



TP/Problèmes d'analyse réelle II

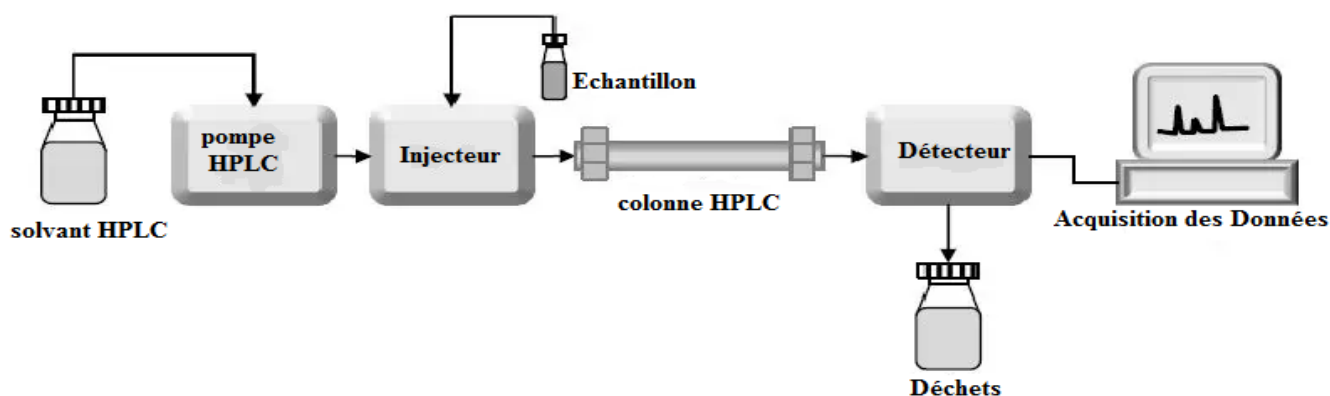
TP IV : Protocole détaillé de HPLC (Chromatographie Liquide Haute Performance)

Objectifs : L'objectif de ce TP est d'apprendre à utiliser la chromatographie liquide haute performance (HPLC) pour séparer, identifier et quantifier des composés d'un mélange donné. .

I- Introduction : La **HPLC** : (**High-Performance Liquid Chromatography**) est une technique analytique utilisée pour séparer, identifier et quantifier les composants d'un mélange. Elle repose sur le passage d'un échantillon dissous dans une phase mobile (solvant ou mélange de solvants) à travers une phase stationnaire (colonne remplie d'un matériau spécifique) sous haute pression.

II- Principes de la HPLC

1. **Phase mobile :** Liquide (eau, acétonitrile, méthanol, etc.) qui transporte l'échantillon à travers la colonne.
2. **Phase stationnaire :** Matériau solide (silice modifiée, polymères, etc.) contenu dans une colonne.
3. **Pompe :** Assure un débit constant de la phase mobile sous haute pression.
4. **Injecteur :** Introduit précisément l'échantillon dans la colonne.
5. **Détecteur :** Permet la détection et la quantification des composés séparés (UV, fluorescence, spectrométrie de masse).
6. **Système d'acquisition de données :** Enregistre les résultats et affiche les chromatogrammes.



Types de HPLC

- **HPLC en phase normale :** Phase stationnaire polaire, phase mobile apolaire.
- **HPLC en phase inversée (RP-HPLC) :** Phase stationnaire apolaire (C18, C8), phase mobile polaire (eau, tampon, solvant organique).
- **HPLC d'exclusion stérique (SEC ou GPC) :** Sépare les molécules selon leur taille.

- **HPLC en échange d'ions** : Sépare les composés en fonction de leur charge.

Applications

- Analyse pharmaceutique (contrôle qualité, dosage des médicaments).
- Analyse alimentaire (détection de contaminants, additifs).
- Analyse environnementale (détection de pesticides, polluants).
- Recherche biomédicale (séparation de protéines, métabolites).

III- Protocole expérimental

2. Matériel et réactifs

- **Matériel** : Chromatographe HPLC équipé d'une pompe, d'un injecteur, d'une colonne et d'un détecteur (UV-Visible, DAD, fluorescence, etc.).

Logiciel d'acquisition et de traitement des données.

Micropipettes et pointes.

Fiole jaugée, bécher, éprouvette graduée.

Filtres (0,45 μm ou 0,22 μm) et seringues.

Flacon pour l'échantillon et pour les solvants de phase mobile.

- **Réactifs**

Phase mobile : mélange de solvants (ex. : eau/acétonitrile, eau/méthanol avec ou sans tampon).

Échantillon à analyser : solution contenant les analytes d'intérêt.

Solutions de standard pour la calibration.

3. Protocole expérimental

3.1. Préparation de la phase mobile

1. Préparer les solvants nécessaires (ex. : mélange eau/acétonitrile dans des proportions spécifiques).
2. Filtrer la phase mobile à l'aide d'un filtre de 0,45 μm pour éliminer les particules.
3. Dégazer la phase mobile en utilisant un ultrason ou un dégazeur en ligne si disponible.

3.2. Préparation des échantillons

1. Dissoudre l'échantillon dans un solvant compatible avec la phase mobile.
2. Filtrer la solution à l'aide d'un filtre de 0,22 μm pour éviter toute obstruction de la colonne.
3. Placer la solution filtrée dans un flacon HPLC propre et étiqueté.

3.3. Réglage du système HPLC

1. **Mise en marche du système** : Allumer la pompe, le détecteur et l'ordinateur.
2. **Conditionnement de la colonne** : Faire passer la phase mobile à travers la colonne à un débit stable pendant au moins 20 à 30 minutes avant l'injection des échantillons.
3. **Réglage des paramètres** :

- **Type de colonne** : colonne C18, C8 ou autre selon l'analyse.
- **Phase mobile** : sélectionnée en fonction de la polarité des analytes.
- **Débit** : généralement entre 0,5 et 1,5 mL/min.
- **Longueur d'onde du détecteur** : selon l'absorption des composés étudiés.

3.4. Calibration et courbe d'étalonnage

1. Préparer une série de solutions étalons à différentes concentrations.
2. Injecter chaque standard et enregistrer les chromatogrammes.
3. Tracer la courbe d'étalonnage (aire du pic en fonction de la concentration).

3.5. Injection des échantillons

1. Injecter un volume précis d'échantillon (généralement 10-20 μ L) dans le système HPLC.
2. Lancer l'acquisition des données et surveiller le chromatogramme.
3. Noter les temps de rétention et les aires des pics.

3.6. Analyse et interprétation des résultats

1. Comparer les temps de rétention des échantillons avec ceux des standards pour l'identification des composés.
2. Calculer la concentration des analytes à l'aide de la courbe d'étalonnage.
3. Interpréter les résultats et discuter des éventuelles erreurs expérimentales.

4. Nettoyage et arrêt du système

- 1- Rincer la colonne avec un solvant approprié pour éliminer toute contamination.
- 2- Arrêter la pompe et éteindre le détecteur après le rinçage.
- 3- Nettoyer le matériel utilisé (seringues, flacons, etc.).

5. Exploitation des données

- Exporter et analyser les chromatogrammes.
- Vérifier la linéarité de la courbe d'étalonnage.
- Calculer la limite de détection (LOD) et la limite de quantification (LOQ).

6. Remarques et précautions

- Toujours utiliser des solvants HPLC de haute pureté pour éviter la contamination.
- Ne jamais laisser la colonne sécher, elle doit toujours être remplie de solvant.
- Vérifier régulièrement la pression du système pour éviter les obstructions.
- Manipuler les solvants et les échantillons sous hotte si nécessaire.

BOUDJERDA ABDELHAMID