**TP Chromatographie Liquide**

La pomme

Ce TP a pour objectif de déterminer la teneur des différents sucres contenus dans la pomme. Pour cela, nous allons réaliser un dosage chromatographique (HPLC), les résultats seront obtenus sur un chromatogramme.

1. **Principe de l’analyse HPLC**

Cette analyse permet de séparer et d’identifier les solutés contenus dans le mélange. Celui-ci est injecté dans la colonne en fine quantité, il est entrainé par la phase mobile de long de la colonne à une vitesse propre. Lors de cette traversé, les solutés sont inégalement retenus par la phase stationnaire. Ils sont élués par la suite, donc séparés. A la sortie, ils sont dirigés vers un détecteur qui émet un signal, celui est transmit à un enregistreur sous forme de chromatogramme. En effet, on pourra lire le temps de rétention et l’aire du pic associé aux différents solutés du mélange. L’HPLC réalisée est de type chromatographie à échange d’ions.

1. **Quelles sont les interactions mises en jeu entre la phase stationnaire et les solutés ?**

Les sucres ont plus ou moins d’affinité avec la phase stationnaire, ainsi ils sortiront à des temps différents. Lors de cette analyse, les ions Pb2+ vont se fixer sur le groupement OH- libre, et la partie cationique de ces glucides se fixe sur la colonne. Ainsi, le saccharose n’étant pas un sucre réducteur (car OH utilisé pour liaison osidique), il sortira en premier. Le galactose est un épimère en C4 du glucose, donc il a plus d’affinité pour la phase stationnaire que celui-ci. Le fructose, de forme furane sortira en dernier, car celle-ci a plus d’affinité pour la phase stationnaire que la forme pyrane. Pour l’élution on utilise de l’eau, car l’ion H+ a plus d’affinité et ainsi décroche les glucides par ordre d’affinité.

1. **Quelles sont, dans la pomme, les teneurs théoriques des différents glucides solubles ?**

Les différentes teneurs sont :

Fructose = 6%

Glucose = 2%

Saccharose = 4%

1. **Teneurs des glucides solubles dans la pomme étudiée**

On calcule en premier, le Rfi pour chaque sucre pur, c'est-à-dire à partir de la gamme étalon. Sachant que l’étalon interne est le galactose.

C Sucre Aire Etalon interne

X

Rfi =

C Etalon interne Aire Sucre

D’où Rfi Saccharose = 0,688 ; Rfi Glucose = 0,690 ; Rfi Galactose = 1 ; Rfi Fructose = 0,96

A l’aide des Rfi calculé ci-dessus, on détermine la concentration des différents sucres dans nos 2 pommes étudiées.

Pomme Granny :

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Glucides | Surface des pics | Concentration (g/100mL) |
| Saccharose | 8,08943E5 | 2,6300 |
| Glucose | 5,67639E5 | 1,8509 |
| Fructose | 1,36379E6 | 6,1868 |
| Galactose (étalon interne) | 8,72707E5 | 4,1240 |

Pomme Royal :

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Glucides | Surface des pics | Concentration (g/100mL) |
| Saccharose | 1,86353E6 | 6,0586 |
| Glucose | 2,86936E5 | 0,9356 |
| Fructose | 1,58591E6 | 7,1945 |
| Galactose (étalon interne) | 8,23695E5 | 3,8924 |

On remarque que les concentrations calculées sont très porches de celles trouvées avec le chromatogramme. En effet, notre concentration en galactose est précise, puisque elle est de 0,389g/L pour la pomme Royal et de 0,412g/L pour la pomme Granny, soit une erreur de 0,1 g/L. On remarque que le fructose a une plus forte teneur que les autres sucres quelque soit la pomme.

Calculons les pourcentages d’erreurs des résultats expérimentaux par rapport aux valeurs références données (question 3)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Glucides | % erreur Pomme Granny | % erreur Pomme Royal |
| Saccharose | 34,3 | 51,5 |
| Glucose | 7,5 | 53,2 |
| Fructose | 3,1 | 19,9 |

Les pourcentages d ‘erreurs sont élevés car les teneurs en glucides solubles varient en fonction des pommes (variétés). Ainsi les valeurs théoriques ne sont pas fiables.

Ensuite, il y a les erreurs de manipulations à prendre en compte, comme l’étape où il fallait peser exactement 2g de pomme, ou un poids précis de saccharose à ajouter. Puisque d’une balance à une autre, la masse affichée n’était pas la même, ainsi nos résultats perdent en précision.

**Conclusion**

L’HPLC est très utilisée comme méthode d’analyse quantitative et qualitative, pour des contrôles de qualité, des analyses biologiques et bien d’autres… La méthode de l’étalon interne présente l’avantage de s’affranchir des erreurs au niveau du volume injecté dans la colonne qui parfois varie d’une injection à une autre. De plus il peut arriver que deux composés différents aient le même temps de rétention, par contre il faut s’assurer qu’un pic correspond à un composé.