

CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (HPLC)

C'est une technique de séparation analytique en fonction de l'hydrophobicité et préparative des molécules d'un composé ou d'un mélange de composés. Pour certains, HP signifie «haute pression». Cette forme de chromatographie est fréquemment utilisée en biochimie, ainsi qu'en chimie analytique. Le «P» du sigle, à l'origine signifiait Pression mais lorsque la méthode a été améliorée (réduction des particules et régulation de la phase stationnaire) le «P» a donc été attribué à Performance afin de marquer cette innovation. La fine granulométrie de la phase stationnaire permet une meilleure séparation des composants. Les pics obtenus sont plus étroits donc la résolution est améliorée (les pics sont bien séparés). La combinaison de la rapidité et de la résolution élevées conduit à l'appellation haute performance.

Le champ d'application de ce type de chromatographie recouvre une grande partie du domaine de la chromatographie en phase gazeuse auquel s'ajoute l'analyse:

- * Des composés thermosensibles.
- * Des composés très polaires.
- * Ainsi que des composés de masses molaires élevées.

1. Principe

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant). Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique.

La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique. Le mélange à analyser est injecté puis transporté au travers du système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire.

En sortie de colonne grâce à un détecteur approprié les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme.

2. Appareillage

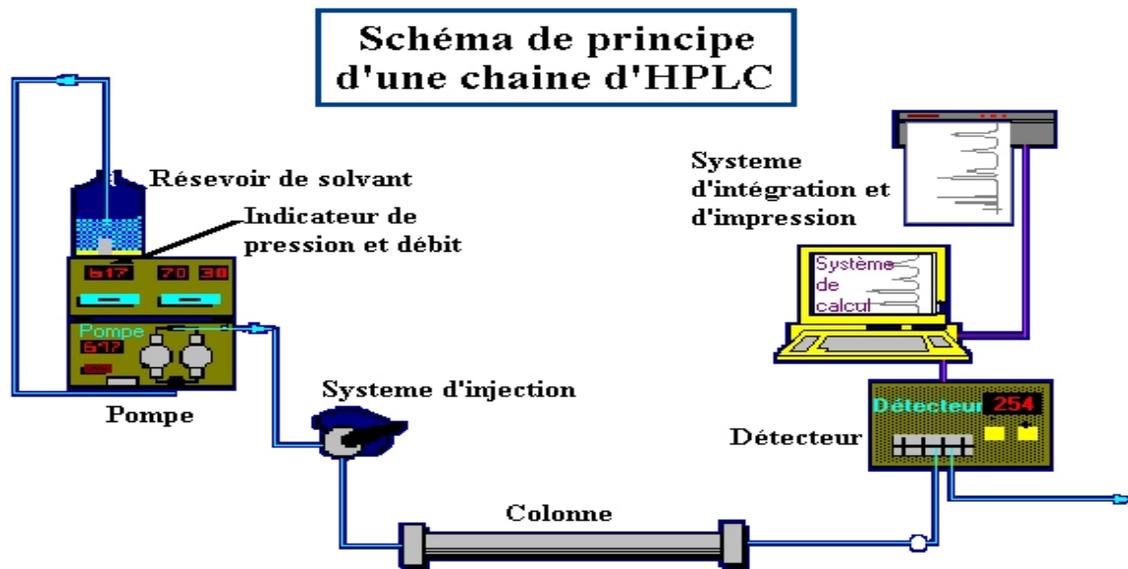


Figure 1. Appareillage de l'HPLC.

2.1. Réservoir de la phase mobile (solvant)

Le plus souvent ce réservoir est une bouteille en verre dans lequel plonge un tube avec une extrémité filtrante en téflon. S'il est nécessaire le dégazage peut se faire par agitation puis conservation du solvant sous atmosphère d'hélium.

2.2 La pompe

Elle est munie d'un système de gradient permettant d'effectuer une programmation de la nature du solvant. Elle permet de travailler:

- en mode isocratique, c'est-à-dire avec 100% d'un même éluant tout au long de l'analyse.
- en mode gradient, c'est-à-dire avec une variation de la concentration des constituants du mélange d'éluants.

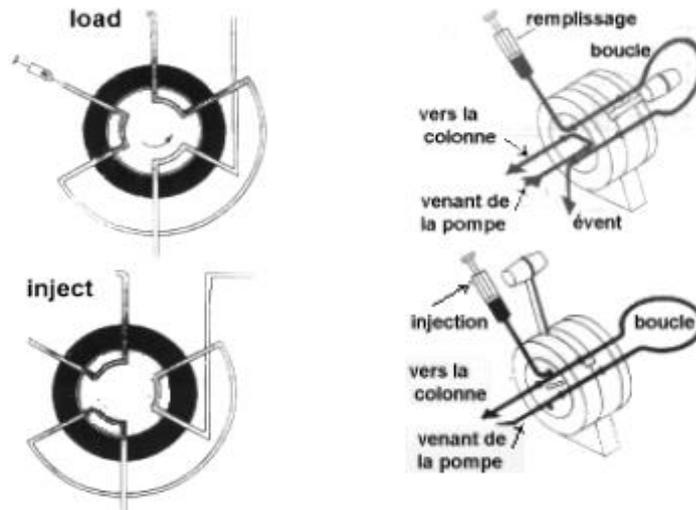
Les pompes actuelles ont un débit variable de quelques μL à plusieurs ml/min .

5.3 Vanne d'injection

Le type d'injecteur le plus couramment utilisé comporte une vanne à boucle d'échantillonnage d'une capacité fixe (10, 20, 50 μL ...). Cette boucle permet d'introduire l'échantillon sans modifier la pression dans la colonne.

Elle possède 2 positions. La première permet le remplissage de la boucle d'injection de volume fixe (load), la seconde permet la mise en circulation de l'échantillon dans le système chromatographique (inject).

Le remplissage de la boucle d'injection se fait à l'aide d'une seringue.



5.4 Colonne

Une colonne est un tube construit dans un matériau le plus possible inerte aux produits chimiques, souvent en inox ou en verre. Sa section est constante, de diamètre compris entre 4 et 20 mm pour des longueurs généralement de 15 à 30 cm. Au delà, les importantes pertes de charges exigeraient des pressions de liquide beaucoup trop élevées. La colonne est souvent précédée d'une précolonne, dite *colonne de garde*, courte (0,4 à 1 cm), remplie de la même phase stationnaire, ce qui sert à retenir certaines impuretés (**Figure 2**).

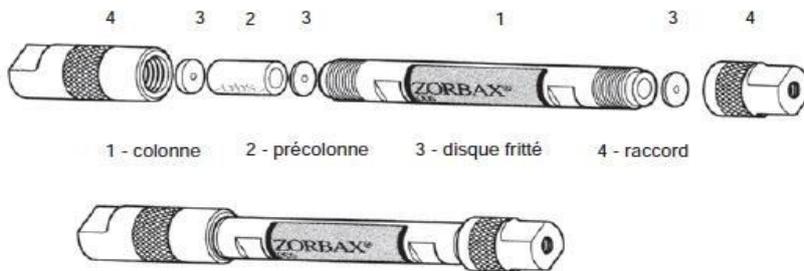


Figure 2. Colonne standard et précolonne de CLHP.

5.5 Phase stationnaire

5.5.1 Phase normale

La phase normale est constituée de gel de silice. Ce matériau est très polaire. Il faut donc utiliser un éluant apolaire. Ainsi lors de l'injection d'une solution, les produits polaires sont retenus dans la colonne, contrairement aux produits apolaire qui sortent en tête. L'inconvénient d'une telle phase, c'est une détérioration rapide au cours du temps du gel de silice, ce qui entraîne un manque de reproductibilité des séparations.

5.5.2 Phase inverse

La phase inverse est majoritairement composée de silice greffée par des chaînes linéaires de 8 ou 18 atomes de carbones (C8 et C18). Cette phase est apolaire et nécessite donc un éluant polaire (ACN, MeOH, H₂O). Dans ce cas, ce sont les composés polaires qui seront élués en premier. Contrairement à une phase normale, il n'y a pas d'évolution de la phase stationnaire au cours du temps, et la qualité de la séparation est donc maintenue constante.

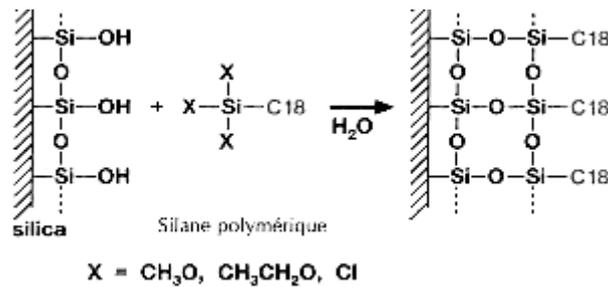


Figure 3. Gel de silice greffé

5.6 Phase mobile

L'interaction plus ou moins forte entre la phase mobile et la phase stationnaire normale ou à polarité inversée se répercute sur les temps de rétention des solutés. La polarité de la phase stationnaire permet de distinguer deux situations de principe :

- si la phase stationnaire est polaire, on utilisera une phase mobile peu polaire la chromatographie est dite en **phase normale**.
- si la phase stationnaire est très peu polaire, on choisira une phase mobile polaire (le plus souvent des mélanges de méthanol ou d'acétonitrile avec de l'eau), c'est la chromatographie en **phase inverse**.

En modifiant la polarité de la phase mobile, on agit sur les facteurs de rétention k des composés. Les silices greffées conduisent en général à une perte importante de polarité. Avec une phase greffée, l'ordre d'éluion est opposé à celui auquel on est habitué avec les phases normales. Ainsi avec un éluant polaire, un composé polaire migre plus vite qu'un composé apolaire. Dans ces conditions les hydrocarbures sont fortement retenus. On réalise des gradients d'éluion en diminuant au cours de la séparation la polarité de l'éluant (ex : mélange eau /acétonitrile dont la concentration en acétonitrile va en croissant au cours de l'éluion). On peut, en mélangeant plusieurs solvants, ajuster le pouvoir d'éluion de la phase mobile.

En plus du pouvoir d'élution le choix de la phase mobile dépend aussi d'un certain nombre de facteurs dont les plus importants sont la solubilité de l'échantillon, la compatibilité de la phase mobile avec le détecteur et la viscosité de la phase mobile. Aucun de ces paramètres n'est une variable indépendante et le meilleur solvant est donc celui qui donne une réponse optimale à toutes ces conditions.

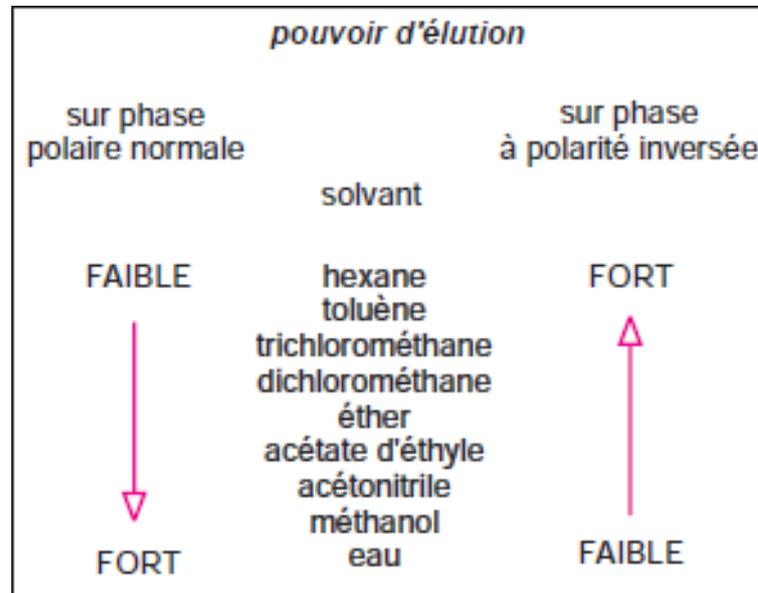


Figure 4. « Force d'élution » des solvants utilisés comme phases mobiles

5.7 Détecteurs

Il existe deux types de détections basés :

- Sur les propriétés générales (solvant + soluté) ; ex. : indice de réfraction, conductivité, constante diélectrique, etc.
- Sur les propriétés des solutés ; ex. : UV, polarographie, radioactivité, etc.

Principaux paramètres

Bruit : Qui se définit comme la variation du signal de sortie d'un détecteur non attribuable au passage du soluté dans la cellule.

- a) bruit à court terme : zigzags sur la ligne de base
- b) bruit à long terme : pics et vallées
- c) dérives : déviation constante de la ligne de base vers le haut et le bas de l'échelle.

Sensibilité:

- a) absolue : mesurée par un déplacement sur tout l'échelle de l'enregistreur lorsque la sensibilité du détecteur est maximale sans interférence de bruit de fond.

b) relative : concentration minimale de soluté détectable pour un signal au moins égal à deux fois la hauteur du bruit de fond. La sensibilité peut changer avec la nature du bruit de fond (type de détecteur), avec le débit (polarographie) et la température ambiante. En outre, le volume mort, l'élargissement des pics dans la cellule et les raccords peuvent augmenter la quantité minimale détectable.

Linéarité : Région où il y a une proportion linéaire entre le signal de sortie et la concentration du soluté.

5.7.1 Spectroscopie dans l'UV et le Vis

Mesure l'absorbance absolue d'un solvant + soluté ou la différence d'absorbance entre le solvant et le solvant + soluté (en présence d'une cellule de référence) à la longueur d'onde fixe de 254 ou 280 nm, ou à longueur d'onde variable entre 190 et 800 nm, ou à longueurs d'onde multiples lorsqu'on utilise une barrette de diodes . Les cuvettes doivent être construites de façon à empêcher la production de faisceaux parasites et à éviter la formation de bulles d'air. La Figure 5. illustre une de ces cuvettes.

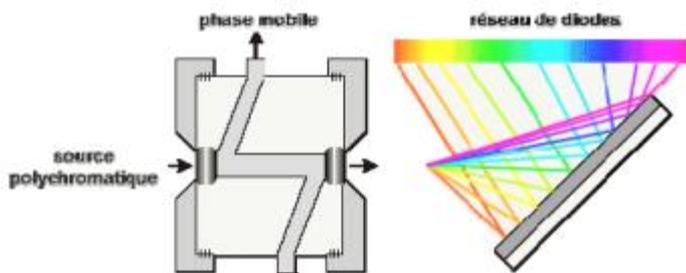


Figure 5.Schéma d'une cuvette de détecteur UV-Vis.

Les avantages du détecteur UV-Vis sont nombreux :

- Sensibilité : Détection de substances de concentrations de l'ordre de $5 \cdot 10^{-7}$ à $5 \cdot 10^{-8}$ M par l'utilisation de cuvettes de volume aussi petit que $5 \mu\text{l}$ pour une trajectoire optique de 1 cm.
- Sélectivité : Il est possible de choisir une ou des longueurs d'ondes qui permettront de voir apparaître le pic correspondant à certaines substances choisies plutôt que toutes. Les détecteurs pouvant mesurer l'absorbance à quatre longueurs d'onde simultanément ou ceux à barrettes de diodes permettent de s'assurer de l'homogénéité d'un pic et ainsi se rendre compte d'une possible coélution.
- Renseignements spectraux sur les substances par le spectre UV (réseau de diodes).
- Peu sensible aux variations de débit et de température.

- Utilisation et entretien facile.
- Peut être utilisé en mode gradient d'élution.

IL possède toutefois également quelques défauts

- Les substances doivent être chromophores.
- Les facteurs de réponse sont différents pour chaque composé.

5.7.2 Fluorimétrie

Mesure l'énergie de fluorescence d'un soluté excité par une radiation ultraviolette. L'émission de lumière est mesurée à angle droit du faisceau d'excitation. Ce procédé sert pour les composés fluorescents ou les dérivés fluorescents de certains composés.

Avantages :

- Encore plus sensible que le détecteur UV-Vis. - Très spécifique. - Peu sensible aux variations de débit et de température. - Peut être utilisé en mode gradient d'élution.

Inconvénients :

- Les substances doivent être fluorescentes. - Sensibilité à l'oxygène dissous dans la phase mobile .

Ainsi que différents types de couplage : Spectrométrie infrarouge, Spectrométrie de masse Résonance Magnétique Nucléaire....

Le détecteur suit en continu l'apparition des solutés. Pour détecter, on utilise différents phénomènes physico-chimiques. Le signal obtenu est enregistré en fonction du temps

