

HPLC

Il existe divers types d'appareils de chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) selon les compagnies et selon le type de détecteur et d'injecteur. Les démarches abrégées suivantes sont pour un HPLC monochromatique avec un injecteur manuel.

Il est recommandé de consulter le manuel du fabricant pour la programmation du logiciel se rapportant à l'instrument.

Préparation des échantillons

Puisque le HPLC est sous haute pression, il est possible que la colonne (phase stationnaire) se bloque facilement. Il est donc préférable de filtrer les échantillons au préalable avec un filtre de nylon 0,45 μm .

- 1) Insérer l'échantillon dans la seringue.
- 2) Insérer le filtre sur la seringue.
- 3) Verser le contenu filtré dans un contenant propre.

Préparation de la seringue

Lorsque l'on utilise un instrument sans injecteur automatique, il faut nettoyer la seringue avant de procéder à l'injection. Lors de l'utilisation d'un injecteur automatique, le nettoyage de la seringue sera inclus dans les choix de programmation de l'instrument par le logiciel.

- 1) Nettoyer la seringue trois fois avec un solvant de qualité optimale. Habituellement, on utilise un des solvants de la phase mobile. À chaque lavage déverser le contenu de la seringue dans un bocal à déchets.
- 2) Par la suite, effectuer deux rinçages chimiques avec l'échantillon à injecter. Il suffira donc encore une fois de jeter le contenu de la seringue.
- 3) Remplir la seringue avec l'échantillon. Il est recommandé de placer une quantité supérieure au volume de la boucle d'injection. Par exemple, si on injecte 10 μl , on peut placer 30 μl dans la seringue.

Préparation de la phase mobile (solvant)

Afin d'éviter le passage de bulles dans la colonne (phase mobile), il faut retirer les bulles présentes dans les lignes (tuyaux) qui apportent la phase mobile jusqu'à la pompe. Pour ce faire, on doit faire une purge de chacun des solvants. Lors de la purge, le liquide sera versé dans un bécher à déchets au lieu d'aller jusqu'à la colonne.

- 1) Ouvrir la valve de purge.
- 2) Programmer l'instrument afin d'effectuer la purge du premier solvant. Vérifier la ligne de ce solvant pour des traces de bulles. Il est possible de donner des petits coups sur le tube afin de dégager plus facilement ces bulles.
- 3) Effectuer l'étape 2 de nouveau pour les autres solvants.
- 4) Fermer la valve de purge et mettre la pompe en marche.

Il est préférable que la phase mobile circule pendant 10 minutes avant de procéder à une injection afin de stabiliser le tout.

Injection

- 1) Placer la valve d'injection dans la position chargement (*load*).
- 2) Entrer la seringue dans la valve d'injection.
- 3) Appuyer sur le piston de la seringue. Conserver la seringue dans la valve d'injection.
- 4) Placer la valve d'injection à la position injection (*inject*). Il est possible maintenant de retirer la seringue.
- 5) Le plus rapidement possible, appuyer sur le bouton démarrer du logiciel de l'instrument.
- 6) Conserver la valve d'injection dans la position injection (*inject*) pendant 5 minutes et, par la suite, replacer celle-ci à la position chargement (*load*).