

 LYCEE SAINT-PAUL IV	PROCEDURE	Pr Bioch Ma 010
	Utilisation HPLC Flexar UV VIS Perkin Elmer	Version : 4
		Date d'émission 30/08/2016
		Page : 1/3

Utilisation d'une colonne C18 : 100 x 2,1 mm. Taille des particules : 5,0 µm.

Allumer l'HPLC grâce aux 2 boutons " **on** " à l'arrière de l'appareil

En façade : appuyer 3 secondes sur le bouton marche " **détecteur UV** " et le bouton marche de la pompe.

Allumer l'ordinateur connecté à l'HPLC (identifiant : administrateur ; mot de passe : sq300)

Double cliquer sur l'icône " **CHROMERA LC UV** "

1- Effectuer la purge de l'appareil : 2 -3 min

Mettre les crépines des entrées A et B dans les solvants désirés.

Protocole : lavage 10 fois le volume de la colonne, $V_{mort} = 0,25$ mL pour une colonne de diamètre intérieur 2,1 mm

Dans « Control Panel » vérifier que la pompe est bien arrêtée

Visser la seringue dans le troisième compartiment et tourner la molette noire vers la gauche (3/4 tours)

Purger en appuyant sur le bouton de la voie A. Récupérer un volume de 10 mL. Arrêter la pompe en appuyant de nouveau sur le bouton de la voie A.

Faire la même manipulation avec la voie B.

En fin de purge tourner la molette à droite pour la fermer et retirer la seringue.

2- Lavage de la colonne : 5 à 10 min

La colonne et le circuit sont stockés dans 100% d'acétonitrile.

Cliquer dans « **manual Control** » dans le panneau latéral gauche.

Dans « **pump setting** » cliquer sur % de A afficher la valeur 50 % et faire 50% de B, imposer un débit de 0.3 mL/min .

« **Apply** » pendant 10 minutes (vérifier le temps sur la partie droite de l'écran **Pump Step Time** et vérifier qu'il n'y ait pas de fuite (pression maximale environ 3000 psi).

Vérifier la pression en cliquant sur le panneau latéral gauche : "**plot 1**" puis cocher "**pump pres**"

Après 10 minutes dans « **Control Panel** » cliquer sur « **Stop LC Pump** »

V1 Rédigé par : E.SOW Date : 28/11/2012	V3 Vérifiée par : S.Gerbelot Date : 14/10/2015	V3 Approuvé par : P.LAMAUVE Date : 09/11/2015
--	---	--

 LYCEE SAINT-PAUL IV	PROCEDURE	Pr Bioch Ma 010
	Utilisation HPLC Flexar UV VIS Perkin Elmer	Version : 4
		Date d'émission 30/08/2016
		Page : 2/3

3- Préparation de la méthode

Cliquer sur "**method**" en bas à gauche

Cliquer sur "**file new method**"

Nommer la méthode et choisir le groupe « **group Training** »

Cliquer sur "**instruments**" puis sur "**UV**" : régler la longueur d'onde

Cliquer sur " auto zéro"

Cliquer sur "pompe" et programmer selon un mode isocratique ou gradient.

Cocher "**in use**" et "**run time reconciliation**"

Revenir sur "**UV**" et mettre "**end time**" à la même valeur que total time de la pompe.

Sauver la methode en cliquant sur« "**save method**"

4- Equilibration de la colonne : 10 min

Dans **Run Time**, puis dans **Manual Control** puis dans dans **Pump Setting** équilibrer la colonne avec un pourcentage en chacun des solvants correspondant aux conditions initiales de la méthode. Le débit doit être de 0.3 mL/min.

Cliquer sur **Apply** pour lancer cette équilibration.

Après 5 minutes dans **Control Panel** cliquer sur Stop LC Pump »

5- Préparation de l'injection

Rincer 2 fois la seringue Perkin Elmer 100 µL avec l'eau milliQ.

Rincer 2 fois avec la solution à **injecter**.

Charger la boucle en position "**load**": volume 50µL (volume de la boucle d'injection de 20µL)

Retirer la seringue et la rincer.

V1 Rédigé par : E.SOW Date : 28/11/2012	V3 Vérifiée par : S.Gerbelot Date : 14/10/2015	V3 Approuvé par : P.LAMAUVE Date : 09/11/2015
--	---	--

 LYCEE SAINT-PAUL IV	PROCEDURE	Pr Bioch Ma 010
	Utilisation HPLC Flexar UV VIS Perkin Elmer	Version : 4
		Date d'émission 30/08/2016
		Page : 3/3

6- Application de la méthode

Cliquer sur "**file**" puis rappeler la méthode avec "**open method** "

Cliquer sur « **Manual Control** » puis sur "**Single run**"

Cliquer sur "**Apply**"

Activer la pompe dans **Control Panel** en haut à droite.

A la fin du temps d'équilibration une fenêtre s'ouvre "**waiting for manual injection** "

Tourner la **boucle sur "inject "** puis la remettre au bout de quelques secondes en **position "load"**

Quand l'acquisition est terminée, cliquer sur « **apply** » de nouveau pour relancer une nouvelle acquisition.

7- Traitement des données

Cliquer sur le bandeau du bas à gauche "**post run**" puis "**file open data**" pour choisir votre fichier.

Un tableau avec l'aire et la hauteur de chaque pic apparaît.

Sélectionner dans le bandeau à gauche l'injection à traiter.

8- 8.Procédure de nettoyage en fin de séance.

Cliquer sur "**manual control**".

Laisser fonctionner la pompe durant 20 min à un débit de 0.5mL/min en éluant acétonitrile à 100 %.

Arrêter la pompe en cliquant sur **STOP LC PUMP**.

Ranger les solvants sous la hotte en flacons fermés s'ils seront utilisés ultérieurement.

Mettre les crépines d'entrée des solvants dans un bécher sec.

Eteindre l'ordinateur.

Eteindre les boutons de la lampe et de la pompe en façade de l'HPLC ainsi que les deux boutons à l'arrière de l'appareil.

V1 Rédigé par : E.SOW Date : 28/11/2012	V3 Vérifiée par : S.Gerbelot Date : 14/10/2015	V3 Approuvé par : P.LAMAUVE Date : 09/11/2015
--	---	--