FORCIONE Sylvain Groupe 1  
SELIG Matthieu Promotion 45

**HPLC**

**Principe de la méthode**

La chromatographie liquide haute performance est une analyse qui permet de déterminer la teneur en différents sucres dans un aliment (ici les glucides solubles glucose, fructose et saccharose).   
Le principe se base sur la migration hétérogène des composants du mélange préparé, due au déplacement de la phase mobile sur le milieu stationnaire. Dans cette expérience, une plus grande séparation sera observée par l'utilisation de granulométries faibles. A la sortie, l'enregistreur transmettra à l'ordinateur les données suivantes : temps de rétention, aire et concentration des solutés du mélange. Des hautes pressions (d'où HPLC) seront utilisées pour compenser les fortes pertes de charge.

Pour se faire, il est nécessaire d'utiliser une gamme étalon préalablement préparée (0,4% de Saccharose, 0,4% de Galacose, 0,3% de Glucose et 0,8% de Fructose). Dans un second temps, il faut prélever un échantillon environ précisément de 2g de notre pomme (GALA) auquel on ajoute de l'eau osmosée. Nous utiliserons le Galactose en tant qu'étalon interne, d'où l'addition de 0,4%. Broyer le tout à l'ultraturax une douzaine de secondes (à laver à l'eau après utilisation, pour ne pas "contaminer" les autres échantillons avec des parties de notre pomme). Après cela, la centrifugation est effectuée par le professeur durant un quart d'heure, il sera ensuite de notre devoir de filtrer sur filtre Millipore 0,45µm la phase supérieure obtenue dont le substrat sera l'objet d'étude puisqu'il contient les glucides dont on doit déterminer les concentrations.

Pour procéder à l'analyse chromatographique, rincer boucle et seringue d'injection avec de l'eau osmosée, avant de faire de même avec l'échantillon (prendre garde aux éventuelles bulles d'air qui pourraient faire rater la manipulation et abîmer la pompe). On injecte l'échantillon en position load (à mettre avant d'injecter). On règle une température de 80°C pour que les conditions soient optimales. La réfractométrie est la technique utilisée pour la détection (fonction de la déviation des rayons lumineux des différents glucides). Un pic sera formé sur l'ordinateur, preuve de l'envoi d'un signal électrique montrant la variation des indices de réfraction. La surface des pics obtenus sera proportionnelle aux concentrations glucidiques.

Il est à savoir que le saccharose sortira en premier du fait qu'il n'est pas réducteur, le glucose en second à cause de sa forme pyrane et le fructose en dernier à cause de sa forme furane (a plus d'affinité avec la phase stationnaire à cause de ses liaisons –OH tournées vers le haut). Comme dit précédemment, le galactose lui constitue l'étalon interne.

**Pertinence de la méthode**

La méthode est fiable, et a parfaitement fonctionné pour nous puisque tous nos éléments sont sortis, dans l'ordre et à des temps de rétention proches (+/- 0,2 minute) de l'analyse étalon. Il nous a alors été possible d'observer la proportion des différents sucres dans notre pomme GALA, de faire l'observation des concentrations et des calculs de Rfi, qui doit être entre 0,8 et 1, le plus haut pour nous étant celui pour le Fructose (0,98).  
  
**Rfi = (c° sucre x aire étalon interne)   
 (c° étalon interne x aire sucre)**

Nous avons ainsi :

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | **Saccharose** | **Fructose** | **Glucose** |
| **Concentration (g/L)** | 2,393 | 6,349 | 1,476 |
| **Rfi** | 0,82 | 0,98 | 0,82 |

Les composés ont donc été séparés convenablement ce qui démontre que la méthode est sûre. C'est une technique facile à utiliser à condition de procéder rigoureusement aux étapes et de respecter soigneusement le matériel, notamment pour la chromatographie puisque ce dernier appareil coûte extrêmement cher. (plus de 50 000€). L'HPLC est souvent employée dans les laboratoires d'analyses du fait de sa grande précision et sa vitesse de séparation. Il est aussi possible de la coupler avec un spectromètre de masse. Elle peut être réalisée sur 4 supports différents pour la phase stationnaire (chromatographies d'échange d'ions, d'exclusion, de partage et d'adsorption).

**Bibliographie :**[*https://fr.vwr.com/app/Home*](https://fr.vwr.com/app/Home)[*http://www.lachimie.fr/analytique/chromatographie/HPLC/HPLC.php*](http://www.lachimie.fr/analytique/chromatographie/HPLC/HPLC.php)