

**Formation : Théorie et Pratique de la Chromatographie en Phase Liquide (HPLC)**

**Référence : M98-TPLC**

**Durée : 3,5 jours** (du mardi 9h00 au vendredi 12h30)

**Formation indépendante de la marque de matériel utilisée**

**Pré-requis :**

- connaissances élémentaires de chimie (pression, débit, température, volume, concentration, dilution, pH, pKa, polarité, caractère hydrophile/hydrophobe, ...)
- au moins 3 mois de pratique régulière de la chromatographie en phase liquide

**Objectifs :**

- comprendre les principes de fonctionnement des modules constituant un système HPLC
- connaître les caractéristiques d'une colonne HPLC et le principe général de la séparation et comprendre le mode de rétention en phase normale ou inverse
- comprendre les spécificités et l'intérêt du gradient
- comprendre la démarche d'analyse quantitative
- connaître les grandeurs caractéristiques de la séparation issues de la théorie de l'HPLC
- connaître les précautions d'usage en HPLC
- savoir appréhender les problèmes les plus courants

**Théorie**

**Pratique**

**Instrumentation**

- constituants d'un système HPLC
- principe de fonctionnement, rôle et intérêt des dégazeurs, pompes, injecteurs, enceintes colonnes, détecteurs (UV 2D, UV 3D, Fluo, RI, DEDL)

**Colonnes**

- principe général de la séparation et notion de mode chromatographique
- principe de la séparation en phase normale ou phase inverse et intérêt du recul d'ionisation et de l'appariement d'ions

**Mode d'élution**

- isocratique (principe, avantages/inconvénients)
- gradient (principe, avantages/inconvénients)
- optimisation d'un profil de gradient

**Exploitation quantitative des données**

- principe de l'intégration
- principe de l'étalonnage externe / interne

**Qualité de la séparation chromatographique**

- grandeurs fondamentales  $k'$ ,  $\alpha$ , N, HEPT, R
- dispersion et diagramme de Van Deemter

**Précautions d'usage**

- préparation des échantillons et phases mobiles
- choix des tubulures et raccords
- installation et utilisation de la colonne
- démarrage et arrêt du système

**Problèmes courants et causes principales**

- problèmes de pression
- bruit de fond anormal ou dérive du signal
- apparition de pics parasites
- déformation des pics
- problèmes de TR et/ou de surfaces

**Travaux Pratiques n°1**

Injections successives d'un échantillon dans différentes conditions en mode phase inverse.

Analyse collégiale des résultats et mise en évidence :

- du rôle et de l'influence de la polarité de la phase mobile
- de la relation entre conditions d'analyse (colonne / phase mobile) et qualité de la séparation (grandeurs fondamentales)
- de l'effet du débit sur les TR, les surfaces et les grandeurs fondamentales
- de la notion de sélectivité liée à la colonne

**Travaux Dirigés**

Exercices permettant de réviser certains points vus en cours concernant les chapitres Instrumentation / Colonnes / Modes d'élution / Qualité de la Séparation.

**Travaux Pratiques n°2**

Un échantillon est injecté sur un système HPLC fonctionnant normalement afin d'obtenir un chromatogramme « de référence ».

A l'insu des stagiaires, le formateur génère un problème et réinjecte l'échantillon.

Les stagiaires doivent alors déterminer le (ou les) symptôme(s) montrant la présence d'une anomalie, en déduire une liste de causes possibles et déterminer laquelle d'entre elles est à l'origine du problème.

La correction est réalisée collégalement.

Une dizaine de problèmes est ainsi successivement passée en revue.