
HPLC Shimadzu

Introduction

We have an Aminex HPX-87H column. Use 5 mM H₂SO₄ as mobile phase, use UV and RI detectors (the latter will detect glucose, ethanol, butanol, and lactate, which the UV can't). Use a column guard (there is a second, new one in the column box, if you need to change the one that is currently installed. Change the guard if dirt gets in, this might be signalled by the UV signal going all over the place.

Materials

› For 96 well plate measurements :

- › Plate : 4TITUDE ; Ref: 4TI-0960/C [lien](#)
- › Film percable :
- › SEALPLATE ; Ref. ZAF-PE-NL-50 [lien](#)
- › or
- › WATERS ; Ref: 186002789 [lien](#)

› Standards

- › Sulfuric acid (H₂SO₄) 99% (sous hotte, salle des -80°C) (98.08 g/mol – d : 1.84 g/ml)
- › Ethanol 100% (46.07 g/mol – d : 0.789 g/ml)
- › Glucose 20% (180.16 g/mol)
- › Lactic acid 500 mM dans notre frigo (solid L-lactic acid is in fridge 1, number 1232) (90.08 g/mol)
- › Acetic acid glacial (= 99.7%) (60.05 g/mol – d : 1.049 g/ml) sur notre paillasse
- › Formic acid 99% (46.03 g/mol – d : 1.22 g/ml) sur notre paillasse
- › Butanol 100% (74.12 g/mol – d : 0.81 g/ml) sur notre paillasse

Procedure

Calibration

1. The RI detector can take a while to stabilise. Temperature and pressure need to be super stable, so you might need to leave it to equilibrate overnight, not just a few hours (which is enough for the UV detector). Bubbles or leaks can mess with pressure, whereas opening/closing column oven can mess with temperature. So purge the system after changing the mobile phase, set column to final temperature, then don't touch anymore before equilibration. Let the R flow open for some time to rinse it well. Open and close it several times to remove bubbles that might be inside (you will see the UV/Vis detector move every time you open and close, but each "pulse" will be smaller than the previous one). Then leave it closed, wait 5 min, then hit "balance the RID" on the machine.

2. Preparing standards:

3. You can mix standards as long as you know they come out at a different time from the machine (and you know the order). I diluted them in water, maybe using the mobile phase (5 mM sulfuric acid) is better.

4. Mobile phase H₂SO₄ à 5 mM :

Rincer la bouteille de 5L avec eau milliQ en aile Chimie.

Ajouter 266.5 µl/L H₂O soit 1 332.5 µl de H₂SO₄ à 5L d'eau milliQ de l'aile Chimie

5. Standards solution 1: 2% ethanol (=342.5 mM), 0.5% glucose (=27.775 mM), 50 mM Lactic acid, 50 mM acetic acid in Sulfuric acid 5 mM

200 µL Ethanol à 100% (Temps Rétention HPLC : 26.796)

250 µL Glucose à 20% (TR : 11.305)

1 mL Lactic acid à 500 mM (TR : 15.636)

29 µL Acetic acid glacial (TR : 18.457)

In 10 mL total volume (add 8.52 mL phase mobile H₂SO₄ à 5 mM)

6. Standards solution 2 :

500 µL cellobiose 10% (TR : 9.2)

19 µL Formic acid à 99% (TR : 17.026) 50 mM

100 µl Butanol à 100 % (TR : 44.916) 1% (= 109.28 mM)

100 µL Butyrate à 100%

In 10 mL total volume phase mobile H₂SO₄ à 5 mM

7. Préparation plaque :

Mettre d'abord 2 puits avec H₂O

On veut 5 concentrations de chaque standards, du moins concentré vers le plus concentré.

Faire 4 dilutions en cascade (6.25% - 12.5% - 25% - 50% et 100%) dans H₂SO₄ 5 mM.

Mettre maximum 170µl de chaque échantillon dans la plaque filtrante (ainsi que H₂O et Standards). On peut avoir des pertes de milieu dans la plaque filtrante.

Il faut au moins 100µl dans les puits pour que l'aiguille de l'HPLC puisse plonger.

Cette aiguille prélève 10 µl par échantillons.

Adapter la plaque filtrante sur une plaque adaptée à l'HPLC (4titude, cf référence plus haut) et centrifuger à vitesse maxi (4000 rpm) pendant 3 minutes.

Mettre un pad adapté, c'est à dire perçable sur la plaque réceptrice qui sera clipsée sur le support de la machine HPLC.

8. Lancer run de 55 min pour voir le butanol

Pour la dilution des standards : 10 mL de standard, sur la plaque on utilise 170 µL de standards

Chaque dilution est une dilution au 1/2, on peut faire des dilution en cascade dans 1 mL en utilisant 500 µL de la solution précédente

On a donc besoin de 2 mL de phase mobile (H₂SO₄) et 1 mL de standard

Fonctionnement pratique de la machine et du logiciel :

9. Allumer l'ordinateur en premier et lancer le logiciel avant d'allumer l'HPLC :

Connexion : User, mdp : shimadzuultra

Software : LabSolution, connexion : user, enter
Mise en route de la machine :
Allumer le CMB en premier, attendre qu'il arrête de clignoter
Allumer chaque module un par un

10. Dans le logiciel :

Instrument
Ouvrir le dossier Tom
Activate Instrument
Dans Method, "Wash with no column" si la colonne est nouvelle
Download

11. Equilibrage de la colonne et du RID :

Il faut mettre une méthode qui pompe uniquement de la phase mobile (pompe A) et la laisser tourner plusieurs heures voir la nuit si la colonne a été ajoutée dans la journée ou avant sans être équilibrée.
Dans un premier temps il faut commencer avec un débit de 0.1 mL/min et augmenter de 0.1 en 0.1, de préférence il faut augmenter le débit lorsque le four est à la bonne température (55°C dans mon cas) jusqu'à 0.5 (ou jusqu'à la vitesse à laquelle tu comptes l'utiliser).
Le RID est très sensible, on peut commencer à rincer la Ref cell et la Sample Cell ensemble uniquement lorsque le détecteur UV-vis est déjà stable.
Ouvrir 1h la Ref Cell du RID pour retirer le maximum d'impureté, la refermer et la rouvrir plusieurs fois de suite pour retirer les bulles qui s'y seraient logées, on répète cette méthode jusqu'à que les variations lors de l'ouverture/fermeture soit imperceptibles
Une fois le détecteur stable, on peut "Balance the RID" pour mettre le signal à 0
Le signal est considéré comme stable si il n'a pas de variation de plus de 2-3 mV (c'est du bruit)

12. Plan d'exécution du Run :

Une fois le signal stable à 0 depuis plus de 30 min on peut lancer le run.
Le design du plan du Run doit être fait dans l'ordre de la plaque, c'est mieux (la machine lit les plaques dans le sens des lignes)

13. C'est mieux si entre chaque ligne (12 samples) on a un échantillon d'eau

14. Initiation du run :

Cliquer sur Batch
Double clique sur le fichier d'intérêt (celui avec le plan du Run)
Cliquer sur Real Time Batch
Start Single Run
La pompe va pipeter et injecter le premier échantillon et on peut vérifier que cela ça passe bien

Numero de puits dans la plaque

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
2	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
3	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
4	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
5	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
6	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
7	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
8	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96

Protocole de Lavage de la Animex HPX-87H Column 300 * 7.8

	A	B
1	<u>Specification and operating guidelines for Animex HPX-87H Column 300 x 7.8 mm</u>	
2	Catalogue number	125-0140
3	Resin ionic form	Hydrogen
4	Support	Sulfonated divinyl benzene-styrene
5	Particle size	9 µM
6	Maximum pressure	1,500 psi
7	Max flow rate at max temperature	0.6 mL/min
8	Max temperature	Ambient / 65°C
9	Maximum injection volume	20 µL
10	Typical mobile phase	0.005 M H ₂ SO ₄
11	pH range	1-3
12	<u>Cleaning, Regeneration and Storage guidelines for Animex HPX-87H Column 300 x 7.8 mm</u>	
13	Avoid	MeOH, Salts, bases, metal ions, amines, organic solvents , H ₂ O > pH 3
14	Cleaning solvent	(1) 5% CH ₃ CN in 0.005 M H ₂ SO ₄ ; (2) 30% CH ₃ CN in 0.005 M H ₂ SO ₄
15	Flow rate	0.2 mL/min
16	Temperature	65°C
17	Duration	(1) 4h ; (2) 12h ; (3) run mobile phase until steady baseline
18	Regeneration solvent	0.025 M H ₂ SO ₄
19	Flow rate	0.2 mL/min
20	Duration	4-16h
21	Storage	0.005 M H ₂ SO ₄