

Bonnes pratiques concernant l'utilisation d'un système de LC Agilent

Note technique

La présente note technique décrit les bonnes pratiques concernant l'utilisation d'un système de LC Agilent.

Entretien 2

Tâches quotidiennes / hebdomadaires 5

Mise sous tension / arrêt du système 6

Recommandations pour les dégazeurs 8

Recommandations pour les pompes 9

Recommandations pour les échantillonneurs 14

Recommandations pour les pompes et échantillonneurs dotés d'un filtre en ligne en option 17

Recommandations pour les colonnes 18

Recommandations pour les détecteurs 19

Recommandations pour les systèmes biocompatibles et bio-inertes 20

Informations supplémentaires concernant les pompes Agilent 1290 Infinity et 1290 Infinity II 22

Entretien

Comment manipuler les solvants

- Utilisez uniquement des flacons propres en verre borosilicaté.
 - Avant de le remplir à nouveau, rincez le flacon avec le solvant souhaité.
 - Les flacons risquent d'être contaminés par les détergents de lave-vaisselle.
- Utilisez des filtres d'entrée de solvant pour protéger le système contre la pénétration de particules.
- Changez quotidiennement les solvants aqueux.
 - La prolifération d'algues et de bactéries risque d'obstruer le dégazeur ou les filtres.
 - La précipitation de sels insolubles risque d'obstruer les filtres ou les capillaires.
- Préparez un volume de solvant à consommer en 1 - 2 jours.
- Utilisez uniquement des solvants et de l'eau de grade HPLC.
 - Tous les solvants organiques, les mélanges et les tampons aqueux préparés doivent être filtrés avec un filtre de 0,2 µm.
 - Les résidus ou les contaminations risquent d'obstruer les filtres ou les capillaires.
- Étiquetez correctement les flacons en indiquant le contenu du flacon, la date de remplissage et la date d'expiration.
- Réduisez le risque de prolifération d'algues : utilisez des flacons marron pour les solvants aqueux, évitez la lumière directe du soleil ou enveloppez les flacons dans du papier aluminium.

Mesures supplémentaires avec de l'acétonitrile (ACN)

- L'ACN et d'autres solvants organiques peuvent être filtrés avec une membrane filtre en PTFE de 0,2 µm (par ex. 5191-4339).

REMARQUE

Le filtrage avec des filtres en nylon n'est pas recommandé pour les systèmes LC/MS présentant une sensibilité élevée.

- Utilisez des bouteilles brunes et remplissez-les avec le volume d'ACN à consommer dans un délai de 1 à 2 jours afin de prévenir son oxydation et les réactions photochimiques.

Comment préparer les échantillons

ATTENTION

Risque de précipitation de l'échantillon

- ✓ Assurez-vous que l'échantillon est totalement soluble dans le diluant ainsi que dans la phase mobile.
 - ✓ Appariez le diluant de l'échantillon et la phase mobile initiale autant que possible afin d'éviter toute précipitation, les pointes de pression et les pics de solvant sur le chromatogramme.
-
- Le filtrage au travers de filtres de 0,2 µm est la méthode privilégiée pour éliminer la fraction non soluble des échantillons et éviter le bouchage du système. Si cette méthode n'est pas possible, centrifugez les échantillons vigoureusement et veillez à ne pas contaminer le surnageant avec le précipité lors de la décantation ou de l'aspiration.
 - Assurez-vous que le diluant de l'échantillon est également exempt de particules.
 - Les échantillons non filtrés provoquent des bouchages et la contamination du circuit, ce qui peut augmenter peu à peu la contrepression du système et causer des anomalies de pression telles que des ondulations résiduelles ou des baisses soudaines. Les changements de pression peuvent affecter la reproductibilité des résultats de chromatographie.
 - Par exemple, les échantillons de protéines non filtrés peuvent provoquer la formation d'un film protéique qui bloquera petit à petit le circuit et diminuera de manière significative la durée de vie des colonnes de chromatographie.

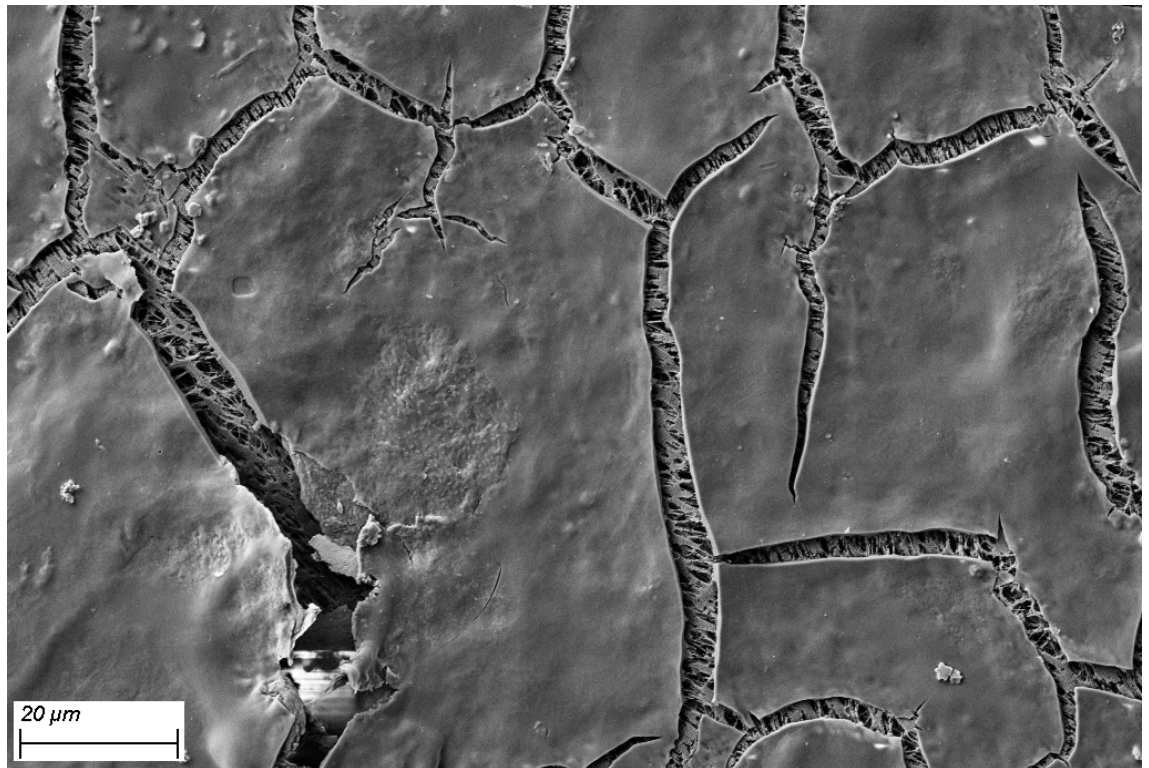


Figure 1 Film protéique formé à la surface du support en PTFE au-dessus du filtre en ligne (confirmé par SEM EDX)

- L'utilisation de filtres en ligne est recommandée afin d'éviter que des matériaux particuliers n'entrent dans le circuit et n'endommagent les valves, les colonnes et le détecteur. Voir « Recommandations pour les pompes et échantillonneurs dotés d'un filtre en ligne en option », page 17.

Comment nettoyer le système

- Si une contamination du système est suspectée, la procédure de nettoyage suivante peut être appliquée.
 - Utilisez les solutions suivantes de manière séquentielle à un débit modéré (0,5 – 1 mL/min) pendant au moins 30 min chacune :
 - a Eau
 - b 0,1 M NaOH
 - c Eau
 - d 0,13 M HCl
 - e Eau
- Lors de l'utilisation de systèmes de tampons biocompatibles (p. ex., phosphate, acétate), il faut veiller particulièrement à éviter la formation de biofilms.
 - La procédure de nettoyage du système (décrite précédemment) doit être réalisée lorsque l'on constate un déclin de la reproductibilité chromatographique sur tous les canaux de solvants utilisés pour les tampons biocompatibles.
- Avant toute procédure de nettoyage d'un système de LC, assurez-vous que la colonne et le détecteur sont exclus du circuit.
- Les colonnes chromatographiques utilisées pour la séparation de biomolécules, par exemple la chromatographie d'exclusion stérique ou la chromatographie à échange d'ions, doivent être conservées en présence d'azide de sodium 0,02 %. Pour d'autres guides de l'utilisateur sur les colonnes LC Bio, voir <https://www.agilent.com/en/support/liquid-chromatography/kb005960>.

Tâches quotidiennes / hebdomadaires

Tâches quotidiennes

- Remplacez les solvants et les flacons de solvant pour les phases mobiles d'après l'eau/le tampon.
- Remplacez les solvants et les flacons de solvant pour la phase mobile organique au plus tard tous les 2 jours.
- Vérifiez la présence de solvant de rinçage de joint.
- Purgez chaque voie avec du solvant fraîchement préparé avec un débit de 2,5 – 3 mL/min pendant 5 min avant l'opération.
- Équilibrez le système avec la composition et le débit de la méthode suivante.

Tâches hebdomadaires

- Changez le solvant de rinçage de joint (10 % isopropanol dans de l'eau) et le flacon.
- Si des applications contenant des sels ont été utilisées, rincez toutes les voies avec de l'eau (pour plus d'informations, reportez-vous à « [Procédure de rinçage](#) », page 20) et retirez les éventuels dépôts de sel manuellement.
- Vérifiez l'absence de saleté ou de bouchage sur les filtres pour solvants. Remplacez-les en l'absence de débit depuis le tuyau de solvant lors du retrait de l'injecteur du dégazeur.

ATTENTION

Contamination du solvant de rinçage de joint

Pistons et joints endommagés

- ✓ **Ne recyclez pas le solvant de rinçage de joint.**
- ✓ **Remplacez le solvant de rinçage de joint chaque semaine.**
- ✓ **Consommation type de solvant : 0,5 L par semaine.**
- ✓ **Nous vous recommandons vivement d'utiliser le Kit de rinçage de joint de tête de flacon (5067-6131).**

Mise sous tension / arrêt du système

Mise sous tension du système

- Assurez-vous que tous les modules sont dans un environnement à température stable et à l'abri de la lumière directe du soleil.
- Mettez tous les modules sous tension et préparez-les comme indiqué ci-dessous :

Préparation de la pompe

- Utilisez une phase mobile fraîchement préparée ou différente (selon les besoins).
- Purgez chaque voie à un débit de 2,5 – 3 mL/min pendant 5 min. Ouvrez la vanne de purge manuelle ou utilisez la commande de purge, selon le type de pompe.

Préparation de l'échantillonneur

- Évitez d'utiliser un solvant organique pour le rinçage d'aiguille et le rétrolavage du siège d'aiguille dans les applications avec tampon car cela peut provoquer la précipitation de sels dans le siège d'aiguille.
- Lors du rinçage de l'aiguille et/ou du rétrolavage du siège d'aiguille :
 - Utilisez toujours des solvants vierges.
 - Le méthanol, l'ACN, l'isopropanol, l'eau et leurs mélanges sont des options appropriées.
 - Ne pas utiliser des solutions de rinçage non miscibles ou susceptibles de précipiter.
- Lors de l'utilisation du refroidisseur/thermostat d'échantillons :
 - Mettez le refroidisseur/thermostat sous tension et attendez que la température cible soit atteinte et stable.
Cela peut être fait pendant que la lampe du détecteur chauffe (voir « Préparation du détecteur », page 6).
- Assurez-vous que les flacons contiennent suffisamment de solution d'échantillon pour toutes les injections.

Préparation du détecteur

- Faites chauffer la lampe pendant au moins 1 h afin de s'assurer que la ligne de base est stable.
- Pour les détecteurs à indice de réfraction uniquement : mettez l'élément chauffant sous tension et rincez le côté de référence et le côté échantillon avec le solvant fraîchement préparé utilisé pour l'application en cours.

Équilibrage du système

- Pendant que la lampe du détecteur est en train de chauffer, équilibrez votre système (colonne et détecteur inclus) à l'aide de la composition de votre application pendant au moins 15 min, jusqu'à ce que la pression et le signal de la ligne de base du détecteur soient stables.

Arrêt du système

- Rincez la colonne avec les solvants appropriés et conservez-la conformément au mode d'emploi de la colonne (assurez-vous que le solvant de rinçage est compatible avec le solvant présent dans le système afin d'éviter toute précipitation).
- Les colonnes chromatographiques utilisées pour la séparation de biomolécules, par exemple la chromatographie d'exclusion stérique ou la chromatographie à échange d'ions, doivent être conservées en présence d'azide de sodium 0,02 %. Pour d'autres guides de l'utilisateur sur les colonnes LC Bio, voir <https://www.agilent.com/en/support/liquid-chromatography/kb005960>.
- Installez un raccord union ou un capillaire restricteur et rincez le système abondamment avec de l'eau, particulièrement après l'utilisation de tampons. Pour plus d'informations, reportez-vous à « Procédure de rinçage », page 20.
- Rincez et conservez le système dans 50 % de méthanol ou 50 % d'isopropanol dans de l'eau, sans additifs.
- Retirez tous les échantillons de l'échantillonneur automatique, et stockez-les conformément aux bonnes pratiques de laboratoire.
- Mettez tous les modules hors tension.

Recommandations pour les dégazeurs

ATTENTION

Liquide à l'intérieur du dégazeur

Au cas où un solvant à point d'ébullition bas se condenserait ou en cas de fuite, du liquide peut s'accumuler à l'intérieur des chambres du dégazeur et compromettre ainsi la performance.

Lorsque cela se produit,

- ✓ **Purgez toutes les voies de solvant à l'isopropanol.**
- ✓ **Maintenez les voies inutilisées remplies d'isopropanol.**

- Vérifiez la compatibilité des solvants avec le dégazeur et l'application
 - Utilisez les dégazeurs autonomes standard (G1322A ou G7122A) pour les applications réfractométriques, des débits supérieurs à 5 mL/min, avec des solvants à point d'ébullition bas (<60 °C) et avec de l'hexane, du tétrahydrofurane et les solvants halogénés.
 - Utilisez un dégazeur haute performance intégré ou autonome (G4225A) pour toutes les autres applications.
- S'il n'est pas possible d'atteindre ou de maintenir un vide suffisant pour avoir une performance de dégazage optimale (indiquée par une DEL d'état de couleur jaune ou rouge pour les dégazeurs autonomes, ou des messages d'erreur spécifiques sur les dégazeurs intégrés), rallumez le module.
- Si, après avoir rallumé le module, le vide ne peut toujours pas être obtenu ou maintenu sur les dégazeurs intégrés, utilisez le **Evacuation Mode**, disponible sur l'écran de pilotage de l'instrument du logiciel Agilent Lab Advisor.

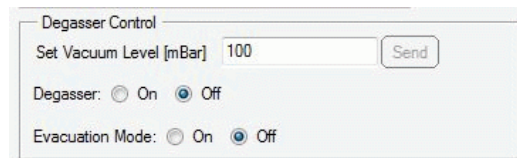


Figure 2 Pilotage du dégazeur pour les dégazeurs internes dans Agilent Lab Advisor

REMARQUE

Suivez les consignes à l'écran au démarrage du **Evacuation Mode**.

Recommandations pour les pompes

- Vérifiez régulièrement la performance des pompes en contrôlant le signal de pression.
- Effectuez une procédure de maintenance préventive en respectant l'intervalle d'utilisation recommandé.
- Préparez la pompe comme décrit dans la section Mise sous tension, pour garantir une performance et une durée de vie optimales.
- Lors du remplacement des solvants, assurez-vous que le nouveau solvant est miscible avec le précédent (si nécessaire, ajoutez un solvant miscible supplémentaire comme intermédiaire).
- Utilisez la fonction de rinçage des joints tel que recommandé afin que la performance et la durée de vie soient optimales, voir « Rinçage des joints (utilisation obligatoire si installé) », page 10.

Recommandations pour la MCGV

Sélectionner les voies pour la vanne de gradient multivoie (MCGV)

- Utilisez des ports inférieurs (A et/ou D) pour les solutions tampons.
- Pour éliminer les dépôts de sel éventuels, rincez régulièrement toutes les voies de la MCGV avec de l'eau à 5 mL/min pendant au moins 10 min par voie.
- Vérifiez la compatibilité des tampons et solvants organiques pour éviter toute précipitation dans la chambre de mélange de la MCGV.

REMARQUE

En cas de mélange avec des solvants non compatibles, les sels peuvent précipiter au point de mélange, bloquant le circuit en aval et endommageant les pièces.

Rinçage des joints (utilisation obligatoire si installé)

Rinçage des joints (G4204A, G4220A, toutes les pompes 1260)

ATTENTION

Contamination du solvant de rinçage de joint

Pistons et joints endommagés

- ✓ Ne recyclez pas le solvant de rinçage de joint.
- ✓ Remplacez le solvant de rinçage de joint chaque semaine.
- ✓ Consommation type de solvant : 0,5 L par semaine.
- ✓ Nous vous recommandons vivement d'utiliser le Kit de rinçage de joint de tête de flacon (5067-6131).

Il est obligatoire d'utiliser la fonction de rinçage des joints si installée et lors de l'utilisation de tampons, d'autres solvants non volatils ou d'additifs pouvant provoquer des dépôts sur les pistons et les joints. La fonction de rinçage des joints sert à nettoyer automatiquement et régulièrement ces composants.

Avantages de l'opération de rinçage des joints :

- Élimination des particules, des cristaux de sel et d'autres résidus non volatils des pistons et des joints ; ils risqueraient d'endommager le piston et les joints du piston
- Lubrification de l'interface joints/pistons
- Refroidissement des pistons

Boîte de dialogue Rinçage des joints dans votre CDS

Cette boîte de dialogue se trouve sous l'écran de pilotage. Nous vous recommandons d'utiliser les paramètres affichés sur la [Figure 3](#), page 11.

Notez que :

- Les paramètres de rinçage des joints NE sont PAS des paramètres de méthode (en tant que paramètres de pilotage de l'instrument, ils sont appliqués à toutes les méthodes utilisées sur un instrument donné).
- Le rinçage des joints doit être réactivé manuellement suite aux situations ci-après :
 - Une ERREUR a été éliminée.
 - Mise sous tension.

Opération de rinçage des joints :

- Opération PÉRIODIQUE, par exemple 0,5 min toutes les 7 min.
 - Vous pouvez modifier les paramètres dans l'écran de pilotage, voir la [Figure 3](#), page 11. Les paramètres sont accessibles via le menu contextuel, voir la [Figure 5](#), page 11.
 - Le débit de solvant standard est de 0,7 mL/min, ce qui correspond à une consommation d'environ 3 mL/h ou 0,5 L/semaine pour un fonctionnement constant.
- Utilisez
 - 10 % d'isopropanol dans de l'eau.
 - 100 % d'isopropanol pour les applications en phase normale.
- Placez le flacon de solvant de rinçage au-dessus de l'instrument, et le flacon de déchets sous l'instrument.

Recommandations pour les pompes

- *Ne rechargez pas* le flacon de solvant de rinçage de joint. Utilisez toujours des flacons vierges bien nettoyés.
- Pour les pompes qui ne sont pas équipées de capteur de rinçage des joints, testez la pompe péristaltique.
 - À l'aide de votre doigt, touchez la pompe péristaltique pour vérifier qu'elle fonctionne, ou confirmez la présence d'un flux de solvant de rinçage de joint en vérifiant visuellement qu'il goutte bien hors du tube.

Tableau 1 Boîte de dialogue Rinçage des joints et opération

G4204A, G4220A	Toutes les pompes 1260

Figure 3 Paramètres de rinçage des joints (pompes Agilent 1290 Infinity)

Figure 4 Paramètres de rinçage des joints (toutes les pompes 1260)

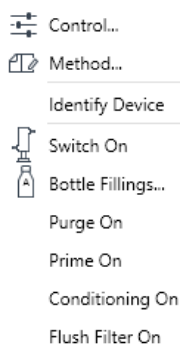


Figure 5 Menu contextuel (pompes Agilent 1290 Infinity)

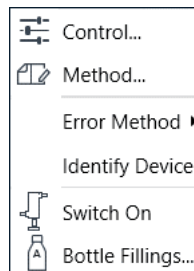


Figure 6 Menu contextuel (toutes les pompes 1260)

Liquide de rinçage de joint (G7104A, G7104C, G7120A, G7131A, G7131C et G7132A)

ATTENTION

Contamination du solvant de rinçage de joint

Pistons et joints endommagés

- ✓ **Ne recyclez pas le solvant de rinçage de joint.**
- ✓ **Remplacez le solvant de rinçage de joint chaque semaine.**
- ✓ **Consommation type de solvant : 0,5 L par semaine.**
- ✓ **Nous vous recommandons vivement d'utiliser le Kit de rinçage de joint de tête de flacon (5067-6131).**

La fonction de rinçage des joints nettoie régulièrement les pistons et les joints pour éliminer les dépôts automatiquement.

Le capteur de rinçage de joint vérifie en permanence la performance du système de rinçage de joint et avertit l'utilisateur en cas de détection d'une anomalie.

Opération de rinçage des joints :

- L'intervalle de rinçage des joints est réglé sur 30 s tous les 7 min.
- Le débit est réglé sur 500 µL/min.
- L'intégrité du système de rinçage de joint est vérifiée régulièrement.
- La consommation de solvant standard est d'environ 0,5 L par semaine.
- Utilisez
 - 10 % d'isopropanol dans de l'eau.
 - 100 % d'isopropanol pour les applications en phase normale.
- Placez le flacon de solvant de rinçage au-dessus de l'instrument, et le flacon de déchets sous l'instrument.
- *NE* rechargez *PAS* le solvant de rinçage de joint. Utilisez toujours des flacons vierges bien nettoyés.

Recommandations pour les pompes

- NE recyclez PAS les flacons de solvant de rinçage de joint.
- Le symbole EMF devient jaune lorsque le capteur de rinçage de joint des pompes détecte une irrégularité.
 - Changez le solvant de rinçage de joint et déclenchez la fonction Amorçage du rinçage de joint depuis le menu contextuel (voir la [Figure 7](#), page 13).

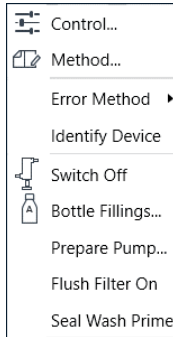


Figure 7 Menu contextuel

- Vérifiez l'absence de pli, de fuite ou de bouchage au niveau du tube de rinçage de joint et du filtre.
- Vérifiez l'absence de bouchage au niveau des tubes de drain. Assurez-vous que les déchets de solvant puissent être évacués sans problème :
 - Si des déchets de solvant s'accumulent dans le tuyau, le capteur ne fonctionne pas correctement.

Recommandations pour les échantillonneurs

- Avant la mise hors tension ou une veille prolongée, réalisez toujours les opérations suivantes :
 - Éliminez le tampon avec de l'eau de grade HPLC (voir « Procédure de rinçage », page 20).
 - Effectuez un rinçage de l'échantillonneur pendant au moins 15 min avec de l'eau (rinçage externe de l'aiguille et rétrolavage du siège d'aiguille pour l'option lavages multiples).
 - Effectuez une vérification visuelle et si nécessaire, nettoyez les résidus de sel manuellement.
 - Éliminez les substances contaminantes avec un solvant puissant, tel que de l'ACN pur.
 - Utilisez la fonction d'auto-nettoyage pour rincer l'échantillonneur tout en déplaçant la vanne d'injection d'avant en arrière plusieurs fois.

Auto-clean Settings and Start

Injection Valve

Switch Injection Valve

Multi-Wash Property

Execute Wash

Step	Solvent	Time [s]	Seat Back Flush	Needle Wash
1	Off	0	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2	Off	0	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3	S1	30	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Flush Flow Pa

Flush Flow Path Duration s

Be sure to set the composition and the flow of your pump accordingly before the start of the action.

Start Cancel

- Utilisez toujours un solvant de rinçage fraîchement préparé pour l'aiguille ou la fonction rétrolavage du siège d'aiguille.
- Pour le rinçage de l'aiguille ou le rétrolavage du siège d'aiguille, placez le réservoir de solvant de rinçage dans l'armoire à solvants.
 - Utilisez un solvant adapté aux propriétés du solvant et de la phase mobile.

REMARQUE

Le solvant de rinçage d'aiguille doit se composer du solvant compatible le plus solubilisant (votre diluant le plus puissant). La sélection des solvants de rinçage fait partie du développement de méthodes. Un mélange de 50 – 100 % de solvant organique dilué dans de l'eau distillée constitue un bon choix pour un grand nombre d'applications.

- Vérifiez l'orientation de l'évacuation de la sortie de l'orifice de rinçage dans un récipient à déchets.
- Remplissez chaque flacon avec suffisamment de solution d'échantillon pour toutes les injections.
 - Utilisez uniquement les flacons Agilent recommandés.

Recommandations pour les échantillonneurs

- Ne remplissez pas trop les flacons, vous ne devez pas dépasser la limite de 90 % pour chaque flacon.
- Utilisez les septa pré-percés lors du prélèvement de gros volumes ou en cas de plusieurs prélèvements depuis le même flacon.
- Filtrez, transférez ou centrifugez l'échantillon pour le séparer des solides insolubles.

REMARQUE

Le solvant d'échantillon doit être exempt de particules et de préférence toujours filtré.

- Veillez à ce que les solvants d'échantillon correspondent autant que possible à la phase mobile proposée.

Lavage multiple

L'option lavage multiple est conçue pour réduire l'effet mémoire et peut être installée sur tous les échantillonneurs multiples d'Agilent.

Cette option réduit l'effet mémoire des échantillons importants en permettant :

- Le rinçage de l'aiguille externe avec jusqu'à trois solvants différents
- Le rétrolavage du siège d'aiguille acceptant jusqu'à trois solvants différents

L'utilisation de l'option lavage multiple n'est pas recommandée pour les phases mobiles contenant des sels étant donné que ces derniers se cristalliseront sur l'aiguille et le siège d'aiguille. Étant donné le circuit de la boîte hydraulique de l'option lavage multiple, lorsque le dispositif doseur passe en position de repos avant l'injection, la phase mobile sort de l'extrémité de l'aiguille et peut tomber dans le siège de l'aiguille. Ce comportement est normal et indépendant des paramètres de nettoyage du circuit d'injection, et n'est pas indicatif d'une fuite.

Si l'option lavage multiple est installée sur le système avec des phases mobiles contenant des sels, il est recommandé de rincer l'échantillonneur multiple tous les jours avec de l'eau pendant 15 minutes et d'inspecter l'aiguille et le siège d'aiguille visuellement afin d'éviter toute accumulation de sel sur ces éléments. Si nécessaire, utilisez un chiffon non pelucheux et de l'eau distillée pour nettoyer manuellement l'aiguille, le siège d'aiguille et d'autres parties présentant encore des dépôts de sel.

Quand faut-il utiliser l'option lavage multiple ?

- Si le système est utilisé pour des applications en phase inverse uniquement et qu'aucun composé susceptible de précipiter n'est présent dans la phase mobile.
- Si le système est utilisé pour des applications avec des phases mobiles contenant des sels, l'option lavage multiple est déconseillée. Si l'option est toutefois installée, une cristallisation sur l'aiguille et le siège d'aiguille peut se produire. Il convient de respecter les pratiques suivantes :
 - Effectuez chaque jour un rinçage avec de l'eau pendant 15 min pour éliminer les résidus de sel.
 - Effectuez un rinçage de l'aiguille externe et un rétrolavage du siège d'aiguille.
 - Contrôlez visuellement l'aiguille/le siège d'aiguille/l'orifice de rinçage pour détecter la présence d'éventuels résidus de sel.
 - Nettoyez manuellement l'aiguille/le siège d'aiguille/l'orifice de rinçage si nécessaire.

REMARQUE

Si ces procédures ne sont pas suivies, l'aiguille et le siège d'aiguille se bloqueront.

Recommandations pour les échantillonneurs

- Si le système est utilisé en alternant des applications à phases mobiles contenant des sels ET des applications en phase inverse, l'option lavage multiple est incompatible. Il existe un risque élevé de formation continue de résidus de sel qui affecteront la chromatographie en phase inverse ou pourront même causer le bouchage du système.

Une quantité considérable de solvant vieillit dans les lignes de circuits de lavage multiple, ce qui pourrait augmenter le bruit de fond pour les mesures UV et MS extrêmement sensibles. Pour réduire cet effet, il est recommandé d'amorcer les solvants de chaque ligne de lavage multiple utilisée vers le port de lavage et la ligne S1 (condition chromatographique initiale) vers le siège pendant au moins 5 minutes avant de démarrer l'analyse de LC proprement dite.

Recommandations pour les pompes et échantillonneurs dotés d'un filtre en ligne en option

Habituellement, le facteur limitant du cycle de vie des colonnes UHPLC est l'exposition à une contrepression élevée. Les particules de l'échantillon s'accumulent au niveau du fritté d'entrée de la colonne, ce qui provoque une augmentation de la contrepression jusqu'à ce que la limite de pression du système soit atteinte. Nous vous recommandons d'utiliser un filtre en ligne pour éviter les bouchages du fritté de la colonne, particulièrement lorsque la préparation d'échantillons ne permet pas de filtrage ou lorsque l'échantillon est susceptible de former un précipité.

Les modules suivants peuvent être équipés d'un filtre en ligne supplémentaire :

- Pompes quaternaires (G7104A, G7104C, G4204A, G7131A, G7131C) :
 - Ensemble filtre en ligne, matériau : acier inoxydable (5067-5407)
 - Ensemble filtre en ligne, biocompatible (5720-0003)
- Passeurs automatiques d'échantillons Agilent 1290 Infinity et 1290 Infinity II (sauf G5668A) :
 - Kit de filtre en ligne Agilent 1290 Infinity II (5067-6189)
 - Kit de filtre en ligne Agilent 1290 Infinity II Bio (5720-0020)

Ces filtres en ligne, qui présentent un diamètre de pore nominal de 0,3 µm, protègent la colonne UHPLC contre les bouchages en filtrant les particules provenant des échantillons ou du système UHPLC.

Avantages du filtre en ligne :

- Volume interne très faible
 - Volume mort avec capillaire rigide 1,3 µL
 - Volume mort avec capillaire souple 1,6 µL
- Destiné à un fonctionnement à des pressions élevées (pression de fonctionnement max. 1300 bar)

Nous vous recommandons d'installer le filtre dans la pompe pour protéger le système en aval contre les bouchages dans les cas suivants :

- en cas d'utilisation de mélanges de solvants pouvant former un précipité après mélange,
- lors de l'exécution d'applications utilisant des tampons ou des additifs avec des colonnes présentant une faible granulométrie.

Conseils généraux pour l'utilisation efficace du filtre en ligne :

- Filtrez les solvants avant leur utilisation.
- Respectez les bonnes pratiques.
- Pour les pompes G4204A, G7104A/C et G7131A/C, rétrolavez le filtre de la pompe chaque semaine (lancez le rinçage du filtre depuis le menu contextuel).

ATTENTION

Détérioration de la vanne

- ✓ **Utilisez le mode rinçage du filtre uniquement si le filtre en ligne est installé, sinon l'impulsion de pression pourrait endommager la vanne multifonction.**

- Pour les filtres en ligne installés sur l'échantillonneur, remplacez le fritté du filtre (Fritte 0,3 µm pour filtre en ligne, 5/pk (5023-0271) ou Fritte 0,3 µm pour filtre en ligne, biocompatible, 5/pk (5320-0022)) toutes les 1000 injections ou lorsque la contrepression augmente de 15 %.

REMARQUE

Pour plus d'informations, consultez la *note technique* G7167-90130.

Recommandations pour les colonnes

- Utilisez uniquement les colonnes dans le sens indiqué.
- Utilisez toujours des raccords spécifiquement adaptés à la colonne utilisée.
 - Les colonnes de différents fabricants nécessitent diverses dimensions de raccords.
 - L'utilisation d'un raccord inapproprié risque d'entraîner la dispersion des pics, voire même d'endommager la colonne.
 - Agilent recommande d'utiliser des raccords InfinityLab pour résoudre les problèmes d'incompatibilité des raccords lors de l'utilisation de colonnes de différents fabricants.
- Respectez toujours les limites de fonctionnement ou d'application, tel qu'indiqué dans le mode d'emploi de la colonne.
- Avant utilisation, stabilisez la colonne avec 10 – 20 volumes de colonne.
 - Il est conseillé de procéder à un rinçage intermédiaire avec une phase mobile de la bonne composition, sans additifs, avant de passer à la stabilisation vers le solvant final, avec additifs.
- Nous vous recommandons d'utiliser une colonne de garde pour protéger votre colonne et prolonger sa durée de vie.

REMARQUE

Le stockage prolongé des colonnes doit toujours être effectué dans le solvant de stockage adapté. Pour en savoir plus sur la colonne utilisée, consultez le mode d'emploi fourni dans l'emballage de la colonne.

Recommandations pour les détecteurs

ATTENTION

Allumer et éteindre la lampe fréquemment

Durée de vie de la lampe réduite

- ✓ Évitez d'allumer / éteindre inutilement la lampe.

REMARQUE

Il convient de respecter un délai de sécurité avant de pouvoir rallumer une lampe après son extinction.

- Laissez la lampe chauffer pendant au moins 1 h.
- Veillez à ce que l'environnement et la température ambiante restent stables pour tous les modules, et en particulier le détecteur.
 - N'exposez pas le détecteur à la lumière directe du soleil.
 - N'exposez pas le détecteur à un trop fort courant d'air provenant du système CVC.
- Installez la soupape de décompression (réf. G4212-68001 lors de l'utilisation des détecteurs DAD G4212A/B et G7117A/B/C, ou réf. 0100-3150 lors de l'utilisation de détecteurs FLD) lorsque vous connectez un deuxième détecteur après la cellule à cartouche Max-Light.
- Utilisez les tuyaux d'évacuation recommandés pour chaque type de détecteur. Évitez de pincer le tuyau de collecte des solvants usagés en aval de la sortie de la cellule.
- Assurez-vous que la cellule du détecteur est exempte de bulles en rinçant avec de l'isopropanol ou un autre solvant organique jusqu'à obtention d'une ligne de base stable.
- Pour les détecteurs réfractométriques uniquement : rincez le côté de référence et le côté échantillon avec le solvant fraîchement préparé utilisé pour l'application en cours.
- Rincez la cellule après chaque utilisation.
 - Utilisez de l'eau de grade HPLC pour éliminer les sels.
 - Utilisez de l'isopropanol pour éliminer les solvants organiques.
- Avant de retirer une cellule pour la stocker, remplissez-la d'isopropanol pour éviter la prolifération d'algues.

Recommandations pour les systèmes biocompatibles et bio-inertes

- Assurez-vous que tous les consommables (raccords, capillaires, filtres en ligne, colonnes, etc.) sont bio-inertes ou biocompatibles.
 - Il est à noter que certaines colonnes pour les applications biologiques ont un revêtement en acier inoxydable et peuvent introduire des ions de fer et d'autres métaux dans le circuit. Cela peut entraîner l'adsorption d'échantillons susceptibles tels que les nucléotides phosphorylés. Dans ce cas, utilisez les colonnes revêtues de PEEK.
- Après utilisation du système avec des concentrations élevées en sel, rincez-le abondamment avec de l'eau pour éviter les bouchages dus aux cristaux de sel.
- Le fonctionnement fiable des pompes 1290 pendant l'analyse ne peut pas être garanti si la pression tombe en dessous de 20 bar. Pour des résultats optimaux, la pression doit être continuellement égale ou supérieure à 50 bar. Par conséquent, lors de l'utilisation de colonnes créant une faible contrepression (< 50 bar, telles que les colonnes SEC avec les systèmes LC 1290), installez un restricteur Capillaire MP35N 0,12 mm x 2 m (5005-0046) entre la pompe et l'échantillonneur pour avoir au moins 50 bar.
- Si l'option lavage multiple est installée, effectuez un rinçage quotidien de l'échantillonneur multiple avec de l'eau (voir « [Lavage multiple](#) », page 15).
- Pour toutes les pompes quaternaires, respectez les recommandations pour garantir l'absence de cristaux de sel dans la MCGV (voir « [Recommandations pour la MCGV](#) », page 9).

ATTENTION

Les systèmes LC Agilent Bio-inertes et Bio-compatibles ne doivent pas être soumis à passivation ou à des procédures similaires

Cela pourrait causer des dommages irréversibles aux surfaces internes du système

- ✓ **N'effectuez pas de passivation ou de procédures similaires sur les systèmes bio-inertes et biocompatibles.**

Procédure de rinçage

- ✓ Cette procédure doit être utilisée lorsque la phase mobile contient du sel. Elle doit être effectuée régulièrement, au moins une fois par semaine, ou avant une longue période de veille ou d'arrêt afin d'éliminer les dépôts de sel du circuit et des surfaces en contact avec les solvants. Pour préparer le système à la mise hors tension, voir « [Arrêt du système](#) », page 7.
- ✓ La procédure est obligatoire pour passer d'une phase mobile contenant du sel à des applications en phase inverse (ou toute application comportant beaucoup de composants organiques), où le sel pourrait précipiter.
- Rincez la colonne avec le solvant de stockage recommandé, assurez-vous que ce solvant est compatible avec la phase mobile en cours et ne peut pas causer de précipitation.
- Remplacez la colonne avec un raccord, remplacez le flacon de solvant contenant du sel par un nouveau flacon d'eau de grade HPLC à température ambiante.
- Nettoyez l'ensemble fermeture de flacon avec des lingettes non pelucheuses afin de minimiser l'effet mémoire de la solution résiduelle de sel dans le nouveau flacon d'eau.
- Échantillonneur automatique : purgez pendant au moins 15 min avec de l'eau pour éliminer les résidus de sel de toutes les voies, rincez l'aiguille et rétrolavez le siège d'aiguille dans le cas de l'option lavage multiple, contrôlez visuellement l'aiguille/le siège d'aiguille/l'orifice de rinçage

Recommandations pour les systèmes biocompatibles et bio-inertes

pour détecter la présence d'éventuels résidus de sel, et si nécessaire, nettoyez manuellement l'aiguille/le siège d'aiguille/l'orifice de rinçage.

- Purgez chaque voie de pompe ayant pompé du tampon séparément pendant au moins 10 min à 5 mL/min.
- Rincez tout le circuit du système avec de l'eau pendant 10 min à 2 mL/min. Durant cette étape, changez la position de la vanne d'injection et de la vanne de sélection de la colonne (si installée) toutes les 1 min, et répétez l'opération jusqu'à ce que chaque position ait été sélectionnée au moins 5 fois.
- Remplacez l'eau par des flacons de solvant fraîchement préparé pour minimiser l'effet mémoire du sel.

Informations supplémentaires concernant les pompes Agilent 1290 Infinity et 1290 Infinity II

Préparation de la pompe

Les pompes Agilent 1290 Infinity et 1290 Infinity II sont pourvues de vannes de purge automatiques. Ces pompes sont dotées de diverses fonctionnalités supplémentaires, non disponibles sur les pompes Agilent équipées de vannes de purge manuelles. Il est possible de préparer la pompe (réglez les paramètres et démarrez les fonctions **Purge**, **Condition** ou **Prime**) à l'aide du logiciel.

Purge

Utilisez la fonction de purge pour :

- Remplir le système avec du solvant fraîchement préparé ou un autre solvant.
 - Assurez-vous que le nouveau solvant est miscible avec le solvant précédent.
 - Évitez la détérioration du dégazeur ou de la pompe en effectuant une étape intermédiaire avec un solvant co-miscible, si nécessaire.
- Supprimer les bulles d'air dans les tuyaux et têtes de pompe.
 - Après que la pompe a été utilisée pendant plusieurs heures (de l'air peut avoir diffusé dans les tuyaux de solvant) au moins.

Dès que la procédure de purge est terminée, le module passe de nouveau automatiquement en mode d'analyse.

Conditionnement

Si des microbulles d'air subsistent dans la tête de pompe, la performance globale de la pompe peut être compromise et la précision du débit pourrait être affectée négativement. Cela peut se manifester par une augmentation de la pression et/ou une fluctuation de la ligne de base du détecteur. Un signal de réglage fortement négatif (d'une valeur inférieure à -1) mais augmentant progressivement est un indicateur fiable d'une telle situation. Pour éliminer efficacement les bulles d'air, vous pouvez utiliser la fonction Conditionnement. Pendant le conditionnement, la pompe génère un débit dans le système (colonne) et les derniers paramètres de méthode utilisés, comme le débit, la composition et la pression maximale, sont à nouveau utilisés. Il n'est pas possible d'effectuer une analyse d'échantillon pendant le conditionnement.

Utilisez un débit (par ex. 1,5 mL/min), une composition (par ex. A : 50 % B : 50 %) et contrepression (>200 bar) pour garantir une élimination efficace des bulles d'air de toutes les têtes de pompes.

Conditionnez la pompe si vous détectez les éléments suivants :

- Accumulation de pression excessive.
- Accumulation excessive de la composition (bruit de ligne de base / bruit de mélange ; le niveau de bruit varie selon la composition), si vous êtes sûr que le type de solvant défini est correct et en l'absence de preuve d'une fuite dans la pompe.

Le conditionnement peut s'avérer nécessaire :

- Après une période de veille prolongée
- Lorsque le solvant est épuisé
- Après un entretien ou une réparation

ATTENTION

**Remplissage de tuyaux de solvant vides
Détérioration des joints**

- ✓ Utilisez une seringue ou la fonction Purge pour remplir les tuyaux de solvant vides.
- ✓ N'utilisez pas la procédure Prime pour remplir les tuyaux de solvant vides.

Amorçage

La fonction Amorçage est utile si de l'air est entré dans les têtes de pompes et ne peut pas être éliminé par un conditionnement de 15 minutes. Le module aspire du solvant à un débit à élevé en utilisant toutes les pompes en même temps, et l'envoie vers l'évacuation par le biais de la vanne de purge automatique. Cette procédure effectuée 20 fois est stressante pour la vanne et le joint du rotor. Par conséquent, elle ne doit être effectuée qu'en dernier recours, avant de remplir les têtes de pompes en forçant avec une seringue ou d'essayer de réparer les têtes de pompes.

Utilisez la fonction Amorçage pour :

- Débloquer une vanne potentiellement coincée.

Les fonctions décrites peuvent être déclenchées depuis l'interface de pilotage :

- 1290 Infinity et 1290 Infinity II

REMARQUE

Pour les paramètres, consultez la [Figure 3](#), page 11.

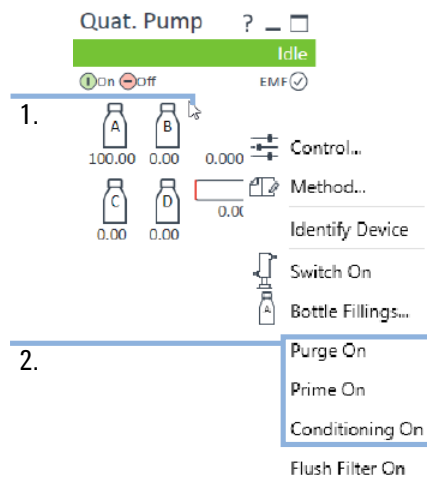


Figure 8 Préparation de la pompe (Agilent 1290 Infinity).

1. Cliquez avec le bouton droit sur le tableau de bord du module
2. Choisissez la bonne fonction pour démarrer la procédure

Le menu contextuel Préparation de la pompe, optimisé pour l'utilisateur, remplace le menu classique :

- Pompes Agilent 1290 Infinity II

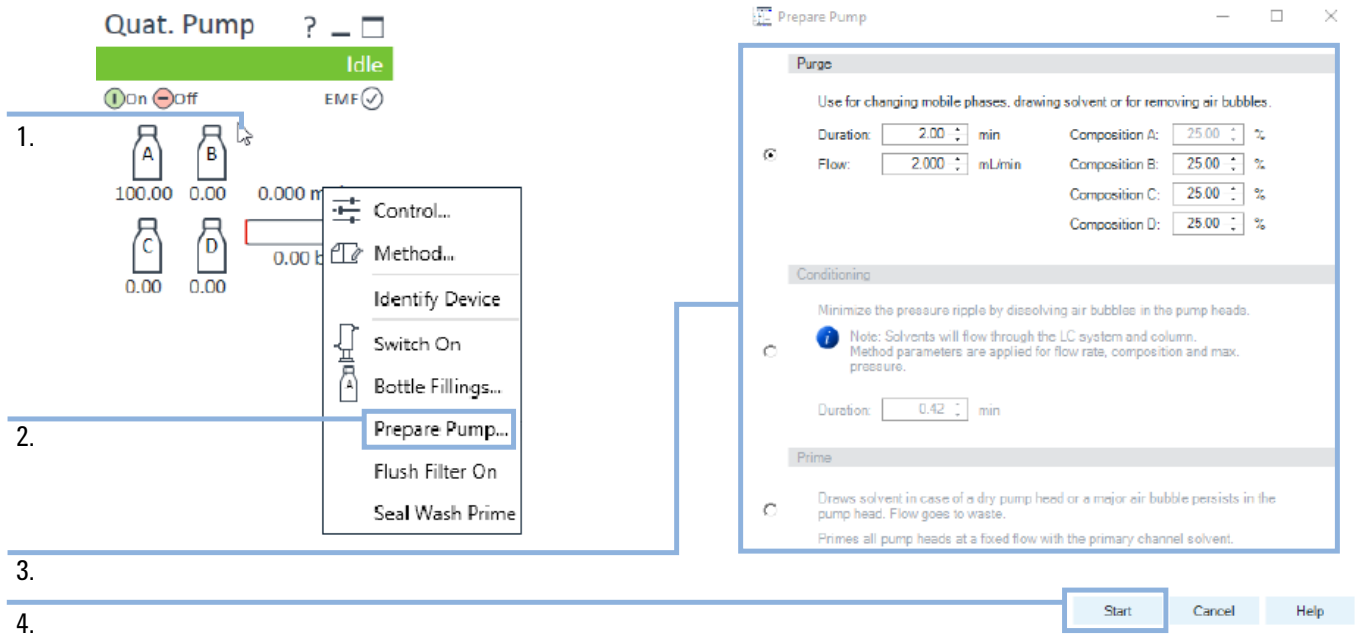


Figure 9 Préparation de la pompe (pompes Agilent 1290 Infinity II).

1. Cliquez avec le bouton droit sur le tableau de bord du module
2. Sélectionnez **Prepare Pump...**
3. Sélectionnez la procédure et complétez les paramètres adéquats
4. Cliquez sur **Start** pour exécuter la procédure sélectionnée

Application Agilent InfinityLab HPLC Advisor

L'application Agilent InfinityLab HPLC Advisor offre un ensemble d'outils de travail utiles au quotidien pour les systèmes HPLC, que vous travailliez à côté ou à distance de l'instrument. Ces outils sont compatibles avec tous les instruments HPLC, peu importe la marque ou le modèle.

Vous pouvez télécharger l'application sur votre téléphone mobile de l'une des manières suivantes :

- En recherchant directement « HPLC Advisor » dans Google Play ou l'Apple Store
- En ouvrant les liens suivants
 - *Google Play* : <https://play.google.com/store/apps/details?id=com.agilent.hplcadvisor>
 - *Apple App Store* : <https://apps.apple.com/app/hplc-advisor/id1566882318>
- En scannant le code QR suivant (compatible avec Android et iOS)



Glossaire d'IU

C

Condition

Conditionnement

E

Evacuation Mode

Mode évacuation

P

Prepare Pump...

Préparer la pompe...

Prime

Amorçage

S

Start

Démarrer