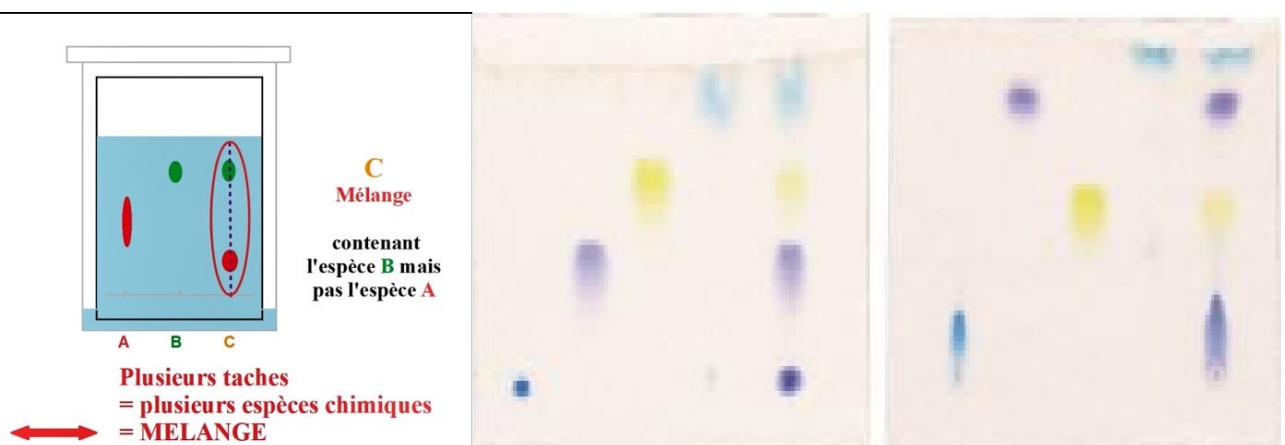


# Réalisation d'un protocole HPLC

## Introduction

### Principe

La chromatographie est un procédé qui permet de déterminer les différents composants d'un mélange. Il existe la chromatographie sur couche mince (CCM) qui est assez connue et appliquée au collège / lycée : en trempant une plaque de CCM, sur laquelle il y a une tache de notre mélange, dans un éluant. L'éluant remonte la plaque en emportant avec lui le mélange. Lorsque le front de l'éluant arrive presque au bout de la plaque, on la retire de l'éluant. On remarque que chaque espèce arrive plus ou moins haut, et on peut ainsi comparer le mélange à des corps purs connus.



Photos trouvées sur : [Interpréter un CHROMATOGRAMME - Chromatographie sur couche mince \(CCM\)](#) de Maths Physique EASY et [Kit d'expérimentation, principes de la chromatographie sur couche mince](#) d'EDVOTEK

Ce qu'il y a à retenir, c'est que les éléments chimiques circulent plus ou moins rapidement dans un éluant en fonction de leur affinité avec celui-ci. Pour l'HPLC, le mélange circule à travers "l'éluant" (qui est sous forme de colonne), à la sortie duquel se trouve un spectrographe. Ses composants traverseront la colonne plus ou moins rapidement, le spectrographe en sortie affichera alors les spectres d'absorption de "chaque" espèce du mélange.



Photo prise de la machine au fablab

La méthode HPLC permet une double vérification des composant, et l'aspect numérique est plus précis qu'une simple CCM. De plus, la spectrographie permet de déterminer la concentration de chaque élément.

## Explication

Pour se familiariser avec l'utilisation de la machine à HPLC (chromatographie en phase liquide haute performance ou haute pression) de l'entreprise Beckmann Coulter avec une colonne C18 (ou phase inverse, revert phase, RP), on essaie de retranscrire un protocole simple, reposant sur le matériel que nous avons.

Nos conditions sont les suivantes :

- le protocole doit être simple
- la phase mobile doit être soit de l'eau soit de l'acétonitrile
- la colonne doit mesurer 250 mm \* 4.60 mm (c'est la colonne que nous avons au fablab)

## Protocole

Le protocole choisi permet de déterminer la concentration en caféine dans les suppléments alimentaires pour perdre du poids.

## Réactifs

- Caféine comme référence standard

- Acétonitrile
- Eau ultra pure
- Échantillons tests – supplément alimentaire à base de caféine

## Matériels

- Varian Pro Star HPLC system
- Détecteur UV
- Colonne C18, 4.6 mm
- Thermostat
- Bain à ultrason
- Seringue Hamilton conçue pour injection manuelle dans les ports HPLC (25 ml)

## Conditions de chromatographie

- Phase mobile 65% d'eau et 35% acétonitrile
- Détection UV : 274 nm
- Débit : 1 ml/min
- Colonne : C18
- Température thermostat : 25°C

## Préparation des solutions standards

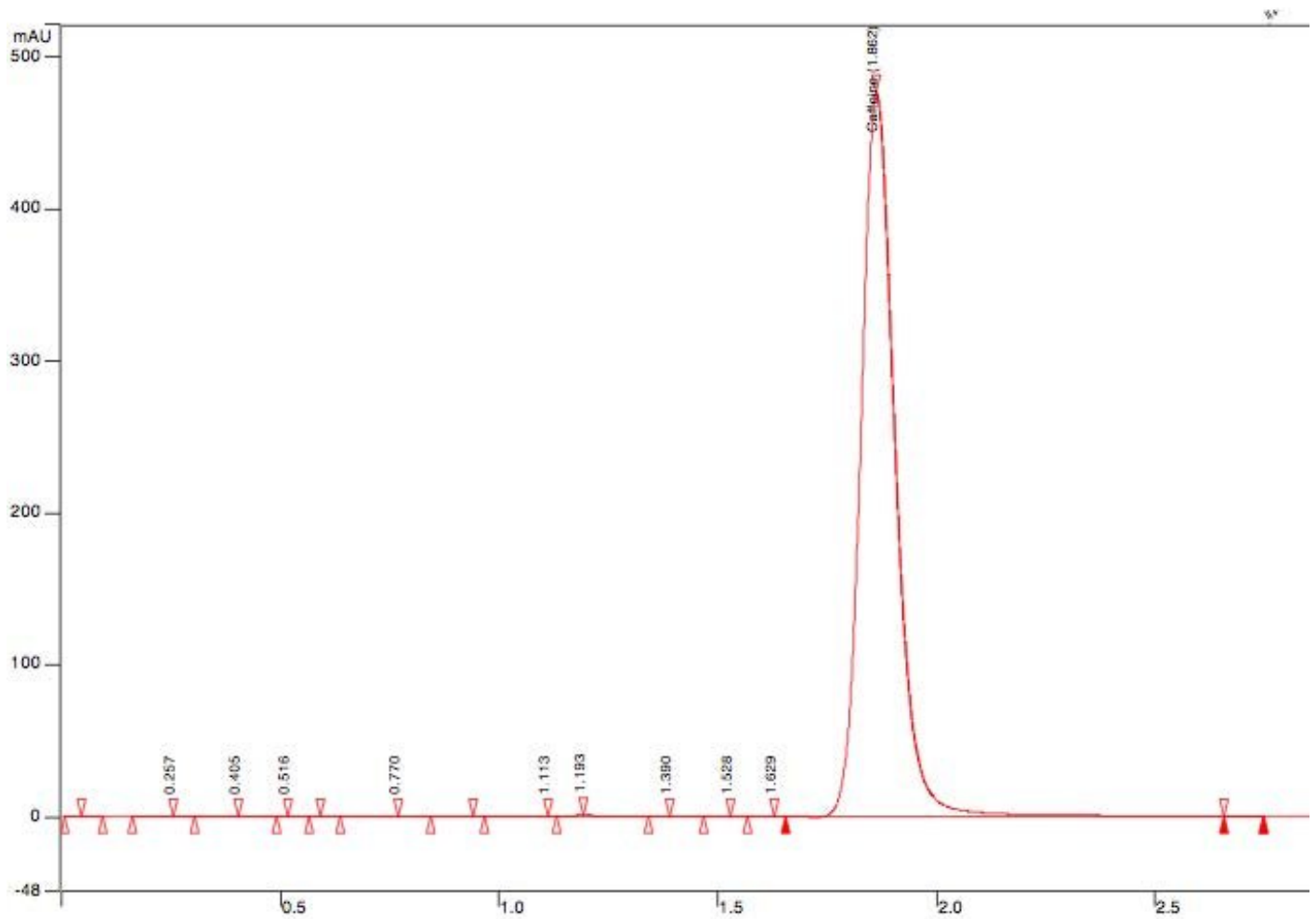
Dilution dans une solution d'acétonitrile/eau en ultrasonication pendant 15 min dans un bain à ultrason.

## Préparation des échantillons tests

1. Extraction avec de l'acétonitrile/eau, une ultrasonication dans un bain à ultrasons pendant 15 minutes.
2. Peser la capsule pour avoir son poids exacte. Réduire la capsule alimentaire à analyser sous forme de poudre. Dans un bécher de 50 ml, dissoudre la poudre obtenue dans la phase mobile acétonitrile:eau 35:65. Filtrer sous Buchner. Récupérer le filtrat et le diluer dans la phase mobile en proportion 100/200. Injecter 20 ml de la solution dans l'appareil HPLC à l'aide d'une seringue Hamilton de 25 ml
3. Filtration deux fois pour toutes les solutions et préfiltration pour éliminer les grosses particules des solutions. Filtration plus fine avec des filtres à seringue (taille des pores 0,45 µm).
4. Analyse de tous les échantillons trois fois.

## Résultats

Les résultats présentés ci-dessous sont ceux de l'étude :



## Bibliographie

### Sources

[Quelles sont les différentes phases en Chromatographie? AirLiquide](#)

[Chromatographie en phase liquide à haute performance, Wikipédia](#)

L'article utilisé est celui de Stanislava Ivanova, Kalin Ivanov, Melissa Bekyar et de Pavlina Kostova, publié en mai 2020, intitulé [HPLC Method for Determination of Caffeine in Food Supplements for Weight Loss](#), sur le site [ResearchGate](#).

Documentation réalisée par Juliette VREUGDENHIL et Sassi BEN HALIMA

---

Revision #25

Created 2 December 2024 13:38:52 by Vreugdenhil Juliette

Updated 18 December 2024 13:58:30 by Ben Halima Sassi