2 à 5 ml/min.

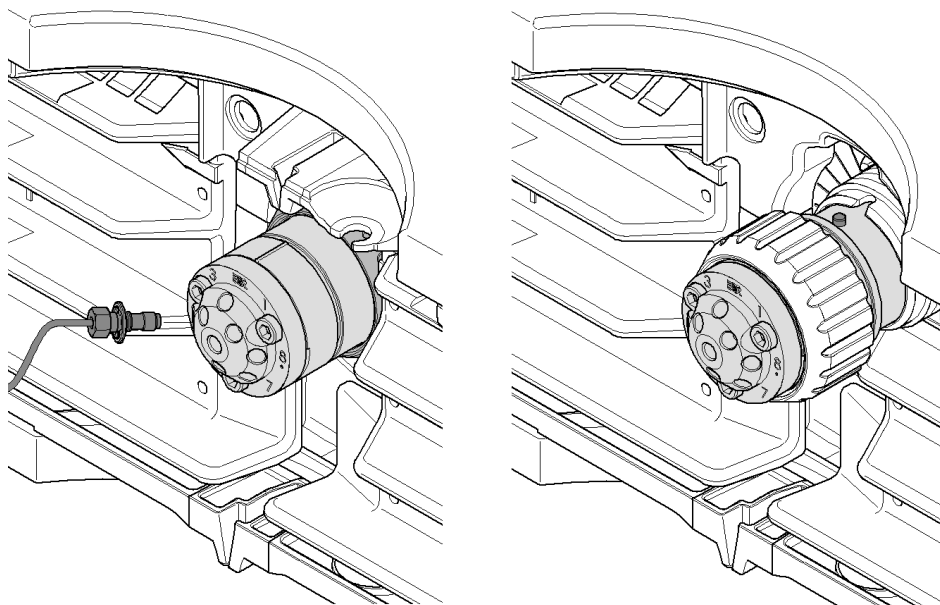


Figure 19 Vanne à remplacement rapide sur le TCC

Jusqu'à trois TCC peuvent être regroupés pour permettre des opérations complexes telles que la permutation entre huit colonnes pour le développement de méthodes automatisé, ou lorsqu'il est souhaitable que des colonnes supplémentaires soient disponibles pour différentes applications. De cette façon, la colonne à utiliser devient un paramètre de méthode simple. Cette configuration requiert deux têtes de vanne à 8 positions/9 voies, une dans deux des TCC. Pour faciliter leur utilisation, les TCC regroupés sont représentés dans le logiciel sous la forme d'une unité unique avec une seule interface.

Par rapport à des modèles plus anciens, d'autres améliorations sont le renforcement de l'isolation thermique, des guides à capillaire mieux adaptés et un capteur d'ouverture de la porte pour que les méthodes puissent intégrer le paramètre « porte fermée » (particulièrement utile pour les méthodes à température élevée ou basse).

Détecteur à barrette de diodes 1290 Infinity

Le système optique du détecteur à barrette de diodes 1290 Infinity est de conception innovante avec une cuve de type cartouche incorporant la technologie de guide d'ondes optofluidique. Il offre une sensibilité élevée avec une faible dispersion, une plage linéaire étendue et une ligne de base très stable pour les applications CPL standard ou ultra rapides. La cuve de type cartouche Agilent Max-Light augmente de manière importante la transmission de la lumière selon le principe de réflexion interne totale le long d'un capillaire en verre de silice non recouvert. Un nouveau niveau de sensibilité est ainsi atteint sans perdre en résolution en raison d'effets de dispersion de la cuve. Ce format réduit au minimum les variations de la ligne de base provoquées par l'indice de réfraction ou des effets thermiques et permet une intégration plus fiable de l'aire des pics.

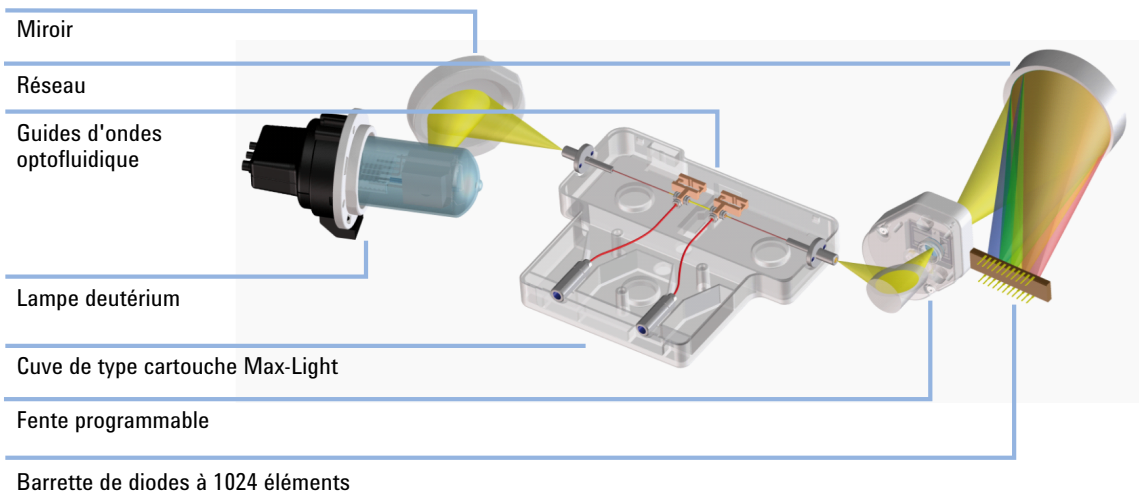


Figure 20 Faisceau lumineux du détecteur à barrette de diodes 1290 Infinity

Ce module comprend aussi une régulation de la température électronique pour améliorer encore la résistance aux effets dus à des variations de la température ambiante. Bien que le volume hydraulique de la cuve de type cartouche Max-Light soit très petit, la longueur du trajet est standard, soit 10 mm. Toutefois, pour des sensibilités encore supérieures, la cuve Agilent Max-Light haute sensibilité est disponible, avec une longueur du trajet de 60 mm. Les cuves peuvent être remplacées aisément en les faisant coulisser dans le porte-cuve ; elles sont alignées automatiquement au niveau du banc optique.

2 Le système CPL Agilent 1290 Infinity - Description du produit

Composants du système

La source de lumière du DAD est une lampe deutérium ; la plage de longueurs d'onde de fonctionnement est comprise entre 190 et 640 nm. La détection s'effectue au moyen d'une barrette à 1024 diodes. L'entrée du spectrographe est une fente optique programmable dont la résolution spectrale est comprise entre 1 et 8 nm. La fente est généralement utilisée au milieu de cette fourchette mais l'ouverture peut être diminuée à 1 nm lors d'optimisations pour obtenir une résolution spectrale élevée (ce qui est rarement le cas pour des spectres UV en phase liquide) ou agrandie jusqu'à 8 nm pour maximiser la transmission de lumière et minimiser le bruit de fond du signal.

Les signaux chromatographiques sont extraits des données de la barrette de diodes par le micrologiciel du module. Jusqu'à huit signaux individuels peuvent être définis, chacun comprenant une longueur d'ondes de signal, une bande passante de paquet de diodes et, s'il y a lieu, une longueur d'ondes et une bande passante de référence. Les signaux peuvent être émis à jusqu'à 160 Hz (160 points de données/seconde) pour un enregistrement précis des pics chromatographiques les plus rapides (étroits). En même temps le module peut aussi envoyer le spectre complet au système de données à la même vitesse, soit 160 Hz.

Il est important que les paramètres des méthodes puissent être enregistrés pour les laboratoires réglementés. Le DAD 1290 Infinity enregistre non seulement les points de consigne de l'instrument mais est également doté de étiquettes RFID (étiquettes d'identification par radiofréquence) intégrées à la lampe et à la cartouche de la cuve à circulation pour que l'identité et les caractéristiques de ces composants importants soient également enregistrées par le système.



3

Optimisation du système CPL Agilent 1290 Infinity

Volume de retard et volume hors colonne	42
Volume de retard	42
Volume hors colonne	43
Configuration d'un volume de retard optimal	44
Comment augmenter le volume d'injection	53
Comment améliorer la capacité d'analyse	55
Comment améliorer la résolution	58
Comment améliorer la sensibilité	61
Comment minimiser le transfert	70
Comment empêcher les obstructions de colonne	72

Ce chapitre traite de l'application des notions théoriques et de l'utilisation des caractéristiques du système CPL pour développer des séparations optimisées.



Volume de retard et volume hors colonne

Le *volume de retard* est défini comme le volume du système entre le point de mélange dans la pompe et au sommet de la colonne.

Le *volume supplémentaire de la colonne* est défini comme le volume entre le point d'injection et le point de détection, à l'exclusion du volume dans la colonne.

Volume de retard

Dans les séparations du gradient, ce volume entraîne un retard entre le changement de mélange dans la pompe et ce changement atteignant la colonne. Le retard varie en fonction du débit et du volume de retard du système. En effet, cela signifie que, dans chaque système CPL, il y a un segment isocratique supplémentaire dans le profil du gradient au démarrage de chaque analyse. En général, le profil du gradient est rapporté en termes de réglages du mélange au niveau de la pompe, et le volume de retard n'est pas rapporté, même s'il a un effet sur la chromatographie. Cet effet devient plus significatif à faibles débits et faibles volumes de colonne, et il peut exercer un impact important sur la transférabilité des méthodes de gradient. Il est par conséquent important, pour les séparations rapides du gradient, d'avoir de faibles volumes de retard, plus particulièrement avec des colonnes de petits diamètres (par ex. 2,1 mm de diamètre intérieur), car elles sont souvent utilisées avec la détection spectrométrique de masse.

Le volume de retard d'un système comporte le volume dans la pompe depuis le point de mélange, les connexions entre la pompe et l'échantillonneur automatique, le volume du circuit via l'échantillonneur automatique, et les connexions entre l'échantillonneur automatique et la colonne.

Par exemple, pour les méthodes CPL utilisant un matériau d'emballage de 5 µm, des débits de 1 ml/min. sont typiquement employés dans une colonne avec un diamètre intérieur de 4,6 mm, et environ 0,2 ml/min. pour une colonne avec un diamètre intérieur de 2,1 mm (même vitesse linéaire dans la colonne). Sur un système ayant un volume de retard type de 1 000 µl et utilisant une colonne de 2,1 mm, il y aura un segment isocratique initial « caché »

de 5 min., alors que sur un système avec un volume de retard de 600 μl , le retard sera de 3 min.. Ces volumes de retard seraient trop élevés pour des analyses d'une durée d'une à deux minutes. Avec des emballages de moins de 2 μm , le débit optimal (d'après la courbe de Van Deemter) est légèrement supérieur, et une chromatographie rapide peut donc utiliser trois à cinq fois ces débits, entraînant ainsi des volumes de retard d'environ une minute. Toutefois, le volume de retard doit ensuite être réduit pour parvenir à des retards d'une fraction de la durée d'analyse prévue. On peut parvenir à ceci grâce au système CPL Agilent Infinity 1290 en raison du faible volume de retard du circuit de la pompe, du faible volume du mélangeur Jet Weaver, et du faible volume du circuit de l'échantillonneur automatique.

Volume hors colonne

Le volume supplémentaire de la colonne est une source de dispersion du pic qui réduira la résolution de la séparation, il doit donc être réduit. Les colonnes d'un plus petit diamètre requièrent proportionnellement de plus faibles volumes supplémentaires de la colonne, afin de conserver la dispersion du pic à un minimum.

Dans un chromatographe en phase liquide, le volume supplémentaire de la colonne dépendra des tuyaux de raccordement entre l'échantillonneur automatique, la colonne et le détecteur et également du volume de la cuve à circulation dans le détecteur. Le système CPL Agilent Infinity 1290 réduit le volume supplémentaire de la colonne grâce aux tuyaux de petits diamètres (0,12 mm de diamètre intérieur), aux échangeurs de chaleur à faible volume situés dans le compartiment à colonnes, et à la cuve de type cartouche Max-Light située dans le détecteur.

Configuration d'un volume de retard optimal

Les [Tableau 3](#), page 44 et [Tableau 4](#), page 45 montrent les volumes de composant qui contribuent au volume de retard dans le système CPL Agilent 1290 Infinity. Dans la configuration standard avec la pompe binaire Agilent 1290 Infinity, le mélangeur Jet Weaver, l'échantillonneur automatique 1290 Infinity et le compartiment à colonnes thermostaté, le volume de retard du système est d'environ 125 µl. Ce volume de retard standard convient pour la plupart des applications. Par exemple, une séparation rapide sur une colonne de 50 mm x 2,1 mm remplie avec des particules sub-2-microniques à un débit modéré de 0,6 ml/min aboutira à un retard de gradient typique d'environ 0,2 min ce qui est généralement acceptable pour des durées de gradient de deux à trois minutes (voir le [Tableau 6](#), page 46). Il est souvent utile de considérer le débit en termes de volumes de colonne. Par exemple, pour la colonne du [Tableau 7](#), page 46 avec un débit de 0,6 ml/min, environ six volumes de la colonne circulent dans le système par minute, et le volume de retard représente environ 1,2 fois le volume de la colonne.

Une configuration comprenant la pompe quaternaire Agilent 1290 Infinity, l'échantillonneur automatique 1290 Infinity et le compartiment à colonne thermostaté a un volume de retard de 430 µL, et donc un retard de 0,7 min. Ces valeurs correspondent au seuil d'acceptabilité pour des gradients d'une durée de 3 min.

Tableau 3 Volumes de retard des modules CPL 1290 Infinity

Composants	Volume de retard (µl)
Pompe binaire	10
Mélangeur Jet Weaver (standard)	35
Pompe binaire + Jet Weaver	45
Pompe quaternaire	350
Pompe quaternaire + Jet Weaver V380	500
Échantillonneur automatique (boucle fixe de 5 µl)	5
Échantillonneur automatique (volume variable, standard)	80
Échangeur de chaleur à faible dispersion du compartiment à colonnes	1.6
Tubulure de connexion, diam. int. de 0,12 mm, pour 100 mm	1.1

Tableau 4 Volumes de retard des configurations du système CPL binaire 1290 Infinity

Configurations de système¹	Volume de retard (µl)
Pompe binaire + Échantillonneur automatique à boucle fixe (MS seulement)	20
Pompe binaire + Jet Weaver + Boucle fixe	55
Pompe binaire + Échantillonneur automatique standard (MS seulement)	90
Pompe binaire + Jet Weaver + Échantillonneur automatique	125

¹ 5 µl sont rajoutés pour comptabiliser les connexions dans les configurations de système

Tableau 5 Volumes de retard des configurations du système CPL quaternaire 1290 Infinity

Configurations de système¹	Volume de retard (µl)
Pompe quaternaire + Échantillonneur automatique à boucle fixe (MS seulement)	360
Pompe quaternaire + Échantillonneur automatique standard (MS seulement)	430
Pompe quaternaire + Jet Weaver V380 + Boucle fixe	510
Pompe quaternaire + Jet Weaver V380 + Échantillonneur automatique	580

¹ 5 µl sont rajoutés pour comptabiliser les connexions dans les configurations de système

3 Optimisation du système CPL Agilent 1290 Infinity

Configuration d'un volume de retard optimal

Tableau 6 Retard du système : temps pour que le gradient atteigne la tête de la colonne

Débit (ml/min)	Volume de retard du système (microlitres)							
	20	55	90	125	360	395	430	465
	Retard (minutes)							
0.2	0.10	0.28	0.43	0.60	1.80	2.15	2.55	2.90
0.4	0.05	0.14	0.21	0.30	0.90	1.08	1.28	1.45
0.6	0.03	0.09	0.14	0.20	0.60	0.72	0.85	0.97
0.8	0.03	0.07	0.11	0.15	0.45	0.54	0.64	0.73
1.0	0.02	0.06	0.09	0.12	0.36	0.43	0.51	0.58
1.5	0.01	0.04	0.06	0.08	0.24	0.29	0.34	0.39
2.0	0.01	0.03	0.04	0.06	0.18	0.22	0.26	0.29
3.0	0.01	0.02	0.03	0.04	0.12	0.14	0.17	0.19
4.0	0.01	0.01	0.02	0.03	0.09	0.11	0.13	0.15
5.0	0.00	0.01	0.02	0.02	0.07	0.09	0.10	0.12

Tableau 7 Volume approximatif de liquide dans des dimensions de colonne typique, en supposant que la porosité est égale à 0,6.

Diamètre de la colonne (mm)	Longueur de la colonne (mm)				
	30	50	100	150	250
	Volume de la colonne - Phase liquide (microlitres)				
2.1	62	104	208	312	520
3.0	127	212	424	636	1060
4.0	226	377	754	1131	1885
4.6	299	499	997	1496	2493

Pour des gradients très rapides d'une durée inférieure à 0,5 min, possibles uniquement avec les système CPL binaire Agilent 1290 Infinity, le volume de retard du système peut être diminué facilement sans modifier physiquement la configuration du système. Cette modification est appliquée en changeant le comportement de l'échantillonneur automatique.

Le volume de retard de 80 µl de l'échantillonneur automatique Agilent 1290 Infinity est dû au circuit hydraulique depuis la vanne d'injection via le dispositif doseur, l'aiguille, le siège de l'aiguille et les capillaires de connexion qui reviennent à la vanne d'injection (voir la [Figure 18](#), page 35). Lors de l'injection, la vanne passe de la voie principale à la voie de dérivation afin que le dispositif doseur puisse aspirer l'échantillon dans le capillaire de l'aiguille. L'injection a lieu lorsque la vanne revient sur la voie principale et l'échantillon est purgé vers la colonne. La vanne reste dans cette position pendant l'analyse pour que l'échantillonneur automatique soit purgé en continu ; le gradient doit donc emprunter ce circuit (volume de retard) avant d'atteindre la colonne. Ce volume de retard peut donc être éliminé en faisant passer la vanne d'injection de la voie principale à la voie de dérivation juste après l'injection de l'échantillon et sa purge vers la colonne. En pratique, cette opération peut être réalisée en quelques secondes après l'injection en activant la fonction « Réduction automatique du volume de retard » (ADVR) dans le menu de configuration de l'échantillonneur automatique. Le facteur de purge (généralement cinq fois le volume d'injection) garantit que suffisamment de temps est alloué pour purger l'échantillon de l'injecteur avant de passer sur la voie de dérivation. Cela permet de réduire de manière efficace le volume de retard du système de 125 µl à 50 µl.

Lors de l'activation de la fonction ADVR, il convient de noter que le gradient a déjà démarré au niveau de la pompe au moment de l'injection. Il faut se poser la question de savoir si le gradient a déjà atteint l'échantillonneur automatique, dans quel cas, un petit décalage sera observé au niveau du gradient. Cela se produit si le volume de retard est inférieur au volume de purge et n'est pas forcément problématique. Toutefois, il s'agit d'un phénomène qui peut être pris en compte lors d'un transfert de méthode. Pour un facteur de purge de 5 et un volume d'injection de 10 µl, le volume qui circule à travers l'échantillonneur automatique avant le passage sur la voie de dérivation est de 50 µl et le volume de retard est de 50 µl, ce qui signifie que le gradient vient juste d'atteindre la vanne d'injection. Aucun effet ne sera constaté pour des volumes d'injection plus petits, mais un petit décalage sera observé au niveau du gradient pour des volumes d'injection plus grands. L'utilisation de la fonction ADVR est également dépendante du débit utilisé. À un débit de 0,2 ml/min le

3 Optimisation du système CPL Agilent 1290 Infinity

Configuration d'un volume de retard optimal

retard est diminué de 21 secondes alors qu'à un débit de 1,0 ml/min il n'est que de 4 secondes.

La fonction ADVR ne convient en général pas aux applications impliquant des composés réputés causer des problèmes de transfert.

Pour réduire au minimum la dispersion des pics et le volume de retard dans le compartiment à colonnes thermostaté, l'échangeur de chaleur à faible dispersion doit être installé. L'échangeur de chaleur à faible dispersion est un élément des kits de capillaires recommandés pour les applications à faible dispersion. Le kit de capillaires classique comporte également des capillaires étroits (diamètre interne de 0,12 mm). Les échangeurs de chaleur intégrés de 3 μ l et 6 μ l sont destinés à des fins de rétrocompatibilité et doivent uniquement être utilisés dans le cas où une méthode conventionnelle doit être lancée sur le système, même si dans ce cas aussi l'échangeur de chaleur à faible dispersion doit être utilisé.

Pour préserver la résolution dans le détecteur à barrette de diodes Agilent 1290 Infinity, la cuve de type cartouche Max-Light présente un faible volume de dispersion (volume σ de 1,0 μ l) et aucune optimisation de volume supplémentaire n'est nécessaire. Pour des applications où la cuve Agilent Max-Light haute sensibilité est utilisée pour obtenir une sensibilité plus élevée, le volume de la cuve est optimisé pour une utilisation avec des colonnes de diamètre interne de 3 mm et 4,6 mm.

Au niveau de la pompe, il est recommandé de sélectionner le bon solvant sur l'écran de configuration de la pompe. Malgré le système de commande intelligent qui permet d'abaisser automatiquement les fluctuations de pression à un niveau minimum, la compressibilité du solvant peut avoir un effet sur la stabilité de la précision du débit à une pression élevée. Ceci garantit que les bonnes valeurs de compressibilité sont toujours appliquées pour les phases mobiles utilisées. Des fonctions d'étalonnage sont disponibles pour les pompes binaire et quaternaire Agilent 1290 Infinity.

Pour la pompe binaire 1290 Infinity, le volume de retard physique de la pompe dépend principalement de l'utilisation du mélangeur Jet Weaver. Pour la détection UV, le Jet Weaver doit toujours être utilisé, mais pour la détection par spectrométrie de masse l'utilisateur peut décider de contourner le Jet Weaver et ainsi gagner 35 μ l sur le volume de retard. Ceci est uniquement valable pour un fonctionnement avec des gradients ultra rapides (d'une durée inférieure à 0,5 min) ou lors de l'utilisation de colonnes de très faible volume. Le [Tableau 6](#), page 46 présente l'effet sur le temps de retard dans le système. En cas de contournement du Jet Weaver, la tubulure de raccordement à l'échan-

tillonneur automatique est acheminée directement depuis le clapet de purge. Assurez-vous que le Jet Weaver a été rincé avec du solvant ne contenant pas de tampons ou d'autres additifs avant de le déconnecter.

Il est parfois préférable d'augmenter le volume de retard dans la pompe. Ceci peut plus particulièrement être le cas si la détection UV est utilisée et si un composant à forte absorption UV a été ajouté à la phase mobile. Ceci peut avoir pour effet d'accentuer le bruit de fond de la pompe. L'exemple le plus courant en est l'utilisation d'acide trifluoroacétique (TFA) pour l'analyse de protéines et de peptides. Cet effet peut être atténué en augmentant le volume du mélangeur. Selon l'orientation de son montage, le Jet Weaver offre deux volumes de mélange possibles. Le passage du volume le plus faible, de 35 µl, au volume le plus élevé, de 100 µl, est effectué en le démontant, en le tournant d'avant en arrière, puis en le remettant en place. Le volume de mélange (et par conséquent le volume de retard) est augmenté de 65 µl et la performance de la ligne de base avec des additifs comme le TFA sera améliorée. La configuration du Jet Weaver est rapportée automatiquement par une étiquette RFID intégrée. Pour obtenir le bruit de ligne de base le plus bas possible lors d'applications exigeantes, un Jet Weaver de 380 µL est disponible. Il s'installe de la même manière que le mélangeur Jet Weaver standard.

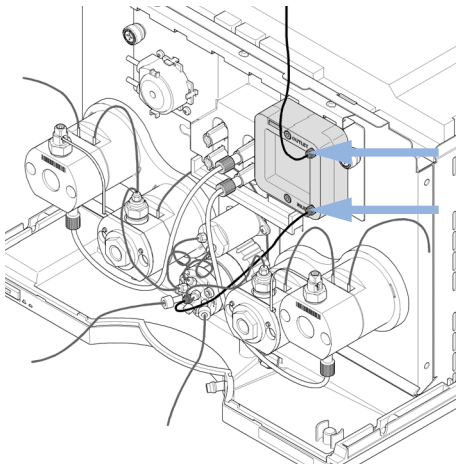
La procédure de remplacement d'un mélangeur Jet Weaver dans la pompe binaire 1290 Infinity est illustrée dans « [Remplacement du mélangeur Jet Weaver sur la pompe binaire 1290 Infinity](#) », page 50.

En raison d'une configuration et d'un principe de mélange différents pour la pompe quaternaire Agilent 1290 Infinity, le volume de retard physique est beaucoup plus important ; il n'est donc pas nécessaire d'ajouter de mélangeur Jet Weaver supplémentaire pour des applications standard. Toutefois, il est toujours possible d'installer en option un mélangeur Jet Weaver de 380 µL pour des applications exigeantes au niveau de la ligne de base, par exemple les applications à base de TFA. Le boîtier du mélangeur Jet Weaver facultatif est différent et adapté à la forme de la pompe quaternaire 1290 Infinity.

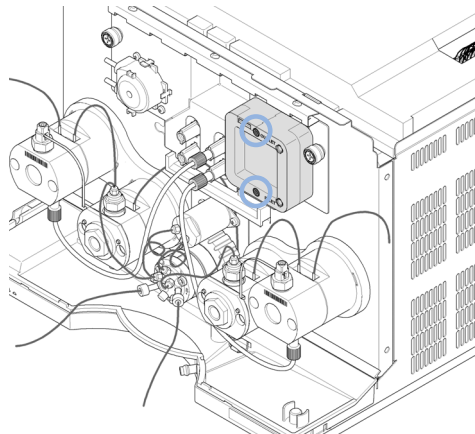
La procédure d'installation d'un mélangeur Jet Weaver dans la pompe quaternaire 1290 Infinity est illustrée dans « [Mise en place du mélangeur Jet Weaver V380 sur la pompe quaternaire 1290 Infinity](#) », page 51.

Remplacement du mélangeur Jet Weaver sur la pompe binaire 1290 Infinity

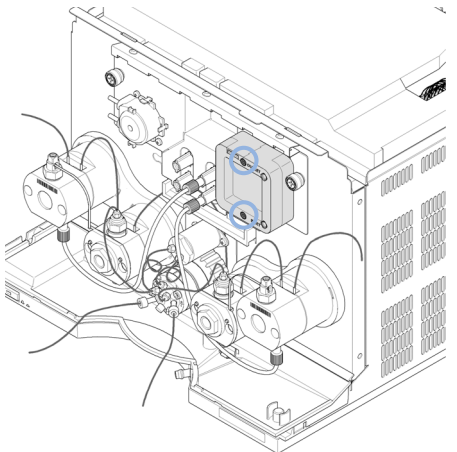
1 Débrancher les connexions capillaires du Jet Weaver.



2 Retirez les vis à six pans qui fixent le mélangeur Jet Weaver sur le boîtier de la pompe.



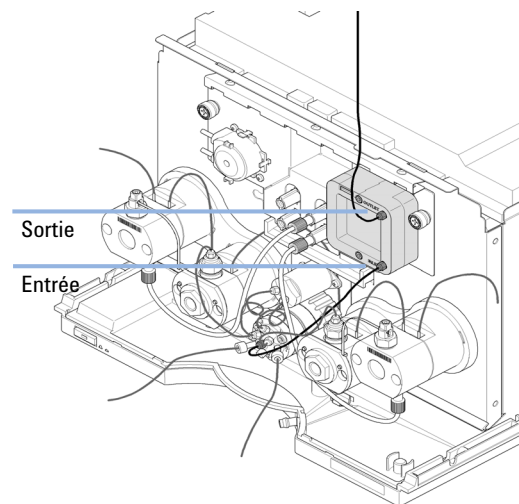
3 Mettez en place le nouveau mélangeur Jet Weaver.



REMARQUE

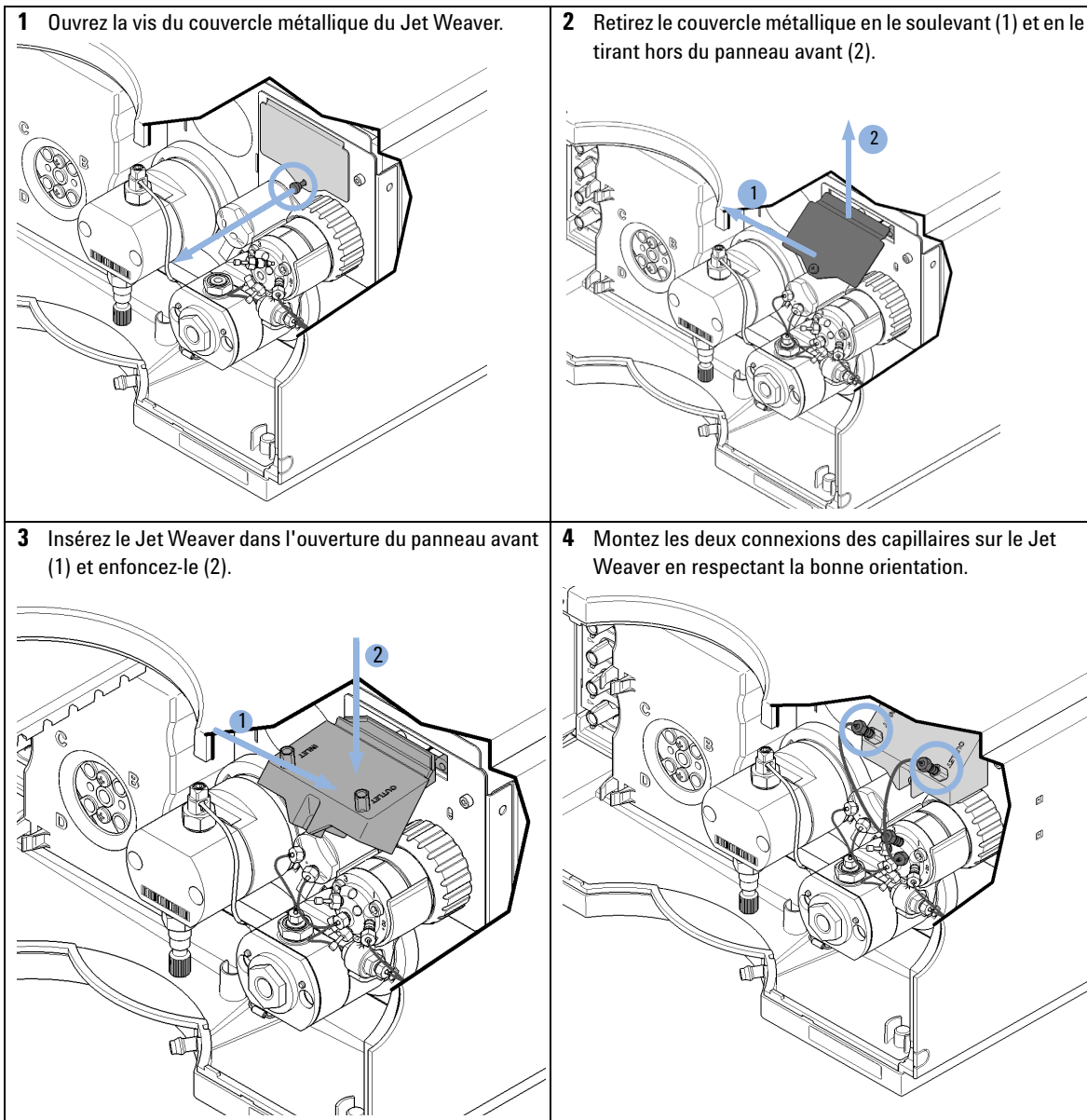
Les volumes internes des côtés avant et arrière du Jet Weaver sont différents (35 / 100 μ l) ; ils sont optimisés respectivement pour un volume de retard faible et une efficacité de mélange élevée.

4 Rebrancher les connexions capillaires.



L'entrée du bas du Jet Weaver est branché au port central une du clapet de la pompe par un capillaire (longueur 300 mm, 0,17 mm de d.i.). La sortie du dessus est branchée sur l'autoéchantillonneur.

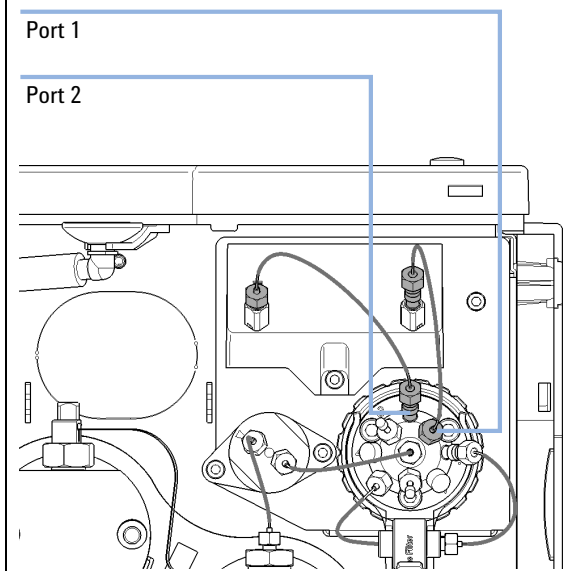
Mise en place du mélangeur Jet Weaver V380 sur la pompe quaternaire 1290 Infinity



3 Optimisation du système CPL Agilent 1290 Infinity

Configuration d'un volume de retard optimal

- 5 Connectez le capillaire d'entrée du Jet Weaver au port 2 du clapet multifonction. Connectez le capillaire de sortie au port 1.



Comment augmenter le volume d'injection

La configuration standard de l'échantillonneur automatique Agilent 1290 Infinity inclut une boucle d'échantillonnage à volume variable pour un maximum de 20 µl injections. Le doseur peut injecter un volume maximal de 40 µl et vous pouvez changer la cartouche de la boucle d'échantillonnage dans ce but (consultez le *Guide de l'échantillonneur automatique 1290 Infinity* pour des informations plus détaillées). Le volume mort du système dû à l'échantillonneur automatique augmente en conséquence.

Lorsqu'une méthode est réduite pour une plus petite colonne, il importe que la conversion de la méthode tienne compte de la réduction du volume d'injection proportionnellement au volume de la colonne pour conserver le niveau de performance de la méthode. Ceci permet de maintenir un pourcentage identique du volume d'injection par rapport à la colonne. Cet aspect est d'autant plus important que le solvant d'injection est plus fort (plus éluotrope) que le début de la phase mobile ; toute augmentation affecte la séparation, en particulier pour les pics précoces de l'analyse (faible facteur de rétention). Dans certains cas, il est à l'origine de la distorsion des pics. C'est pourquoi la règle générale consiste à maintenir un solvant d'injection similaire ou plus faible que la composition d'origine du gradient. Cela influe sur la possibilité et le niveau d'augmentation du volume d'injection. Vous devez surveiller les signes d'augmentation de la dispersion (pics plus larges ou plus inclinés et de résolution réduite) lorsque vous tentez d'augmenter le volume d'injection.

Lorsqu'une injection est effectuée dans un solvant faible, le volume peut probablement être augmenté davantage, car l'effet obtenu tend à concentrer l'analyte en haut de la colonne, au début du gradient. Inversement, si l'injection est effectuée dans un solvant plus fort que la phase mobile de départ, le volume d'injection augmenté répartit la bande d'analyte vers le bas de la colonne, avant le gradient, produisant une dispersion des pics et une perte de résolution.

Le point principal pour déterminer le volume d'injection est probablement le diamètre de la colonne, qui exerce un impact important sur la dispersion des pics. Les hauteurs de pics peuvent être plus élevées dans une colonne étroite qu'avec une injection plus importante dans une colonne plus large, car la dispersion des pics est moindre. Avec un diamètre intérieur de 2,1 mm, les volumes d'injection des colonnes varient généralement entre 5 et 10 µl, bien que cette valeur dépende largement de la chimie de l'analyte et de la phase mobile,

3 Optimisation du système CPL Agilent 1290 Infinity

Comment augmenter le volume d'injection

comme exposé plus haut. Vous pouvez obtenir une idée approximative du volume maximal d'injection en regardant le volume de la colonne (voir) ; dans une séparation de gradient, des volumes d'injection de 5 % environ du volume de la colonne peuvent être réalisés tout en maintenant un bon niveau de résolution et de dispersion des pics.

Pour réaliser des injections plus importantes, une méthode consiste à utiliser une colonne de piégeage sélectionnée à l'aide d'une vanne de commutation, afin de capter et de concentrer l'injection avant de la commuter, c'est-à-dire de l'injecter, dans une colonne analytique ; voir . La vanne peut être commodément située dans le compartiment à colonne thermostaté.

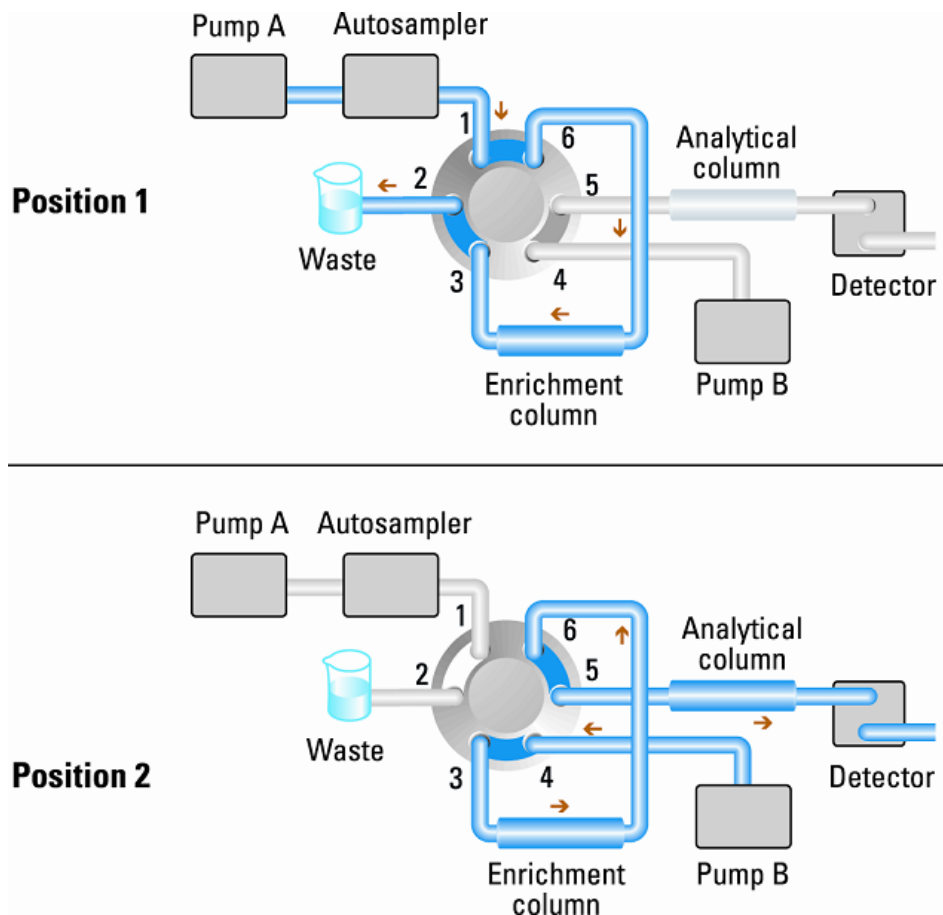


Figure 21 Enrichissement de l'échantillon

Comment améliorer la capacité d'analyse

Certains laboratoires fonctionnent dans un environnement de haut débit (HT) où la charge de travail requiert des centaines, voire des milliers, d'injections à exécuter pour achever un travail important. Dans ces situations, il est fortement recommandé de réduire les durées de cycle, car même quelques secondes économisées par injection réduiront la durée globale nécessaire à l'achèvement du travail d'un montant significatif et utile. Les principales étapes à suivre pour parvenir à des durées de cycle plus rapides et à des opérations de haut débit sont :

- Utiliser des séparations rapides
- Faire chevaucher les injections
- Réduire le temps de stabilisation
- Alternier la régénération des colonnes

La première étape permettant de parvenir à des opérations de hauts débits consiste à s'assurer que les méthodes utilisées ont de courtes durées de cycle, c.-à-d. que ce sont des méthodes de chromatographie rapide. L'utilisation de colonnes courtes avec un emballage de taille des particules de 1,8 µm est idéale à cet effet en raison de la haute disponibilité efficace d'une colonne courte. Si les méthodes impliquent une séparation isocratique, ceci permet d'obtenir des durées de cycle plus rapides, car aucune stabilisation de la colonne n'est requise entre les analyses. Cependant, les méthodes de gradient sont le plus souvent employées en raison de la plage de complexité des échantillons. En développant la méthode, la plage du gradient doit être conservée au minimum requis pour parvenir à la séparation. Dans de nombreux gradients de système « d'accès ouvert » analysant de 5 % à 95 %, des solvants organiques sont utilisés pour disposer d'une plus grande flexibilité quand il s'agit de traiter une gamme de composants inconnus. Dans la situation de haut débit, il faut essayer de déterminer si une plage plus petite suffira, sur la base que la plage de composants attendue pour l'analyse est réduite, et cela permettra de non seulement réduire le temps d'analyse, mais aussi de réduire le temps de stabilisation entre les analyses.

La durée du cycle se décompose en plusieurs éléments : Durée du cycle = injection + séparation + stabilisation + traitement des données.

3 Optimisation du système CPL Agilent 1290 Infinity

Comment améliorer la capacité d'analyse

Avec un grand nombre d'échantillons à traiter, même une petite réduction de la durée du cycle peut s'ajouter à une grande réduction de la durée globale pour achever le travail. Pour cette raison, le traitement des données peut être mis hors ligne pour permettre au système de se concentrer sur l'analyse des échantillons et le recueil des données.

L'injection peut être optimisée pour la vitesse, en n'oubliant pas qu'une aspiration trop rapide du solvant peut réduire la reproductibilité. On peut faire ici des gains marginaux, car les volumes d'échantillon utilisés tendent à se diriger vers la plus petite extrémité de la plage dans tous les cas. Une partie significative du temps d'injection est le temps pris par les mouvements de l'aiguille vers et depuis le flacon et vers le port de rinçage. Ces manipulations peuvent être exécutées pendant l'analyse de la séparation précédente. C'est ce que l'on appelle le « chevauchement d'injections » qui peut être facilement activé depuis l'écran des réglages de l'échantillonneur automatique dans le logiciel de commande de la ChemStation. On peut ordonner à l'échantillonneur automatique de diriger le circuit vers l'échantillonneur automatique à dévier après que l'injection ait été effectuée, puis après, par exemple, 3 minutes dans une analyse de 4 minutes, de démarrer le processus d'aspiration de l'échantillon suivant et de préparation pour l'injection. Ceci peut généralement permettre de gagner de 0,5 à 1 minute par injection. Pour ce qui concerne les composants collants, il est recommandé de procéder à ceci pendant la stabilisation de la colonne, après que l'échantillonneur automatique ait vu les conditions de démarrage de la prochaine analyse de gradient.

L'étape de stabilisation de la colonne peut représenter une partie significative de la durée du cycle. En général, la colonne doit être rincée avec de trois à cinq fois le volume de la colonne pour la stabiliser et qu'elle soit prête pour l'injection suivante, et ceci peut représenter 50 % ou plus du temps de séparation dans certaines applications. C'est un processus très important, mais il peut être éliminé de la durée du cycle en utilisant la régénération alternée automatique de la colonne. Pour ce faire, une tête de vanne deux-positions dix-voix, 1 200 bars, est requise dans le compartiment à colonnes ; une seconde colonne analytique, identique à la première ; et une deuxième pompe est nécessaire. Étant donné qu'une colonne est utilisée dans l'analyse de séparation, l'autre colonne est en cours de rinçage avec la composition de démarrage du gradient de phase mobile et, pour démarrer l'injection, la colonne récemment restabilisée est commutée au circuit analytique. Les deux colonnes sont donc alternées de cette manière pour toute la séquence des injections. La deuxième pompe sert uniquement à rincer un mélange isocratique dans la colonne et peut donc être une pompe plus simple que les pompes Infinity 1290. Par exemple, une pompe isocratique de la série 1200 sera suffi-

sante pour exécuter cette tâche. L'installation est illustrée dans Figure 22, page 57.

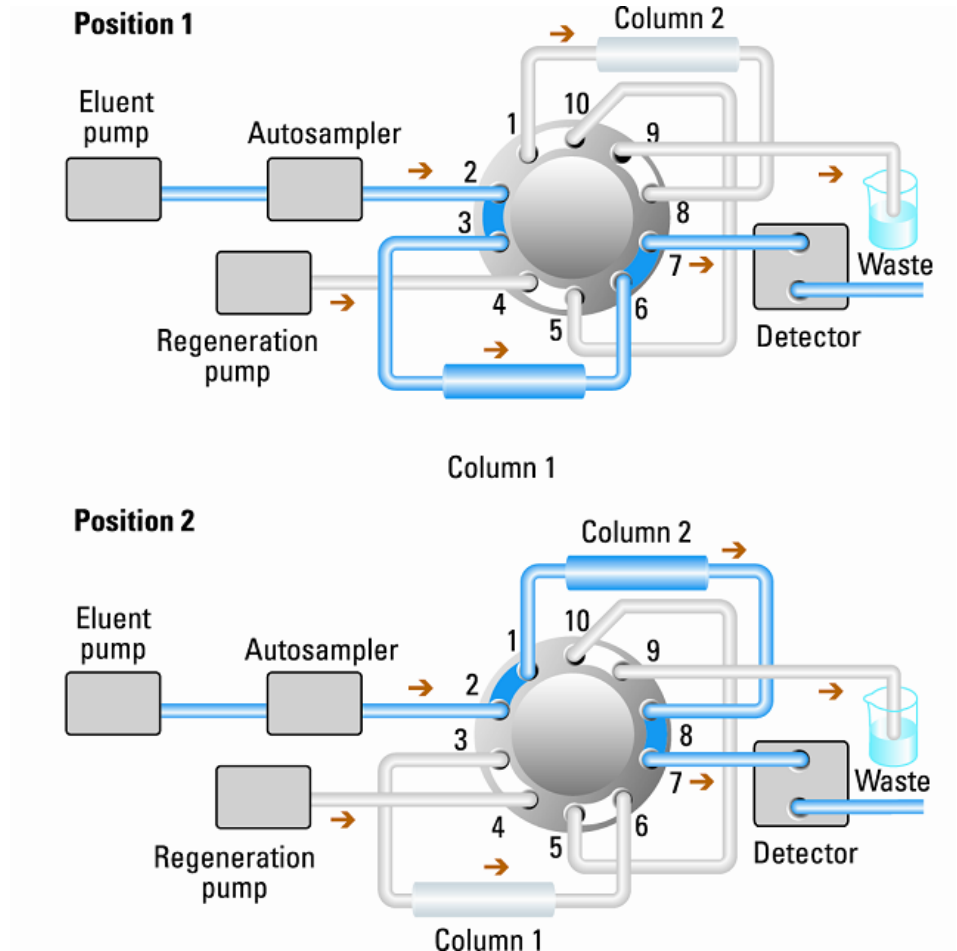


Figure 22 Alternance de la régénération des colonnes

Comment améliorer la résolution

L'augmentation de la résolution d'une séparation améliore les données sur les plans qualitatif et quantitatif, permet de séparer plus de pics et ouvre des perspectives sur l'accélération de la séparation. Ce chapitre examine comment améliorer la résolution à partir des points suivants :

- optimisation de la sélectivité ;
- remplissage avec des particules de granulométrie plus faible ;
- utilisation de colonnes plus longues ;
- utilisation de gradients moins abrupts, de débits plus élevés ;
- réduction maximale des volumes hors-colonne
- optimisation de l'injection du solvant et du volume injecté ;
- acquisition suffisamment rapide des données ;

La résolution entre deux pics est obtenue en résolvant l'équation suivante :

$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} \frac{(\alpha - 1)(k_2 + 1)}{\alpha k_2}$$

avec :

- R_s = résolution ;
- N = nombre de plateaux plate count (mesure de l'efficacité de la colonne) ;
- α = sélectivité (entre deux pics) ;
- k_2 = facteur de rétention du second pic (paramètre autrefois dénommé facteur de capacité).

Le terme ayant la plus grande influence sur la résolution est la sélectivité, α . Dans la pratique, on agit sur ce terme en changeant le type de phase stationnaire (C18, C8, phényle, nitrile, etc.), la phase mobile et la température afin de rechercher la sélectivité maximale entre les différents solutés à séparer. Cela représente un travail considérable que l'on effectue au mieux à l'aide d'un système de développement automatisé de méthodes. Un tel système permet d'évaluer le comportement de différentes colonnes dans toute une gamme de conditions au moyen d'un protocole exploratoire. Ce chapitre s'intéresse à l'obtention de la résolution la plus élevée possible pour toutes les associations

de phases stationnaires et mobiles. Si un système de développement automatisé des méthodes est utilisé pour le choix des phases, il est probable que des colonnes courtes soient utilisées pour accélérer les analyses et chaque étape de l'exploration.

L'équation de la résolution fait apparaître que le terme le plus important est le nombre de plateaux (ou l'efficacité) N . Il peut être optimisé de bien des façons différentes. N est inversement proportionnel à la granulométrie et directement proportionnel à la longueur de la colonne par conséquent, les particules les plus petites et les colonnes les plus longues donneront un nombre de plateaux supérieur. La pression augmente en proportion inverse du carré de la granulométrie et en proportion directe de la longueur de la colonne. C'est la raison pour laquelle le système de LC 1290 Infinity a été conçu pour atteindre 1200 bar et ainsi exploiter des particules d'une granulométrie inférieure à 2 microns et les colonnes d'une longueur portée à 100 mm ou 150 mm. Il existe même des exemples de colonnes de 100 mm et 150 mm connectées en série pour obtenir une longueur de 250 mm. La résolution augmente comme la racine carrée de N , donc en doublant la longueur de la colonne on augmente la résolution d'un facteur 1,4. La viscosité de la phase mobile détermine les possibilités car elle conditionne directement la pression. Les mélanges à base de méthanol entraînent une perte de charge plus élevée que les mélanges à base d'acétonitrile. Au-delà de sa plus faible viscosité, l'acétonitrile est souvent choisi parce que la forme des pics est meilleure et les pics plus étroits. En revanche, le méthanol induit généralement une meilleure sélectivité (à coup sûr pour les plus petites molécules de moins de 500 Da). Il est possible de réduire la viscosité en augmentant la température, mais il faut se souvenir que la température influence la sélectivité de la séparation. L'expérience permet de savoir si c'est en bien ou en mal. Comme le débit et la pression sont augmentés, il faut tenir compte que l'échauffement dû aux frictions à l'intérieur de la colonne augmente et que cela peut entraîner une augmentation notable de la dispersion et le cas échéant, un léger changement de sélectivité qui pourraient tous deux entraîner une perte de résolution. Cette dernière éventualité peut être combattue en réduisant la température du thermostat de quelques degrés. Une nouvelle analyse permettra alors de trancher.

La courbe de van Deemter indique que le débit optimal dans une colonne STM est plus élevé pour les particules les plus fines et les granulométries les plus élevées. On notera que la pente de la courbe reste faible au-delà du débit optimal. En général pour les colonnes STM les débits utilisés proches de l'optimum sont : 2 ml/min pour un d.i. de colonne de 4,6 mm, et 0,4 ml/min pour un d.i. de colonne de 2,1 mm.

3 Optimisation du système CPL Agilent 1290 Infinity

Comment améliorer la résolution

Dans les séparations isocratiques, l'augmentation du facteur de rétention k , entraîne une augmentation de la résolution car les solutés sont retenus plus longtemps. Dans les séparations en gradient, k^* représente la rétention dans l'équation suivante :

$$k^* = \frac{t_G}{\Delta\%B} \cdot \frac{F}{V_m} \cdot \frac{100}{S}$$

avec :

- k^* = valeur moyenne de k ;
- t_G durée du gradient (ou du segment de gradient), en min ;
- F = débit (ml/min) ;
- V_m = volume mort de la colonne ;
- $\Delta\%B$ = modification de la fraction du solvant B en cours de gradient ;
- S = constante (env. 4 à 5 pour les petites molécules).

Cette équation indique que k et par conséquent la résolution peuvent être augmentés en utilisant un gradient à plus faible pente (en général, une pente de 2 à 5 %/min convient), un débit plus élevé et un faible volume de colonne. Cette équation montre également comment accélérer un gradient existant : si le débit est doublé, mais que la durée du gradient est divisée par deux, k^* reste constant et la séparation similaire, mais deux fois plus rapide. Les dernières recherches publiées montrent que pour une température supérieure à 40 °C, une colonne STM courte fait preuve d'une capacité de pics supérieure à une colonne STM longue parce qu'elle opère plus rapidement. (Cf. *Petersson et al., J.Sep.Sci., 31, 2346-2357, 2008, Maximizing peak capacity and separation speed in liquid chromatography [Optimisation de la capacité de pics et de la vitesse de séparation en chromatographie liquide]*).

Toute réduction du volume hors colonne réduit la dispersion et améliore la résolution. Ce paramètre est déjà optimisé dans les systèmes de LC 1290 Infinity avec capillaires de faible diamètre (narrow bore 0,12 mm) et la cellule à cartouche Max-light (s'assurer que la longueur la plus faible possible est utilisée entre la colonne et le détecteur).

Enfin, toute amélioration de la résolution sera préservée si l'acquisition des données est suffisamment rapide pour échantillonner finement les pics les plus étroits.

Comment améliorer la sensibilité

Comment obtenir une sensibilité plus élevée

La sensibilité d'une méthode de séparation est liée au choix des phases statique et mobile, car il est souhaitable d'obtenir une bonne séparation avec des pics étroits et une ligne de base stable avec un minimum de bruit. Le choix de configuration de l'instrument exerce un effet, et l'impact principal réside dans la configuration du détecteur. Cette section étudie de quelle façon la sensibilité est affectée par les aspects suivants :

- Volume de la pompe du mélangeur
- Colonnes de plus faible diamètre
- Cuve à circulation du détecteur
- Paramètres du détecteur

En outre, l'étude des paramètres du détecteur mentionne également les thèmes liés de sélectivité et de linéarité.

Volume de la pompe du mélangeur

Pour obtenir le plus faible bruit de ligne de base avec une détection UV, la configuration du volume mort standard avec le Jet Weaver 35 µl est conseillée pour le module de pompe 1290 Infinity. Cela est valable pour pratiquement toutes les applications mais, lorsque le TFA est utilisé en phase mobile, ou dans d'autres circonstances exigeant davantage de mélange, le côté du plus grand volume du mélangeur Jet Weaver doit être utilisé pour diminuer le bruit de mélange.

Colonnes

La sensibilité étant spécifiée sous forme de rapport signal/bruit (S/N), il est nécessaire d'optimiser la hauteur de pics et de diminuer le bruit de la ligne de base. Toute réduction de la dispersion des pics contribue à maintenir leur hauteur. Par conséquent, le volume de colonne supplémentaire doit être diminué en utilisant un faible diamètre intérieur, des capillaires de raccordement et des raccords correctement installés. L'utilisation de colonnes de plus faible diamètre doit produire des hauteurs de pics supérieures, et convient donc

3 Optimisation du système CPL Agilent 1290 Infinity

Comment améliorer la sensibilité

idéalement aux applications avec un nombre limité d'échantillons. Si la même quantité d'échantillon peut être injectée dans une colonne de plus faible diamètre intérieur, la dilution due à ce même diamètre est moindre et la sensibilité augmentée. Par exemple, diminuer le diamètre intérieur de la colonne de 4,6 mm à 2,1 mm produit un gain théorique de hauteur de pics de 4,7 fois grâce à une moindre dilution dans la colonne. Dans le cas d'un détecteur de spectromètre de masse, le débit inférieur des colonnes de faible diamètre peut produire une efficacité supérieure et par conséquent une plus grande sensibilité.

Comment parvenir à une meilleure sensibilité pour le détecteur

Le détecteur est doté d'un certain nombre de paramètres que l'on peut utiliser pour optimiser ses performances. Les sections suivantes décrivent la manière dont les paramètres du détecteur affectent les caractéristiques de performance :

- La cuve à circulation affecte la sensibilité ;
- La longueur d'onde et la bande passante affectent la sensibilité, la sélectivité et la linéarité ;
- La largeur de fente affecte la sensibilité, la résolution spectrale et la linéarité.
- La largeur de pic affecte la sensibilité et la résolution.

Cuve à circulation

La cuve de type cartouche Max-Light a une distance déterminée standard de 10 mm et elle est optimisée pour un volume et une dispersion minimale (σ volume 1,0 μL). Elle est dotée d'une haute transmission de lumière réduisant au maximum le bruit dû au guide d'ondes optofluidique. Elle convient pour un usage avec une vaste gamme de colonnes analytiques, des courtes colonnes de faible diamètre aux longues colonnes d'un diamètre standard (4,6 mm). En général, le volume de dispersion du pic (calculé en multipliant la largeur de pic par le débit) doit être supérieur d'environ 2 μL pour cette cuve (par exemple 0,02 min x 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ = 4 μL).

La cuve haute sensibilité Max-Light a une longueur de trajet de 60 mm et ceci augmentera de trois à cinq fois les valeurs signal-vers-bruit en fonction des conditions de l'application. Le volume de dispersion augmente légèrement plus que celui de la cuve standard.

Longueur d'ondes et bande passante

Le détecteur mesure l'absorbance simultanément à des longueurs d'onde de 190 nm à 640 nm à l'aide d'une détection à barrette de diodes. Une lampe UV donne une bonne sensibilité sur toute la gamme de longueurs d'onde. Le détecteur à barrette de diodes (DAD) peut simultanément calculer et envoyer au système de données jusqu'à huit signaux chromatographiques et toute la gamme de spectres à chaque point temporel.

3 Optimisation du système CPL Agilent 1290 Infinity

Comment améliorer la sensibilité

Un chromatogramme ou un signal UV est un tracé de données d'absorbance en fonction de la durée, et il est défini par sa longueur d'ondes et sa bande passante.

- La longueur d'ondes indique le centre de la bande de détection.
- La bande passante définit la gamme de la longueur d'ondes sur laquelle est calculée la valeur moyenne de l'absorbance pour donner un résultat à chaque point temporel.

Par exemple, un signal d'une longueur d'onde de 250 nm avec une bande passante de 16 nm sera une moyenne des données d'absorbance de 242 nm à 258 nm. Il est de plus possible de définir une longueur d'ondes de référence et une bande passante de référence pour chaque signal. L'absorbance moyenne calculée depuis la bande passante de référence centrée sur la longueur d'ondes de référence sera soustraite de sa valeur équivalente à la longueur d'ondes du signal pour produire le chromatogramme de sortie.

On peut choisir la longueur d'ondes et la bande passante du signal afin de pouvoir les optimiser pour :

- détection universelle de bande large ;
- détection sélective de bande étroite ;
- sensibilité pour une analyte particulière.

La bande large ou la détection universelle travaillent avec une large bande passante permettant de détecter toute espèce ayant une absorbance dans cette gamme. Par exemple, pour détecter toutes les molécules absorbantes entre 200 nm et 300 nm, paramétrez un signal à 250 nm avec une bande passante de 100 nm. L'inconvénient de cette méthode est que la sensibilité ne sera pas optimale pour une quelconque de ces molécules. On utilise plus souvent une bande étroite ou une détection sélective. Le spectre UV pour une molécule particulière est analysé, et un maximum d'absorbance approprié est sélectionné. Si possible, évitez la gamme dans laquelle les solvants absorbent fortement (inférieure à 220 nm pour le méthanol, inférieure à 210 nm pour l'acétonitrile). Par exemple, dans la [Figure 23](#), page 66, l'acide anisique affiche un maximum d'absorbance convenable à 252 nm. Une bande passante étroite de 4 nm à 12 nm donne généralement une bonne sensibilité, elle est spécifique à l'absorbance dans une gamme étroite.

On peut optimiser la bande étroite pour la sensibilité d'une molécule particulière. Étant donné que la bande passante est augmentée, le signal est réduit, mais il en est de même pour le bruit et il y aura un rapport signal/bruit optimal. Comme guide approximatif, ce rapport optimal est souvent proche de la

bande passante naturelle à mi-hauteur de la bande d'absorption dans le spectre UV. Dans l'exemple de l'acide anisique, le rapport est égal à 30 nm.

La longueur d'ondes analytique est habituellement réglée à un maximum de longueur d'ondes afin d'augmenter la sensibilité de cette molécule. Le détecteur est linéaire jusqu'à 2 AU et au-delà pour de nombreuses applications. Ceci offre une vaste gamme linéaire pour la concentration. Pour des analyses de haute concentration, la gamme linéaire de concentration peut être étendue en réglant la longueur d'ondes sur un avec une plus faible absorbance telle qu'un minimum de longueur d'ondes, ou en choisissant une bande passante plus large qui comporte généralement des valeurs d'absorbance plus faibles. L'utilisation d'un maximum et d'un minimum de longueur d'ondes pour quantification remonte à l'époque des détecteurs UV traditionnels qui, à cause des tolérances mécaniques pour le déplacement des réseaux, devaient éviter les parties en pente raide du spectre. Les détecteurs basés sur la technologie de la barrette de diodes ne souffrent pas de cette limitation, mais, pour des raisons de convention, le maximum et le minimum sont choisis de préférence à d'autres parties du spectre.

La bande passante de référence est normalement paramétrée sur une région du spectre UV dans laquelle l'analyte n'a pas d'absorbance. Ceci est illustré pour le spectre de l'acide anisique dans la [Figure 23](#), page 66. Ce spectre est typique pour de nombreuses petites molécules comportant un chromophore UV. Pour obtenir de meilleurs résultats, la référence a été paramétrée afin que ce soit une bande large aussi proche de la longueur d'ondes du signal que possible, mais sur une région d'absorbance zéro. Des bandes passantes de référence de 60 nm à 100 nm sont couramment utilisées. La référence par défaut est 360 nm avec une bande passante de 100 nm. On utilise une large bande passante parce que cela réduit le bruit dans le signal de référence (depuis la théorie statistique, l'erreur, c.-à-d. que le bruit, dans ce cas, est réduit par la racine carrée du nombre de déterminations). Il est important que la bande passante de référence ne s'étende pas jusqu'à une partie du spectre ayant quelque absorbance, car cela réduirait alors le signal résultant et la sensibilité serait également réduite. L'utilisation d'une longueur d'ondes de référence peut aider à réduire la dérive ou les variations dans le chromatogramme induites par les changements de l'indice de réfraction dus aux fluctuations de la température ambiante ou à l'opération du gradient. On peut facilement tester l'effet d'un signal de référence en paramétrant deux signaux autrement identiques, l'un avec un signal de référence, et l'autre sans signal de référence. Si aucune partie du spectre ne présente une absorbance zéro, il sera alors préférable de désactiver le signal de référence.

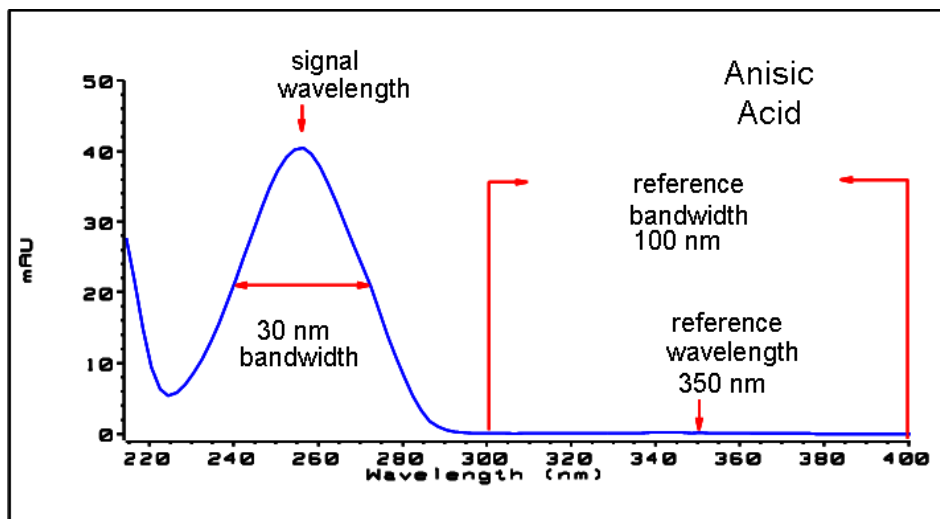


Figure 23 Spectre de l'acide anisique

Largeur de fente (G4212A uniquement)

La transmission de la lumière dans le spectrographe et dans la bande passante optique est contrôlée par la fente d'entrée à ouverture variable. Le paramètre par défaut pour la largeur de fente est 4 nm, ce qui est approprié pour la majorité des applications car il permet d'obtenir une bonne performance globale. Les caractéristiques de performance affectées sont la sensibilité, la résolution spectrale et la linéarité. Pour une longueur d'ondes particulière entrant dans le spectrographe, sa lumière tombera sur une petite bande de diodes, dont la largeur est proportionnelle à celle de la fente d'entrée. La description de la fente de 4 nm décrit ce comportement – la lumière tombe sur le nombre de diodes qui détectent une bande passante de 4 nm. Il s'ensuit que la résolution optique minimum sera de 4 nm ; par conséquent, la bande passante de la barrette de diodes (ou numérique) devra être paramétrée sur 4 nm ou plus. Pour obtenir une sensibilité optimale, le réglage sur 8 nm permettra de laisser entrer plus de lumière et réduira le bruit au maximum, mais la résolution spectrale sera à sa plus faible valeur. Ce n'est généralement pas un problème avec les spectres UV car leurs bandes passantes naturelles sont habituellement supérieures à 25 nm sans aucune structure fine. La bande passante optique de 8 nm réduit la gamme de linéarité par rapport à une fente de 4 nm, il est donc important qu'une méthode validée emploie la largeur de fente utilisée pour la validation. Pour obtenir une résolution spectrale optimale, le meilleur paramètre doit être de 1 nm. Ceci permettra de résoudre une structure fine telle

que celle du spectre du benzène (voir la [Figure 24](#), page 67). Très peu de composants affichent ces fins détails dans les spectres d'une solution. Le niveau de lumière sera plus faible et le signal émettra donc moins de bruit - le niveau sonore dépend de la longueur d'ondes et des solvants de phase mobile utilisés.

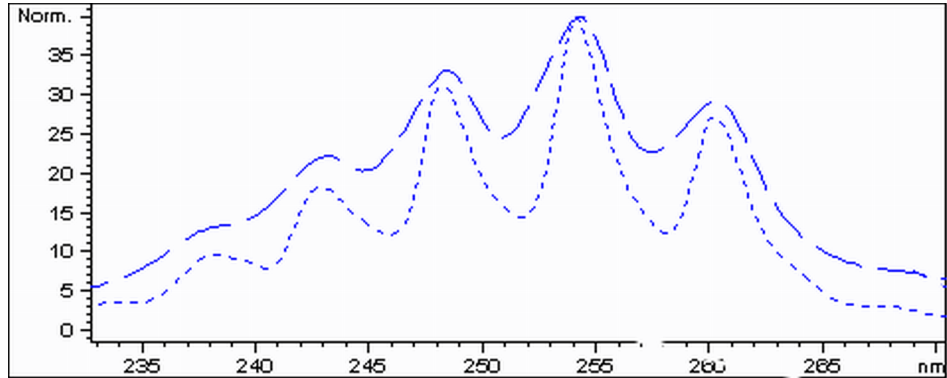


Figure 24 Benzène à une largeur de fente de 1 et 4 nm (principe)

Le volume d'injection et le solvant de dissolution de l'échantillon sont importants pour contrôler la dispersion. Il faut s'assurer que les composants soient concentrés dans le haut de la colonne, afin d'éviter une dispersion du pic due à l'injection, ce qui pourrait réduire la hauteur du pic. Pour ce faire, l'échantillon doit être dissout dans une composition de solvant d'une force d'éluion plus faible que la phase mobile. Il est possible d'augmenter le volume d'injection pour obtenir une plus grande concentration d'analytes sur la colonne, et par conséquent augmenter la hauteur du pic.

Reportez-vous aux commentaires en « [Comment augmenter le volume d'injection](#) », page 53.

Largeur de pic, temps de réponse et débit de recueil des données

Le paramétrage de largeur du pic, le temps de réponse et le débit des données dans le détecteur sont tous reliés entre eux. Les paramètres disponibles sont indiqués dans le . Il est important de paramétrer ceci correctement afin d'obtenir une sensibilité optimale et pour préserver la résolution obtenue dans la séparation.

Le détecteur acquiert en interne les points de données plus rapidement que nécessaire pour un chromatogramme et les traite pour produire le signal perçu par le système de données. Une partie du processus réduit les données à un débit de données approprié, ce qui permet de tracer des pics chromatographiques précis. Comme pour la plupart des déterminations analytiques, une moyenne des groupes de lectures est effectuée afin de réduire les erreurs dans le résultat. Le détecteur regroupe les points de données et produit le signal de sortie au débit de recueil des données requis au moyen d'un processus électronique de filtrage. Si le débit de données résultant est trop faible (surfiltrage), les hauteurs de pic seront réduites et la résolution entre eux sera réduite ; trop rapide et les données seront plus bruyantes que nécessaire pour obtenir un profil précis des pics étroits.

Le paramétrage de la *largeur du pic* dans le détecteur permet à l'utilisateur de régler correctement ces paramètres sans connaissances nécessaires autres que la lecture des résultats d'intégration du chromatogramme pour voir la largeur des pics. Le paramètre de largeur du pic doit être réglé pour la largeur de pic la plus étroite observée dans le chromatogramme. S'il est réglé sur une trop grande largeur, les pics seront moins hauts et plus larges (et avec une résolution éventuellement plus faible) ; s'il est réglé sur une largeur trop étroite, cela augmentera inutilement le bruit de la ligne de base. Le logiciel utilise principalement cette valeur pour régler le *débit de recueil des données* de manière à ce qu'il recueille suffisamment de points de données au-dessus des pics les plus étroits, visant à obtenir de 15 à 25 points par pic. Le DAD Infinity 1290 peut recueillir des données à un maximum de 160 Hz si nécessaire, ce qui permettrait de recueillir suffisamment de points de données au-dessus d'un pic d'une largeur de 0,1 s seulement. Le paramétrage du *temps de réponse* est un autre moyen d'identification du réglage du filtrage. Il est mesuré en secondes et représente environ un tiers de la valeur de largeur du pic (qui est mesurée en minutes). Il indique avec efficacité la vitesse à laquelle le signal tracé répond à un changement de pas dans le signal d'entrée.

Tableau 8 Largeur de pic — Temps de réponse — Débit de données

Largeur de pic à mi-hauteur [mn] ¹	Réponse [s]	Débit des données du signal [Hz]
< 0,0015625	0,015625	160
> 0,0015625	0,03125	160
> 0,003125	0,0625	80
> 0,00625	0,125	40
> 0,0125	0,25	20
> 0,025	0,5	10
> 0,05	1,0	5
> 0,10	2,0	2,5
> 0,20	4,0	1,25
> 0,40	8,0	0,625
> 0,85	16,0	0,3125

¹ Les valeurs peuvent être arrondies dans l'interface utilisateur.

Comment minimiser le transfert

L'effet mémoire est mesuré lorsque des pics résiduels issus d'une injection précédente contenant des actifs apparaissent dans l'injection suivante avec un solvant neutre. L'effet mémoire entre injections actives peut conduire à des résultats erronés. Le niveau d'effet mémoire est reporté en termes de zone de pic dans la solution neutre, exprimé en pourcentage de la zone dans l'injection active précédente. L'échantillonneur automatique Agilent 1290 Infinity est optimisé pour produire un faible effet mémoire, grâce à la conception étudiée du circuit et l'utilisation de matériaux qui minimisent l'adsorption de l'échantillon. Une valeur d'effet mémoire de 0,002 % doit être réalisable, même lorsque le détecteur est un spectromètre de masse à triple quadripôle. Les réglages fonctionnels de l'échantillonneur automatique permettent de définir les paramètres appropriés afin de diminuer l'effet mémoire dans toutes les applications impliquant des composés susceptibles de coller dans le système.

Les fonctions suivantes de l'échantillonneur automatique peuvent contribuer à diminuer l'effet mémoire :

- Rinçage interne de l'aiguille
- Rinçage externe de l'aiguille
- Rétrobalayage du siège de l'aiguille
- Nettoyage de la vanne d'injection

Le circuit, intérieur de l'aiguille compris, est continuellement rincé en fonctionnement normal, assurant l'élimination adéquate de l'effet mémoire dans la plupart des cas. La réduction automatique du volume mort (ADVR) diminue ce dernier, mais aussi le rinçage de l'échantillonneur automatique ; elle ne doit pas être utilisée avec des analytes susceptibles de poser un problème d'effet mémoire.

L'extérieur de l'aiguille peut être rincé à l'aide d'un flacon de rinçage situé à un emplacement spécifique, ou en utilisant l'orifice de rinçage. Lorsque vous utilisez un flacon de rinçage situé à un emplacement de votre choix, ce flacon doit être exempt de septum et contenir un solvant convenant au rinçage de l'échantillon de l'aiguille. L'absence de septum évite la contamination par essuyage de l'aiguille en aval, pour le réappliquer lors de sa course ascendante. L'aiguille peut être plongée dans le flacon à plusieurs reprises. Cette méthode est effi-

cace pour éliminer un léger effet mémoire mais il est préférable d'utiliser l'orifice de rinçage pour plus d'efficacité à l'extérieur de l'aiguille.

L'orifice de rinçage est situé au-dessus et à l'arrière du siège de l'aiguille, et une pompe péristaltique distribue le solvant de rinçage. Sa capacité est de 0,68 ml et la pompe péristaltique distribue 6 ml/min, ce qui signifie que le volume de l'orifice de rinçage est entièrement rempli de solvant propre en 7 s. Si vous choisissez l'orifice de rinçage, vous pouvez définir la durée de rinçage de l'extérieur de l'aiguille dans le solvant propre. Cette durée peut être limitée à deux ou trois secondes dans les circonstances où l'effet mémoire ne pose guère de problème, ou atteindre 10 à 20 s pour un rinçage plus complet. Le rinçage de l'extérieur de l'aiguille dans l'orifice de rinçage est conseillé en procédure standard pour éviter de contaminer le siège de l'aiguille. Une fois contaminé, le siège de l'aiguille doit faire l'objet d'un rétrobalayage, en changeant manuellement les raccords du circuit pour le nettoyer. C'est l'une des tâches qui peuvent être automatisées avec le module Flexible Cube.

L'orifice de rinçage et sa pompe de distribution de solvant et ses tubulures doivent être régulièrement rincés pour obtenir l'effet mémoire le plus faible. Par exemple, amorcez la pompe de rinçage avec le solvant approprié pendant trois minutes chaque jour avant d'utiliser le système.

Lorsque les autres méthodes ont échoué pour éliminer l'effet mémoire, il est possible que l'analyte soit collé à l'intérieur de la vanne d'injecteur. La vanne d'injecteur peut être réglée de façon à exécuter des mouvements de commutation supplémentaires pour nettoyer le circuit dans la vanne si des problèmes d'effet mémoire se posent. Si l'élution des composés problématiques nécessite un fort pourcentage de phase organique, il est conseillé de commuter la vanne d'injection sur un haut pourcentage de phase organique après élution du dernier pic. Il est également conseillé de commuter à nouveau la vanne d'injection une fois les conditions initiales de la phase mobile stabilisées. Ainsi, la rainure de dérivation dans le joint de rotor de la vanne présente les conditions de départ du gradient, aspect particulièrement important pour les débits inférieurs à 0,5 ml/min.

Avec les échantillons pour lesquels l'extérieur de l'aiguille ne peut pas être nettoyé suffisamment avec de l'eau ou de l'alcool provenant de la pompe de rinçage, utilisez des flacons de rinçage contenant un solvant approprié. Avec un programme d'injection, il est possible d'utiliser plusieurs flacons pour le nettoyage.

Comment empêcher les obstructions de colonne

Comme pour tout système HPLC, il faut veiller à éviter toute obstruction partielle ou totale de la colonne ou de la tubulure du système par inadvertance. Les problèmes dus à l'introduction involontaire de matériaux dans le système peuvent généralement être évités en prenant les mesures suivantes :

- Filtrez les solvants,
- Filtrez les échantillons,
- Remplacez régulièrement les phases mobiles,
- Éliminez les sels des solutions tampon du système par rinçage.

Une source inévitable de particules est le système lui-même. Comme pour tous les systèmes HPLC, les joints s'usent en libérant des particules qui se retrouvent piégées dans les frittés du système, ce qui rend le remplacement systématique des ces derniers nécessaire. Les colonnes remplies de particules sub-2-microniques nécessitent en plus des frittés avec des pores de faible diamètre pour empêcher le matériau de remplissage d'être entraîné hors de la colonne. Cela accroît le risque d'obstruer ces frittés avec des particules contenues dans les échantillons ou la phase mobile et provenant de l'instrument lui-même.

Respectez les recommandations d'utilisation simples suivantes afin d'optimiser vos résultats :

- 1** Installez et utilisez la colonne seulement dans le sens d'écoulement indiqué sur la colonne.
- 2** Utilisez uniquement des solvants d'un niveau de qualité élevée pour chromatographie.
- 3** Filtrez tous les tampons aqueux et tous les échantillons à l'aide d'un 0,2 µm filtre approprié avant de les utiliser.
- 4** Remplacez les flacons de phase mobile au moins tous les deux jours. N'ajoutez pas de phase mobile à un flacon déjà utilisé ; utilisez toujours un flacon neuf.
- 5** N'utilisez pas de phase mobile tamponnée à forte concentration en sel (> 50 mM) avec des concentrations élevées d'acétonitrile en raison du risque de précipitation.

- 6 Utilisez l'accessoire de rinçage des joints avec des phases mobiles tamponnées à forte concentration en sel.
- 7 Il est recommandé d'utiliser un filtre en ligne (filtre en ligne 1290 Infinity, diamètre de 2 mm, référence: 5067-4638) pour piéger les particules et rallonger la durée de vie de la colonne.
- 8 Remplacez le filtre lorsque la pression s'accroît de 10 %.
- 9 Purgez les pompes (et les raccords jusqu'à la colonne) de toute phase mobile tamponnée et faites passer 5 ml de solvant avant d'installer la colonne dans l'instrument.
- 10 Purgez la colonne avec une phase mobile compatible en commençant à un débit de 0,1 ml/min pour une colonne de diamètre interne de 2,1 mm, de 0,2 ml/min pour un diamètre interne de 3,0 mm et de 0,4 ml/min pour un diamètre interne de 4,6 mm. Augmentez le débit jusqu'à atteindre le débit souhaité sur une période de 5 minutes.
- 11 Une fois que la pression s'est stabilisée, connectez la colonne au détecteur.
- 12 Équilibrez la colonne et le détecteur avec 10 volumes de colonne de phase mobile avant utilisation (voir le [Tableau 7](#), page 46 pour les volumes de colonne).
- 13 Évitez toute surpression. Contrôlez la plage de pression de votre gradient avant de lancer toute analyse.
- 14 Si les échantillons sont dissous dans un solvant organique concentré, envisagez l'utilisation d'un programme d'injection qui intercale l'envoi des échantillons avec des flux de solvant moins concentré afin de réduire le risque de précipitation avec des phases mobiles tamponnées à concentration élevée.

3 Optimisation du système CPL Agilent 1290 Infinity Comment empêcher les obstructions de colonne



4 Configuration et installation du système

Installation du logiciel	76
Installation du module	78
Optimisation de la configuration de la pile de modules (système CPL binaire)	78
Optimisation de la configuration de la pile de modules (système CPL quaternaire)	83
Amorçage de la pompe	88
Purge de la pompe	90
Raccordements des liquides entre les modules	93
Intégration au réseau	93

Ce chapitre décrit l'installation du logiciel, les configurations de pile et la préparation du système avant fonctionnement.



Installation du logiciel

Installation du logiciel de commande et du système de données

Pour des informations détaillées relatives aux procédures d'installation du logiciel, consultez le *Manuel du détecteur à barrette de diodes 1290 Infinity* et les manuels du logiciel.

Installation du logiciel Agilent Lab Advisor

Pour des informations détaillées relatives aux procédures d'installation du logiciel Agilent Lab Advisor, consultez la documentation du logiciel sur le DVD Lab Advisor.

Le logiciel Agilent Lab Advisor remplace et améliore les fonctions de diagnostic jusqu'alors proposées par le logiciel ChemStation.

Le logiciel Agilent Lab Advisor est une application fonctionnant sous Windows® qui contrôle les instruments de laboratoire en temps réel et permet donc d'accroître la productivité du système au moyen de notifications automatiques pour les tâches de maintenance et d'entretien basées sur des compteurs sophistiqués. Cela permet de résoudre les problèmes éventuels avant qu'ils n'affectent les résultats. Le logiciel comprend un ensemble complet d'informations et de documentation pour l'utilisateur, un jeu de calculateurs et d'outils pour faciliter la configuration, l'étalonnage et la maintenance de votre instrument, ainsi que des tests et des procédures de diagnostic pour vérifier son bon fonctionnement. Le logiciel Agilent Lab Advisor propose également des informations et des solutions pour les éventuels erreurs d'instrument qui pourraient survenir. Le logiciel fonctionne avec ou sans les systèmes de données Agilent.

Le logiciel surveille :

- l'état du module CPL,
- la maintenance prédictive (pour indiquer la nécessité d'une mise à niveau ou du remplacement d'une pièce).

De surcroît, le logiciel :

- automatise différents tests utiles,
- tente d'identifier les instruments du réseau local qui sont sous tension et connectés à votre PC ou au réseau de votre laboratoire,
- suggère automatiquement le remplacement des pièces et les tâches de dépannage pour résoudre certains problèmes courants de l'instrument.

Installation du module

Pour des informations détaillées relatives aux procédures d'installation des modules, reportez-vous aux manuels spécifiques à chaque module. Ces manuels comprennent aussi des informations concernant les caractéristiques des modules, leur maintenance et les pièces.

Optimisation de la configuration de la pile de modules (système CPL binaire)

Configuration en une seule pile

Une performance optimale est garantie en installant les modules du système CLP binaire Agilent Infinity 1290 dans la configuration suivante (voir la [Figure 25](#), page 79 et la [Figure 26](#), page 80). Cette configuration optimise le trajet des liquides avec un volume de retard minimum et réduit l'encombrement.

La pompe binaire Agilent Infinity 1290 doit toujours être installée en bas de la pile.

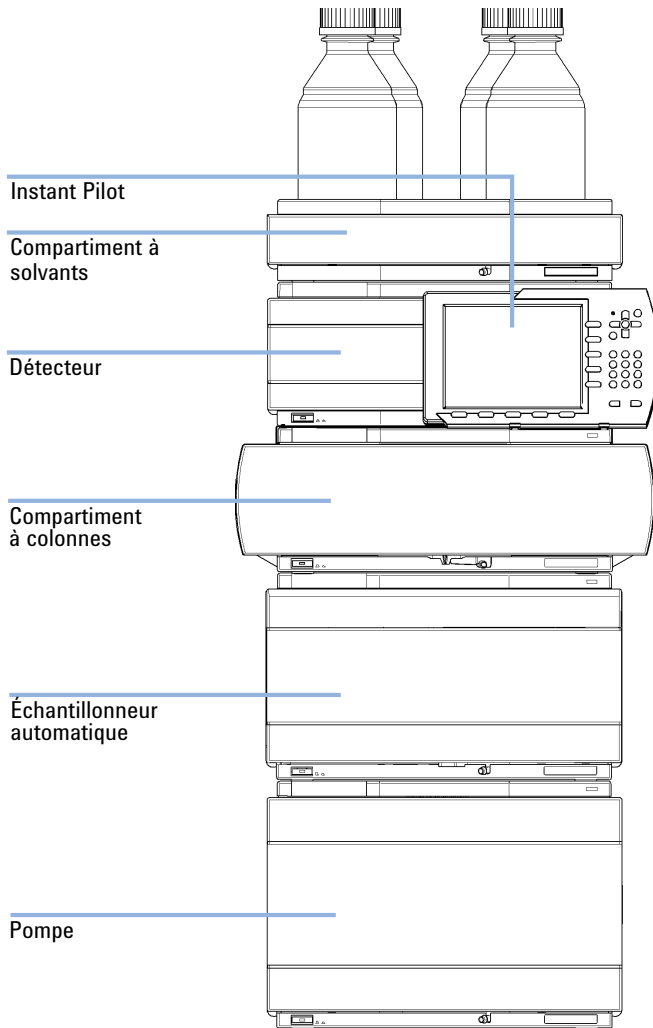


Figure 25 Configuration de la pile de modules recommandée pour le système 1290 Infinity avec la pompe binaire (vue avant)

4 Configuration et installation du système

Installation du module

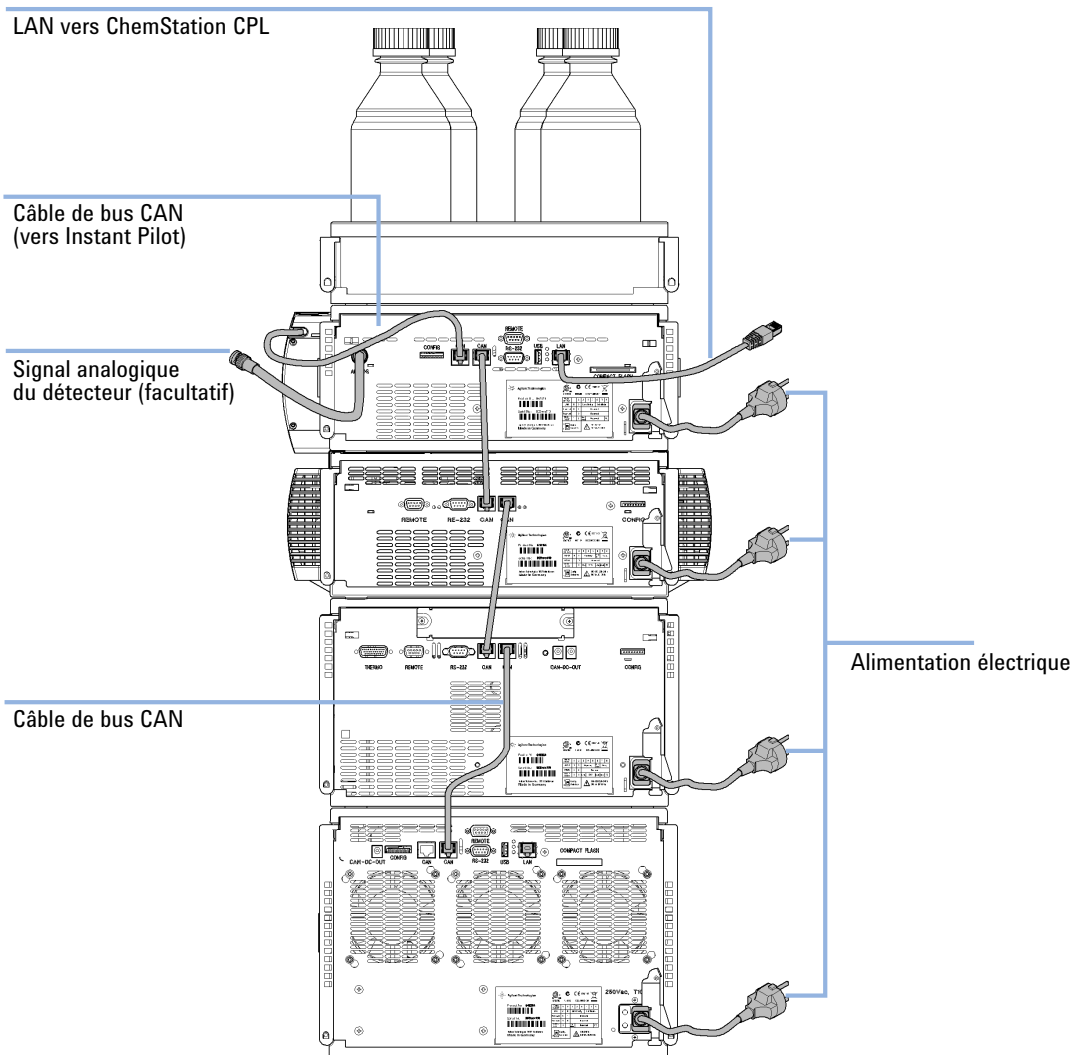


Figure 26 Configuration de la pile de modules recommandée pour le système 1290 Infinity avec la pompe binaire (vue arrière)

Configuration en deux piles

Dans le cas où le thermostat de l'échantillonneur automatique est ajouté au système, il est recommandé d'utiliser la configuration en deux piles car les deux modules lourds (pompe 1290 Infinity et thermostat) sont ainsi placés en bas de chaque pile et les piles sont moins hautes. Certains utilisateurs préfèrent la plus faible hauteur de cette disposition, même en l'absence du thermostat de l'échantillonneur automatique. Un capillaire légèrement plus long est nécessaire entre la pompe et l'échantillonneur automatique (voir la [Figure 27](#), page 81 et la [Figure 28](#), page 82).

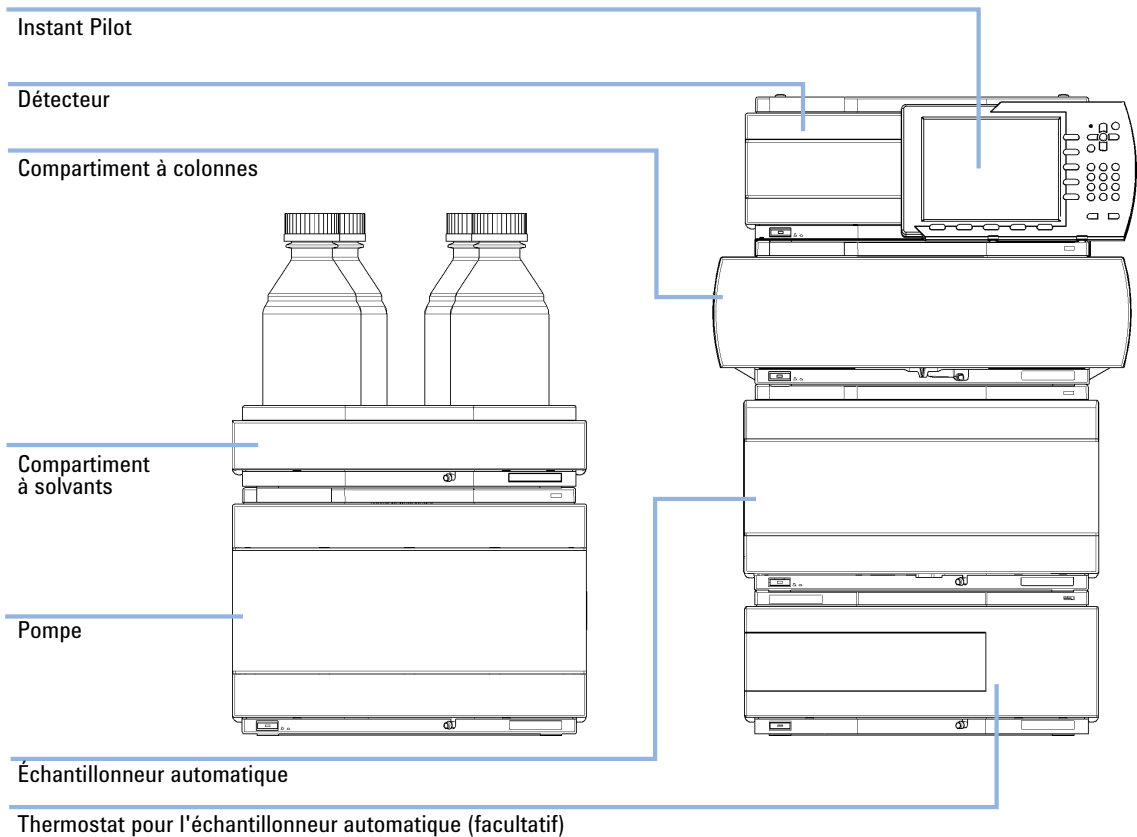


Figure 27 Configuration en deux piles recommandée pour le système 1290 Infinity avec la pompe binaire (vue avant)

4 Configuration et installation du système

Installation du module

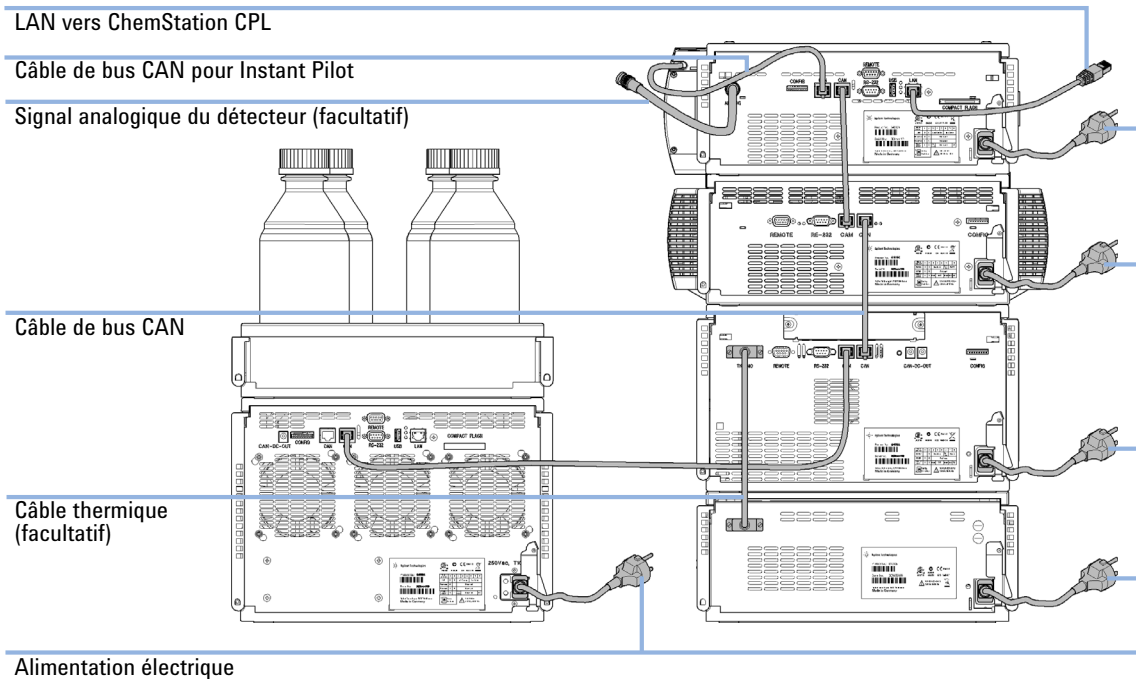


Figure 28 Configuration en deux piles recommandée pour le système 1290 Infinity avec la pompe binaire (vue arrière)

Optimisation de la configuration de la pile de modules (système CPL quaternaire)

Configuration à une seule pile

Une performance optimale est garantie en installant les modules du système CPL quaternaire Agilent 1290 Infinity dans la configuration suivante (voir [Figure 29](#), page 84 et [Figure 30](#), page 85). Cette configuration optimise le circuit, pour un volume de retard minimum et une réduction de l'encombrement requis.

La pompe quaternaire Agilent Infinity 1290 doit toujours être installée en bas de la pile.

4 Configuration et installation du système

Installation du module

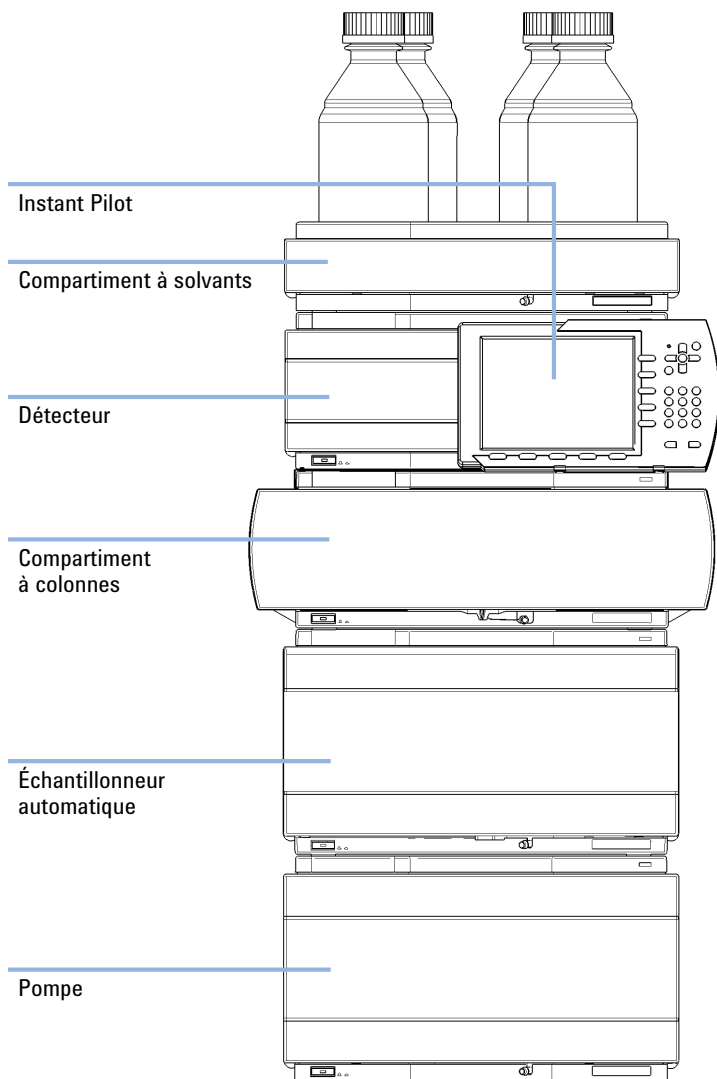


Figure 29 Configuration de pile recommandée pour le système 1290 Infinity avec pompe quaternaire (vue avant)

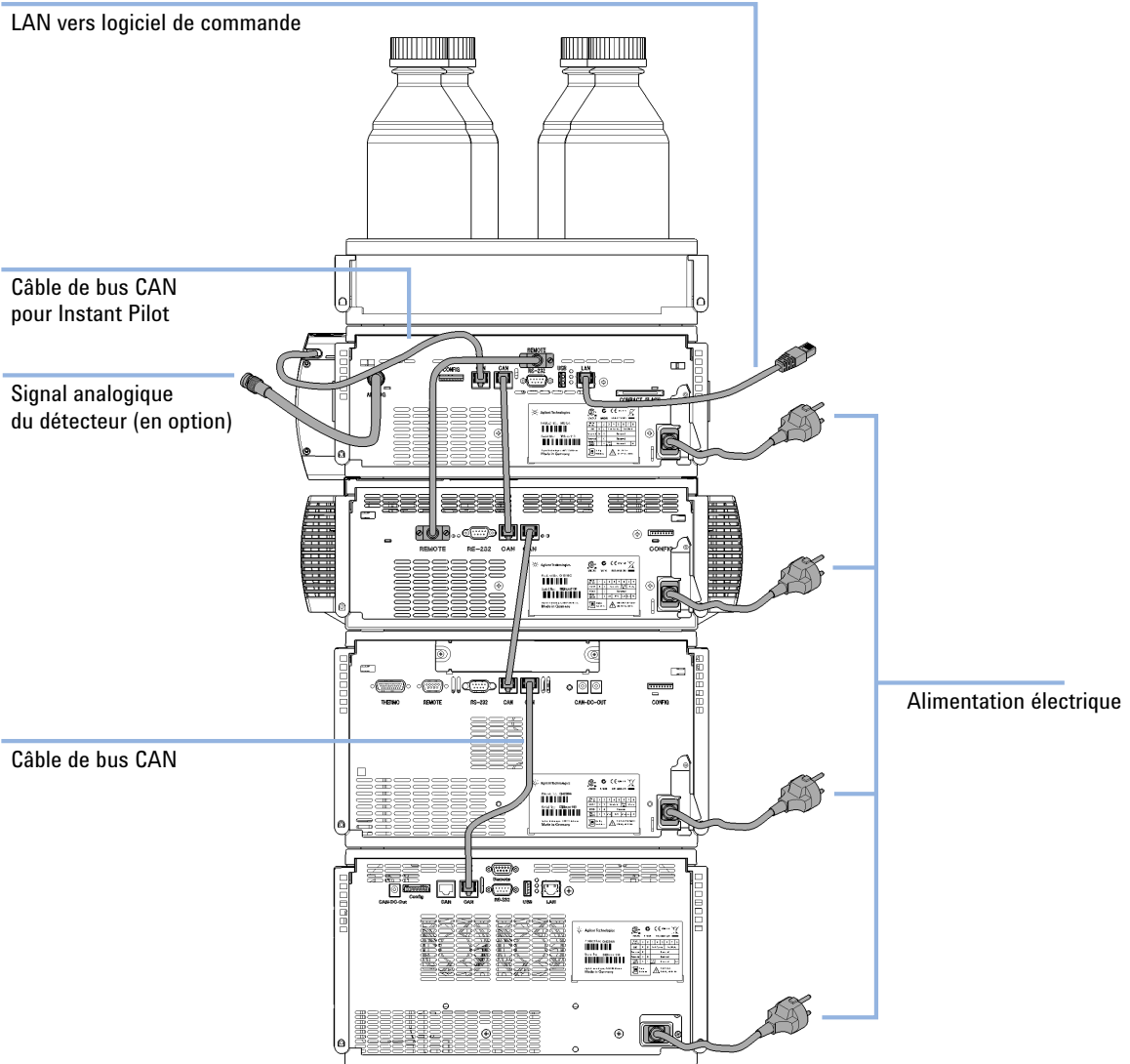


Figure 30 Configuration de pile recommandée pour le système 1290 Infinity avec pompe quaternaire (vue arrière)

4 Configuration et installation du système

Installation du module

Configuration à deux piles

Si le thermostat de l'échantillonneur automatique est ajouté au système, une configuration en deux piles est recommandée ; dans ce cas, les deux modules lourds (pompe Infinity 1290 et thermostat) sont placés au bas de chaque pile, ce qui permet d'éviter les piles hautes. Certains utilisateurs préfèrent la plus faible hauteur de cette disposition, même sans le thermostat de l'échantillonneur automatique. Un capillaire légèrement plus long est nécessaire entre la pompe et l'échantillonneur automatique. (Voir [Figure 31](#), page 86 et [Figure 32](#), page 87).

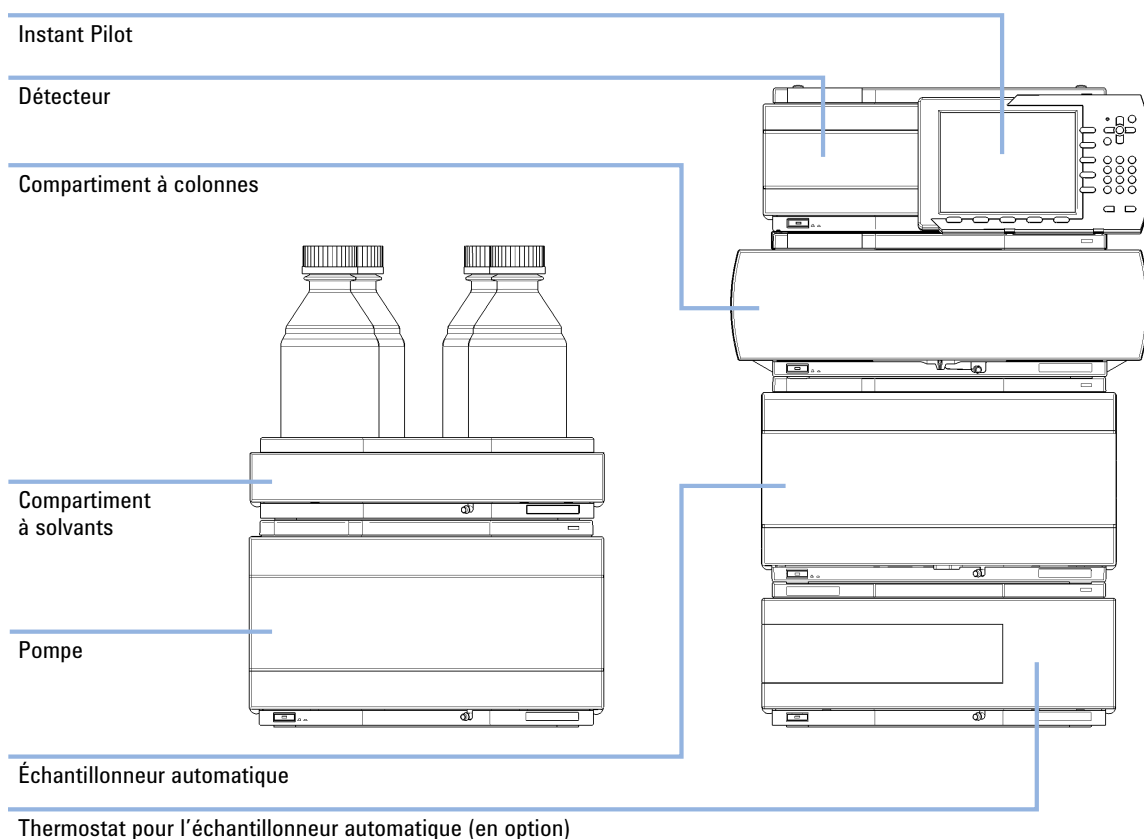


Figure 31 Configuration en deux piles recommandée pour le système 1290 Infinity avec pompe quaternaire (vue avant)

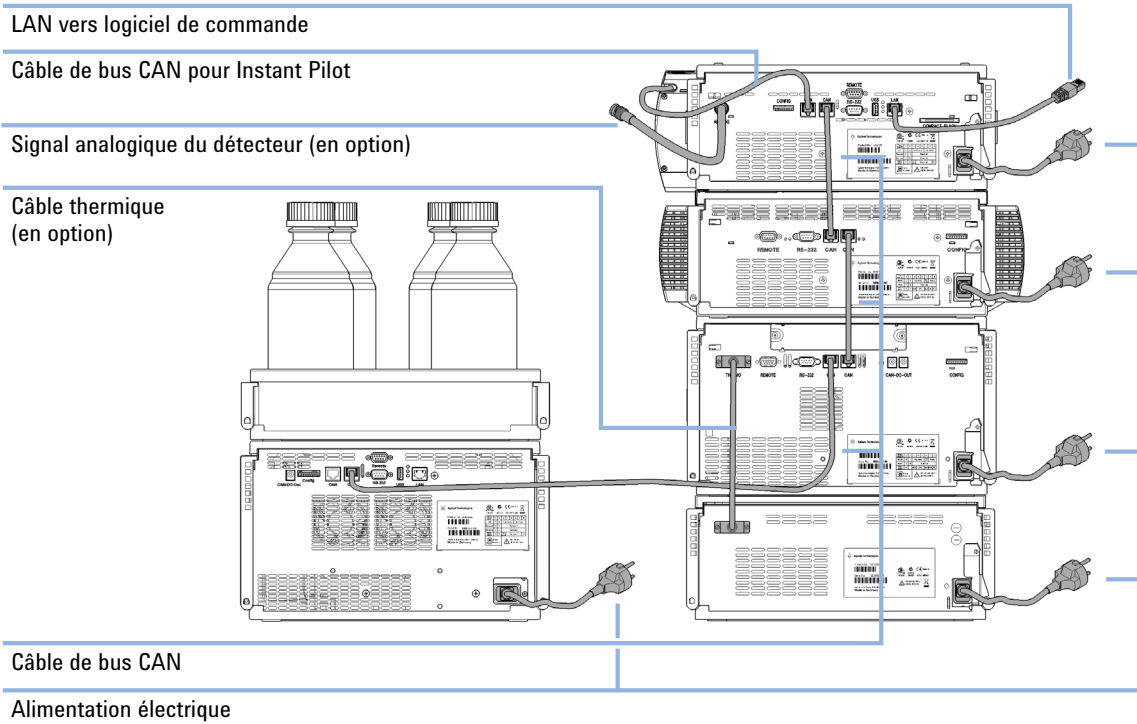


Figure 32 Configuration en deux piles recommandée pour le système 1290 Infinity avec pompe quaternaire (vue arrière)

Amorçage de la pompe

Cette procédure est nécessaire lorsque ...

- la pompe est utilisée pour la première fois,
- un ou plusieurs des tuyaux d'entrée contiennent des bulles d'air ou sont secs pour d'autres raisons.

Le but de l'amorçage est d'éliminer toutes les bulles d'air de la pompe et des tuyaux d'entrée.

Le propan-2-ol (autres dénominations : isopropanol, alcool isopropylique, IPA) est le meilleur solvant pour l'amorçage de la pompe et présente l'avantage d'être miscible avec la plupart des solvants pour phase normale ou inverse (vérifiez à l'aide du tableau de miscibilité des solvants si nécessaire).

AVERTISSEMENT

Solvants, échantillons et réactifs toxiques, inflammables et dangereux

La manipulation de solvants, d'échantillons et de réactifs peuvent comporter des risques pour la santé et la sécurité.

- Lors de la manipulation de ces produits, respectez les règles de sécurité (lunettes, gants et vêtements de protection) telles qu'elles figurent dans la fiche de sécurité fournie par le fournisseur, et respectez les bonnes pratiques de laboratoire.
- Le volume des substances doit être réduit au minimum requis pour l'analyse.
- L'instrument ne doit pas fonctionner dans une atmosphère explosive.

REMARQUE

Évitez de vider en totalité les réservoirs à solvant à l'aide de l'écran de contrôle du remplissage des bouteilles. Utilisez une seringue pour remplir les tuyaux de solvant car la pompe ne peut pas aspirer de l'air.

REMARQUE

Avant de démarrer la procédure, assurez-vous que tous les tuyaux de solvant sont reliés à la pompe comme indiqué dans le manuel d'installation de la pompe, et que les extrémités des tuyaux d'évacuation sont correctement positionnées dans un récipient pour déchets liquides approprié. Assurez-vous que la pompe est commandée par le logiciel informatique ou par Instant Pilot, et que le débit est réglé sur zéro.

- 1 Préparez la voie A et la tête de pompe A pour l'amorçage :

- a Remplissez en partie chaque réservoir à solvant avec environ 150 ml de propan-2-ol de qualité HPLC pour l'amorçage de la pompe et placez les extrémités des tuyaux de solvant portant les filtres en verre fritté dans les réservoirs.
 - b Déconnectez la tubulure qui arrive à la vanne de vérification d'entrée sur la tête de pompe A. Il s'agit de la tubulure sortant de la voie A du déga-zeur à vide.
 - c Installez la seringue d'amorçage munie de l'adaptateur fileté sur la tubulure.
 - d Aspirez lentement du solvant à travers la tubulure jusqu'à élimination de toutes les bulles.
 - e Retirez rapidement la seringue et l'adaptateur de la tubulure et recon-nectez la tubulure à la vanne de vérification d'entrée sur la tête de pompe A.
- 2 Répétez l'étape précédente pour la voie de solvant B et la tête de pompe B.
- 3 Si une vanne de sélection de solvant (SSV) est installée dans la pompe, effectuez les étapes suivantes pour tous les tuyaux à solvant encore vides :
- a Déconnectez la tubulure vide au niveau de la vanne de sélection de solvant. Installez la seringue d'amorçage munie de l'adaptateur fileté sur la tubulure.
 - b Aspirez lentement du solvant à travers la tubulure jusqu'à élimination de toutes les bulles.
 - c Retirez rapidement la seringue et l'adaptateur de la tubulure et recon-nectez la tubulure à la vanne de sélection de solvant.
- 4 Dans le logiciel ChemStation, effectuez un clic droit sur la partie pompe du schéma du système, puis sélectionnez **Prime On** dans le menu contextuel (attention à ne pas la confondre avec la commande **Purge On**). Les autres logiciels de commande fonctionnent de manière similaire.

Le clapet de purge basculera à présent les voies A et B vers l'évacuation et amorcera simultanément les deux voies. Le module aspire du solvant à un débit élevé en utilisant les quatre pompes en même temps et l'envoie vers l'évacuation par le biais du clapet de purge automatique. Cette opération est renouvelée 20 fois, puis le processus d'amorçage s'arrête. Le clapet de purge rebasculé le circuit hydraulique vers le système.

Ensuite, il est conseillé de purger chaque voie avec 30 ml de propan-2-ol. Suivez la procédure « [Purge de la pompe](#) », page 90.

Purge de la pompe

La procédure de purge décrite est celle de la pompe binaire 1290 Infinity. Elle peut être réalisée de la même manière pour la pompe quaternaire 1290 Infinity :

- Après que la pompe a été amorcée pour la première fois,
- Lorsque la pompe doit être purgée avec du solvant frais avant d'utiliser le système, ou lorsque le solvant doit être remplacé par un autre solvant,
- Si la pompe n'a pas été utilisée depuis plusieurs heures (de l'air peut avoir diffusé le long des tuyaux de solvant et la purge est recommandée),
- En cas de remplissage des réservoirs à solvant (la pompe doit être purgée pour distribuer le solvant frais dans le système), Si un solvant différent va être utilisé, assurez-vous que le nouveau solvant est miscible avec le solvant précédent. Si ce n'est pas le cas, effectuez une étape intermédiaire avec un solvant co-miscible (l'isopropanol est souvent un bon solvant intermédiaire ; consultez le tableau de miscibilité des solvants).

Les tuyaux d'entrée de la pompe doivent déjà être remplis de solvant. Si les tuyaux d'entrée de la pompe sont partiellement ou totalement secs, procédez à un amorçage complet (voir « [Amorçage de la pompe](#) », page 88).

Le clapet de purge permet de connecter les deux têtes de pompe à l'évacuation en même temps et de les purger à leur débit maximum individuel de 5 ml/min, ce qui fournit un débit de purge total de 10 ml/min avec une composition de 50/50.

AVERTISSEMENT

Solvants, échantillons et réactifs toxiques, inflammables et dangereux

La manipulation de solvants, d'échantillons et de réactifs peuvent comporter des risques pour la santé et la sécurité.

- Lors de la manipulation de ces produits, respectez les règles de sécurité (lunettes, gants et vêtements de protection) telles qu'elles figurent dans la fiche de sécurité fournie par le fournisseur, et respectez les bonnes pratiques de laboratoire.
- Le volume des substances doit être réduit au minimum requis pour l'analyse.
- L'instrument ne doit pas fonctionner dans une atmosphère explosive.

-
- 1 Pour accéder à la fenêtre de contrôle du clapet de purge, effectuez un clic droit sur la partie pompe, et sélectionnez **Control** dans le menu contextuel.

Sinon, vous pouvez sélectionner **Instrument > PompeBin 1290 Infinity, plus d'options > Contrôle.**

The screenshot shows a 'Control' dialog box with the following settings:

- Pump:** On, Off, Standby
- Seal Wash:** Off, Single Wash, Periodic. Duration: 1.0 min, Period: 2.0 min, on for: 0.2 min.
- Automatic Turn On:** Turn on at: Monday, July 06, 2009 11:00:00
- Purge:** On, Off. Duration: 1.00 min, Flow: 0.000 mL/min, Composition A: 100.00 %, B: 0.00 %.
- Prime:** On, Off

2 Dans la section **Purge**, définissez les paramètres suivants :

- **Duration** : 6 min
- **Flow** : 10 ml/min
- **Composition B** : 50 %

La valeur pour **Composition A** sera réglée automatiquement sur 50 %. Laissez le bouton marche-arrêt sur **Off**. Cliquez sur **OK** pour quitter.

3 Effectuez un clic droit sur la partie pompe et sélectionnez **Purge On** dans le menu contextuel.

4 Configuration et installation du système

Installation du module

REMARQUE

Attention à ne pas la confondre la commande **Purge On** avec la commande suivante **Prime On**.

Le clapet de purge basculera à présent le circuit hydraulique en position de purge et purgera simultanément les deux voies vers l'évacuation à un débit de 5 ml/min pour chaque voie et pendant une durée de 6 minutes. Après la durée définie, le débit de purge est arrêté, le clapet de purge rebasculé le circuit hydraulique vers le système, et les valeurs pour le débit et la composition sont de nouveau réglées sur celles définies dans la méthode actuellement en cours. Dans cet exemple, le débit de la méthode est encore réglé sur zéro. Les paramètres de purge définis dans la fenêtre **Control** lors de l'étape 1 et 2 sont conservés ; pour toute nouvelle purge, la procédure peut être commencée à l'étape 3.

Lorsque la pompe a été amorcée et purgée initialement avec du propan-2-ol, les solvants peuvent être remplacés par des solvants de phase mobile tels que l'eau ou le méthanol. La procédure de purge doit être renouvelée chaque fois qu'un solvant différent est utilisé. Le solvant se trouvant dans la pompe juste après une purge n'aura pas été dégazé, il faut donc faire tourner le système pendant au moins 10 min afin de dégazer le solvant.

Raccordements des liquides entre les modules

Lors du raccordement des modules entre eux, rincez systématiquement chaque capillaire et la colonne avec du solvant avant de les relier au composant suivant du circuit hydraulique.

- 1** Raccordez la sortie du mélangeur Jet Weaver à l'échantillonneur automatique à l'aide d'un capillaire souple en acier inoxydable de diamètre interne de 0,12 mm (la couleur de l'étiquette est rouge). Celui-ci doit être raccordé à la vanne d'injection de l'échantillonneur automatique au niveau de la voie n° 1.
- 2** Utilisez un capillaire souple en acier inoxydable de diamètre interne de 0,12 mm pour relier la voie n° 6 de la vanne d'injection de l'échantillonneur automatique au compartiment à colonne thermostaté. Raccordez le capillaire directement sur l'échangeur de chaleur à faible volume de dispersion pour un volume de retard minimal ou sur la vanne d'inversion si celle-ci est installée.
- 3** Raccordez la sortie de la colonne à l'entrée (indiquée par l'inscription CELL-IN, à gauche) de la cuve de type cartouche Max-Light du détecteur 1290 Infinity.
- 4** Raccordez la tubulure d'évacuation à la sortie (indiquée par l'inscription CELL-OUT, à droite) de la cuve de type cartouche Max-Light du détecteur 1290 Infinity et placez la sortie du tuyau dans un récipient à déchets liquides approprié.

Intégration au réseau

Pour des informations concernant l'intégration de votre système au réseau, reportez-vous aux manuels d'utilisation des différents modules (chapitre *Configuration réseau*).

4 Configuration et installation du système

Installation du module



5 Guide de démarrage rapide

À propos du guide de démarrage rapide	96
Préparation du système	97
Mise sous tension du système	97
Chargement de la méthode par défaut	98
Configuration du tracé en ligne	100
Purge de la pompe	102
Acquisition de données dans la vue Contrôle de méthode et d'analyse	103
Paramètres de méthode pour le mélange test et la colonne ZORBAX RRHD	103
Mise en place de la méthode	105
Exécution de la méthode pour une injection unique	107
Exécution plus rapide de la méthode	109
Analyse des données	111
Vue Analyse des données	112
Intégration d'un signal	113
Définition du rapport	115

Ce chapitre traite de l'acquisition de données et de l'analyse des données avec le système CPL 1290 Infinity.



À propos du guide de démarrage rapide

Ce chapitre apporte des informations relatives au fonctionnement du système CPL Agilent 1290 Infinity. Vous pouvez vous en servir comme guide pour lancer rapidement une première analyse après l'installation, l'utilisant à la fois comme exemple et pour vérifier le fonctionnement global du système. Il comprend également des informations plus détaillées sur les paramètres des méthodes.

Cet exemple explique comment mettre en place et effectuer une analyse avec la colonne et l'échantillon test fournis avec le système CPL Agilent 1290 Infinity. L'exemple fait référence aux menus et aux commandes du logiciel OpenLAB CDS ChemStation Edition, mais les mêmes fonctions sont disponibles en utilisant les autres possibilités de commande de l'instrument, à savoir OpenLAB CDS EZChrom Edition, le logiciel Instant Pilot et le logiciel MassHunter.

REMARQUE

Il est supposé pour cet exemple que le système a été installé, mis sous tension et amorcé (voir « [Amorçage de la pompe](#) », page 88). La lampe UV doit être allumée au moins 30 minutes avant de démarrer toute analyse quantitative.

Préparation du système

Mise sous tension du système

Si l'ensemble du système n'est pas encore sous tension et que le logiciel n'indique pas l'état Prêt, suivez les étapes suivantes :

- 1 Mettez l'ordinateur sous tension et attendez l'affichage du bureau Windows.
- 2 Mettez sous tension les modules CPL à l'aide du bouton en bas à gauche de chaque module.

Un voyant vert signalant que le module est alimenté s'allume au centre de chaque bouton.

- 3 Lancez le logiciel de commande de l'ordinateur en cliquant sur l'icône appropriée (le cas échéant). Sinon, sélectionnez **Démarrer > Tous les programmes > Agilent Technologies > OpenLAB > Panneau de configuration OpenLAB**. Sélectionnez l'instrument approprié sous **Instruments** dans le panneau de navigation, puis cliquez sur **Launch online**.

Le logiciel ChemStation s'ouvre dans la vue **Method and Run Control**. Au démarrage, les modules se trouvent en mode Veille à l'état Non prêt, à l'exception de l'échantillonneur automatique qui s'initialise d'emblée et atteint l'état Prêt.

- 4 Pour allumer chaque module individuellement, effectuez un clic droit sur l'icône appropriée et sélectionnez la commande **Switch [module name] on** dans le menu contextuel.

Sinon, vous pouvez choisir d'allumer tous les modules du système simultanément en cliquant sur le bouton **System On/Off** en bas à droite du schéma du système. L'état du système passe de *Non prêt* (indiqué en jaune) à *Prêt* (indiqué en vert) après un court délai nécessaire pour atteindre les points de consigne.

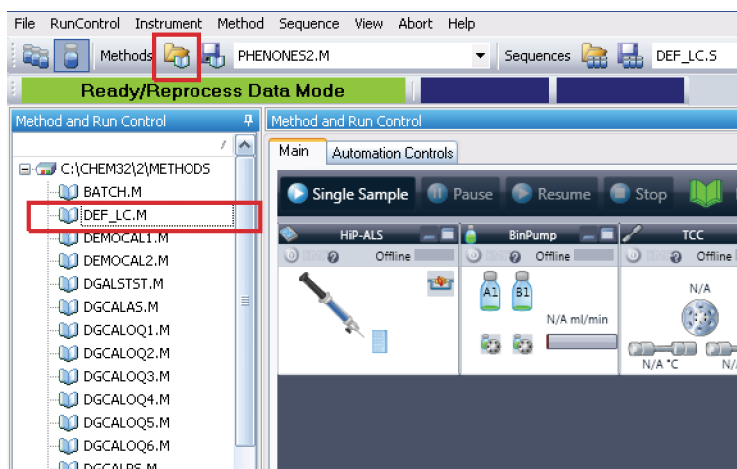
Chargement de la méthode par défaut

Le logiciel ChemStation dispose d'une méthode par défaut appelé **DEF_LC.M** qui est chargée lors de la première mise en route ou lorsqu'un nouveau modèle de méthode vierge est requis. Celle-ci comprend les paramètres par défaut pour tous les modules.

Cette procédure vous indique comment charger la méthode **DEF_LC.M**. Vous pouvez l'utiliser pour régler tous les paramètres sur les valeurs par défaut, ou pour obtenir un modèle de méthode vierge pour la mise en place d'une nouvelle méthode.

- 1 Accédez à la vue **Method and Run Control** de ChemStation.
- 2 Dans la barre de menus, sélectionnez **Method > New Method...**, et sélectionnez **DEF_LC.M** dans le menu contextuel.

Sinon, vous pouvez utiliser l'icône **Load Method** dans la barre de menus, ou double-cliquer sur le nom de méthode **DEF_LC.M** dans l'onglet **Méthodes** du panneau de navigation.



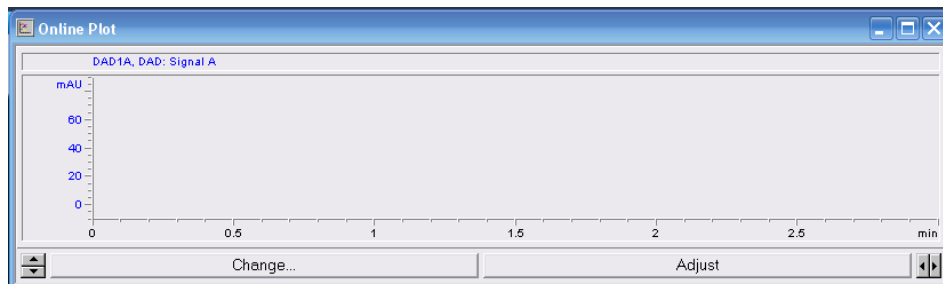
La méthode par défaut (**DEF_LC.M**) comprend un ensemble de paramètres par défaut qui peuvent être modifiés pour créer une nouvelle méthode. Par exemple le débit est réglé sur zéro, et les **Method Information** et **Method History** sont vierges.

REMARQUE

Il est à noter qu'il est impossible d'écraser cette méthode lorsque les paramètres sont modifiés. Ainsi, lorsque vous cliquez sur **Save**, vous serez redirigé vers la fonction **Save As...** pour saisir un nouveau nom de méthode.

Configuration du tracé en ligne

- 1 Si la fenêtre **Online Plot** n'est pas visible : Cliquez sur **Vue > Signaux en ligne > Fenêtre de signal 1** pour afficher la fenêtre.



- 2 Pour configurer le ou les signaux souhaités dans la fenêtre **Online Plot**, cliquez sur **Change...**

La fenêtre de configuration **Edit Signal Plot** s'affiche.

- 3 Dans la liste **Available Signals**, sélectionnez les signaux nécessaires, puis cliquez sur **Add** pour les déplacer vers la liste **Selected Signals**.
- 4 Pour régler les paramètres individuels pour chaque signal, sélectionnez le signal dans la liste **Selected Signal** et réglez les valeurs souhaitées dans la partie inférieure de la fenêtre.

REMARQUE

En plus des signaux provenant des détecteurs, vous pouvez afficher les tracés de paramètres tels que la température et la pression. À l'aide du bouton **Apply to Method**, vous pouvez enregistrer les paramètres de cette fenêtre dans la méthode.

La fenêtre **Online Plot** se comporte comme du papier graphique électronique, et enregistre en continu la sortie du ou des détecteurs ainsi que d'autres paramètres de sortie. Les signaux sont tracés à droite de la fenêtre et se déplacent ensuite vers la gauche. Les dernières 90 min des données sont accessibles. Il s'agit d'un outil pratique pour surveiller la ligne de base et observer les injections antérieures. Les échelles des axes des abscisses et des ordonnées peuvent être ajustées directement à l'aide des boutons haut/bas sur chaque axe.

Le bouton **Adjust** dans la fenêtre **Online Plot** déplace le point actuel du signal sélectionné sur la ligne zéro. Le signal sélectionné est indiqué par la couleur des étiquettes de l'axe des ordonnées. Un signal en particulier peut être sélectionné en cliquant sur le signal ou en cliquant la description de signal appropriée en haut du tracé.

Le bouton **Balance** permet de réinitialiser tous les détecteurs.

REMARQUE

Les modifications apportées à la fenêtre **Online Plot** n'ont aucune influence sur les données stockées dans les fichiers de données individuels.

Purge de la pompe

Il faut purger la pompe, ...

- Après que la pompe a été amorcée pour la première fois,
- Lorsque la pompe doit être purgée avec du solvant frais avant d'utiliser le système, ou lorsque le solvant doit être remplacé par un autre solvant,
- Si la pompe n'a pas été utilisée depuis plusieurs heures (de l'air peut avoir diffusé le long des tuyaux de solvant et la purge est recommandée),
- En cas de remplissage des réservoirs à solvant (la pompe doit être purgée pour distribuer le solvant frais dans le système), Si un solvant différent va être utilisé, assurez-vous que le nouveau solvant est miscible avec le solvant précédent. Si ce n'est pas le cas, effectuez une étape intermédiaire avec un solvant co-miscible (l'isopropanol est souvent un bon solvant intermédiaire ; consultez le tableau de miscibilité des solvants).

Pour des informations détaillées concernant la procédure de purge, consultez la section « [Purge de la pompe](#) », page 90.

Acquisition de données dans la vue Contrôle de méthode et d'analyse

Toutes les procédures et configurations de méthodes sont décrites pour la pompe binaire 1290 Infinity. Elles peuvent être exécutées de la même manière pour la pompe quaternaire 1290 Infinity.

Paramètres de méthode pour le mélange test et la colonne ZORBAX RRHD

Le système CPL 1290 Infinity est livré avec la colonne ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 1,8 μm , 2,1 mm x 50 mm, et un mélange test contenant des phénones à utiliser avec cette procédure d'entraînement.

Le mélange test de phénones (référence 5188-6529) contient 100 ng/ μl de neuf composés dissous dans de l'eau / acétonitrile (65/35). Les neuf composés sont :

- Acétanilide
- Acétophénone
- Propiophénone
- Butyrophénone
- Benzophénone
- Valérophénone
- Hexanophénone
- Heptanophénone
- Octanophénone

Les paramètres de méthode pour la séparation de ce mélange test sont résumés dans le [Tableau 9](#), page 104.

5 Guide de démarrage rapide

Acquisition de données dans la vue Contrôle de méthode et d'analyse

Tableau 9 Paramètres de méthode pour une première séparation test

Module	Paramètre	Valeur
Pompe	Solvant A	Eau
	Solvant B	Acétonitrile
	Débit	0,4 ml/min
	Composition initiale	60 % A, 40 % B
	Tableau des événements du gradient	À 4 minutes 20 % A, 80 % B
	Temps d'arrêt	5 minutes
Échantillonneur automatique	Injection	1 µl
	Lavage de l'aiguille	Voie de lavage, 6 s
TCC	Colonne	ZORBAX Eclipse Plus C18 1,8 µm, diam. int. 2,1 mm x 50 mm
	Température	40 °C
Détecteur	Signal A	250 nm, bande passante 100 nm, réf. 360 nm, bande passante 100 nm
	Largeur de pic	0,025 min (10 Hz)
	Enregistrement des spectres	Tous

Mise en place de la méthode

Cette section explique comment régler rapidement les conditions de méthode pour une analyse avec les conditions du mélange test. Pour de plus amples détails sur tous les paramètres disponibles, consultez la section de l'Annexe, « [Configuration d'une méthode à l'aide de la fonction Edit Entire Method](#) », page 123.

La méthode par défaut **DEF_LC.M** a été chargée pour la préparation de la nouvelle méthode. Maintenant, vous pouvez modifier les paramètres clés pour créer la nouvelle méthode. Pour l'exemple de séparation décrit ici, utilisez les réglages des conditions du [Tableau 9](#), page 104.

- 1 Pour accéder rapidement à la fenêtre **Method** pour chaque module, effectuez un clic droit sur le module dans le schéma du système et sélectionnez **Method...** dans le menu contextuel.

Vous pouvez configurer chaque module de cette manière.

- 2 Effectuez un clic droit sur la zone de la pompe, puis sélectionnez **Method...** dans le menu contextuel.
 - a Dans la fenêtre **Method** pour la **1290 Infinity Binary Pump**, entrez les paramètres suivants :
 - Débit : 0,4 ml/min
 - Solvant A : Sélectionnez **Water** dans la liste déroulante Compressibilité.
 - Solvant B : Cochez la case pour activer le solvant B.
 - %B : Valeur initiale 40 %
 - Temps d'arrêt : 5 min
 - Limite de pression maximum : 1200 bar
 - b Cliquez sur le symbole **+** pour ouvrir le **Timetable**.
 - c Ajoutez une ligne, sélectionnez **Change Solvent Composition**, puis réglez %B sur 80 %.
 - d Les autres paramètres peuvent conserver leurs réglages par défaut. Cliquez sur **OK** pour quitter la fenêtre.

Les modifications sont transmises au module de la pompe.
- 3 Effectuez un clic droit sur la zone de l'échantillonneur automatique, puis sélectionnez **Method...** dans le menu contextuel.

Pour ne pas modifier le modèle de méthode par défaut, le logiciel ChemStation ne vous laissera pas enregistrer la méthode avec le nom **DEF_LC.M**.



- 7 Laissez le système s'équilibrer pendant au moins 10 min, et vérifiez que la ligne de base dans le **Online Plot** est stable avant de démarrer l'analyse.

Exécution de la méthode pour une injection unique

Cette section explique comment exécuter l'analyse d'une injection unique de mélange test à l'aide des conditions saisies dans la section précédente.

Deux modes d'exécution d'analyses existent avec ChemStation :

- **Run Method** : pour des injections uniques, par exemple lors du développement interactif de méthodes, à l'aide des réglages des paramètres actifs à un moment donné ;
- **Run Sequence** : pour des séries d'injections automatisées à partir de plusieurs flacons, éventuellement avec plusieurs méthodes. Pour plus de détails, reportez-vous aux manuels du logiciel ChemStation.

- 1 Cliquez sur l'icône **Select Run Method Task** .
- 2 Si les conditions de méthode souhaitées ne sont pas chargées actuellement, sélectionnez **Méthode > Chargement de méthode** ou l'icône  de la barre de menus pour les charger.

REMARQUE

Si des modifications ont été apportées à une méthode chargée mais non encore enregistrée, un astérisque jaune est affiché sur l'icône d'état de la méthode. L'injection peut être réalisée sans enregistrer au préalable les modifications des paramètres. Le logiciel ChemStation enregistre toujours une copie des paramètres d'acquisition dans le fichier de données ACQ.TXT pour conserver les paramètres de la méthode d'origine.

- 3 Placez le flacon d'échantillon à la position 1 : il s'agit de la position avant des 10 x 2 ml positions de flacons sur le côté droit du plateau à flacons.
- 4 Sélectionnez **Contrôle de l'analyse > Informations sur l'échantillon**, et saisissez un nom de **Subdirectory** (facultatif), **Filename**, **Location** de l'échantillon (**Flacon 1**), **Sample Name** et un **Comment**, le cas échéant.
- 5 Si le système a déjà atteint l'équilibre et que la ligne de base est stable, cliquez sur **Run Method** dans la fenêtre **Sample Info** pour démarrer l'injection.

5 Guide de démarrage rapide

Acquisition de données dans la vue Contrôle de méthode et d'analyse

Sinon, cliquez sur **OK**, et lorsque vous êtes prêt, cliquez sur le bouton **Start Single Sample** au-dessus du schéma du système.

- 6 L'injection est réalisée et le chromatogramme apparaît dans la fenêtre **Online Plot**. L'acquisition de données se termine lorsque le **Stop Time** est atteint.

Le chromatogramme doit être similaire à celui de la [Figure 33](#), page 109 ; toutefois la durée de l'analyse sera plus longue (axe des abscisses) car l'analyse de la figure a été réalisée avec les conditions de la section suivante, à savoir quatre fois plus rapides.

Exécution plus rapide de la méthode

Dans l'exemple précédent, la pression était celle d'un système standard. Maintenant le débit peut être augmenté et le gradient ajusté pour obtenir une séparation plus rapide.

- 1 Modifiez les conditions de méthode de la même manière que dans la section précédente et réglez les paramètres suivants :
 - Débit : 1,6 ml/min
 - Gradient : modifiez le gradient afin que la pente du gradient reste inchangée par rapport à la première analyse pour ce qui est du volume. Le débit doit être multiplié par 4, il faut donc diviser la durée du gradient par 4. Réglez la durée du gradient sur 1 min.
 - Temps d'arrêt : 1,25 min
- 2 Sauvegardez la méthode sous un nouveau nom.
- 3 Assurez-vous qu'un nouveau nom de fichier est utilisé dans **Sample Info**.
- 4 Lorsque la ligne de base est stable et équilibrée, lancez l'analyse à l'aide du bouton **Start Single Sample**.

Le chromatogramme doit être similaire à celui illustré ci-dessous, avec une durée d'analyse d'environ 1 min.

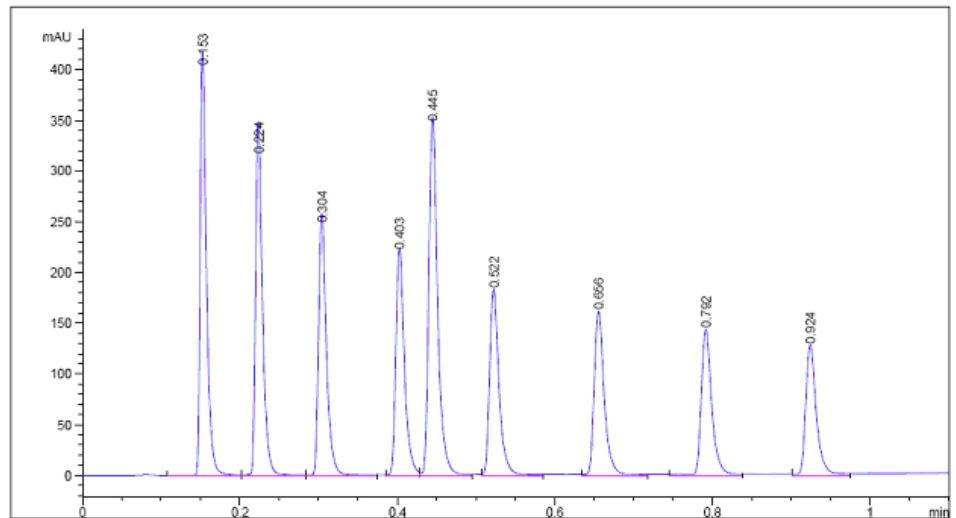


Figure 33 Exemple de chromatogramme pour le mélange test de phénones en utilisant des conditions de démarrage rapides

5 Guide de démarrage rapide

Acquisition de données dans la vue Contrôle de méthode et d'analyse

En fait, cette séparation n'est optimisée dans ces conditions et il est conseillé à l'utilisateur d'acquérir davantage d'expérience sur le fonctionnement du système en essayant d'optimiser la méthode. Pour cela vous pouvez essayer de :

- réduire la concentration de l'échantillon en le diluant au 1/10,
- augmenter la plage du gradient,
- augmenter la température,
- examiner le spectre de pics et sélectionner une bande étroite appropriée pour la détection.

Pour de plus amples détails concernant l'optimisation, consultez la section « [Optimisation du système CPL Agilent 1290 Infinity](#) », page 41.

Analyse des données

Dans le logiciel ChemStation, une méthode contient tous les paramètres nécessaires à l'acquisition des données (gestion du système) et à l'analyse des données (traitement des données pour obtenir des résultats quantitatifs et qualitatifs). Cette section décrit brièvement l'intégration et les rapports d'analyse des données pour que les séparations effectuées plus haut dans ce chapitre puissent être intégrées et les rapports imprimés. Pour des informations supplémentaires concernant l'analyse des données, y compris l'utilisation de l'étalonnage pour la quantification, consultez le manuel du logiciel ChemStation.

Origine de la méthode

Table de navigation

Tâche d'intégration

Tâche de spectre

Panneau de navigation

#	Time	Area	Height	Width	Area%	Symmetry
1	0.122	291.7	238.1	0.0208	10.633	0.919
2	0.192	292.2	228.5	0.0189	11.030	0.908
3	0.279	257.5	238.1	0.0166	9.720	0.945
4	0.349	24.6	16.9	0.0201	0.959	2.05
5	0.377	232.4	361	0.0144	8.771	0.702
6	0.422	239	296	0.0124	9.023	0.861
7	0.487	257.6	295.9	0.0132	9.730	0.749
8	0.601	337.3	337.4	0.0147	12.731	1.421

Figure 34 Vue Analyse des données

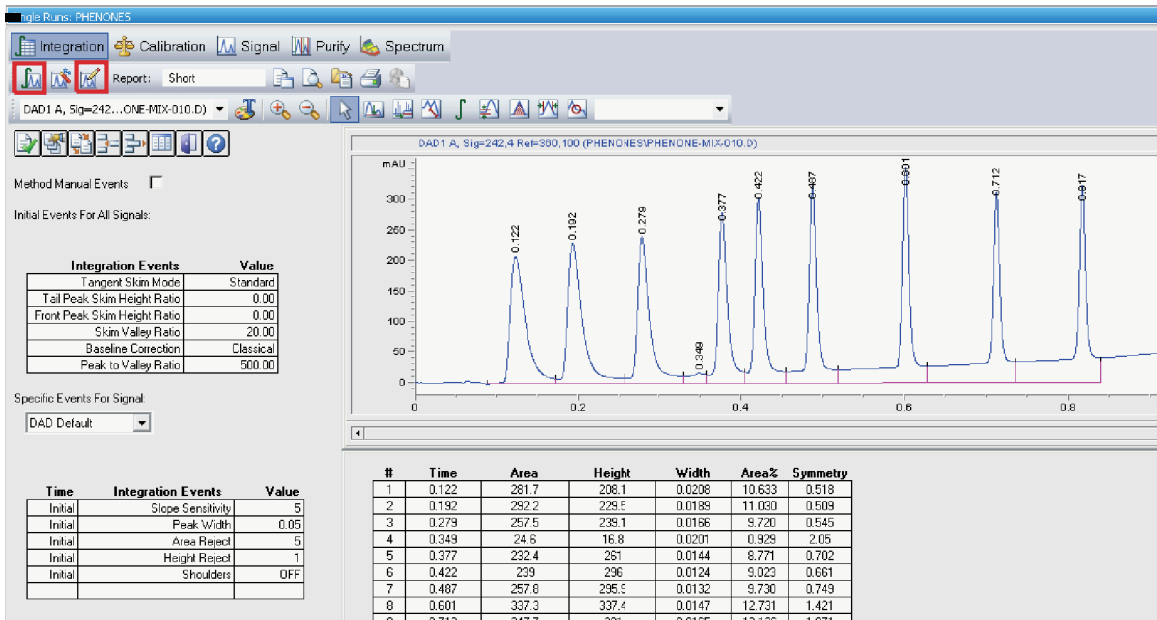
Vue Analyse des données

Pour ouvrir un chromatogramme dans la vue **Data Analysis** :

- 1** Lancez une session de ChemStation hors connexion.
- 2** Cliquez sur Analyse des données dans le coin inférieur gauche de l'écran (voir la [Figure 34](#), page 111).
- 3** Dans le panneau de navigation, recherchez le répertoire de données contenant les fichiers de données. Toutes les données d'injections uniques sont regroupés dans un sous-groupe nommé **Single Runs**. Double-cliquez sur **Single Runs** pour charger ces fichiers de données dans le tableau de navigation.
- 4** Sélectionnez un fichier dans le tableau de navigation, et double-cliquez sur le fichier pour afficher le chromatogramme dans la visionneuse.

Intégration d'un signal

- 1 Sélectionnez l'outil Tâche d'intégration (voir la figure ci-dessous). Les icônes **Integrate** et **Set Integration Events Table** sont entourées dans la figure illustrée ci-dessous.

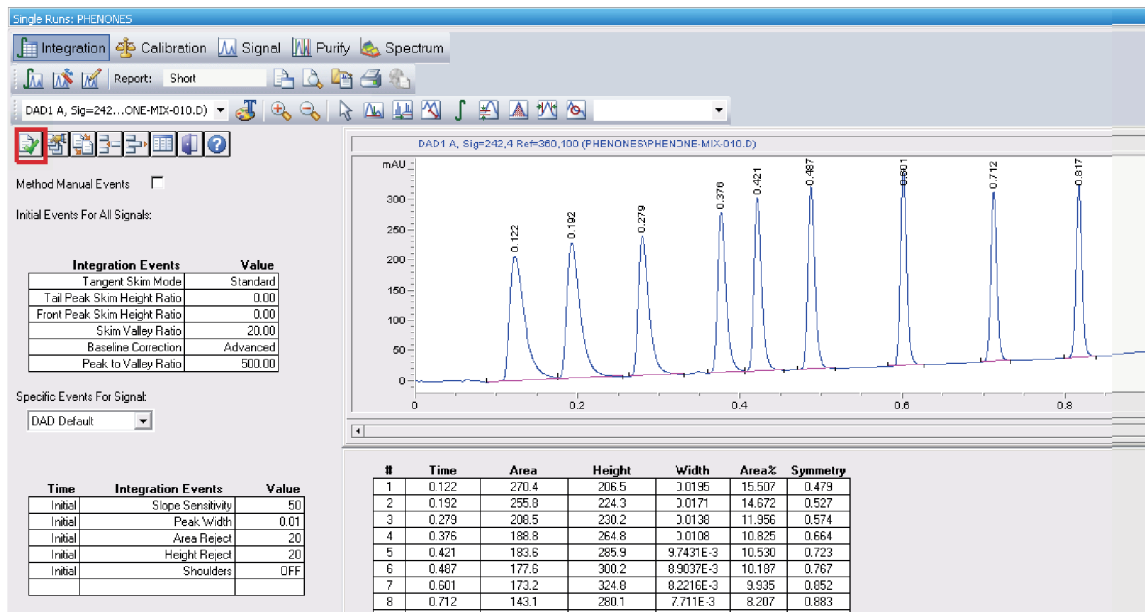


- 2 Cliquez sur l'icône **Set Integration Events Table** pour ouvrir le tableau comme illustré ci-dessus.
- 3 Réglez la **Baseline Correction** sur **Advanced** pour les analyses à gradient.
- 4 Réglez la **Slope Sensitivity** sur 50. Une valeur supérieure intègre les pics à pente plus forte en ignorant les pics à pente moins élevée.
- 5 Réglez la **Peak Width** sur la valeur du pic d'intérêt le plus étroit, soit environ 0,01 dans cet exemple.
- 6 Les paramètres **Area Reject** et **Height Reject** peuvent être réglés pour rejeter les pics plus petits.
- 7 Cliquez sur l'icône **Integrate** pour actualiser les résultats en utilisant ces nouveaux paramètres.

5 Guide de démarrage rapide

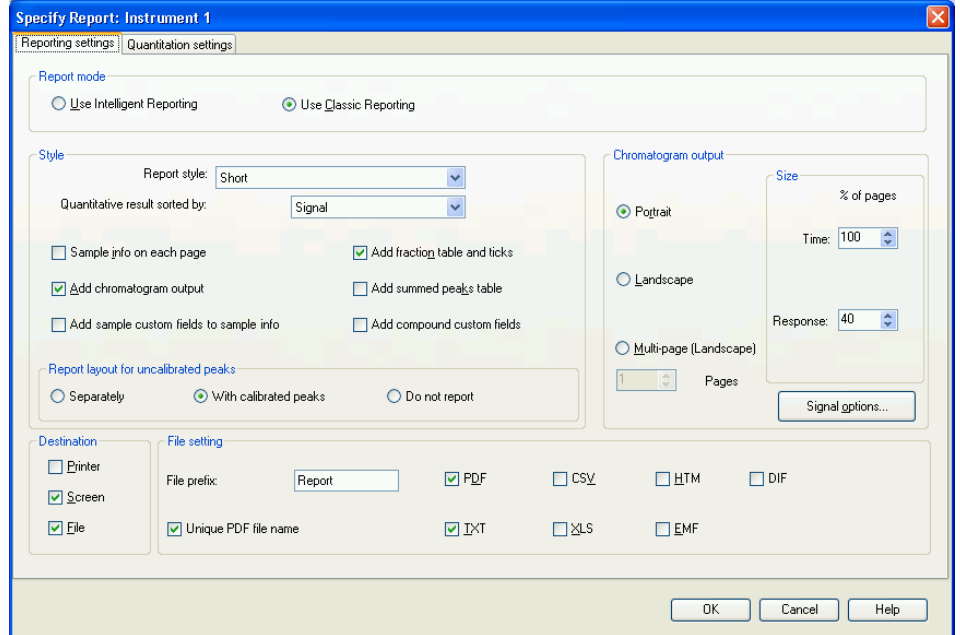
Analyse des données

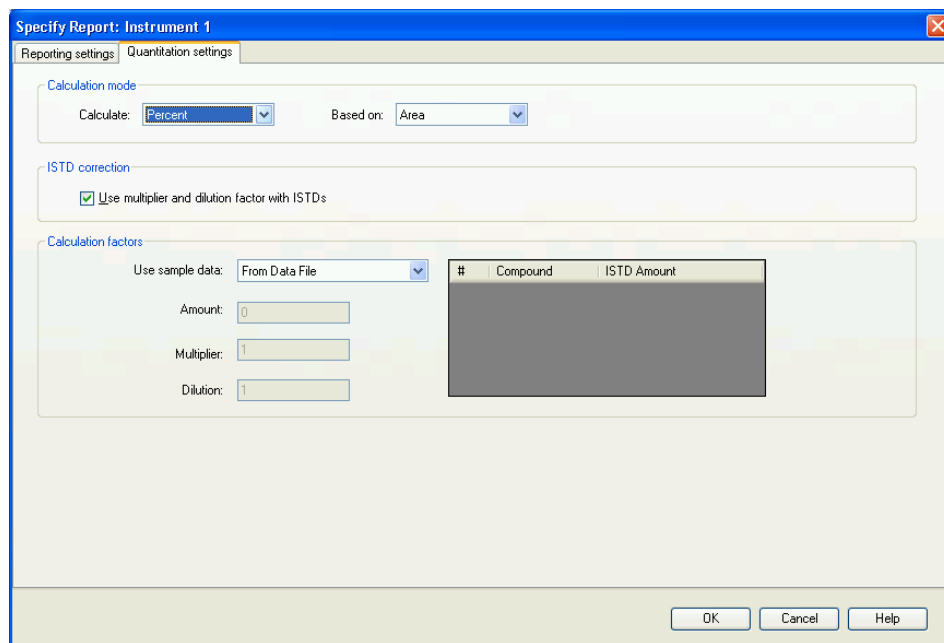
- Quittez le tableau d'événements à l'aide de l'icône verte en forme de coche (voir figure ci-dessous).



Définition du rapport

- 1 Dans la barre de menus, cliquez sur **Rapport > Définition du rapport** pour afficher la fenêtre illustrée dans la figure ci-dessous.





- 2 À l'aide des exemples de paramètres montrés dans les figures ci-dessus, vous pouvez faire afficher un rapport en pourcentage d'aire à l'écran.
- 3 Dans la section **Destination**, sélectionnez **Printer** pour imprimer une version papier, ou **File** puis **PDF** pour obtenir un fichier de rapport en format PDF enregistré dans le fichier de données. (Le fichier de données avec le suffixe .D est en réalité un répertoire. Le fichier de rapport peut être visionné directement dans ChemStation. Il est également accessible dans le répertoire en utilisant l'explorateur de fichiers normal de Windows.)
- 4 Sauvegardez à nouveau la méthode pour vous assurer que les paramètres des rapports sont enregistrés pour les prochaines utilisations de la méthode.

À la prochaine utilisation de la méthode, ces événements d'intégration et ces paramètres de rapport serviront à établir le rapport.

Cette section vient compléter le bref description des fonctionnalités d'Analyse des données du logiciel ChemStation. Vous pouvez consulter les manuels du logiciel ChemStation, ainsi que le système d'aide en ligne pour plus de renseignements concernant les fonctionnalités performantes du logiciel ChemStation.



6 Annexe

Informations relatives à la sécurité	118
Informations sur les solvants	121
Agilent Technologies sur Internet	122
Configuration d'une méthode à l'aide de la fonction Edit Entire Method	123
Informations sur la méthode	125
Instrument/Acquisition	126
Analyse des données	141
Liste de contrôle de l'exécution	148

Ce chapitre apporte des informations complémentaires concernant la sécurité, les aspects juridiques, l'Internet et la configuration d'une méthode.



Informations relatives à la sécurité

Informations générales de sécurité

Les consignes générales de sécurité suivantes doivent être respectées lors de toutes les phases de fonctionnement, d'entretien et de réparation de cet instrument. Le non-respect de ces consignes ou des avertissements spécifiques énoncés ailleurs dans ce manuel, est en violation des normes de sécurité applicables à la conception, à la fabrication et à l'usage prévu de l'instrument. Agilent Technologies ne peut être tenu responsable du non-respect de ces exigences par le client.

AVERTISSEMENT

Vérifiez la bonne utilisation des équipements.

La protection fournie par l'équipement peut être altérée.

→ Il est recommandé à l'opérateur de cet instrument de l'utiliser conformément aux indications du présent manuel.

Normes de sécurité

Cet instrument est un instrument de classe de sécurité I (comportant une borne de mise à la terre) et a été fabriqué et contrôlé conformément aux normes de sécurité internationales.

Fonctionnement

Avant de brancher l'alimentation électrique, effectuez chaque étape de la procédure d'installation. Par ailleurs, vous devez respecter les consignes suivantes.

Ne retirez pas les capots de l'instrument pendant son fonctionnement. Avant la mise sous tension de l'instrument, toutes les bornes de mise à la terre, rallonges électriques, transformateurs et dispositifs qui y sont raccordés doivent être reliés à une terre de protection par le biais d'une prise de masse. Toute

interruption de la connexion à la terre de protection crée un risque d'électrocution pouvant entraîner des blessures graves. Si l'intégrité de cette protection devient suspecte, l'instrument doit être mis hors service et son utilisation doit être interdite.

Assurez-vous que les fusibles sont remplacés uniquement par des fusibles à courant nominal spécifié et de type spécifié (fusion normale, temporisés, etc.). N'utilisez pas de fusibles réparés et ne court-circuitez pas les porte-fusibles.

Certains des réglages décrits dans le manuel sont effectués sur un instrument sous tension dont les capots de protection ont été retirés. Les potentiels présents en de nombreux points peuvent, en cas de contact, causer des blessures.

Il convient d'éviter, dans la mesure du possible, d'effectuer des opérations de réglage, de maintenance et de réparation sur un instrument ouvert sous tension. Si c'est inévitable, ces opérations doivent être effectuées par une personne qualifiée et consciente du danger. Ne tentez pas d'effectuer une opération de maintenance interne ou un réglage sans la présence d'une autre personne capable de donner les premiers secours et d'assurer une réanimation. Ne remplacez pas les composants lorsque le câble d'alimentation est branché.

N'utilisez pas l'instrument en présence de gaz ou fumées inflammables. Dans un tel environnement, le fonctionnement de tout instrument électrique représente un danger certain.






N'effectuez pas de substitutions de pièces ou des modifications non autorisées.

Il se peut que les condensateurs situés à l'intérieur de l'instrument soient encore chargés, bien que l'instrument ait été débranché de sa source d'alimentation. Des tensions dangereuses sont présentes dans cet instrument, capables de causer des blessures graves. Vous devez procéder avec extrême précaution lorsque vous manipulez, testez et ajustez cet instrument.

Lorsque vous manipulez des solvants, respectez les règles de sécurité (lunettes, gants et vêtements de protection) telles qu'elles figurent dans la fiche de sécurité fournie par le fournisseur du solvant, particulièrement s'il s'agit de produits toxiques ou dangereux.

Symboles de sécurité

Tableau 10 Symboles de sécurité

Symbole	Description
	L'appareil est marqué de ce symbole quand l'utilisateur doit consulter le manuel d'instructions afin d'éviter les risques de blessure de l'opérateur et de protéger l'appareil contre les dommages.
	Indique des tensions dangereuses.
	Indique une borne de terre protégée.
	Indique qu'il est dangereux pour les yeux de regarder directement la lumière produite par la lampe au deutérium utilisée dans ce produit.
	L'appareil comporte ce symbole pour indiquer qu'il présente des surfaces chaudes et que l'utilisateur ne doit pas les toucher lorsqu'elles sont chaudes.

AVERTISSEMENT

Un AVERTISSEMENT

vous met en garde contre des situations qui pourraient causer des blessures corporelles ou entraîner la mort.

→ N'allez pas au-delà d'un avertissement tant que vous n'avez pas parfaitement compris et rempli les conditions indiquées.

ATTENTION

Le message ATTENTION

vous prévient lors de situations risquant d'entraîner la perte de données ou d'endommager l'équipement.

→ N'allez pas au-delà d'une mise en garde « Attention » tant que vous n'avez pas parfaitement compris et rempli les conditions indiquées.

Informations sur les solvants

Cuve à circulation

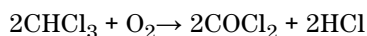
Pour assurer un fonctionnement optimal de votre cuve à circulation :

- Évitez d'utiliser des solutions alcalines (pH > 9,5) susceptibles d'attaquer le quartz et de nuire aux propriétés optiques de la cuve à circulation.

Utilisation de solvants

Respectez les recommandations suivantes lors de l'utilisation de solvants.

- L'utilisation de verre ambré peut empêcher le développement d'algues.
- Évitez d'utiliser les solvants suivants, qui sont corrosifs sur l'acier :
 - Les solutions d'halogénures alcalins et de leurs acides (par exemple l'iodure de lithium, le chlorure de potassium, etc.),
 - Les concentrations élevées d'acides inorganiques, tels que l'acide sulfurique ou nitrique, et des solvants organiques en particulier aux températures élevées (si votre méthode chromatographique le permet, remplacez ces acides par de l'acide phosphorique ou un tampon phosphate, moins corrosifs pour l'acier inoxydable),
 - Les solvants ou mélanges halogénés qui forment des radicaux et/ou des acides, comme :



Cette réaction, dans laquelle l'acier inoxydable joue sans doute le rôle de catalyseur, se produit rapidement avec le chloroforme sec si le processus de séchage élimine l'alcool stabilisant,

- Les éthers de qualité chromatographique, qui peuvent contenir des peroxydes (par exemple, le THF, le dioxane, le di-isopropyléther). De tels éthers doivent être filtrés avec de l'oxyde d'aluminium sec qui adsorbe les peroxydes,
- Les solvants contenant des agents complexants forts (l'EDTA, par exemple),
- Les mélanges de tétrachlorure de carbone avec l'isopropanol ou le THF.

Agilent Technologies sur Internet

Pour les toutes dernières informations sur les produits et les services Agilent Technologies, visitez notre site Internet à l'adresse suivante :

<http://www.agilent.com>

Sélectionnez Produits/Analyse chimique.

Vous y trouverez également la dernière version téléchargeable du micrologiciel des modules.

Configuration d'une méthode à l'aide de la fonction Edit Entire Method

Toutes les procédures et configurations de méthodes sont décrites pour la pompe binaire 1290 Infinity. Elles peuvent être exécutées de la même manière pour la pompe quaternaire 1290 Infinity.

Dans le logiciel ChemStation, une méthode contient tous les paramètres nécessaires à l'acquisition des données (gestion du système) et à l'analyse des données (traitement des données pour obtenir des résultats quantitatifs et qualitatifs). Les paramètres sont accessibles au moyen d'une série d'écrans qui traitent chacun d'un module ou d'une fonction. Vous pouvez accéder à ces écrans en cliquant sur une icône de l'interface utilisateur ou sur la barre de menus et ses menus déroulants. Une nouvelle méthode est créée en chargeant et modifiant une méthode existante, ou en chargeant et modifiant le modèle de méthode vierge **DEF_LC.M**.

Pour modifier quelques paramètres seulement, vous pouvez accéder directement aux fenêtres de configuration appropriées correspondant à ces paramètres. Cependant, les utilisateurs moins expérimentés peuvent trouver qu'il est plus facile d'utiliser la fonction **Modifier l'ensemble de la méthode** car celle-ci vous amène automatiquement de fenêtre en fenêtre. Pour utiliser cette fonction, cliquez sur le menu **Méthode > Modifier l'ensemble de la méthode**. La boîte de dialogue **Check Method Sections to Edit** s'affiche :

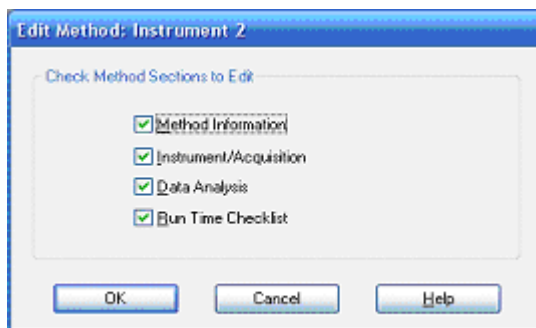


Figure 35 Choix des sections de méthode à modifier

Cette boîte de dialogue résume les sections qui seront parcourues, et permet de sauter certaines sections en les décochant.

En fonction des sections sélectionnées, plusieurs écrans seront affichés successivement :

- La section **Method Information** comprend un texte de description de la méthode.
- La section **Instrument/Acquisition** comprend :
 - les paramètres d'injection,
 - les paramètres de la pompe,
 - les paramètres du four,
 - les paramètres du détecteur, et
 - les courbes de l'instrument.
- La section **Data Analysis** comprend :
 - les détails de signal,
 - les paramètres d'intégration, et
 - les paramètres de création des rapports.
- La section **Run Time Checklist** comprend les parties de la méthode à exécuter.

REMARQUE

Dans la fonction **Edit Entire Method**, le fait de cliquer sur **OK** ferme l'écran en cours et ouvre l'écran suivant. Il s'agit d'un processus à sens unique.

Si vous cliquez accidentellement sur **OK** avant d'avoir effectué toutes les modifications, cliquez sur **Cancel** et recommencez **Edit Entire Method** depuis le début. Sinon, continuez à effectuer vos modifications et revenez à l'écran non terminé à la fin du processus. Lorsque vous cliquez sur **Cancel**, un bouton **Skip** apparaît et permet de sauter les écrans restants.

Informations sur la méthode

Vous pouvez également accéder à l'écran **Method Information** en utilisant le menu **Méthode > Informations sur la méthode** ou en effectuant un clic droit sur l'interface utilisateur.

Cette fenêtre permet de saisir des informations concernant la méthode. Ces informations seront affichées au-dessus du schéma du système sur l'écran **Method and Run Control** lorsque cette méthode est chargée et réside dans la mémoire.

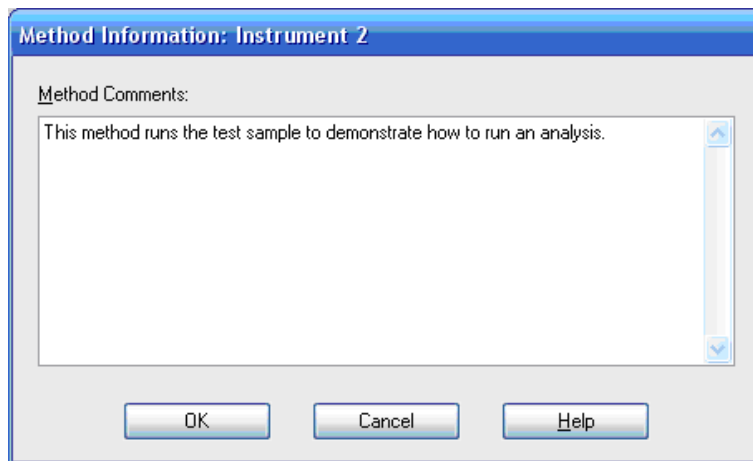


Figure 36 Informations sur la méthode

Instrument/Acquisition

Configuration de la méthode de l'instrument

Vous pouvez accéder directement à l'écran **Setup Method** en utilisant le menu **Instrument > Configuration de la méthode de l'instrument...**, ou en effectuant un clic droit sur toute icône de module de l'interface utilisateur et en sélectionnant **Method...** dans le menu contextuel. La prochaine étape de la fonction **Edit Entire Method** est l'écran **Setup Method** qui comprend six onglets pour les différents modules et fonctions.

Les onglets sont :

- Échantillonneur automatique haute performance (**HiP-ALS**)
- **HiP-ALS Injector Program**
- Pompe binaire (**BinPump**)
- Compartiment à colonne thermostaté (**TCC**)
- Détecteur à barrette de diodes (**DAD**)
- **Instrument Curves**

Pour changer d'onglet, cliquez sur le nom de l'onglet en haut de l'écran. Lorsque vous changez des paramètres, vous pouvez transmettre chaque modification à l'instrument immédiatement en cliquant sur **Apply**. Sinon, si vous pouvez cliquer sur **OK** une fois que vous avez terminé de modifier tous les onglets pour transmettre tous les paramètres modifiés aux modules, fermer l'écran et passer à l'étape suivante.

Les onglets de saisie des paramètres sont d'aspect similaire dans tous les logiciels de commande (ChemStation, EZChrom, MassHunter, etc.) grâce à l'utilisation par Agilent de pilotes RC.Net communs pour les modules de l'instrument.

Pour exécuter l'exemple de séparation, comme pour la plupart des méthodes, il n'est pas nécessaire de modifier tous les paramètres disponibles. Cependant, par souci d'exhaustivité, ils sont tous décrits dans les sections suivantes.

Onglet de l'échantillonneur automatique (HiP-ALS)

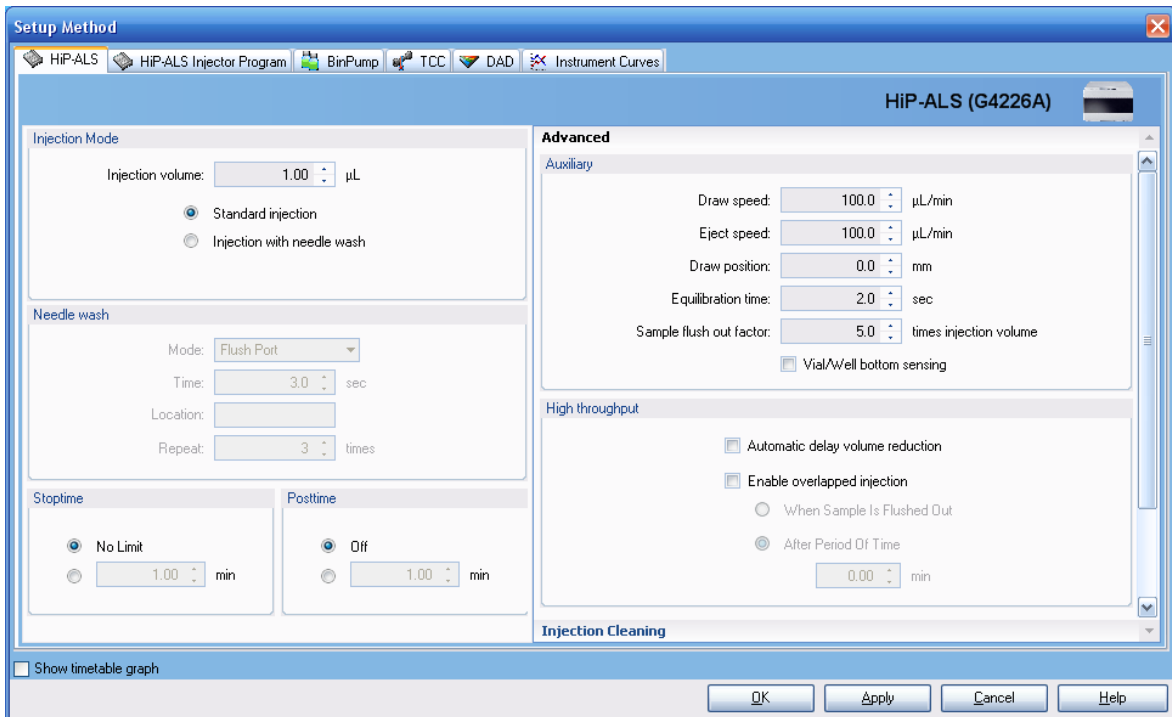


Figure 37 Écran de configuration de méthode – onglet Échantillonneur automatique haute performance

- **Injection Mode**
 - **Injection volume** : règle le volume à injecter (par exemple 3 µl),
 - **Standard injection** : indique qu'aucun lavage de l'extérieur de l'aiguille n'est effectué,
 - **Injection with needle wash** : permet de réduire les transferts éventuels. Il s'agit du mode de fonctionnement recommandé ; il est configuré dans la zone en dessous.
- **Needle Wash** (si l'option est sélectionnée au-dessus).
 - **Mode** : indique comment l'extérieur de l'aiguille est rincé, soit activement au moyen de la **Flush Port**, soit par immersion dans un **Wash Vial** déterminé.

- **Time** : durée en secondes de pompage du solvant de lavage par la pompe péristaltique reliée à la voie de lavage. La pompe fonctionne pendant 15 s supplémentaires pour rincer la voie de lavage.
- **Location** : indique quel flacon ou puits de plaque est utilisé dans le cas où l'option **Wash Vial** est sélectionnée.

REMARQUE

Les flacons ne doivent pas comporter de membrane ; ils doivent être ouverts afin d'éviter toute transmission de matériel par transfert sur la membrane.

- **Repeat** : indique, si l'option Flacon de lavage est sélectionnée, comment de fois l'aiguille est immergée dans le flacon (par défaut 3 fois, maximum 5).
- **Stop Time / Post Time** sont réglés sur **No Limit / Off**. Ces paramètres sont définis dans l'onglet de la pompe.
- **Advanced - Auxiliary**
 - **Draw speed** : indique la vitesse d'aspiration de l'échantillon à travers l'aiguille. La valeur par défaut est 100 µl/min. La vitesse doit être diminuée pour des échantillons visqueux ou pour une plus grande précision avec des petits volumes d'échantillon (<2 µL).
 - **Eject speed** : indique la vitesse de sortie de l'aiguille.
 - **Draw position** : indique le décalage vertical par rapport à la position d'injection nominale de 10 mm au-dessus du fond d'un flacon. Pour un flacon de 2 ml, cela correspond à environ la moitié de la hauteur du flacon donc un décalage négatif permet de prélever l'échantillon plus près du fond du flacon. Par exemple, un décalage de -7 mm positionne l'extrémité de l'aiguille à 3 mm au-dessus du fond du flacon.
 - **Equilibration time** : indique l'intervalle de temps entre l'aspiration de l'échantillon et le déplacement de l'aiguille.
 - **Sample flush out factor** : correspond au temps d'attente de l'échantillonneur automatique après l'injection et avant de permettre à la valve de revenir à la position de dérivation. Cela garantit que l'échantillon a été évacué de l'aiguille, du siège et de la vanne d'injection. La valeur par défaut est 5.
 - **Vial/Well bottom sensing** : représente une alternative à l'utilisation du décalage de la position d'aspiration. L'aiguille se déplace lentement jusqu'à toucher le fond du flacon ou du puits, puis remonte de 1 mm. Il s'agit d'un moyen ingénieux de s'assurer que l'aiguille est proche du fond

du flacon mais par conséquent l'injection est légèrement plus longue. Cette option ne doit pas être utilisée s'il existe des particules au fond du flacon qui pourraient obstruer l'aiguille.

- **Advanced - High Throughput**
 - **Automatic delay volume reduction (ADVR)** : bascule la vanne d'injection de la voie principale vers la voie de dérivation après l'injection et qu'un volume défini par le facteur de rinçage de l'échantillon ait été pompé à travers l'injecteur. Cela réduit le volume de retard du système d'environ 70 µl et permet aux variations de gradient d'atteindre la colonne plus rapidement.
 - **Enable overlapped injection** : bascule la vanne d'injection de la voie principale vers la voie de dérivation après l'injection et soit après que l'échantillon ait été évacué de l'injecteur, soit plus tardivement pendant l'analyse après un intervalle de temps défini. L'injecteur aspire ensuite l'échantillon suivant de façon à être prêt pour l'injection suivante, réduisant ainsi la durée totale de cycle et augmentant la capacité d'analyse d'échantillons.
- **Injection Valve Cleaning**
 - **Injector Cleaning** : permet de rincer le système d'injection avec du solvant.
 - **Injection Valve Cleaning** : permet de basculer la voie de la vanne à des points donnés pendant l'analyse afin de minimiser le transfert lorsque des composés pouvant poser un problème sont injectés.

Onglet de l'échantillonneur automatique haute performance (Hip_ALS Injector Program)

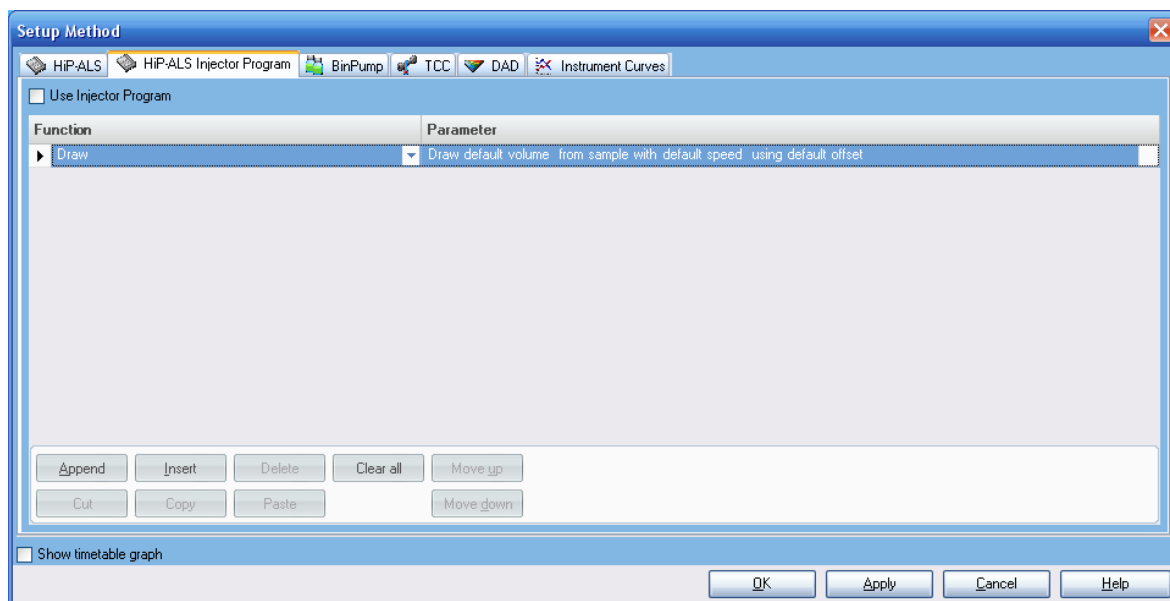


Figure 38 Écran de configuration de méthode – onglet Programme d'injection de l'échantillonneur automatique HiP

Cet onglet permet de créer des programmes d'injection spécifiques comprenant la manipulation d'aliquots à partir de flacons multiples, comme par exemple lors de la dérivation pré-colonne. Des réactifs chimiques sont alors mélangés automatiquement avec l'échantillon pour améliorer sa détection ou la sensibilité. Un exemple courant est la dérivation d'acides aminés avec les réactifs OPA et FMOC. Pour de plus amples informations, consultez le *manuel de l'échantillonneur automatique Agilent 1290 Infinity*.

Onglet de la pompe binaire (BinPump)

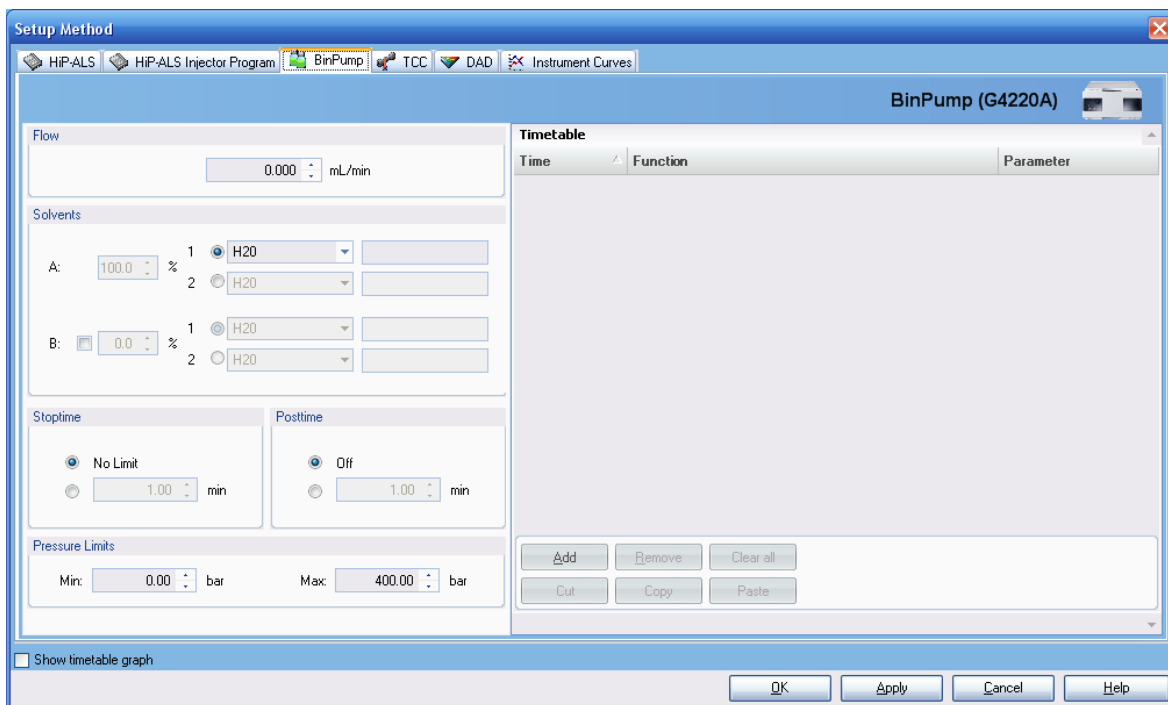


Figure 39 Écran de configuration de méthode – onglet Pompe binaire

- **Flow** : permet de régler un débit de jusqu'à 5 ml/min. Pour l'exemple de séparation, un débit de 0,4 ml/min est utilisé. Si la contre-pression atteint transitoirement la valeur de pression maximale définie, le débit est diminué pendant quelques secondes. Cependant, si la pression est limitée de cette manière plus longtemps une situation d'erreur est générée et le débit est arrêté.
- **Solvents** : indique les phases mobiles disponibles et la composition en pourcentage du mélange pompé dans les deux voies, A et B. Pour chaque voie un menu déroulant permet de sélectionner un solvant dans la liste pour optimiser les paramètres de compressibilité utilisés par la commande de pompe. Cela permet d'optimiser la circulation des liquides comme décrit dans la section « [Configuration d'un volume de retard optimal](#) », page 44. Une deuxième zone de texte permet de saisir une description de la phase mobile. Si une vanne de sélection de solvant est installée sur la pompe il existe deux possibilités de solvant pour chaque voie, l'option appropriée

pour la méthode est sélectionnée à l'aide du bouton radio à gauche de la description du solvant. La pompe génère des mélanges binaires à partir des voies A et B sélectionnées, par exemple A2 et B1 ; il n'est pas possible de mélanger A1 et A2 ou B1 et B2. Les valeurs indiquées pour les pourcentages de A et de B définissent la composition d'une méthode isocratique ou les conditions de départ d'une méthode à gradient et les conditions d'équilibre entre deux analyses à gradient. Seule la valeur de B est saisie, la valeur de A est actualisée pour afficher 100 % moins B dès que le curseur est déplacé. Pour l'exemple de séparation, réglez A sur Eau et B sur Méthanol à 50 %. A sera de 50 %.

- **Timetable** : décrit les variations de la composition de A et de B en pourcentage dans la phase mobile au cours de l'analyse, et le cas échéant les variations du débit et la pression maximum autorisée. Le tableau des événements permet de faire varier de manière linéaire les paramètres entre des points de consigne déterminés. Les valeurs des paramètres définies ailleurs sur cet écran sont utilisées comme conditions de départ et sont modifiées par la suite seulement si des valeurs sont entrées dans le tableau des événements. Par exemple, si le débit doit rester constant durant une analyse alors il n'est pas nécessaire de entrer des valeurs de débit dans le tableau des événements. Pour entrer des valeurs dans le tableau des événements, cliquez sur le bouton **Add** pour ajouter une ligne au tableau ; entrez le temps du point de consigne, sélectionnez le type d'entrée dans la liste déroulante (composition, débit, pression) et cliquez sur la zone **parameter** pour afficher le champ de saisie de la valeur. Si les entrées du tableau ne sont pas saisies par ordre chronologique, elles sont triées automatiquement en fonction du temps. Les lignes du tableau des événements peuvent être modifiées directement et les boutons **Cut**, **Paste** et **Remove** peuvent être utilisés pour ajouter et supprimer des lignes. Plusieurs lignes peuvent être ajoutées pour créer une série de segments de gradient linéaires et définir le profil de gradient souhaité. Pour créer un gradient simple pour l'exemple de séparation, effacez d'abord tout le contenu du tableau à l'aide du bouton **Clear all** si celui-ci contient des entrées, puis ajoutez une ligne à 4,00 min pour passer à une composition de 90 %. L'affichage graphique montrera un gradient linéaire de 50 % de B à 90 % de B sur une durée de 4 min. Si vous souhaitez utiliser un gradient par paliers, effectuez deux entrées avec les paramètres « avant palier » et « après palier » séparés par 0,01 min. Ce type de gradient est souvent utilisé pour éluer rapidement des pics à rétention longue de la colonne vers la fin de l'analyse en augmentant le solvant plus fort et/ou le débit à l'aide d'un palier. Par exemple, le % de B peut être augmenté de 75 % à 95 %. Il n'est pas nécessaire d'entrer les valeurs des paramètres pour le temps 0,00 min dans le tableau des événements, ces valeurs

sont récupérées des autres points de consigne de l'écran. Toutefois, certains utilisateurs aiment voir l'ensemble du tableau des événements et entrent les valeurs pour le temps 0,00 min. Cela ne pose pas de problème mais il est à noter que si les conditions initiales sont modifiées par la suite les nouvelles valeurs doivent être entrées dans le tableau des événements et les points de consigne modifiés dans la zone Solvants de l'écran.

- **Show timetable graph** : affiche une version graphique de la variation des paramètres dans le temps si la case est cochée.
- **Stop Time** : indique la durée totale pour la séparation ou l'analyse. Appelé parfois « Temps d'exécution » par certains utilisateurs. Il s'agit de la durée, mesurée en minutes à partir de l'injection, de l'analyse. Lorsque cette durée est écoulée l'acquisition de données s'arrête et le débit, la composition et les autres paramètres du système reviennent à leurs valeurs initiales pour la méthode. Le système devient de nouveau disponible pour l'injection suivante. Le temps d'arrêt doit toujours être au moins aussi long que la dernière entrée du tableau des événements, car si ce n'est pas le cas l'analyse s'arrête et le système revient aux conditions initiales avant que l'ensemble des événements aient pu être effectué. Le **Stop Time** peut être réglé sur **No Limit**, dans ce cas l'utilisateur doit terminer manuellement l'analyse. Même si des temps d'arrêt peuvent être configurés pour tous les modules du système, le temps d'arrêt de la pompe sert de référence et celui des autres modules est généralement réglé sur cette valeur.
- **Post Time** : définit la durée d'un compte à rebours à la fin de l'analyse pendant laquelle l'injection suivante ne peut être effectuée. Cela permet au système de se rééquilibrer après une analyse à gradient. Pour une méthode isocratique ce paramètre peut être réglé sur **Off**. Pour des méthodes à gradient cette valeur peut être déterminée expérimentalement en observant le comportement de la ligne de base. Généralement, il correspond au temps nécessaire pour rincer le système avec le volume de retard du système plus au moins trois à cinq volumes de colonne.
- **Pressure Limits** : permettent de contrôler le comportement de la pompe en fonction de la pression. La pression maximale de la pompe 1290 Infinity est de 1200 bar mais certaines colonnes ne résistent pas à ce niveau de pression et il est nécessaire de les protéger en fixant une limite de pression. Une situation d'erreur est générée par la pompe si cette pression est atteinte : l'analyse en cours est arrêtée et la pompe passe en mode Veille avec un débit nul. Les informations relatives à la pression maximum supportée par chaque colonne sont fournies avec la colonne. La colonnes Agilent ZORBAX RRHD peuvent être utilisées à 1200 bar. La limite de pression inférieure est « Désactivée » si sa valeur est de zéro mais pour toute autre valeur une

situation d'erreur sera générée par la pompe si la pression de fonctionnement descend en dessous de ce seuil. Ce paramètre correspond à une mesure préventive lorsque la colonne ne se trouve pas à l'intérieur d'un module équipé d'un capteur de fuites ou dans le cas où le système serait asséché. Habituellement cette valeur est réglée entre 10 et 20 bar.

Onglet du compartiment à colonne thermostaté (TCC)

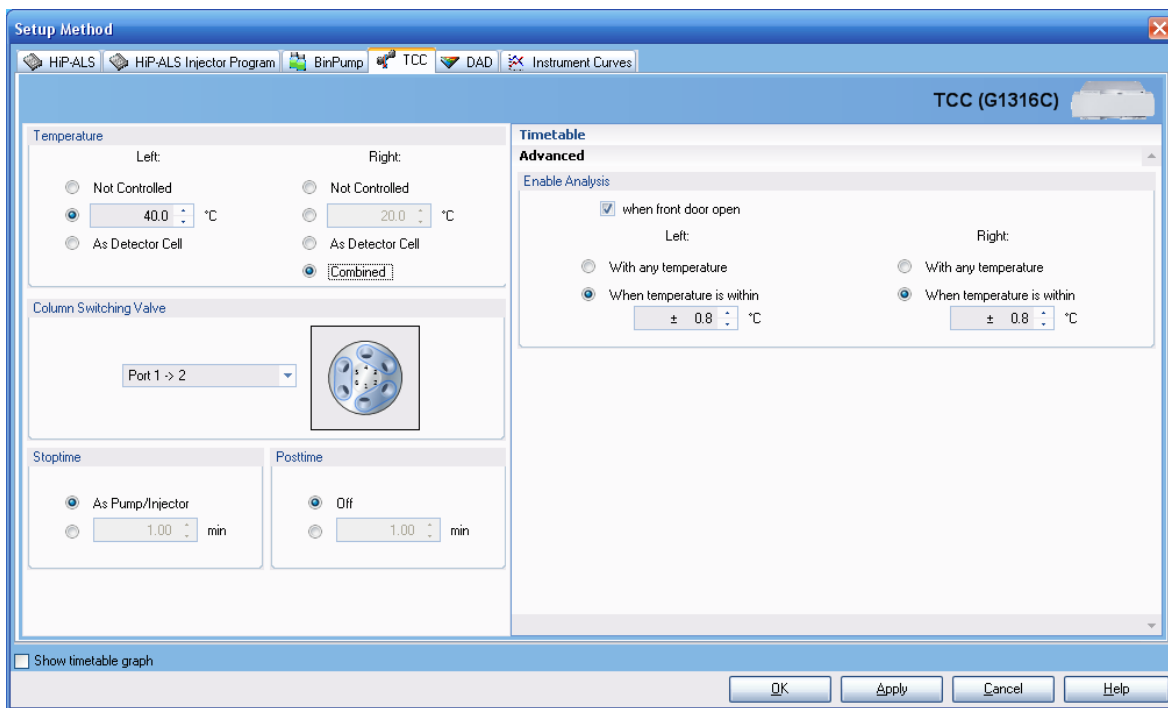


Figure 40 Écran de configuration de méthode écran – onglet Compartiment à colonne thermostaté

- **Temperature** : permet de définir la température des supports de colonne des côtés gauche et droit. Les températures peuvent être réglées de manière indépendante ou associées en activant le bouton radio **Combined**. Lorsque combinées, les valeurs entrées pour le côté gauche s'appliquent aux deux côtés ; cela est nécessairement le cas si la longueur de la colonne dépasse 15 cm et que celle-ci doit être fixée des deux côtés du compartiment. Les deux côtés peuvent fonctionner indépendamment lorsque deux colonnes sont utilisées à des températures différentes ; ceci peut être mise en œuvre

lorsqu'une vanne de d'inversion entre colonnes a été installée pour basculer le flux d'une colonne à l'autre. Un autre cas de figure où les zones de température séparées sont utiles se présente lorsque d'un côté la colonne est utilisée à une température élevée (p. ex. au-dessus de 60 °C) et de l'autre côté l'échangeur de chaleur est utilisé pour refroidir l'éluant avant que celui-ci pénètre dans le détecteur, réduisant ainsi le bruit de fond dû à des effets thermiques dans la cuve à circulation. La sélection de l'option **As Detector Cell** permet de régler automatiquement la valeur de la température sur celle définie pour la cuve du détecteur 1290 Infinity.

La température de chaque zone peut être réglée sur une valeur comprise entre -5 °C et 100 °C ; l'utilisateur doit vérifier que la colonne convient à une utilisation à cette température. (Les phases solides Agilent ZORBAX RRHD et RRHT StableBond peuvent être utilisées dans la fourchette haute de la plage). La température est réglée à une précision de $\pm 0,15$ °C jusqu'à 10 °C en dessous de la température ambiante, bien qu'il soit à noter que très peu d'applications fonctionnent en dessous de 12 - 15 °C. Évitez d'utiliser le TCC à une température tellement basse que l'humidité de l'air se condense car cela pourrait déclencher le capteur de fuites.

- **Column Switching Valve** : cette option n'est active que si une vanne est installée entre les supports de colonne. Trois types de vanne sont disponibles :
 - 2 positions / 6 voies : pour permuter entre deux colonnes,
 - 2 positions / 10 voies : pour alterner avec la régénération des colonnes,
 - 8 positions / 9 voies : utilisée pour la sélection de colonnes multiples avec MDS.

Onglet du détecteur à Barrette de diodes (DAD)

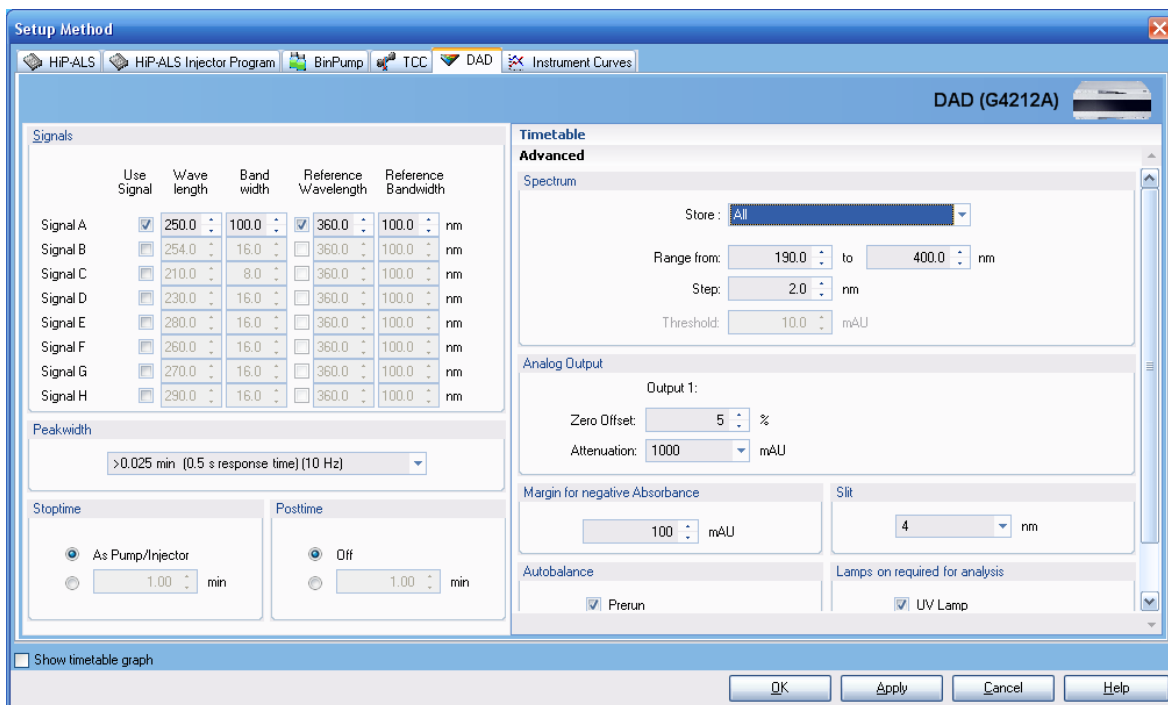


Figure 41 Écran de configuration de méthode – onglet Détecteur à barrette de diodes

- **Signals** : Jusqu'à huit signaux distincts (chromatogrammes) peuvent être enregistrés. Pour indiquer qu'un signal doit être enregistré, la case **Use Signal** correspondant au signal doit être cochée et la longueur d'onde et la bande passante définies. Le cas échéant, un signal de référence doit être défini et sa case cochée.
 - **Wavelength** : indique la longueur d'onde centrale (nm) du signal,
 - **Bandwidth** : indique la largeur (nm) du signal,
 - **Reference Wavelength** : indique la longueur d'onde centrale (nm) de la bande de référence qui est soustraite du signal analytique,
 - **Reference Bandwidth** : indique la largeur (nm) de la bande de référence.
- **Peakwidth** : indique la vitesse d'acquisition des données et le filtrage du signal.

Configuration d'une méthode à l'aide de la fonction Edit Entire Method

- **Stop Time/Post Time** : sont réglés sur **No Limit / Off**. Ces paramètres sont généralement définis dans l'onglet de la **Pump** . Cependant, le temps d'arrêt du détecteur peut parfois être différent de celui de la pompe si par exemple l'analyse des données se termine avant la fin de l'analyse définie pour la pompe. Cela peut être le cas lorsqu'une rampe d'équilibrage du gradient a été définie à la fin du gradient. Par exemple, si le pourcentage de B est de 95 % à 10 min et qu'il est attendu que tous les pics aient été élués de la colonne, alors l'analyse peut globalement être considérée comme étant finie, cependant un segment de gradient supplémentaire peut être ajouté pour redescendre le pourcentage de B à sa valeur initiale sur une période de deux minutes et rééquilibrer en douceur la colonne. Comme aucune donnée utile n'est attendue pendant cette dernière rampe le temps d'arrêt du détecteur peut être réglé sur 10 min pour que l'acquisition des données s'arrête, alors que le temps d'arrêt de la pompe est de 12 min pour permettre la réalisation de la rampe. Il s'agit d'une préférence de l'utilisateur, certaines personnes reconnaissent que les dernières minutes du chromatogramme ne contiennent pas de données utiles mais les enregistrent quand même pour éviter l'inconvénient de devoir définir un temps d'arrêt différent pour le détecteur. Le temps d'arrêt du détecteur n'a aucun effet sur celui de la pompe et le fait qu'il soit plus court ne raccourcit pas l'analyse (comme cela serait le cas avec les temps d'arrêt des autres modules). Le plus facile est donc de régler tous les temps d'arrêt sur **As Pump**.
- Le **Timetable** fonctionne de la même manière que pour les autres modules : vous pouvez ajouter une ligne, sélectionner la fonction à faire varier et entrer de nouvelles valeurs pour cette fonction. Toute variation des paramètres du détecteur s'applique immédiatement au temps défini. Les paramètres suivants peuvent varier au cours d'une analyse :
 - Stabilisation
 - Signal
 - Seuil
 - Largeur de pic du détecteur
 - Mode d'acquisition des spectres
 - Contacts
- **Advanced - Spectrum**
 Les spectres peuvent être enregistrés durant l'analyse de manière continue ou en fonction des pics (cela est vrai pour le logiciel ChemStation ; certains autres logiciels, p. ex. EZChrom, ne prennent en charge que l'acquisition continue de tous les spectres et les options d'enregistrement en fonction des

pics n'apparaissent pas). L'acquisition des spectres et l'acquisition des signaux sont des opérations indépendantes exécutées par le micrologiciel du détecteur ; elles ne dépendent pas de l'extraction des données de la matrice des données 3D par le logiciel de l'ordinateur. La vitesse d'acquisition des spectres est déterminée par le paramètre **Peakwidth** et huit spectres sont acquis pendant la durée indiquée sous **Peakwidth**. Le micrologiciel effectue une détection de pics sur le signal A uniquement afin de déterminer quels spectres de pic doivent être enregistrés. Pour des signaux multiples, il peut être nécessaire de régler le signal A comme détecteur à large bande pour s'assurer que des spectres de pic sont disponibles pour tous les signaux de longueurs d'onde différentes.

- **Store** : permet de choisir le mode d'acquisition des spectres. Les options sont :
 - Aucun** : aucun spectre n'est enregistré,
 - Apex+Lignes de base** : trois spectres sont enregistrés au début, au sommet et à la fin du pic,
 - Apex+Pentes+Lignes de base** : cinq spectres sont enregistrés au début, dans la pente ascendante, au sommet, dans la pente descendante et à la fin du pic,
 - Tout dans le pic** : tous les spectres disponibles à l'intérieur d'un pic sont enregistrés,
 - Tous** : tous les spectres sont enregistrés tout au long de l'analyse,
 - Un spectre sur deux** : enregistre seulement un spectre sur deux tout au long de l'analyse.
- **Range** : les spectres peuvent être enregistrés sur l'ensemble de la plage du détecteur, de 190 nm à 640 nm, ou sur une plage réduite définie par l'utilisateur. (Cela réduit aussi le volume de données à enregistrer).
- **Step** : permet de définir l'intervalle (nm) des données enregistrées dans un spectre et détermine donc la résolution du spectre observé. La valeur par défaut de 2 nm est une bonne choix pour la plupart des applications.
- **Threshold** : définit la valeur seuil de hauteur de pic (mDO) au-dessus de laquelle les spectres sont enregistrés.
- **Advanced - Analog Output**

Le détecteur 1290 Infinity dispose d'un connecteur de sortie de signal analogique pour utilisation avec des systèmes de données qui n'acceptent pas une entrée numérique. Les options sont :

Configuration d'une méthode à l'aide de la fonction Edit Entire Method

- **Zero Offset** : définit le niveau zéro sur un pourcentage fixe du signal de sortie. Cela permet une certaine marge pour la dérive négative.
- **Attenuation** : règle l'échelle de la sortie sur l'absorbance définie.
- **Advanced - Margin for Negative Absorbance**
 La valeur par défaut est de 100 mAU, ce qui signifie que la plage dynamique du détecteur est suffisante, au vu du niveau sur lequel a été réglé le zéro, pour mesurer jusqu'à cette limite inférieure. Pour mesurer des pics négatifs plus importants ou pour suivre une ligne de base présentant une forte dérive négative, cette valeur doit être ajustée vers le bas pour éviter l'obtention d'un signal plat sur la limite inférieure de la plage. Toutefois, cette valeur ne doit pas être modifiée sans bonne raison, car sa diminution augmente le bruit de la ligne de base et réduit la plage disponible pour la mesure des pics positifs.
- **Advanced - Slit**
 La fente d'entrée du spectrographe contrôle la résolution spectrale et agit sur le bruit de la ligne de base et la sensibilité. La valeur par défaut est de 4 nm, ce qui convient à la plupart des applications. Reportez-vous à la section « [Comment obtenir une sensibilité plus élevée](#) », page 61 pour une description plus détaillée de ce paramètre.
- **Advanced - Autobalance** : règle le niveau d'absorbance sur zéro pour toutes les longueurs d'onde (c.-à-d. tous les points du spectre sont stabilisés sur zéro), le signal de la ligne de base est donc également réglé sur zéro. L'option **Prerun** est sélectionnée pour stabiliser avant le début de l'analyse ; il s'agit du choix habituel dans des situations normales. Parfois l'option **Postrun** peut être sélectionnée pour stabiliser à la fin de l'analyse après écoulement du Temps post-analyse. Par exemple, si le signal présente toujours une dérive négative et que l'utilisateur souhaite finir l'analyse avec une absorbance sur zéro, cette option permet de ramener l'absorbance sur le niveau zéro pour l'analyse suivante. Cela ne modifie pas rétrospectivement l'analyse à la fin de laquelle la stabilisation est exécutée.
- **Advanced - Lamps on required for analysis** : le DAD ou MWD 1290 Infinity dispose d'une lampe deutérium qui doit être allumée pour l'analyse ; cette case doit donc être cochée.

Onglet Instrument Curves

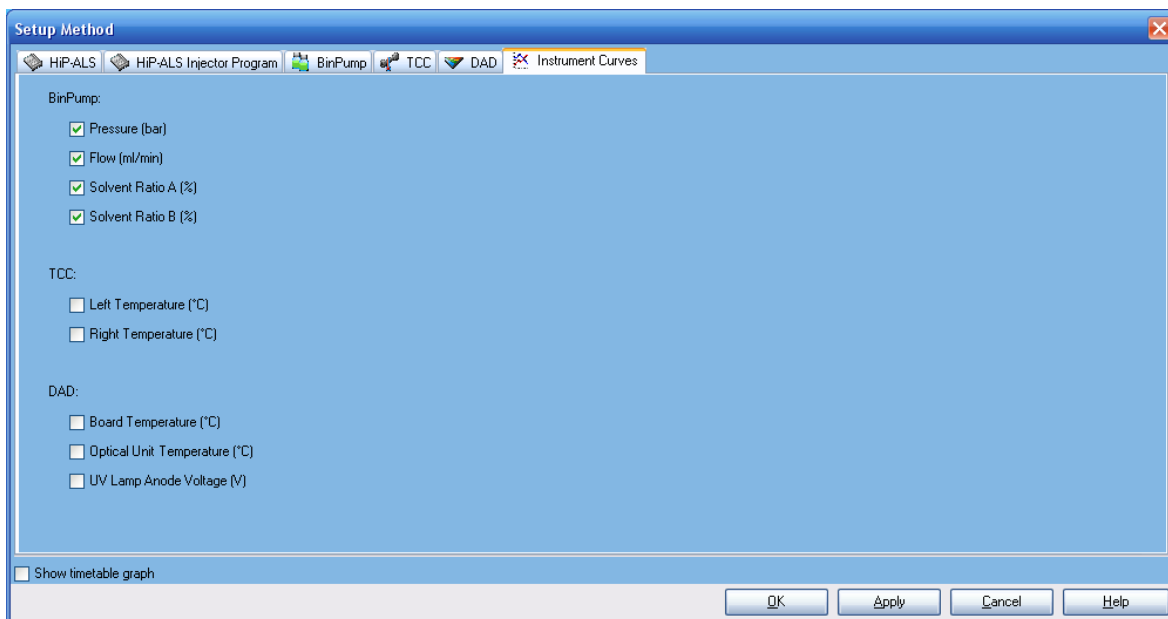


Figure 42 Écran de configuration de méthode – Onglet Courbes de l'instrument

L'onglet Courbes de l'instrument permet de suivre les flux de données autres que les signaux du détecteur. Leur enregistrement avec les données est activé en cochant les cases appropriées. Ces courbes servent essentiellement à des fins de diagnostic. Les courbes possibles sont :

- Pompe :
 - Pression
 - Débit
 - Composition A/B : peut se révéler utile pour superposer le profil du gradient sur un chromatogramme.
- Compartiment à colonne thermostaté :
 - Température gauche/droite
- Détecteur :
 - Température de la carte
 - Température de l'unité optique
 - Tension de l'anode de la lampe UV

Analyse des données

Détails des signaux

Vous pouvez également accéder directement à l'écran **Signal Details** par l'intermédiaire de la vue **Method and Run Control** : effectuez un clic droit sur l'icône **Calibration** de l'interface utilisateur, puis sélectionnez **Signal Details** dans le menu contextuel. Dans la vue Analyse des données, vous pouvez accéder à cet écran par l'intermédiaire du menu **Étalonnage > Détails des signaux**.

L'écran **Signal Details** est l'étape suivante de la fonction **Edit Entire Method** et il permet d'identifier les signaux acquis qui doivent être traités par l'Analyse des données. La liste déroulante énumère les signaux disponibles, y compris les signaux analytiques définis dans les paramètres du détecteur, et des paramètres enregistrés tels que la température, le débit, la composition, la pression et les tracés diagnostiques. Sélectionnez un signal et cliquez sur **Add to Method** pour l'envoyer vers le tableau **Signal Details** affiché dans la partie inférieure de l'écran. Vous pouvez sélectionner un, plusieurs ou tous les signaux acquis par le détecteur. Si aucun signal n'est sélectionné, le tableau est vide ; dans ce cas de figure, le logiciel ChemStation traite par défaut tous les signaux acquis par le détecteur.

Parfois l'utilisateur modifie une méthode existante pour créer une nouvelle méthode et se trouve confronté à une erreur de **Parameter Mismatch** lorsqu'il essaie de lancer la méthode. L'origine de cette erreur vient d'un signal défini dans **Signal Details**, par exemple 250 nm avec une largeur de bande de 8 nm, alors que dans la nouvelle méthode ces valeurs ont été réglées sur 254 nm/12 nm par exemple. Le tableau **Signal Details** contient toujours les informations initiales et le système cherche à traiter un signal qui n'est plus acquis. Pour corriger cette erreur, il suffit de sélectionner l'ancien signal dans le tableau et de le supprimer à l'aide du bouton **Delete Row**.

Si plusieurs détecteurs sont utilisés sur un même système, comme par exemple un détecteur à barrette de diodes et un spectromètre de masse, les lignes **Signal Description** permettent d'entrer un délai de temporisation pour le détecteur aval pour que le logiciel puisse aligner les pics des différents détecteurs.

6 Annexe

Configuration d'une méthode à l'aide de la fonction Edit Entire Method

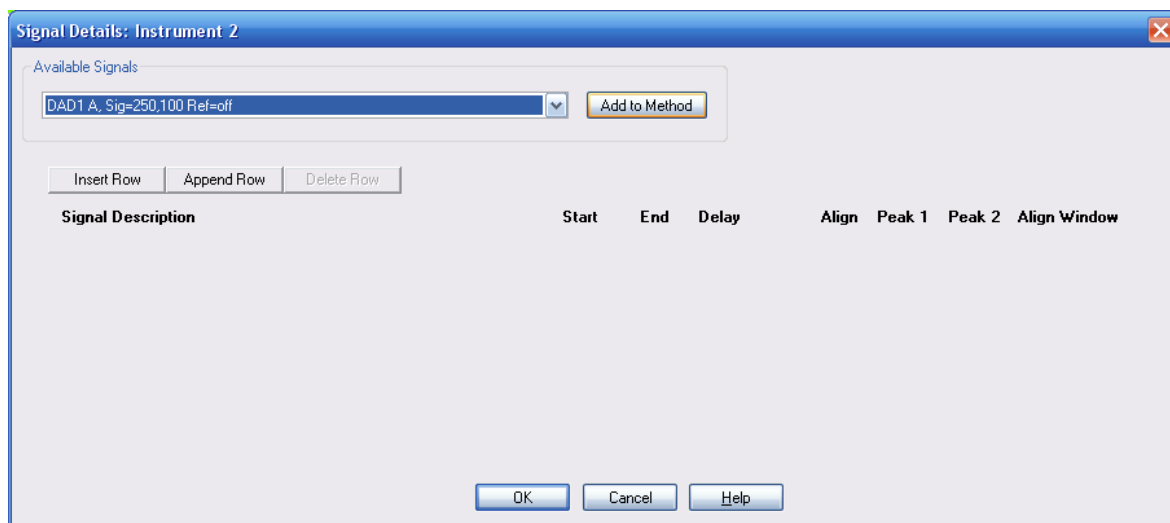


Figure 43 Détails des signaux

Modification des événements d'intégration

Vous pouvez accéder directement à l'écran **Edit Integration Events** par l'intermédiaire de la vue **Method and Run Control** en effectuant un clic droit sur l'icône Événements d'intégration de l'interface utilisateur puis en cliquant sur **Edit Integration Events** dans le menu contextuel. Vous pouvez également accéder à cet écran dans la vue **Data Analysis** par l'intermédiaire du menu **Intégration > Événements d'intégration...** ou l'icône de la tâche **Edit Integration Events**.

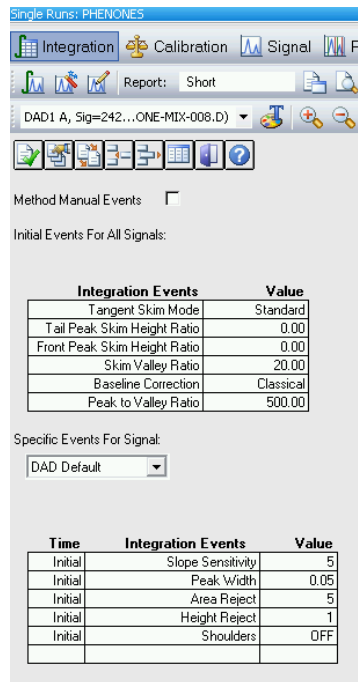


Figure 44 Écran Modification des événements d'intégration

L'intégration, l'étalonnage et la création de rapports constituent la partie d'analyse des données de la méthode. Les paramètres d'intégration et le tableau d'étalonnage sont plus faciles à configurer une fois que les données ont été acquises et peuvent être examinées dans la vue Analyse des données. Les événements d'intégration peuvent être optimisés à ce moment-là et les réglages par défaut sont souvent utilisés pour les premières acquisitions.

L'écran **Edit Integration Events** comprend deux tableaux :

- le tableau **Initial Events For All Signals** contient les événements (paramètres d'intégration) qui s'appliquent à tous les signaux acquis avec la méthode,
- le tableau **Specific Events For Signal** contient les événements qui s'appliquent à un type de détecteur ou à des signaux différents d'un même détecteur.

Les paramètres principaux de ce tableau sont :

- **Slope Sensitivity** : indique la pente et la courbure de la ligne de base qui définissent le début et la fin d'un pic ;
- **Peak Width** : il faut saisir la largeur à mi-hauteur du pic d'intérêt le plus étroit. Cela aide l'intégrateur à distinguer entre le bruit et des pics très petits ;
- **Area Reject / Height Reject** : valeurs seuil déterminant l'aire et la hauteur minimales nécessaire pour inclure un pic dans les résultats ;
- **Integration OFF/ON** : annule l'intégration entre des limites définies. Fonction presque toujours utilisée pour empêcher l'intégration de la région entre l'injection et le front de solvant ou le pic du marqueur non retenu.

Les lignes comme **Integration OFF/ON** sont ajoutées au tableau à l'aide des icônes en haut de la fenêtre.

Cliquez sur **OK** pour quitter et ouvrir l'écran suivant du processus Modifier l'ensemble de la méthode.

Définition du rapport

Vous pouvez accéder directement à l'écran **Specify Report** par l'intermédiaire de la vue **Method and Run Control** en effectuant un clic droit sur l'icône Événements d'intégration de l'interface utilisateur puis en cliquant sur **Specify Report** dans le menu contextuel. Vous pouvez également accéder à cet écran dans la vue **Data Analysis** par l'intermédiaire du menu **Rapport > Définition du rapport** ou l'icône de la tâche Définition du rapport.

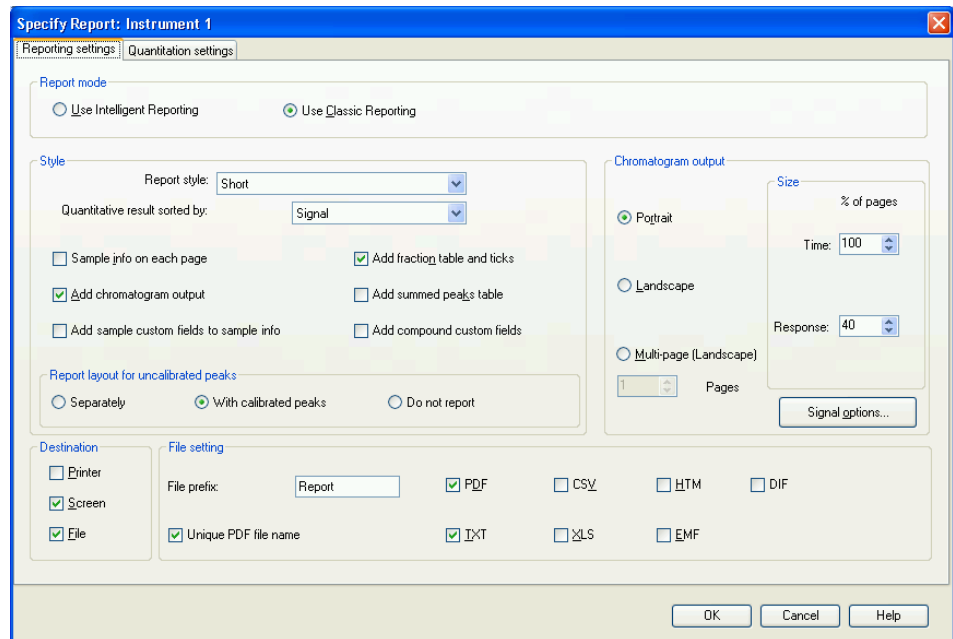


Figure 45 Écran Définition du rapport

Pour obtenir un rapport simple avec les pourcentages des aires avec le mode Rapport classique, qui permet d'envoyer le rapport à l'imprimante et de créer un fichier PDF, entrez les paramètres suivants dans les différentes sections de l'écran Définition du rapport :

Dans l'onglet **Reporting settings** :

- **Report mode:** Utilisez le mode Rapport classique
- **Style**
 - **Report Style:** Court
 - **Quantitative results sorted by:** Signal

6 Annexe

Configuration d'une méthode à l'aide de la fonction Edit Entire Method

- **Add Chromatogram Output:** Coché
- **Chromatogram Output:** Portrait
- **Size:**
 - **Axe Time :** 100 % de la page
 - **Axe Response :** 40 % de la page
- **Destination**
 - **Printer :** Coché
 - **Screen :** Décoché
 - **File:** Coché
- **File Setting:**
 - **PDF:** Coché
 - **Unique PDF file name:** Coché

Dans l'onglet **Quantitation settings** :

- **Calculation mode**
 - **Calculate:** Pourcentages
 - **Based on:** Aire

Cliquez sur **OK** pour quitter et ouvrir l'écran suivant du processus Modifier l'ensemble de la méthode.

Courbes de l'instrument

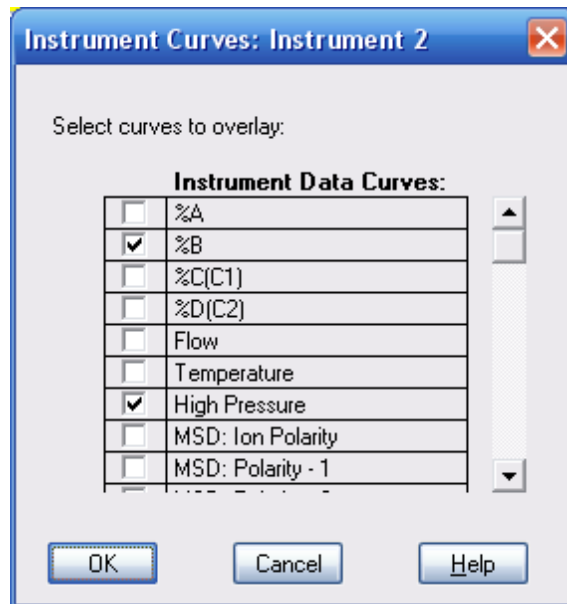


Figure 46 Écran Courbes de l'instrument

Les cases à cocher **Instrument Curves** permettent de superposer ces paramètres enregistrés sous la forme d'un graphique sur le chromatogramme.

Liste de contrôle de l'exécution

Vous pouvez accéder directement à la **Run Time Checklist** par l'intermédiaire du menu **Méthode > Liste de contrôle de l'exécution...** ou en cliquant sur l'icône **Run Time Checklist** en haut à droite de l'écran.

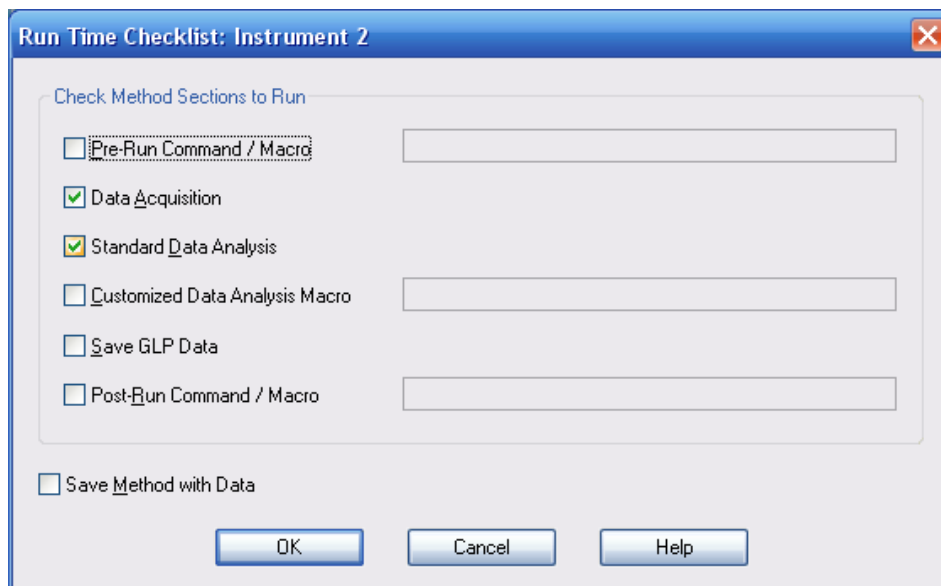


Figure 47 Écran Liste de contrôle de l'exécution

La **Run Time Checklist** permet de choisir si la méthode doit effectuer à la fois l'acquisition de données et l'analyse des données. Elle permet également d'incorporer des macros ou des programmes à différents points pendant la procédure opérationnelle. Dans la plupart des cas les cases **Data Acquisition** et **Standard Data Analysis** sont cochées. Si aucune analyse des données n'est nécessaire, par exemple lors d'une série d'analyses pour le développement d'une méthode, la case **Standard Data Analysis** peut être décochée afin de ne pas créer de rapport, les données pourront être évaluées par la suite dans la vue **Data Analysis**.

Pour lier un macro à un des points d'accès, il faut cocher la case appropriée et saisir le nom du macro dans la zone de texte à droite. Le logiciel cherche le macro dans le répertoire C:\Chem32\Core ; il faut donc inclure le chemin d'accès s'il est localisé dans un autre répertoire.

Les points d'accès dans la procédure opérationnelle de la méthode sont :

- **Pre-Run Command / Macro**
- **Customized Data Analysis Macro**
- **Post-Run Command / Macro**

Save Method with Data permet d'enregistrer une copie de la méthode dans le fichier de données sous le nom RUN.M. Avec la configuration habituelle du logiciel ChemStation, il n'est pas nécessaire d'utiliser cette option car ce dernier enregistre systématiquement la méthode dans le fichier de données (toutes les versions supérieures à B.02.01). Cette option n'est utile que si le logiciel ChemStation a été configuré pour que l'option **Unique Sequence Folder Creation** soit désactivée, dans ce cas de figure les méthodes ne sont pas enregistrées systématiquement dans le fichier de données.

Puisque cet écran est le dernier du processus, en cliquant sur **OK** vous quitterez en même temps la **Run Time Checklist** et le processus **Edit Entire Method**. Vous devez maintenant enregistrer la méthode dans le répertoire principal des méthodes, par défaut C:\Chem32\1\Methods, à l'aide du menu **Fichier > Enregistrer sous > Méthode** ou du menu **Méthode > Enregistrer la méthode sous**.

Glossaire d'IU

1

1290 Infinity Autosampler
 échantillonneur automatique 1290 Infinity
 1290 Infinity Binary Pump
 Pompe binaire 1290 Infinity
 1290 Infinity DAD
 DAD 1290 Infinity
 1290 Infinity TCC
 TCC 1290 Infinity

A

Add
 Ajouter
 Add Chromatogram Output
 Ajouter sortie de chromatogramme
 Add to Method
 Ajouter à la méthode
 Adjust
 Ajuster
 Advanced
 Avancé
 Advanced - Analog Output
 Avancé - Sortie analogique
 Advanced - Autobalance
 Avancé - Stabilisation automatique
 Advanced - Auxiliary
 Avancé - Paramètres supplémentaires
 Advanced - High Throughput
 Avancé - Haut débit
 Advanced - Lamps on required for analysis
 Avancé - Lampes allumées requise pour l'analyse

Advanced - Margin for Negative Absorbance

Avancé - Marge pour absorbance négative

Advanced - Slit

Avancé - Fente

Advanced - Spectrum

Avancé - Spectre

All

Tous

Apply

Appliquer

Apply to Method

Appliquer à la méthode

Area Reject

Réjection d'aire

Area Reject / Height Reject

Réjection d'aire / Réjection de hauteur

As Detector Cell

Identique à la cuve du détecteur

As Pump

Identique à la pompe

Attenuation

Atténuation

Automatic delay volume reduction

Réduction du volume de retard automatique

Available Signals

Signaux disponibles

B

Balance

Stabilisation

Bandwidth

Bande passante

Based on

Basés sur

Baseline Correction

Correction de la ligne de base

BinPump

PompeBin

C

Calculate

Calculs

Calculation mode

Module de calcul

Calibration

Étalonnage

Cancel

Annuler

Change Solvent Composition

Modifier la composition du solvant

Change...

Modifier...

Check Method Sections to Edit

Cocher les sections de méthode à modifier

Chromatogram Output

Sortie de chromatogramme

Clear all

Tout effacer

Column Switching Valve

Vanne d'inversion entre colonnes

Combined

Combinées

Comment

Commentaire

Composition A

Composition en A

Composition B
Composition en B

Control
Contrôle

Customized Data Analysis Macro
Macro d'analyse de données personnalisée

Cut
Couper

D

Data Acquisition
Acquisition de données

Data Analysis
Analyse des données

Delete Row
Supprimer Rangée

Draw position
Position d'aspiration

Draw speed
Vitesse d'aspiration

Duration
Durée

E

Edit Entire Method
Modifier l'ensemble de la méthode

Edit Integration Events
Modification des événements d'intégration

Edit Signal Plot
Modifier le tracé des signaux

Eject speed
Vitesse d'éjection

Enable overlapped injection
Permettre le chevauchement des injections

Equilibration time
Durée d'équilibrage

F

File
Fichier

File Setting
Paramètres de fichier

Filename
Nom de fichier

Flow
Débit

Flush Port
Voie de lavage

H

Height Reject
Réjection de hauteur

Hip_ALS Injector Program
Programme d'injection du HiP_ALS

HiP-ALS Injector Program
Programme d'injection du HiP-ALS

I

Initial Events For All Signals
Événements initiaux pour tous les signaux

Injection Mode
Mode d'injection

Injection Valve Cleaning
Nettoyage de la vanne d'injection

Injection volume
Volume d'injection

Injection with needle wash
Injection avec lavage de l'aiguille

Injector Cleaning
Nettoyage de l'injecteur

Instrument Curves
Courbes de l'instrument

Integrate
Intégrer

Integration OFF/ON
Intégration MARCHÉ/ARRÊT

L

Launch online
Lancer en ligne

Load Method
Chargement de méthode

Location
Position

M

Method
Méthode

Method and Run Control
Contrôle de méthode et d'analyse

Method History
Historique de la méthode

Method Information
Informations sur la méthode

Method...
Méthode...

N

Needle Wash
Lavage de l'aiguille

New Method...
Nouvelle méthode...

No Limit
Aucune limite

No Limit / Off
Aucune limite / Désactivé

O

Off
Arrêt

Online Plot
Tracé en ligne

Glossaire d'IU

P

parameter
Paramètre

Parameter Mismatch
Mésappariement de paramètres

Paste
Coller

PDF
PDF

Peak Width
Largeur de pic

Peakwidth
Largeur de pic

Post Time
Temps post-analyse

Postrun
Post-analyse

Post-Run Command / Macro
Commande ou macro de post-analyse

Prerun
Pré-analyse

Pre-Run Command / Macro
Commande ou macro de pré-analyse

Pressure Limits
Limites de pression

Prime On
Amorcer

Printer
Imprimante

Pump
Pompe

Purge On
Purger

Q

Quantitation settings
Paramètres de quantification

Quantitative results sorted by
Résultats quantitatifs triés par

R

Range
Plage

Reference Bandwidth
Bande passante de référence

Reference Wavelength
Longueur d'onde de référence

Remove
Supprimer

Repeat
Répétition

Report mode
Mode de création de rapport

Report Style
Style de rapport

Reporting settings
Paramètres des rapports

Response
Réponse

Run Method
Exécuter une méthode

Run Sequence
Exécuter une séquence

Run Time Checklist
Liste de contrôle de l'exécution

S

Sample flush out factor
Facteur de rinçage de l'échantillon

Sample Info
Informations sur l'échantillon

Sample Name
Nom de l'échantillon

Save
Enregistrer

Save As...
Enregistrer sous...

Save Method with Data
Enregistrer la méthode avec les données

Screen
Moniteur

Select Run Method Task
Sélectionner la tâche d'exécution de méthode

Selected Signal
Signaux sélectionnés

Selected Signals
Signaux sélectionnés

Set Integration Events Table
Paramétrer le tableau d'événements d'intégration

Setup Method
Configuration de la méthode

Show timetable graph
Afficher le tracé du gradient

Signal Description
Description du signal

Signal Details
Détails des signaux

Signals
Signaux

Single Runs
Analyses uniques

Size
Taille

Skip
Ignorer

Slope Sensitivity
Sensibilité de pente

Solvents
Solvants

Specific Events For Signal
Événements spécifiques pour un signal

Specify Report
Définition du rapport

Spectrum Store
Enregistrement des spectres

Standard Data Analysis
Analyse de données standard

Standard injection
Injection standard

Start Single Sample
Démarrer l'échantillon unique

Step
Pas

Stop Time
Temps d'arrêt

Stop Time / Post Time
Temps d'arrêt/Temps post-analyse

Store
Enregistrer

Subdirectory
sous-répertoire

Switch [module name] on
Allumer le [nom du module]

System On/Off
Système Marche/arrêt

T

Temperature
Température

Threshold
Seuil

Time
Durée

Timetable
Tableau des événements

U

Unique PDF file name
Nom fichier PDF unique

Unique Sequence Folder Creation
Séquence unique de création de dossier

Use Signal
Utiliser le signal

V

Vial/Well bottom sensing
Détection du fond de flacon/puits

W

Wash Vial
Flacon de lavage

Water
Eau

Wavelength
Longueur d'onde

Z

Zero Offset
Décalage zéro

Index

A

- Agilent
 - sur Internet 122
- algues 121
- analyse
 - données 111

B

- bande passante 65

C

- calculateur
 - coûts 15
- chargement
 - par défaut 98
- chromatographie en phase liquide
 - utilisation de particules plus fines 8
- classe de sécurité I 118
- colonne
 - température 19
 - thermostatation 19
- colonnes
 - particules sub-2-microniques 15
- Compartiment à colonne thermostaté
 - description 37
- composants du système
 - compartiment à colonne thermostaté 37
 - détecteur à barrette de diodes 39
 - échantillonneur automatique 35
 - pompe binaire 28
- configuration de la méthode de l'instrument 126
- configuration et installation du système

- intégration au réseau 93
- configuration
 - en deux piles arrière 87
 - en deux piles avant 86
 - en deux piles, arrière 82
 - en deux piles, avant 81
 - en deux piles 81, 86
 - pile unique 78, 83
 - tracé en ligne 100
- cuve à circulation
 - cuve à circulation de type cartouche Max-Light 63
 - cuve à haute sensibilité Max-Light 63
 - informations sur les solvants 121

D

- débit de recueil des données 68
- DEF_LC.M 123
- Détecteur à barrette de diodes
 - description 39
- détecteur
 - parvenir à une meilleure sensibilité 63
- données
 - analyse 111

E

- Échantillonneur automatique Infinity
 - description 35
- échauffement par frottement 19
- effet mémoire 70
- Équation de van Deemter 10

F

- facteur de rétention 12

G

- guide de démarrage rapide
 - introduction 96

H

- hauts débits
 - Optimisation 55

I

- informations sur la méthode 124, 125
- informations sur les solvants 121
- Instrument/Acquisition 124
- intégration au réseau 93
- intégration 113
 - signal 113
- Internet 122

J

- Jet Weaver
 - Débranchement des connexions capillaires 50

L

- l'analyse des données, 124
- largeur de fente 66
- largeur du pic 68
- Liste de contrôle de l'exécution 124
- longueur d'onde et bande passante
 - optimisation 63
- longueur d'ondes du signal 65

M

- méthode
 - exécution plus rapide 109
 - injection unique 107
 - mise en place 105
 - modifier l'ensemble de la méthode 123
 - par défaut 123

O

- obstruction de la colonne 72
 - recommandations d'utilisation 72
- optimisation
 - parvenir à de hauts débits 55
- optimisation
 - conditions de HPLC 12
 - largeur de fente 66
 - longueur d'onde et bande passante 63
 - obtention d'un effet mémoire plus faible 70
 - obtention d'une haute sensibilité 61
 - Obtention d'une meilleure résolution 58
 - prévention de l'obstruction de la colonne 72
 - sensibilité du détecteur 63
 - séparation chromatographique 12
 - utilisation des colonnes 61
 - volume de la pompe du mélangeur 61
 - volumes d'injection 53

P

- paramètres de méthode 103
- particules sub-2-microniques 15
- plateaux théoriques 12
- Pompe binaire
 - description 28
- purge de la pompe 90

R

- rapport
 - définition 115
- réduction automatique du volume mort 70
- résolution 12, 18
 - Optimisation 58

S

- sécurité
 - informations générales 118
 - symboles 120
- sensibilité
 - optimisation 61
- signal
 - intégration 113
- solvants 121
- Système CPL Agilent 1290 Infinity
 - Composants du système 28
 - nouvelles fonctionnalités 24
 - plage de puissance 24
- système
 - mise sous tension 97

T

- tableau d'événements d'intégration 113
- temps de réponse 68
- tracé en ligne
 - configuration 100

V

- volume de la pompe du mélangeur 61
- volume de retard
 - description 42
 - exemple 42
- volume d'injection
 - obtenir des volumes supérieurs 53
- volume supplémentaire de la colonne

description 43

www.agilent.com

Contenu de ce manuel

Ce manuel contient des informations techniques relatives au système CPL Agilent 1290 Infinity.

Il aborde les points suivants :

- introduction,
- description du produit,
- optimisation du système,
- configuration et installation,
- guide de démarrage rapide.

© Agilent Technologies 2009-2011, 2012

Printed in Germany
05/2012



G4220-93301



Agilent Technologies