

Centre universitaire Abdelhafid Boussouf, Mila
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie

Méthodes Chromatographiques

1^{ère} Année Master Biotechnologies Et Amélioration des Plantes

2022-2023

Dr. Bouchekrit M.



HPLC

HГC

HP LC

High Performance Liquid Chromatography

chromatographie liquide à haute performance

Définitions

Cette chromatographie utilise une phase mobile liquide et une phase stationnaire **très fine**. Pour obtenir un débit satisfaisant, il faut injecter la phase mobile sous des pressions de plusieurs centaines de bars.

1



Utilisation à haute pression

2



Grande vitesse de séparation

3



Abaissement du seuil de détection

4



Grande fiabilité

Principe

L'HPLC utilise une phase mobile liquide pour séparer les composants d'un mélange sous une haute pression.

Chaque soluté est soumis à:

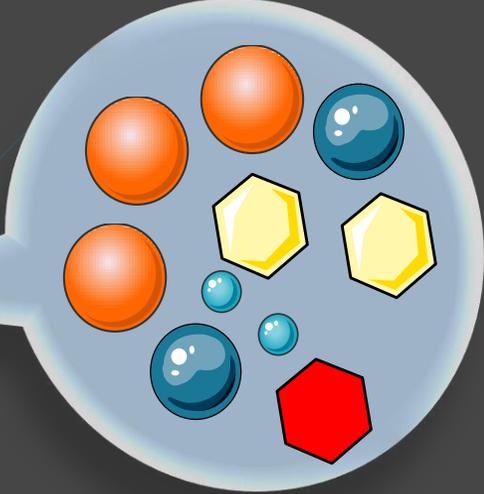
Une force de rétention (exercée par la phase stationnaire),

Une force de mobilité (due à la phase mobile).

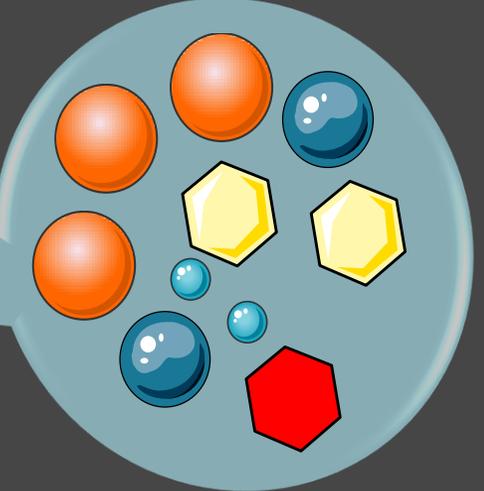
Chromatographie classique



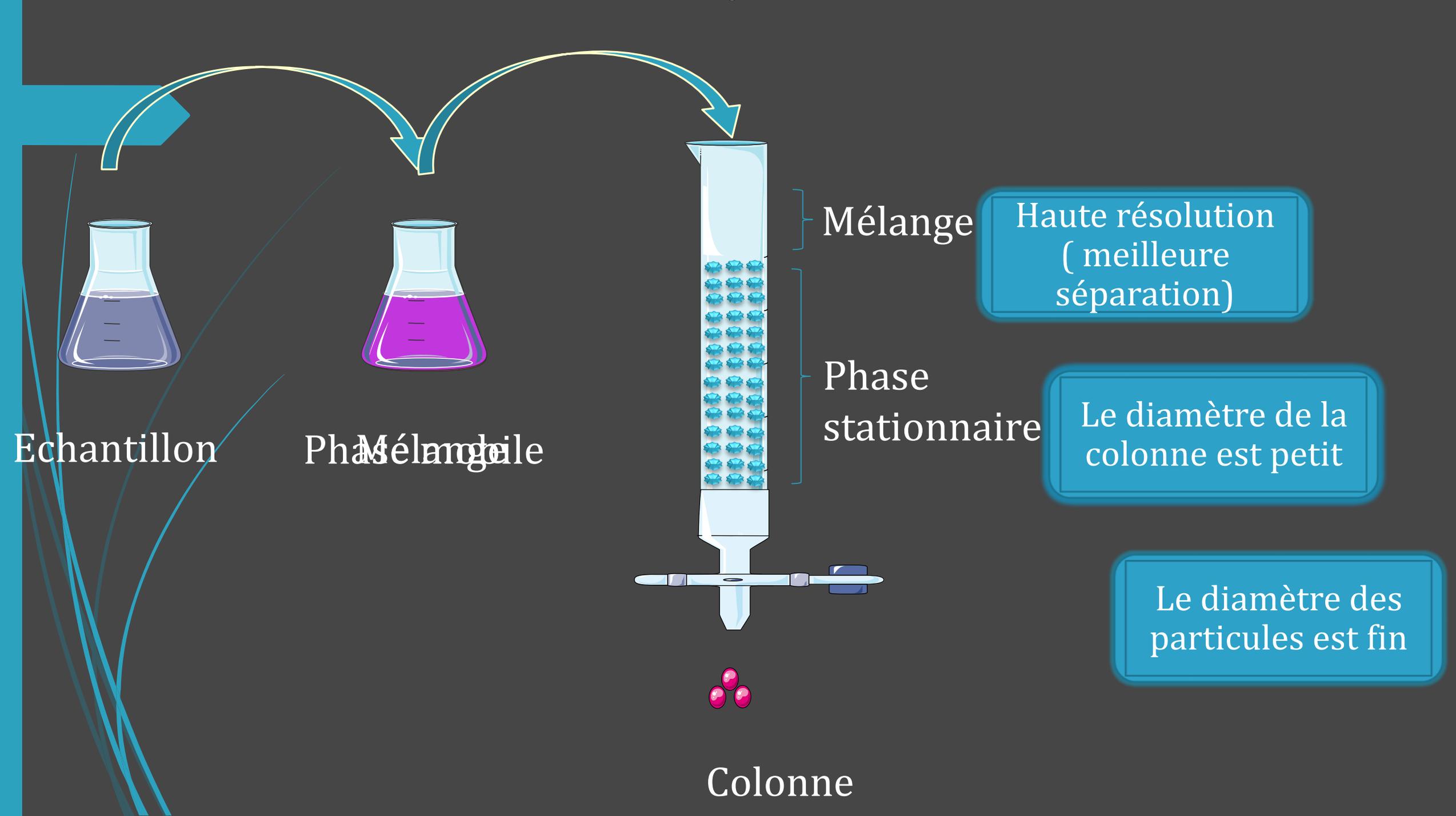
Echantillon



Echantillon



HPLC



Echantillon

Phase mobile

Mélange

Haute résolution
(meilleure
séparation)

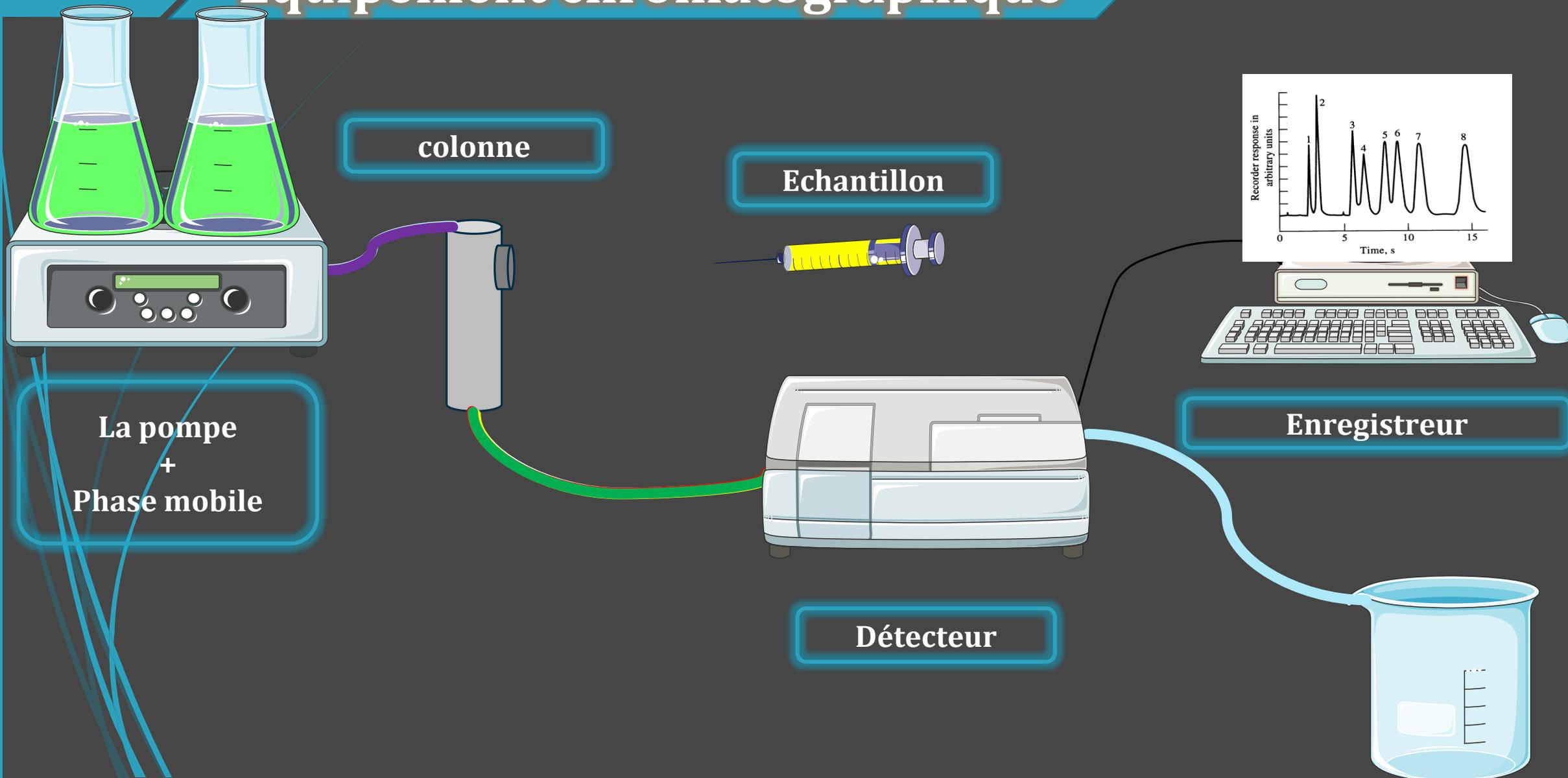
Phase
stationnaire

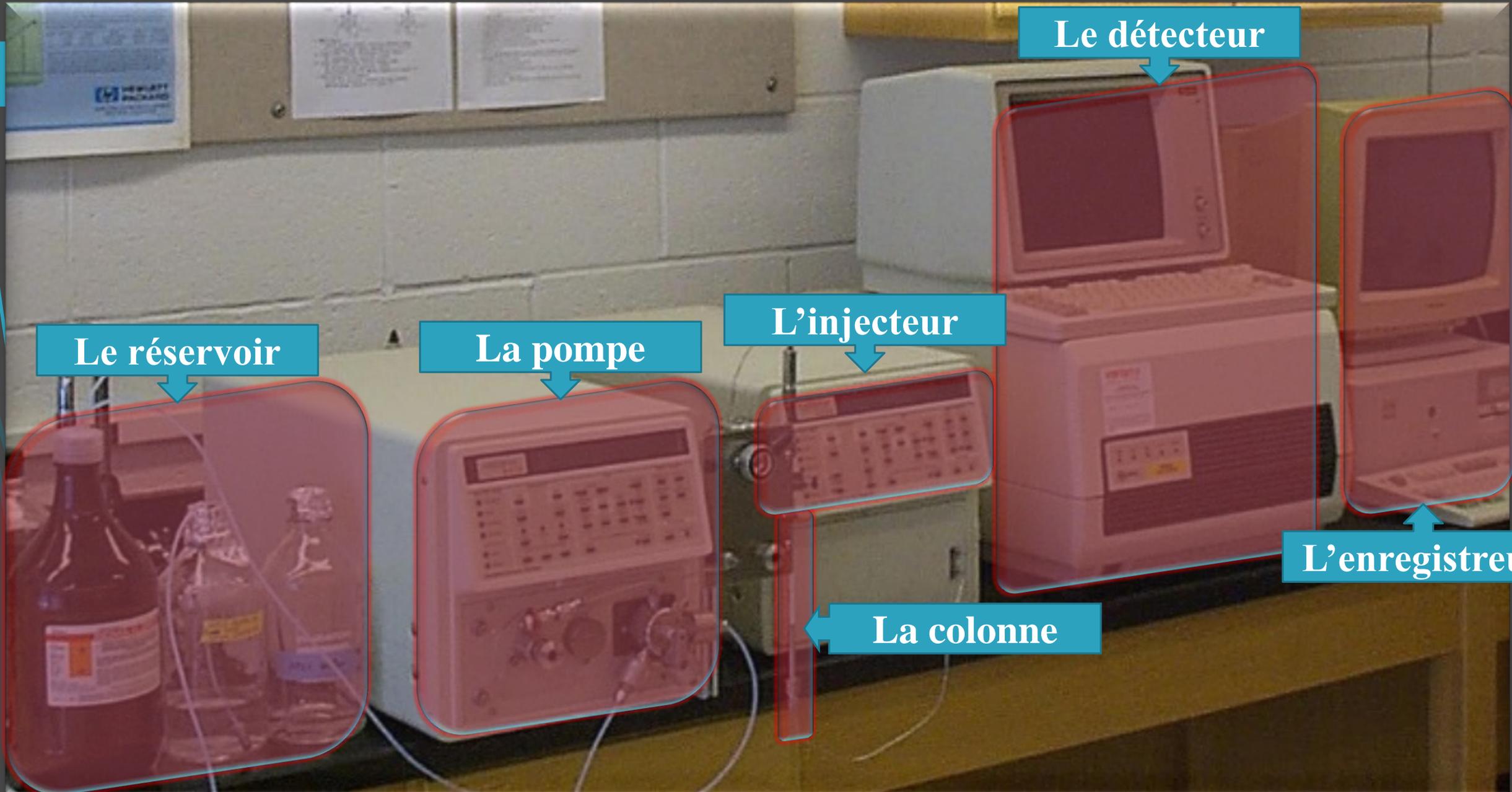
Le diamètre de la
colonne est petit

Le diamètre des
particules est fin

Colonne

Équipement chromatographique





Le détecteur

Le réservoir

La pompe

L'injecteur

La colonne

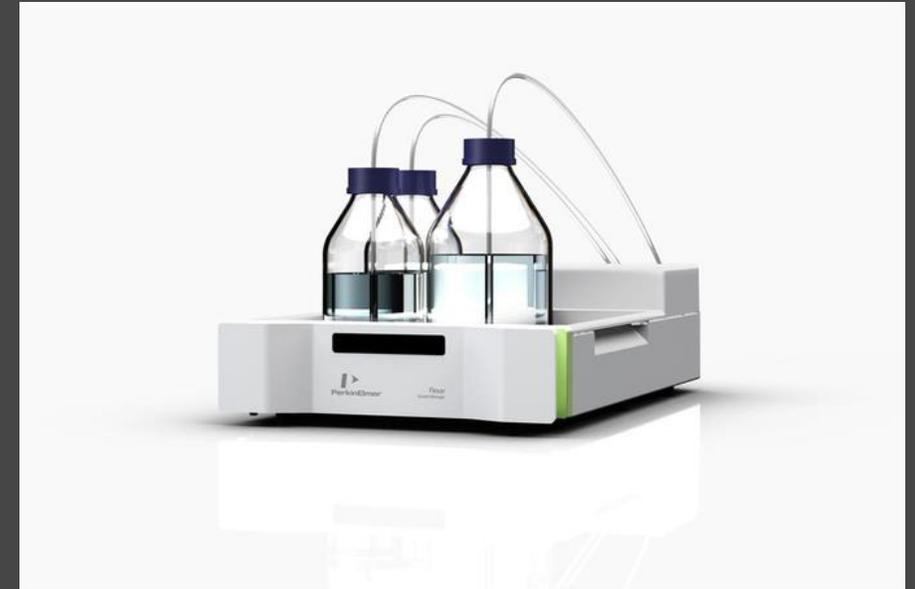
L'enregistreur

Le réservoir de la phase mobile

Contient la phase mobile en quantité suffisante

Permet de réaliser des gradients d'élution

Permet d'éviter l'évaporation des solvants volatils



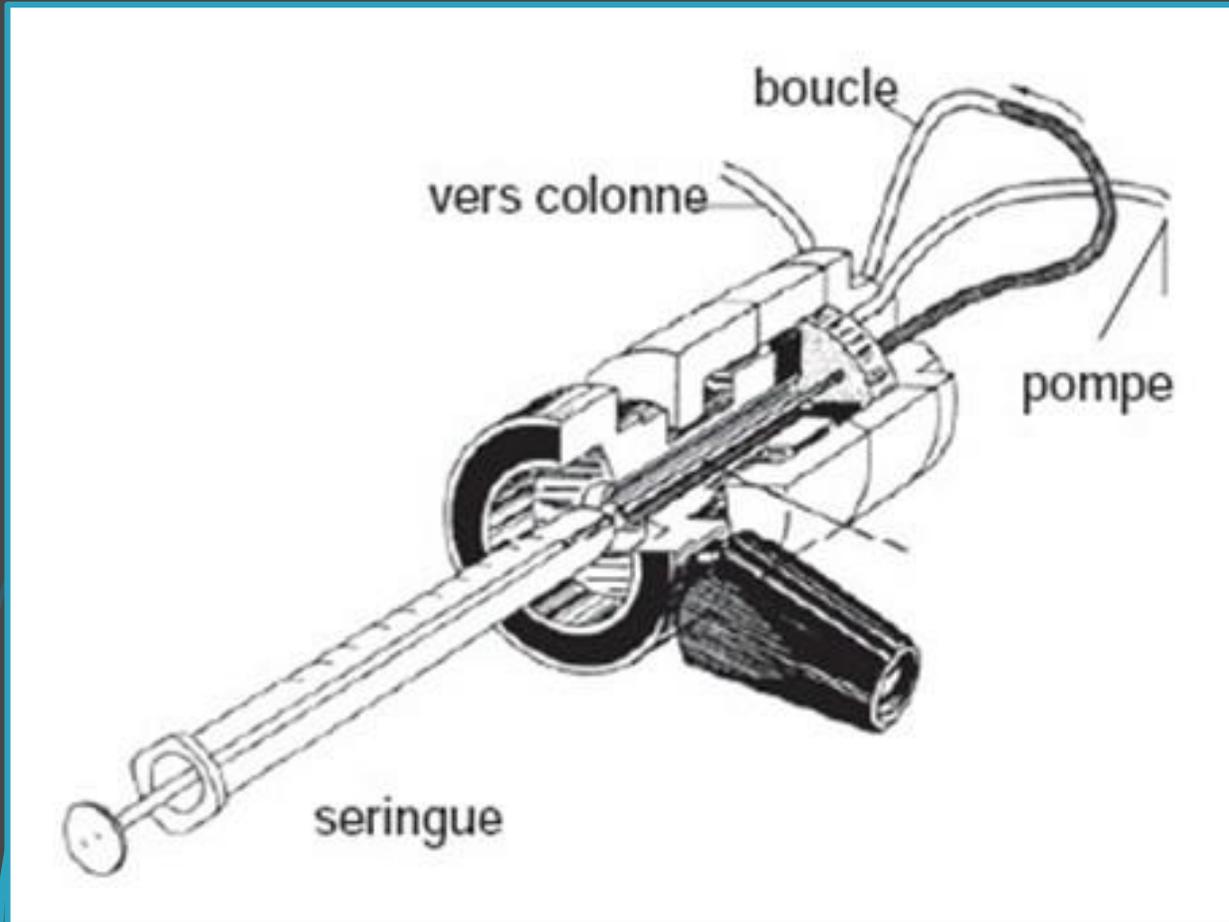
L'injecteur

L'injection doit se faire de manière très rapide (ne pas perturber la circulation du solvant).

La difficulté consiste à introduire en tête de colonne un volume d'échantillon là où la pression atteint plusieurs dizaines de bars.

On utilise pour cela une vanne haute pression à plusieurs voies (6 vanne à boucle d'injection)

Ce système évite les brusques variations de pression dans l'appareil et est d'une grande reproductibilité



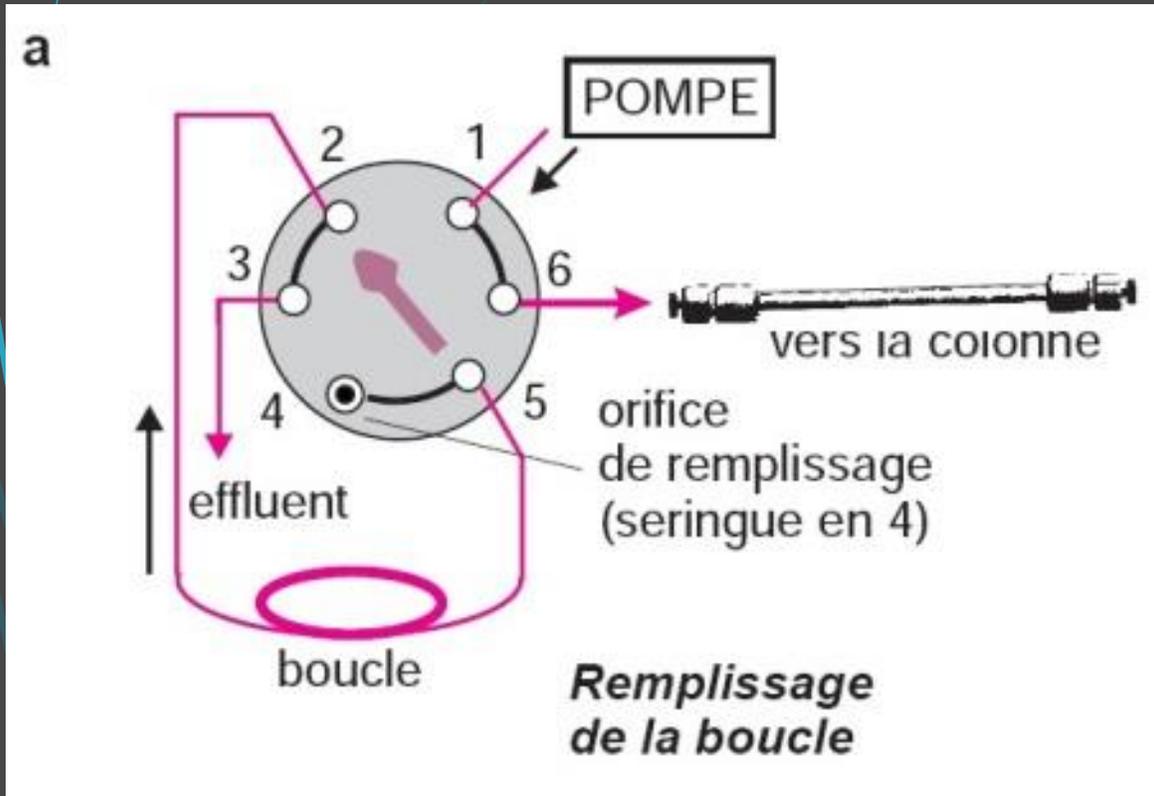
Remplissage de la boucle



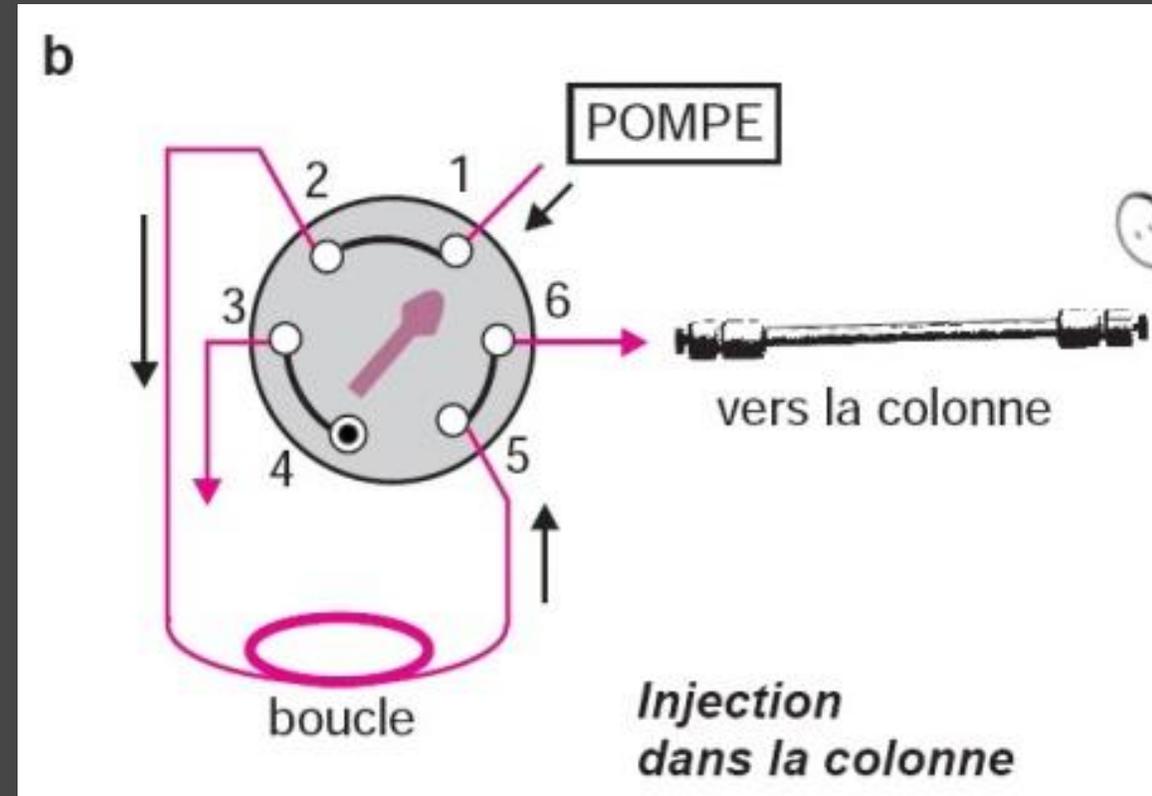
injection



L'échantillon est introduit avec une seringue à la pression atmosphérique dans la boucle (position remplissage ou load (a))

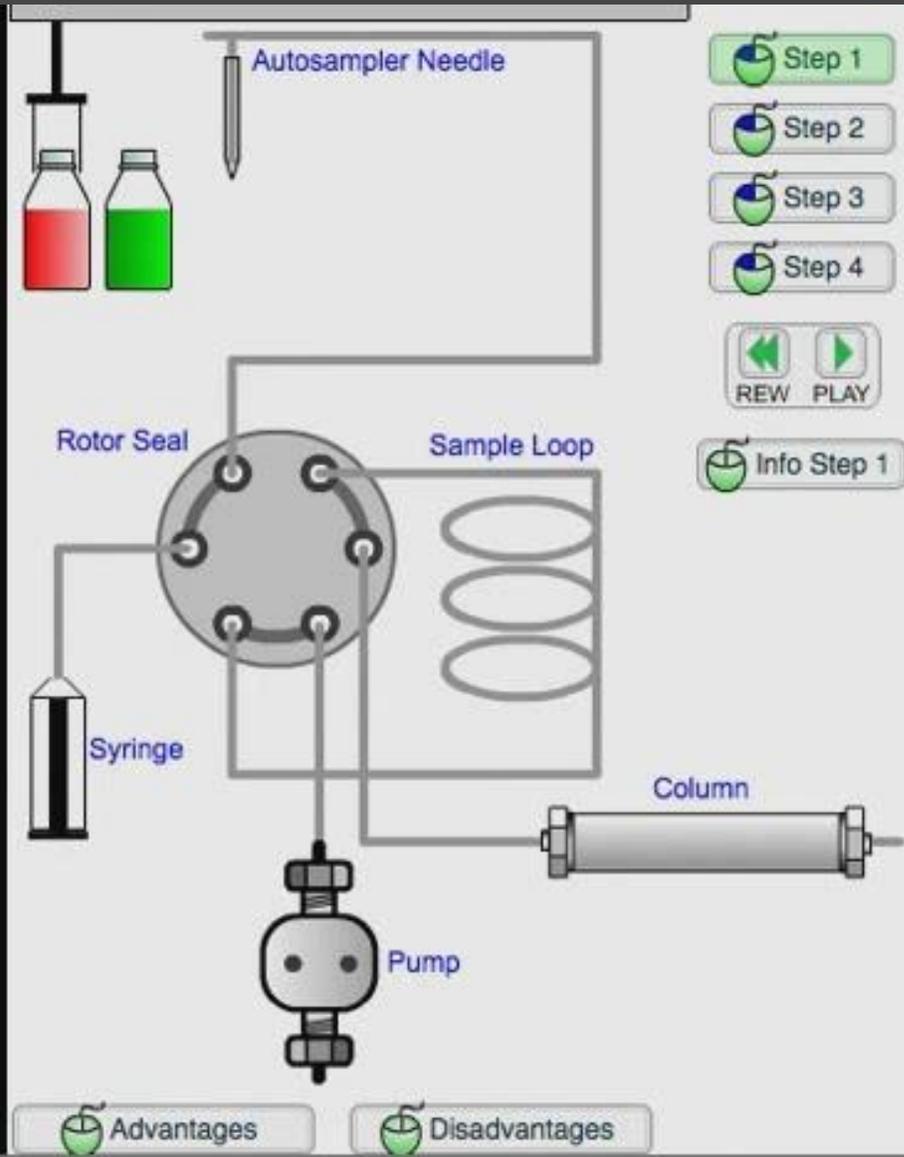


L'échantillon est mis en communication par rotation de la vanne avec la phase mobile et la colonne (position inject (b))



a) Remplissage de la boucle. Dans cette étape, la seringue est introduite à la position 4

b) injection dans la colonne



La pompe

**La pompe force la phase mobile à traverser la colonne.
Elle assure un débit stable et réglable.
Les pompes appelé binaire, ternaire ou quaternaire selon le
mode des solvants qu'elle peut mélangé.**



La pompe

Le mode isocratique



La composition de la phase mobile est fixe.

Le mode gradient



varier la composition du solvant au cours d'analyse

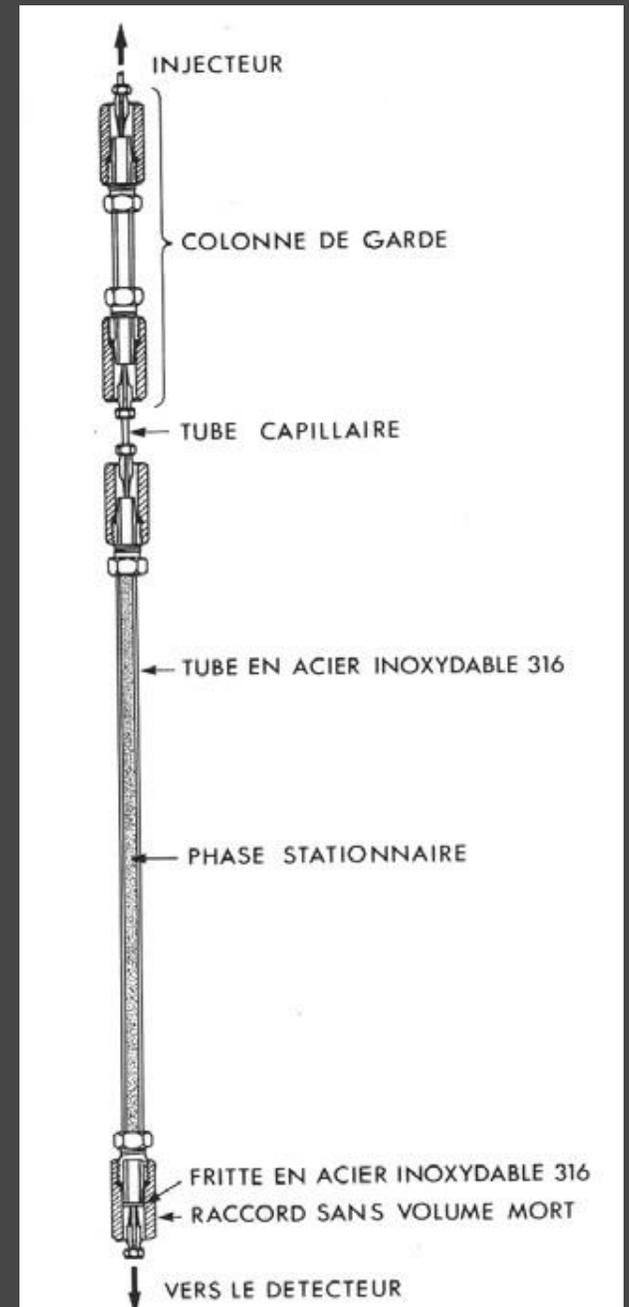


améliorer les séparations et minimiser les temps d'analyse

La colonne

remplie de phase stationnaire de granulométrie de 5 à 10 μm .

la colonne est précédé par une précolonne dite colonne de garde remplie par la même phase stationnaire pour retenir les impureté et augmente la durée de vie de la colonne



La phase stationnaire



Phase normale

Gel de silice

Très polaire donc la phase mobile est apolaire



Phase inverse

Gel de silice greffé

**Une polarité faible
Modification en ajoutant
d'une chaîne poly-C (8 à 18)
La Phase mobile est polaire**

La phase mobile

Se sont des solvants dégazé et traité (grade HPLC)

Phase mobile est un mélange d'eau et un autre solvant: Méthanol ou Acétonitrile, le mélange change la polarité



HPLC normale

**Phase stationnaire polaire et
Phase Mobile apolaire**

HPLC phase inverse

**Phase Stationnaire apolaire et
Phase Mobile polaire**

HPLC normale

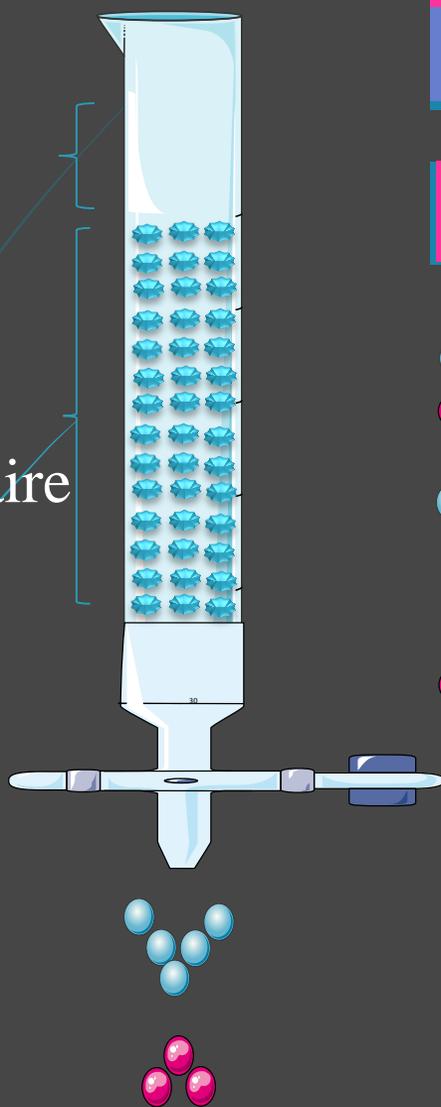
HPLC inverse

Phase normale polaire

Phase inverse apolaire

Mélange

Phase stationnaire



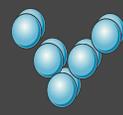
Phase mobile polaire



Phase stationnaire apolaire



Molécules de l'échantillon



Molécules polaires



Molécules apolaires

Hépane

Trichlorométhane

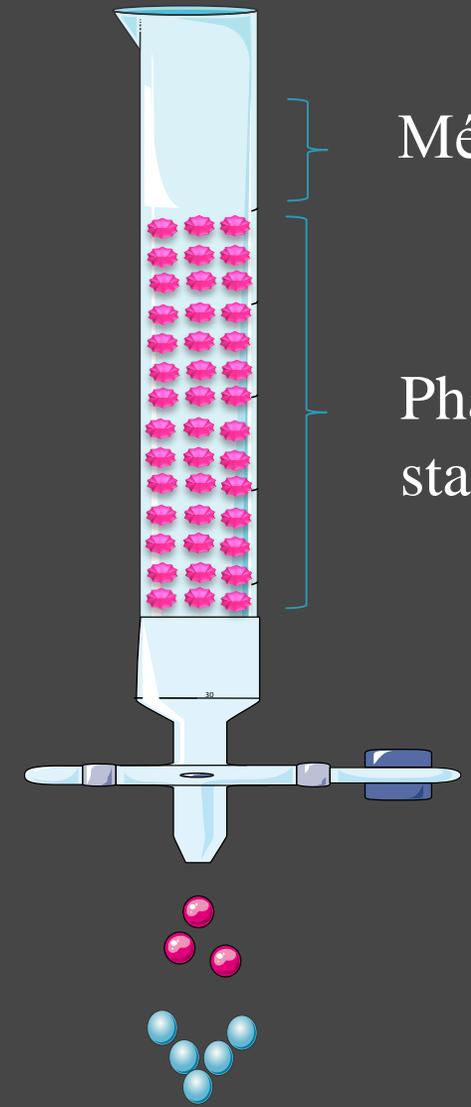
Éther

Trichlorométhane

hexane

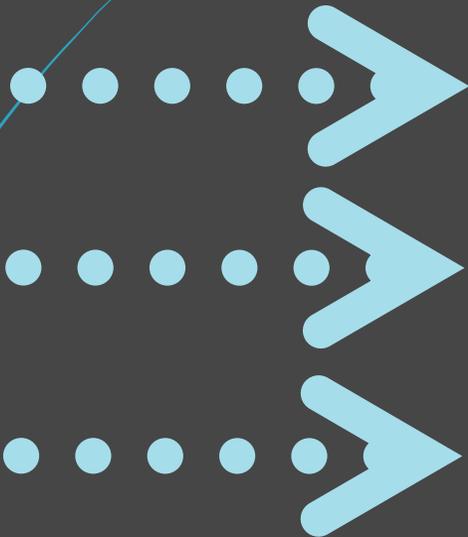
Mélange

Phase stationnaire



Le détecteur

Le détecteur a pour but de fournir un signal électrique suivant les variations de composition de l'éluant en sortie de colonne ce qui permet de détecter le passage des composés.



Spectrophotomètre UV-Visible.

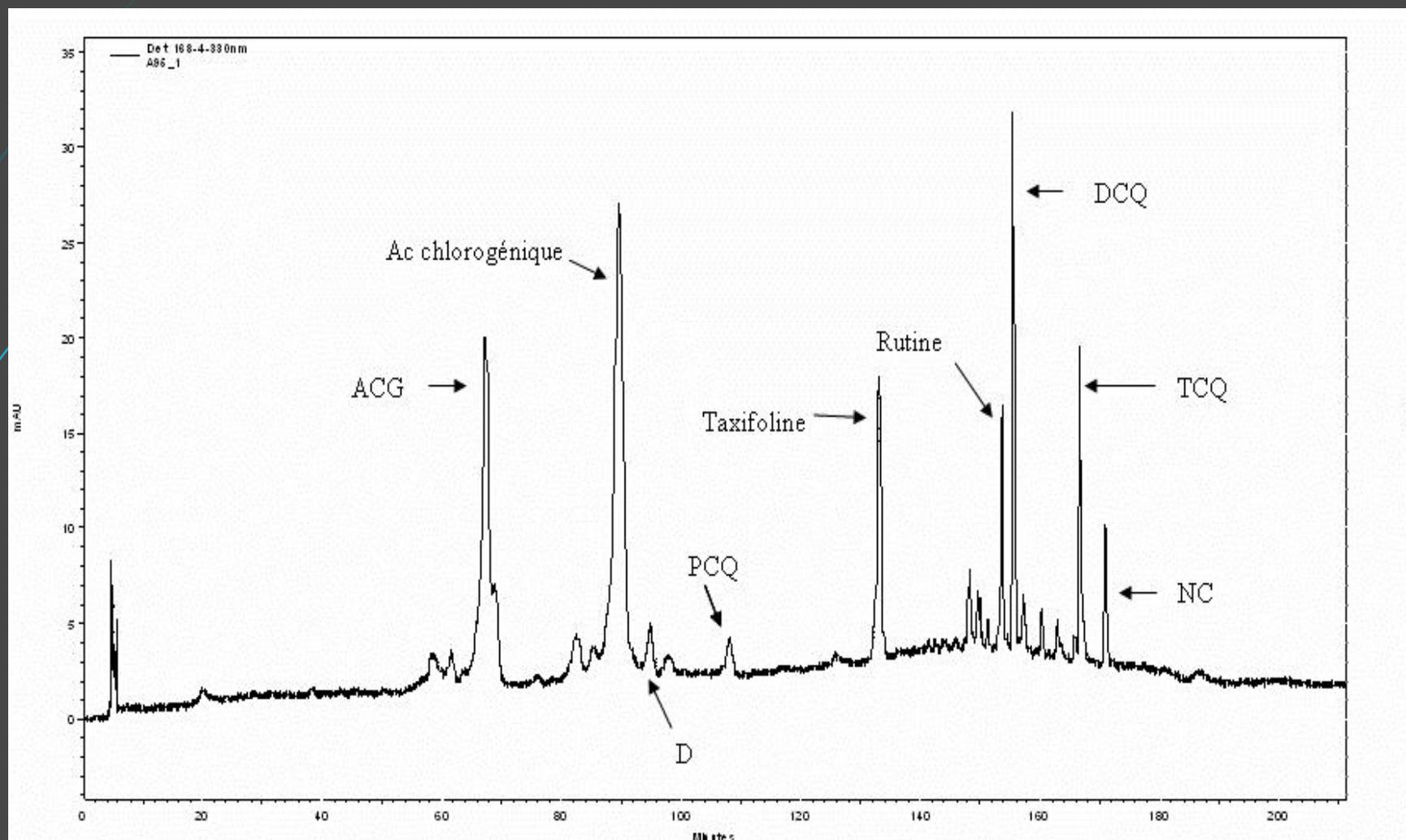
Détecteur à fluorescence.

Détecteur réfractométrique.

L'enregistreur

Il s'agit d'un ordinateur qui récupère toutes les données issues des détecteurs, trace les chromatogrammes et intègre la surface des pics. Il imprime un rapport d'analyse donnant les temps de rétentions et les surfaces de chaque pic. On peut le programmer pour qu'il fasse seul les divers calculs conduisant aux concentrations à partir de chromatogrammes étalon et des chromatogrammes des mélanges analysés.

L'enregistreur



L'enregistreur

Molécule témoin	Temps de rétention tr(min)
M1	tr1
M2	tr2
M3	tr3

