

# CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A HAUTE PRESSION HPLC

## I BUT DU TRAVAIL PRATIQUE

Identification et dosage par HPLC des principaux composants d'un coca cola zéro : la caféine et les édulcorants.

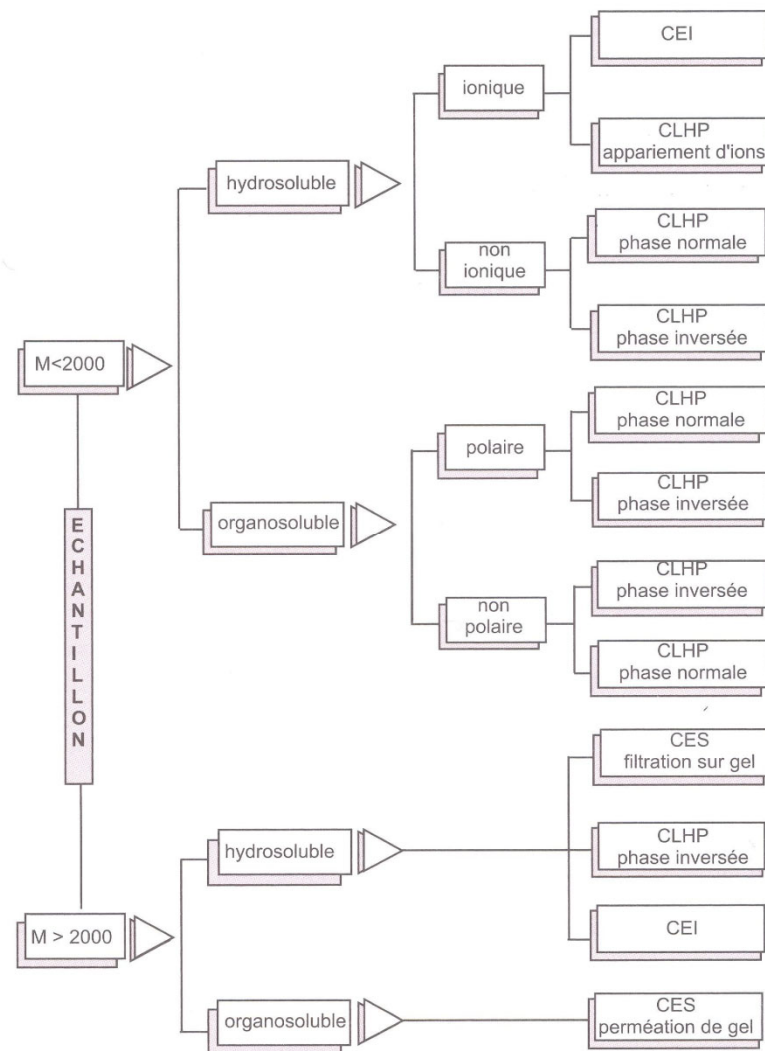
- Trouver les conditions optimales pour la séparation des constituants d'intérêt.
- Identifier les constituants par comparaison des temps de rétention de ces substances avec des standards.
- Analyse quantitative de la caféine et des édulcorants avec la méthode des ajouts dosés.
- Comparaison des résultats obtenus avec deux colonnes chromatographiques aux caractéristiques physiques différentes.

## II INTRODUCTION

### II.1 Généralités

La chromatographie en phase liquide est basée sur les mêmes principes que la chromatographie sur colonne et met en œuvre, selon la nature de la phase stationnaire, des phénomènes de partage, d'adsorption, d'échange d'ions ou d'exclusion. Le terme HPLC, High Pressure Liquid Chromatography, est réservé à la chromatographie en phase liquide basée sur des phénomènes d'adsorption et de partage. Elle est appliquée à la séparation de substances dont la masse molaire est inférieure à 2000 g/mol.

Le choix de la nature de la phase stationnaire se base sur la nature des substances à séparer et le choix de nature de la phase mobile (éluant) est lié à la nature de la phase stationnaire sélectionnée pour séparer le mélange à disposition :

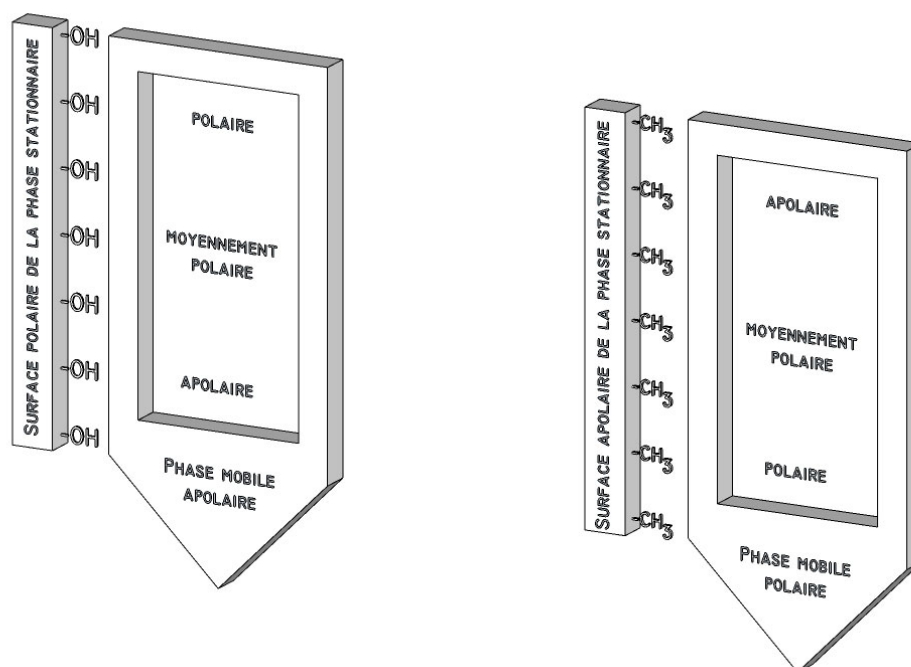


CEI : chromatographie d'échange d'ion (IC), CLHP : Chromatographie Liquide à Haute Pression (HPLC), CES : Chromatographie d'exclusion Stérique (SEC)

**Figure 1 : Organigramme de sélection d'une méthode de séparation en phase liquide**

La chromatographie HPLC est basée sur une interaction à 3 corps :

- la phase stationnaire.
- la phase mobile.
- le(s) soluté(s).



**Figure 2 : Interaction phase mobile / phase stationnaire / solutés**

La chromatographie la plus usuelle se base sur une phase stationnaire issue de silice modifiée par des groupes polaires ou apolaire. On distingue alors les phase stationnaires normales (polaires) et les phase stationnaires inverses (apolaires) :

- Une phase **stationnaire normale** nécessite l'utilisation d'une phase mobile peu polaire (e.g. mélange : hydrocarbures/THF, hydrocarbures/alcools...). Les composés les moins polaires vont être élués en premier.
- Une phase **stationnaire inverse** nécessite l'utilisation d'une phase mobile polaire (e.g. mélange : eau/méthanol, eau/acétonitrile, eau/tétrahydrofurane...). Les composés les plus polaires vont être élués en premier.
- Ci-dessous quelques exemples de phases stationnaires de silice greffée par des groupes à polarité variable :
  - Amine :  $-(CH_2)_3-NH_2$  (polarité forte)
  - Nitrile :  $-(CH_2)_n-CN$  (polarité moyenne)
  - Alkyle :  $-(CH_2)_7-CH_3$  (apolaire) "colonne C8"
  - Alkyle :  $-(CH_2)_{17}-CH_3$  (apolaire) "colonne C18"
  - Phényle :  $-(CH_2)_n-C_6H_5$  (apolaire)

## II.2 Schéma de principe d'un chromatographe HPLC

Dans tout appareil de chromatographie liquide à haute pression, on retrouvera toujours les éléments de base suivant :

- Un ou plusieurs réservoir(s) de phase mobile contenant des solvants purs ou des mélanges de solvants dans des proportions définies.
- Un système d'injection comportant une boucle d'injection calibrée.
- Une colonne remplie de particules de phase stationnaire mesurant quelque dizaines de centimètres de long.
- Un détecteur permettant à la fois, de mettre en évidence l'ordre d'élution des solutés sortant de la colonne (temps de rétention brut) et de donner un signal proportionnel à la quantité de chacun de ces solutés dans le mélange à séparer. Les principaux détecteurs utilisés sont les suivants : détecteur réfractométrique, détecteur UV-visible (classique ou à barrette de diodes), détecteur à conductivité ionique, détecteur électrochimique.

L'élution est réalisée dans la plupart des cas avec un mélange de solvants de composition constante : mode isocratique, ou dont la composition évolue au cours du temps : mode gradient.

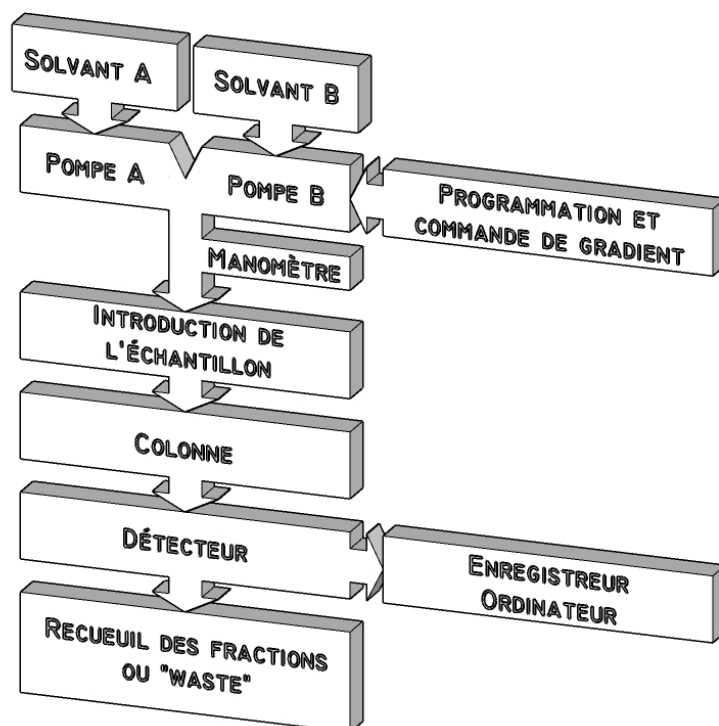


Figure 3 : Principe d'un chromatographe en phase liquide

## II.3 Schéma détaillé d'un chromatographe HPLC

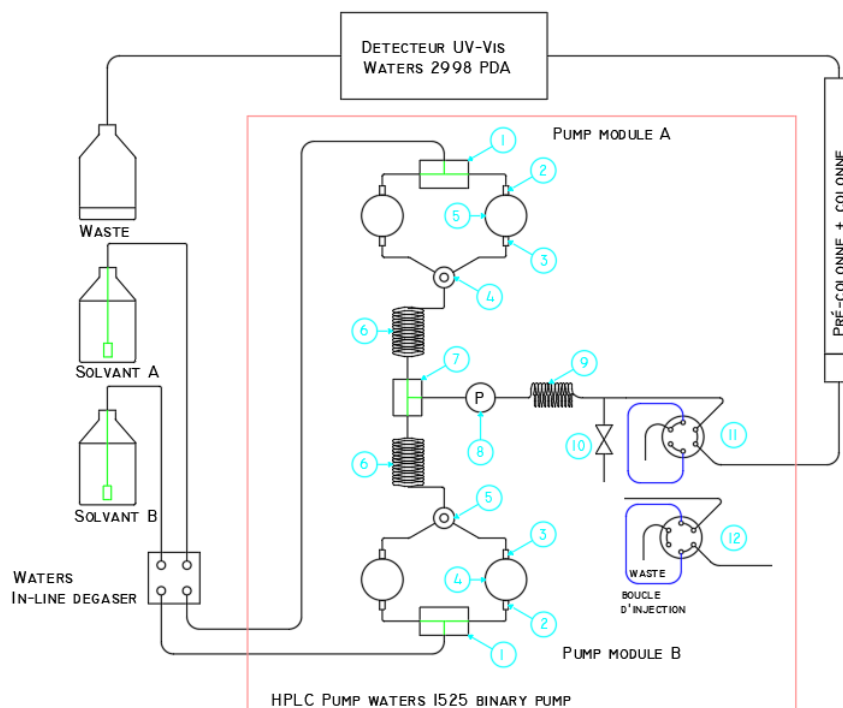


Figure 4 : Schéma synoptique d'un chromatographe HPLC Waters

1. **Inlet manifold** : pièce de raccordement entre les arrivées des solvants A et B et les clapets anti-retour d'entrées de chaque tête de pompe.
2. **Inlet check valve** : clapet anti-retour d'entrée.
3. **Outlet check valve** : clapet anti-retour de sortie.
4. **Pump head assembly** : ensemble de deux têtes de pompe.
5. **Draw-off valve** : soupape de prélèvement qui permet de fixer une seringue et d'aspirer le solvant à travers la conduite du réservoir afin d'amorcer la pompe ou de purger le circuit.
6. **Pulse dampeners** : pièce qui amortit les fluctuations de pression.
7. **Tee** : pièce qui met en commun les deux lignes de solvants A et B.
8. **Pressure transducer** : mesure de la pression dans le système.
9. **Gradient mixer** : pièce qui combine les deux solvants A et B et les aide à s'homogénéiser.
10. **Reference valve waste line** : lorsque cette vanne est ouverte, le débit est dirigé vers les déchets. Lorsqu'elle est fermée le débit est dirigé vers la colonne.
11. **Manual injector** : en position **LOAD** on remplit la boucle d'injection (10-100  $\mu$ L) avec l'échantillon à analyser tout en laissant passer l'éluant dans la colonne.
12. **Manual injector** : en position **INJECT** la boucle d'injection se vide dans la colonne. Après quelques secondes elle sera remise en position **LOAD** pour une prochaine injection.

### III ETUDE DETAILLEE DES ELEMENTS DE L'HPLC

#### III.1 La colonne

Dans le cadre des travaux pratiques, la colonne est confinée dans une enceinte thermostatée à 40°C. Les caractéristiques de cette colonne sont données ci-après. Elle est munie d'une pré-colonne afin de la préserver d'une éventuelle contamination.

Colonne Waters, SYMMETRY RP-C18, 4,6 mm x 75 mm, particules de 3,5 µm de diamètre.

#### III.2 La phase mobile ou éluant

La colonne à disposition contient une phase stationnaire apolaire et on choisira en conséquence une phase mobile polaire ou moyennement polaire.

Dans notre cas, la phase mobile sera constituée d'un solvant polaire : une solution tampon (tampon phosphate 0.0125 M et avec un pH=3,5) et d'un solvant moins polaire : de l'éthanol (EtOH), dans des proportions variables (voir partie pratique).

Pour la préparation de ce tampon on utilisera un mélange d'acide phosphorique ( $\text{H}_3\text{PO}_4$  : 85% pKa = 2.15, 7.20, 12.32) et de dihydrogénophosphate de potassium ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  : pKa = 7.20, 12.3). Il faudra prévoir de préparer 2 L de solution tampon en utilisant l'équation de Henderson-Hasselblach pour déterminer les masses d'acide et base conjuguée à utiliser.

Le pH (3.5) sera vérifié et ajusté si besoin avant utilisation.

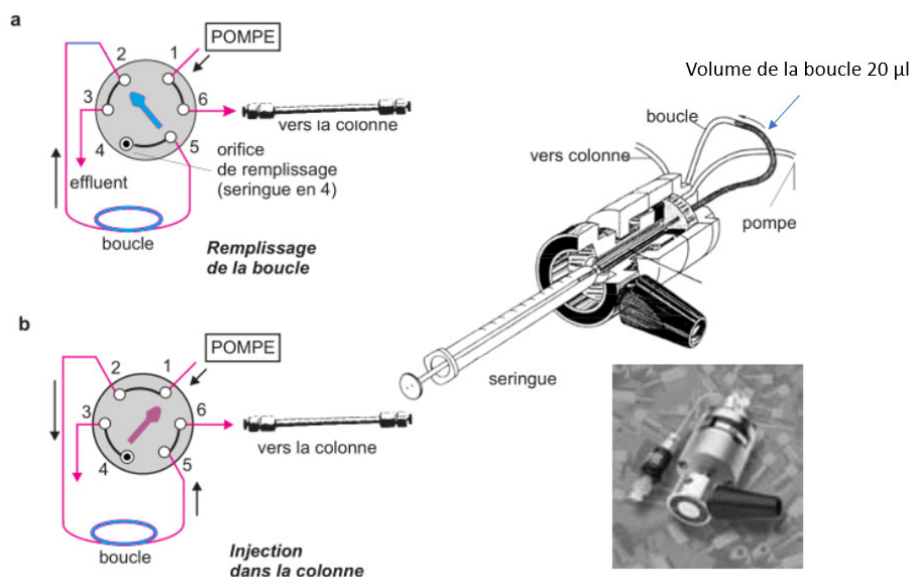
#### III.3 Les pompes

Les pompes utilisées en HPLC permettent de délivrer les solvants à débit constant sous de fortes pressions (jusqu'à 6000 psi). Le débit correspondant au solvant A+B sera de 0.8 mL/min

Attention : les pressions doivent être inférieures à 3200 psi (~220 bar) pour les colonnes utilisées dans ce TP.

#### III.4 L'injecteur

Le type d'injecteur le plus couramment utilisé comporte une vanne à boucle d'injection remplie de l'échantillon à étudier. Cette boucle calibrée peut permettre d'introduire sans variation importante de pression dans le circuit (allant des pompes vers l'entrée de la colonne) l'échantillon en question. Dans notre cas, le volume d'injection est de 20 µL et reproductible.

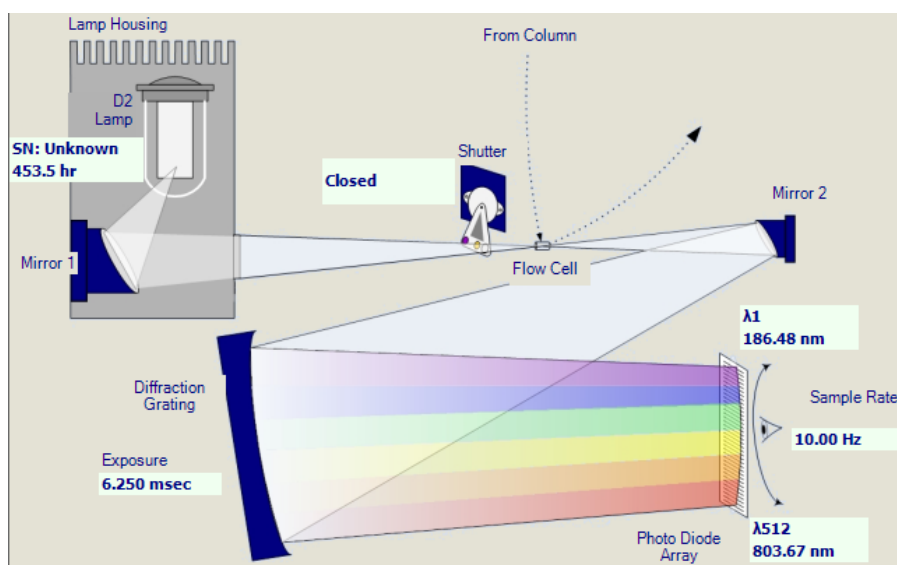


**Figure 5 : Schéma et principe d'une vanne d'injection Rhéodyne™**

### III.5 Le détecteur

Le type de détecteur qui équipe l'appareil utilisé en travaux pratiques est un détecteur à absorption UV-visible travaillant à longueur d'onde fixe mais réglable dans la gamme 190-800 nm avec une résolution de 1.2 nm. Il est constitué d'une cuve à circulation en quartz, d'une capacité d'environ 10 µL, traversée en continu par le faisceau UV-visible. Ce détecteur permet d'enregistrer deux chromatogrammes à deux longueurs d'onde différentes à la fois.

Dans notre cas, la longueur d'onde utilisée est de 220 nm @ 1,2 nm (résolution).



**Figure 4 : Schéma synoptique d'un détecteur UV-visible Waters 2998 photodiode array**

## IV Partie pratique

### IV.1 Généralités

Les composés décrits dans le tableau ci-dessous vont être identifiés et quantifiés dans le coca-cola zéro. Le logP de chaque composé nous permettra de déterminer l'ordre d'élution de ces derniers car le log(k') d'une substance est proportionnel à son logP.

Le logP, aussi appelé log Kow, est une mesure de la solubilité différentielle de composés chimiques dans deux solvants non miscibles entre eux et en contact. Il représente le logarithme décimal du coefficient de partage d'une substance entre les deux solvants en contact, l'octan-1-ol et l'eau. Le logP est égal au logarithme décimal du rapport des concentrations dans l'octan-1-ol et dans l'eau de la substance étudiée.

Composés	Fournisseur Pureté	Solubilité dans l'eau	<sup>1</sup> LogP	Remarques
<sup>1</sup> <b>Caféine</b> (E970) <chem>C8H10N2O4</chem> (194.19 g/mol) pKa = 9,9	Fluka > 99 %	21.7 g/L (25°C)	- 0,07 (légèrement hydrophile)	La caféine est très stable en milieu acide et basique.
<sup>2</sup> <b>Acesulfame-K</b> (Ace-K) (E950) <chem>C4H4KNO4S</chem> (201.24 g/mol) pKa = 3,02	Sigma-Aldrich > 99 %	270 g/l (20°C)	-1,33 (hydrophile)	L'acesulfame K est stable à la chaleur, en milieu acide ou basique modéré.
<sup>3</sup> <b>Aspartame</b> (E961) <chem>C14H18N2O5</chem> (294.64 g/mol)  pKa = 1,83 (fonction acide) pKa = 9,13 (fonction amine)	Aber 98 %	10 g/l (20°C) Peu soluble	+ 0,07 (légèrement lipophile)	L'aspartame se dégrade très rapidement en milieu basique, c'est la raison pour laquelle on travaille en milieu acide.

Deux de ces trois composés seront quantifiés par la méthode des ajouts dosés.

<sup>1</sup> 1,3,7-triméthyl-1H-purine-2,6(3H,7H)-dione

<sup>2</sup> 6-Méthyl-1,2,3-oxathiazin-4(3H)-one 2,2-dioxyde potassium salt

<sup>3</sup> (3S)-3-amino-4-[(1S)-1-benzyl-2-(méthoxy-2-oxoéthyl)amino]-4-oxobutanoïque



## IV.2 Analyse qualitative

### IV.2.1 Préparation des solutions

- Préparer 2 L de solution tampon phosphate 0.0125 M à pH=3.5.
- Préparer trois solutions mères en pesant 50 mg de caféine, 50 mg acésulfame et 50 mg d'aspartame dans trois fioles jaugées de 50 mL. Compléter au trait de jauge avec la solution de tampon phosphate.
- Chacune de ces solutions sera diluée 10 fois avec la solution tampon dans trois ballons jaugés de 20 mL contenant chacun 2 mL de coca zéro. Ces trois solutions seront appelées : T\_Caf, T\_Ace et T\_Asp.
- Préparer une solution en diluant 2 mL de coca zéro dégazé dans une fiole jaugée de 20 mL. Cette solution sera nommée T.

### IV.2.2 Détermination des paramètres HPLC

- Etudier l'influence de la polarité de l'éluant sur la séparation des trois composés à l'aide d'un éluant EtOH/tampon phosphate. Le débit de phase mobile (EtOH + tampon phosphate) est fixé à 0,8 mL/min. La colonne chromatographique est maintenue à 40°C.
- Réaliser une première injection de la solution T avec un éluant EtOH / tampon phosphate (10%/ 90%).

Réaliser d'autres injection de la solution T en augmentant la quantité d'EtOH dans l'éluant par sauts de 10%.

Entre chaque changement de composition, prenez le temps d'analyser le comportement de l'éluant utilisé afin de déterminer le pourcentage d'EtOH optimal pour notre séparation. Il faut équilibrer la colonne pendant 10 minutes au minimum après chaque changement de composition d'éluant.

A la suite de ces expériences préliminaires, déterminer la composition de l'éluant à utiliser pour réaliser la séparation dans des conditions optimales.

Que se passe-t-il si on augmente ou diminue la quantité d'EtOH dans l'éluant ?

- A l'aide des solutions T\_Caf, T\_Ace et T\_Asp, déterminer l'ordre d'élution des composants étudiés dans les conditions chromatographiques optimales.

## IV.3 Analyse quantitative

### IV.3.1 Préparation des solutions

- Préparer une solution mère en pesant environ exactement (relever la masse de chaque composant) 150 mg d'acésulfame-K et 90 mg de caféine dans une fiole jaugée de 100 mL. Compléter à la jauge avec le tampon phosphate pH 3.5.

- Dans des ballons jaugés de 20 mL, préparer comme suit :

Solution 1 : 1 mL coca cola zéro pur .

Solution 2 : 1 mL           "                   + 100 µL de solution mère.

Solution 3 : 1 mL           "                   + 200 µL           "

Solution 4 : 1 mL           "                   + 300 µL           "

Solution 5 : 1 mL           "                   + 400 µL           "

Solution 6 : 1 mL           "                   + 500 µL           "

Compléter au trait de jauge à l'aide du tampon phosphate.

#### **IV.2.2 Analyse des solutions d'ajouts dosés**

Prélever à l'aide d'une seringue environ 2 mL de la solution 1. Adapter un filtre en PES (25 mm, 0,2 µm), puis transférer le contenu de la seringue dans un tube à centrifuger de 2 mL. Noter le numéro de la solution sur le tube.

Réitérer l'opération pour les solutions 2 à 5.

En utilisant les paramètres d'élution précédemment déterminés, injecter successivement les solutions. Effectuer 3 injections par solution.

### **V COMPTE-RENDU**

#### **V.1 Analyse qualitative**

- Donner la composition de l'éluant retenu pour réaliser les analyses chromatographiques.

#### **V.2 Analyse quantitative**

- Déterminer la composition en caféine et en acésulfame K de l'échantillon de coke zéro par régression linéaire en utilisant les aires moyennes obtenues à partir des 3 injections réalisées. Ce résultat doit être exprimé en concentration mg/L.
- Donner l'équation de la droite de régression ainsi que les incertitudes sur la pente et l'ordonnée à l'origine.
- A partir de la droite de régression, estimer l'incertitude sur les concentrations des composants du coke zéro étudié. Calculer ensuite, l'incertitude sur la concentration de ces derniers en prenant en compte l'incertitude de préparation des solutions d'ajouts dosés.

## VI BIBLIOGRAPHIE

Sik, B. Development and Validation of a Green High Performance Liquid Chromatographic Method for the Determination of Some Artificial Sweeteners and Caffeine in Soft Drinks. *Food Anal. Methods* **2012**, 5 (6), 1443–1452. <https://doi.org/10.1007/s12161-012-9385-7>.