

Réalisation d'un protocole HPLC

Introduction

Principe

La chromatographie est un procédé qui permet de déterminer les différents composants d'un mélange. Il existe plusieurs procédés de chromatographie, et l'une des plus performantes s'appelle CLHP (Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance) ou HPLC en anglais (High Performance *ou Pressure* Liquid Chromatography). La méthode HPLC se fait à haute pression **[1]**.

Une phase mobile, composée d'acétonitrile, d'eau ou autre, pousse le mélange à analyser dans une "colonne" (voir sur l'image ci-dessous). Dans cette colonne, il y a une phase stationnaire : des grains de très petite taille. En fonction des propriétés des différents composants, et avec un choix judicieux de phase mobile et de phase stationnaire, les composants du mélange sont plus ou moins ralentis au passage de la colonne, et donc sortent de celles-ci à des instants différents **[2]**.

Le spectrographe en sortie affichera alors les spectres d'absorption de "chaque" espèce du mélange. Les pics sont alors plus fins (la résolution est augmentée), et le seuil de détection est plus bas que si le mélange avait été placé directement dans un spectrographe **[2]**.



Photo prise de la machine au fablab

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 **[3]**.

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 (respectivement 35/65) 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 (si on n'utilise de la poudre à café, peser simplement une dose de poudre).
3. Dans un bécher de 50 ml, dissoudre la poudre obtenue dans la phase mobile acétonitrile/eau (35/65). Filtrer sous Buchner.
4. Récupérer le filtrat et le diluer dans la phase mobile en proportion 100/200 (filtrat/phase liquide). Injecter 20 ml de la solution dans l'appareil HPLC à l'aide d'une seringue Hamilton de 25 ml
5. 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).
6. Analyse de tous les échantillons trois fois.

Résultats

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



Bibliographie

Sources

1. [Quelles sont les différentes phases en Chromatographie? AirLiquide](#)
2. [Chromatographie en phase liquide à haute performance, Wikipédia](#)
3. 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](#). Voici le [pdf](#) de l'étude : [Caffeine-NM2020.pdf](#)

Revision #29

Created 2 December 2024 13:38:52 by Julius

Updated 16 May 2025 14:36:12 by Ben Halima Sassi