

CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (CLHP)

I- INTRODUCTION

La chromatographie en phase liquide sur colonnes est devenue un outil analytique performant utilisé dans des domaines variés. Ce développement est dû à la fois :

- à une meilleure compréhension des mécanismes d'interaction,
- aux grandes efficacités obtenues avec des phases stationnaires de plus en plus fines ,
- aux progrès importants effectués dans le domaine de l'appareillage, en particulier pour la détection.

La chromatographie en phase liquide couvre un vaste domaine d'applications que l'on peut scinder en quatre grands thèmes : *pétrochimie, environnement, pharmacie et fluides biologiques, produits alimentaires et agroalimentaires, séparations d'isomères optiques et l'analyse de polymères...*

La chromatographie est une méthode physique de séparation basée sur les *différences d'affinités* des substances à analyser à l'égard de deux phases, l'une *stationnaire ou fixe*, l'autre *mobile*. Selon la technique chromatographique mise en jeu, la séparation des composants entraînés par la phase mobile, résulte soit de leur *adsorption* et de leur *désorption* successives sur la *phase stationnaire*, soit de leur *solubilité différente* dans chaque phase.

On peut situer à 1958 le début de la chromatographie en phase liquide moderne avec l'introduction de l'analyse « automatique » des acides aminés (on parle alors de chromatographie « à grande vitesse », « *sous haute pression* », ou « *à haute résolution* », ou de préférence « *de haute performance* » [HPLC].

Pour un système chromatographique donné, on caractérise la distribution de chaque soluté entre les deux phases par le *coefficient de distribution (ou coefficient de partage) K* défini par la relation :

$$K = \frac{C_s}{C_m}$$

Cs et Cm désignant respectivement les concentrations du soluté dans la phase stationnaire et dans la phase mobile.

Une bonne séparation en chromatographie en phase liquide implique :

- que les divers constituants du mélange soient **retenus dans la colonne**, donc présentent une affinité pour la phase stationnaire suffisante pour qu'ils apparaissent dans l'effluent après un volume supérieur au volume de phase mobile contenu dans la colonne ;
- que les différents pics soient **bien séparés**, ce qui, pour deux pics consécutifs, implique que les bandes de solutés se séparent entre elles (**sélectivité**) plus vite qu'elles ne s'évalent (**efficacité**) ;
- que l'analyse soit aussi **rapide que possible**.

On peut distinguer deux objectifs principaux:

- **Objectif analytique** : Il s'agit d'identifier des solutés qualitativement et/ou quantitativement. Les concentrations dans ce cas sont très faibles. Les systèmes de détection devront donc être très sensibles.

- **Objectif préparatif** : Les concentrations des solutés sont ici importantes et on travaille hors des règles d'idéalité thermodynamiques. Les quantités produites demeurent cependant faibles (de l'ordre du kg / jour) et le procédé ne sera utilisé que pour préparer des substances rares, sensibles à la chaleur (protéines, etc...).

II. GRANDEURS FONDAMENTALES

Volume et temps de rétention : On appelle temps de rétention t_R le temps d'élution au sommet du pic, mesuré à partir de l'injection

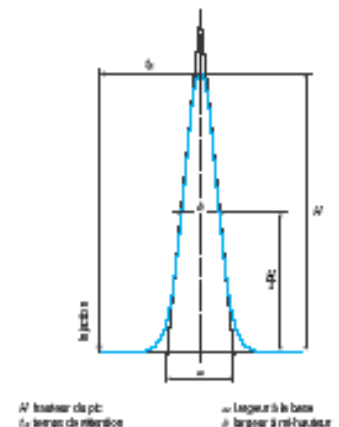
$$V_R = t_R \cdot D = t_R \cdot u \cdot s \cdot \epsilon$$

avec

« s » section droite de la colonne,

« u » vitesse linéaire de la phase mobile,

« ϵ » porosité de la colonne.



« V_R » représente, à l'étalement du pic près, le volume de phase mobile nécessaire pour éluer chaque composé. Le temps de rétention ou le volume de rétention sont des grandeurs caractéristiques de chaque composé, dans des conditions et pour une colonne données. Le volume de rétention V_R est relié directement au coefficient de distribution K par la relation : $V_R = V_m + K V_s$ avec V_s volume de la phase stationnaire et V_m : volume de phase mobile contenu dans la colonne.

Facteur de capacité k' , défini comme le rapport de la quantité de soluté dans la phase stationnaire à la quantité de soluté dans la phase mobile ; on a :

$$k' = \frac{C_s V_s}{C_m V_m} = K \frac{V_s}{V_m}$$

soit :

$$k' = \frac{V_R - V_m}{V_m} = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

t_0 : temps de rétention d'un composé non retenu (= au quotient de la longueur L de la colonne par la vitesse linéaire u de la phase mobile)

Sélectivité

Pour caractériser la distance séparant les sommets de deux pics consécutifs 1 et 2, on utilise la sélectivité α (ou rétention relative) définie par la relation :

$$\alpha = \frac{t_{R_2} - t_0}{t_{R_1} - t_0} = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{K_2}{K_1}$$

Efficacité d'une colonne

L'efficacité d'une colonne chromatographique, dont dépend l'étalement des pics, est mesurée, pour chaque composé, par le nombre de plateaux théoriques N de la colonne. En assimilant les pics d'élution à des courbes de Gauss, on établit que le nombre de plateaux théoriques d'une colonne qui s'exprime, pour un soluté donné, par les relations :

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{\sigma} \right)^2 = 5,54 \left(\frac{t_R}{\delta} \right)^2$$

Avec ω largeur du pic à la base, définie comme la distance entre les points d'intersection des tangentes d'inflexion avec la ligne de base, δ largeur du pic à mi-hauteur.

Pour pouvoir comparer entre elles des colonnes de différentes longueurs, on définit la hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT ou H) :

$$H = \frac{L}{N} \quad \text{avec } L \text{ longueur de la colonne.}$$

Résolution

La résolution R_s entre deux pics est définie par la relation :

$$R_s = 2 \frac{(t_{R_2} - t_{R_1})}{\omega_2 + \omega_1}$$

ω_2 et ω_1 étant les largeurs à la base, déterminées par l'intersection des tangentes aux points d'inflexion des pics avec la ligne de base.

Perte de charge et facteur de résistance à l'écoulement : Une autre caractéristique importante d'une colonne chromatographique est sa résistance à l'écoulement. La perte de charge d'une colonne est donnée par la loi de Darcy :

$$\Delta P = \frac{\Phi \eta L u}{(d_p)^2}$$

ΔP (Pa) perte de charge
 d_p (cm) diamètre moyen des particules,
 L (cm) longueur de la colonne,

u (cm s⁻¹) vitesse linéaire de la phase mobile,

η (Pa s) viscosité dynamique de la phase mobile,

ϕ (sans dimension) facteur de résistance à l'écoulement.

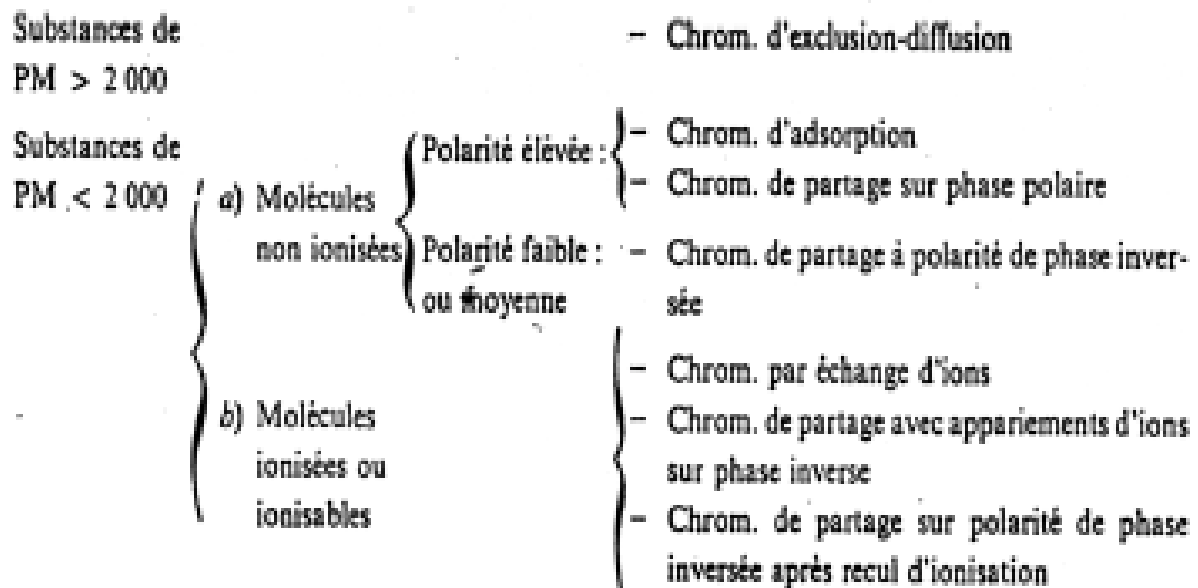
III- LES DIFFÉRENTS MODES DE CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE

On dispose d'un grand nombre de modes de chromatographie. Certains ont un champ d'application très large, d'autres au contraire correspondent à des applications très spécialisées.

On distinguera dans ce qui suit :

- 1 - chromatographie d'adsorption*
- 2 - chromatographie de partage (en phase directe ou inverse)*
- 3 - chromatographie d'échange d'ions (chromatographie ionique)*
- 4 - chromatographie de paires d'ions*
- 5 - chromatographie d'exclusion (séparation selon la taille)*
- 6 - chromatographie d'affinité*
- 7 - chromatographie adaptée à la séparation d'énantiomères*

Le choix de tel ou tel mode obéit à des règles logiques directement liées à la nature des composés à séparer :



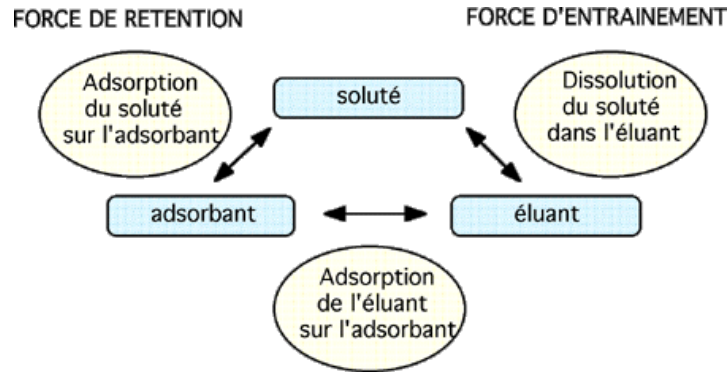
1- LA CHROMATOGRAPHIE D'ADSORPTION :

Ce mode de chromatographie met en jeu un mécanisme d'adsorption du soluté sur la phase stationnaire solide et un mécanisme d'élution (désorption) par la phase mobile liquide (éluant).

PRINCIPE :

- L'adsorption est la fixation plus ou moins énergétique d'un liquide ou d'un soluté sur une surface solide; elle met en jeu des liaisons à faible énergie (liaisons hydrogène, interactions électrostatiques...). Pour être utilisable à des fins séparatives, l'adsorption doit être réversible.
- L'élution ou désorption consiste à extraire le soluté adsorbé à l'aide d'un solvant appelé éluant.
- Les différents solutés sont plus ou moins adsorbés sur la phase stationnaire, et plus ou moins solubles dans la phase mobile; il en résulte une migration différentielle des solutés en fonction de la résultante entre les deux forces (de rétention et d'entraînement) et donc une séparation de ces solutés.

Le schéma ci-après résume les interactions entre le soluté, le solide adsorbant et l'éluant :



ADSORBANTS :

- Les adsorbants doivent être insolubles dans le solvant et chimiquement inertes vis-à-vis du solvant et des solutés.
- Leur granulométrie varie entre 5 et 100 μm et leur surface spécifique de 50 à 1000 m^2/g ,
- L'activité d'un adsorbant dépend de sa nature et de sa teneur en eau.
- La capacité d'adsorption peut être :

- faible (carbonate de calcium...)
- forte (silice, alumine, charbon ...)

- La polarité peut être

- faible (charbon...)
- forte (silice SiO_2 , utilisée sous forme hydratée : gel de silice, qui présente des fonctions "silanol" : Si-OH , alumine Al_2O_3 , $n \text{H}_2\text{O}$...)

SOLVANTS :

On utilise généralement des mélanges de solvants, de polarité voisine de celle des solutés à séparer (ceux-ci doivent être solubles dans l'éluant !). On classe les différents solvants selon leur "force éluante" qui traduit leur polarité:

Le choix du solvant doit obéir à certaines contraintes :

- miscibilité des composantes élémentaires

- **compatibilité avec le système de détection**

[illegible]

La chromatographie d'adsorption est utilisée pour séparer des molécules organiques de masse molaire 100 à 1000 g/mol et de polarité moyenne;

2- LA CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE :

- la chromatographie de partage est la technique de chromatographie liquide, la plus utilisée
- la technique fonctionne par partage de solutés entre deux phases non miscibles
- la silice perd ses propriétés adsorbantes par saturation des sites d'adsorption (support inerte)
- ce mécanisme est surtout utile pour la séparation de molécules très polaires de masses molaires inférieures à 3000 (composés non-ioniques)
- la phase stationnaire liquide est immobilisée par adsorption (possibilité de dissolution / perte dans la phase mobile) ou formation de liaisons covalentes.
- les solides (supports) ont de très grandes surfaces (e.g. gel de silice, billes de silice poreuses, cellulose)

Il y a 2 types de chromatographie de partage:

- Chromatographie de partage sur phase inversée

- Chromatographie de partage sur phase normale

	Phase stationnaire	Phase mobile	Exemples de phase stationnaire	Exemples de phase mobile
Phase inverse	Non polaire	polaire	silice greffée par une chaîne alkyle ou phényle	- eau - méthanol - acétonitrile - Tétrahydrofuranne
Phase normale	polaire	Non polaire	- C ₂ H ₄ CN - C ₃ H ₆ NH ₂ - C ₃ H ₆ N(CH ₃) ₂ - diol	- n-hexane - chloroforme - éther

Les supports sont inertes vis-à-vis des composés à séparer. Ils ne servent qu'à immobiliser, par adsorption ou formation de liaisons chimiques covalentes, la phase stationnaire liquide. Ce sont des solides très finement divisés qui présentent une très grande surface afin de retenir, sous un petit volume, une grande quantité de phase stationnaire.

LA PHASE STATIONNAIRE GREFFÉE

La chromatographie liquide-liquide a ses limites. Puisque la phase mobile solubilise faiblement la phase stationnaire, il faut la pré-saturer. De plus, les forces de friction dues aux colonnes étroites provoquent une perte de phase stationnaire par entraînement mécanique (important en CLHP). Pour surmonter ces inconvénients, on a développé l'usage de remplissages à phases stationnaires chimiquement liées (greffées). C'est ainsi, par exemple, que le groupement silanol des supports est « silanisé » puis on y fixe des groupements (R) de polarité variable. Les remplissages ayant ainsi des « silicones » (-SiO-R) chimiquement greffés sur leur surface, donnent à la colonne une efficacité et une stabilité excellentes.



X = Cl, CH₃O, C₂H₅O, etc.

L'éluant doit être immiscible à la phase stationnaire. On doit aussi tenir compte de la compatibilité des solvants avec les détecteurs utilisés. La polarité de la phase mobile a une grande influence sur le coefficient de partage des solutés.

Rappel : *Polarité des solvants*: hydrocarbures < éthers < esters < cétones < aldéhydes < amides < amines < alcools < H₂O

Selon la nature des radicaux R, on distinguera :

- les phases greffées polaires (-diol, -cyanopropyl, aminopropyl,...)
- les phases greffées apolaires (-alkyl, -phényl, ...)

Les premières sont utilisées avec des solvants peu polaires et permettent de réaliser de la chromatographie en **phase normale** ou **directe**.

Les secondes s'emploient avec des solvants polaires et l'on a alors de la chromatographie en *phase inverse* ou *reverse*.

En première approximation, l'ordre d'élution des composés est inversé entre les deux modes, les composés polaires étant élués en premier dans les systèmes en phase reverse.

a- CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE SUR PHASE INVERSÉE

Environ 80% des séparations chromatographiques en phases liquides sont effectuées par partage sur des phases inversées. La phase inverse est majoritairement composée de silices greffées 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.

Exemple : phase stationnaire: octadécylsilane ODS (C18)

Influence de la longueur de la chaîne sur la séparation en phase inverse

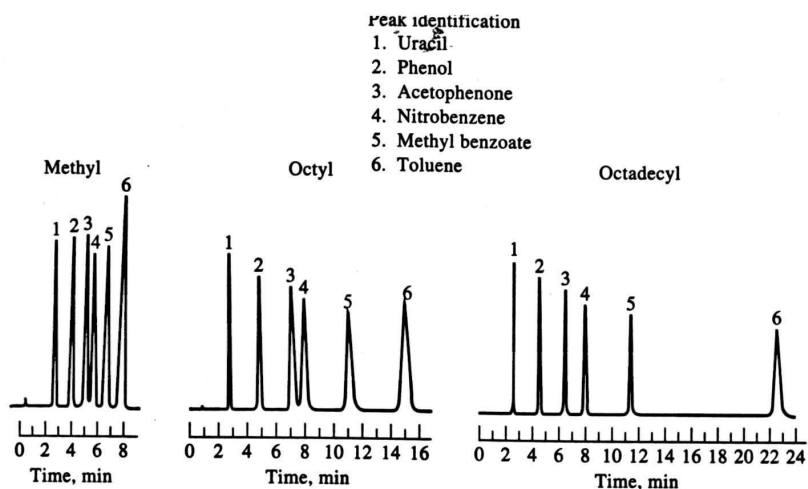


Figure 28-15 Effect of chain length on performance of reversed-phase siloxane columns packed with 5-μm particles. Mobile phase: 50/50 methanol/water. Flow rate: 1.0 mL/min.

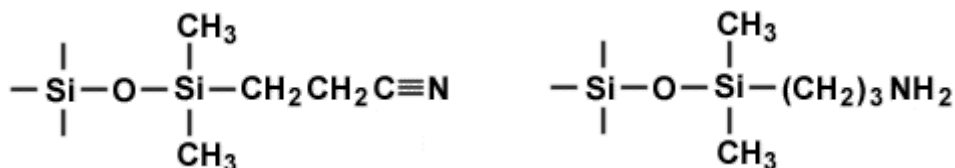
b- CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE SUR PHASE NORMALE

- Comme pour les silices apolaires, le motif polaire est greffé sur la silice au moyen d'une réaction de silanisation.
- L'échange est basé sur des interactions type dipôle-dipôle, liaisons hydrogène, etc.
- Les molécules polaires interagissent avec le support dans un solvant apolaire, De même, plus qu'un composé présente un fort caractère polaire, plus il sera retenu.

Les principales phases greffées polaires sont les suivantes :

- aminopropyle : $-(CH_2)_3 - NH_2$
- paranitrobenzyle (nitro) : $-CH_2-\Phi-NO_2$
- glycéropropyle (diol) : $-(CH_2)_3 - O - CH_2 - CH(OH) - CH_2-OH$
- alkylnitrile : $-(CH_2)_n - CN$

Les phases aminopropyle et alkylnitrile sont les plus utilisées.



On utilise des mélanges de solvants: alcane et un solvant plus polaire tel que CHCl_3 , THF,

EtOH, etc.

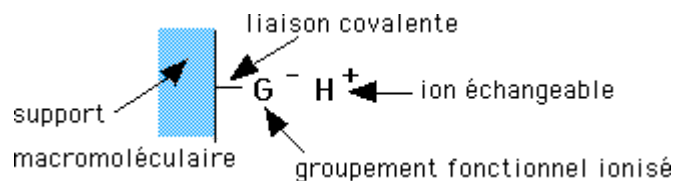
3-LA CHROMATOGRAPHIE D'ÉCHANGE D'IONS

Dans la chromatographie d'échange d'ions, la phase stationnaire comporte des groupements ionisés (+ ou -) fixes; des ions mobiles de charge opposée assurent l'électroneutralité. Les ions retenus au voisinage des charges fixes sont échangeables avec les ions présents dans la phase mobile. La séparation est basée sur cette propriété d'échange d'ions et ne peut donc s'appliquer qu'à des solutés ionisables.

A - Les échangeurs d'ions :

1-Nature :

La phase stationnaire est constituée d'un support insoluble dans l'eau, sur lequel sont greffés des groupements fonctionnels ionisables.



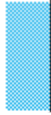
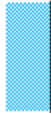
-Les **supports** peuvent être :

- minéraux : silice
- organiques : résine polystyrénique, cellulose, dextrane

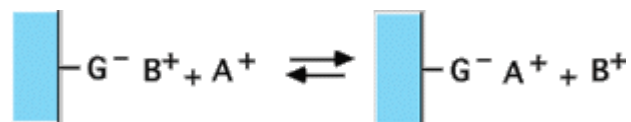
-Les **groupements fonctionnels** sont fixés par des liaisons covalentes sur la matrice; ils sont de deux types :

- Les échangeurs de cations portent des groupements chargés (-)
- Les échangeurs d'anions portent des groupements chargés (+)

2-Exemples :

ECHANGEURS DE CATIONS	ECHANGEURS D'ANIONS
FORTS  -SO₃⁻ résine sulfonique  -N⁺(CH₃)₃ ammonium quaternaire	
FAIBLES	
 -CO₂⁻ résine carboxylique  -NH₃⁺ amine primaire	
 -CH₂CO₂⁻ carboxyméthyl- cellulose  -CH₂CH₂N⁺(CH₂CH₃)₂ diéthylaminoéthyl cellulose	

Réaction d'échange d'ions :



Les éluants sont des solutions aqueuses qui contiennent des ions échangeables avec les solutés fixés sur l'échangeur :

- solutions contenant un ion de densité de charge plus élevée et (ou) de concentration plus élevée.
- solutions d'un pH tel qu'il modifie la charge des ions fixés et (ou) des groupements fonctionnels et provoque leur libération dans l'éluant.

Applications : La chromatographie d'échange d'ions est utilisée pour séparer des

molécules ionisables, quelle que soit leur taille : ions minéraux, acides aminés, peptides, protéines, nucléotides, acides nucléiques, glucides ionisés et lipides ionisés.

4-LA CHROMATOGRAPHIE DE PAIRES D'IONS

On appelle **paire d'ions** une entité formée par l'association de deux ions de charge opposée. La paire d'ions a donc une charge nette nulle et peut dans ce cas présenter des propriétés $\pm$ hydrophobes qui permettent de l'analyser sur une colonne de chromatographie en phase inverse.

Pour arriver à cette utilisation, on emploie des phases mobiles qui contiennent un **détergent anionique ou cationique**. Ces détergents sont des molécules ionisées qui comportent par ailleurs des chaînes carbonées hydrophobes (ex tétrabutylammonium, laurylsulfonate,...) et forment avec les composés à séparer des paires d'ions hydrophobes.

On peut dans ce mode chromatographique jouer sur un très grand nombre de paramètres :

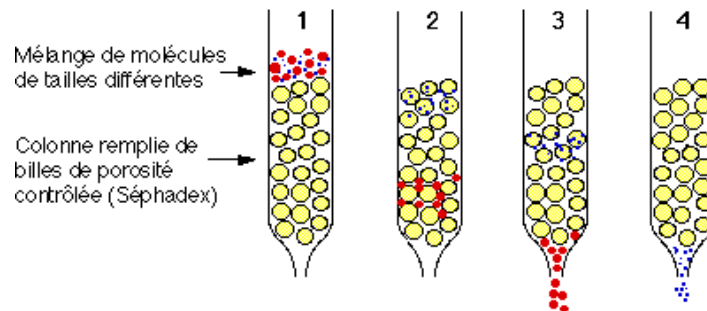
- nature et concentration du détergent
- pH et force ionique du tampon
- température
- modifiant organique (alcool, acétonitrile,...)

5-LA CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION

La chromatographie d'exclusion est aussi appelée **FILTRATION SUR GEL** ou **TAMISAGE MOLECULAIRE**. Cette technique est apparue en 1959 avec un produit nouveau : le Sephadex.

Le Sephadex est un **gel de dextrane** (polymère de glucose α -1-6 produit par *Leuconostoc mesenteroides*), auquel on fait subir une réticulation. Il se présente sous forme de billes poreuses, dont la porosité dépend du degré de réticulation. Ces billes sont très hydrophiles et gonflent dans l'eau. Il en existe différents types en fonction de la taille des billes et de leur porosité.

Principe de la chromatographie d'exclusion :



D'une façon plus générale :

-Les **molécules de taille supérieure à celle des pores des billes** de Sephadex sont totalement exclues du gel et ne se répartissent que dans le volume extérieur aux billes, c'est-à-dire dans la phase mobile (éluant). Elles sortent les premières, à un volume d'élution V_0 appelé volume mort de la colonne.

- Les **molécules de taille inférieure à celle des pores des billes** de Sephadex peuvent pénétrer librement dans les billes et se répartissent dans l'ensemble des liquides de la colonne. Elles sortent donc les dernières.

- Les **molécules de taille intermédiaire** pénètrent un peu dans les billes, en fonction de leur taille et de leur forme; elles pénètrent d'autant moins qu'elles sont plus grosses, et elles sont éluées dans l'ordre des masses molaires décroissantes.

-le **choix de la phase mobile** ne s'effectue plus selon la polarité du solvant comme dans le cas de la chromatographie de partage et celui de la chromatographie d'adsorption. En effet, la phase mobile **doit surtout être capable de dissoudre l'échantillon et être suffisamment semblable à la phase stationnaire afin de la mouiller et d'éviter l'adsorption**. Lorsque le gel est mou, le solvant doit aussi le gonfler puisque la taille des pores de ce gel dépend de la quantité de solvant imbibée. Il faut aussi que le solvant soit compatible avec l'appareillage et le détecteur si l'on en fait usage directement.

6-LA CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITÉ

Le principe consiste à utiliser une phase stationnaire constituée d'un support (silice, polymère) sur lequel on a greffé une molécule organique particulière qui présente une affinité sélective pour certains constituants d'un mélange dont on cherche à les isoler. Ceux-ci vont être sélectivement adsorbés ou tout au moins retenus sur la colonne, tandis que les autres composants sont très rapidement élués. Un changement de la phase mobile (pH, force ionique ou ajout d'un compétiteur) permet ensuite d'éluer les substances intéressantes, avec un facteur de purification pouvant atteindre 1000.

La chromatographie d'affinité s'utilise avec des colonnes basse pression ou des supports à haute performance (HPLC).

IV. PHASE MOBILE :

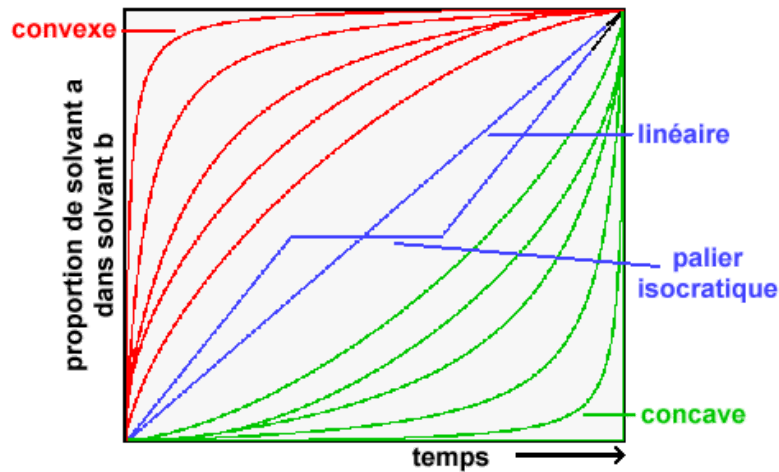
L'interaction plus ou moins forte entre la phase mobile et la phase stationnaire normale ou à polarité inversée se répercute sur les temps de rétention des solutés. La polarité de la phase stationnaire permet de distinguer deux situations de principe :

- 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.

Il existe deux modes d'élution:

- **isocratique** où l'éluant est de composition fixe;
- **par gradient** où l'éluant est de composition variable. Cet éluant peut provenir d'un mélange de 2 à 4 solvants dont les proportions peuvent changer pendant la

séparation. Le changement dans les proportions des solvants peut être linéaire, concave ou convexe et même comporter des régions isocratiques.



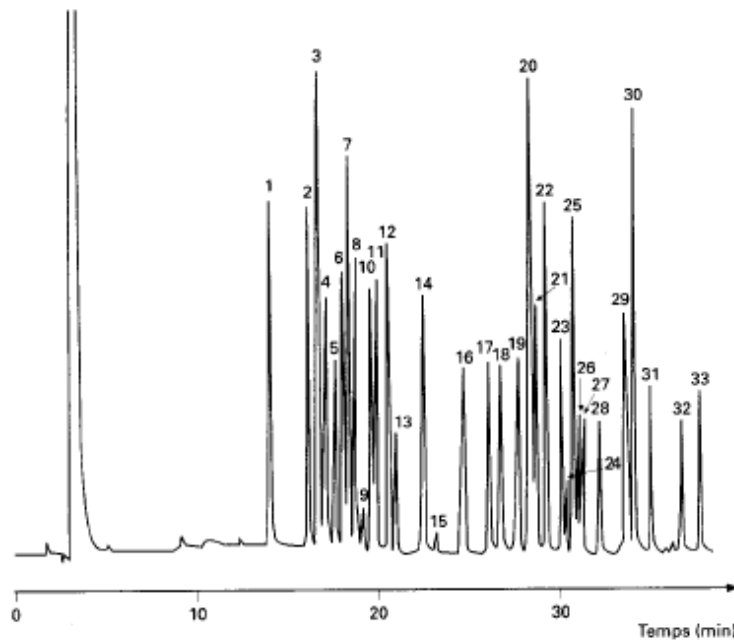
Optimisation de la composition de la phase mobile

- Sélectivité : obtenue en jouant sur la *nature des solvants*.
- Force éluante : doit correspondre, pour un mélange de plusieurs solutés, à une rétention satisfaisante obtenue en jouant sur le pourcentage des différents solvants du mélange.

Exemple d'utilisation des silices liées chimiquement

Polarité des solutés	Polaires	Moyennement polaires		Non polaires
Polarité de la PM	Moyennement polaire	Faiblement polaire	Polaire	
Composition type de la PM	Mélange <u>hexane</u> et <u>dichlorométhane</u> Ex : $C_6H_{14} - CH_2Cl_2$ 20 : 80	<u>hexane</u> pur ou mélangé avec peu de <u>dichlorométhane</u> Ex : $C_6H_{14} - CH_2Cl_2$ 80 : 20	Mélange <u>méthanol</u> (ou <u>acétonitrile</u>) et <u>eau</u> Ex : $CH_3OH - H_2O$ 40 : 60	Mélange <u>méthanol</u> (ou <u>acétonitrile</u>) et peu d' <u>eau</u> Ex : $CH_3OH - H_2O$ 90 : 10
Type de PS	phase liée <u>moyennement polaire</u> (CN, NH_2)		phase liée <u>apolaire</u> (C8, C18)	

Exemple: Séparation des acides aminés



- | | |
|---------------------------|-----------------------------------|
| 1 Acide cystéique | 19 Acide γ -aminobutyrique |
| 2 Arginine | 20 FMOC-OH |
| 3 Asparagine | 21 Valine |
| 4 Glutamine | 22 Norvaline |
| 5 Citrulline | 23 Phénylalanine |
| 6 Sérine | 24 Tryptophane |
| 7 Acide aspartique | 25 Cystine ou cystéine |
| 8 Acide glutamique | 26 Iso-leucine |
| 9 Taurine | 27 Leucine |
| 10 Méthioninesulfone | 28 Hydroxylysine |
| 11 Thréonine | 29 Histidine |
| 12 Glycine | 30 Ornithine |
| 13 Dihydroxyphénylalanine | 31 Lysine |
| 14 Alanine | 32 Dityrosine |
| 15 Mono-tyrosine | 33 FMOC-Cl |
| 16 Proline | |
| 17 Éthanolamine | |
| 18 Méthionine | |

Conditions du gradient			
Temps (min)	% A	% B	% C
0,0	80	0	20
4,0	76	0	24
8,0	0	72	28
11,5	0	68	32
13,5	0	68	32
17,0	0	56	44
20,0	0	55	45
25,0	0	52	48
30,0	0	28	72
37,0	0	20	80
39,0	0	20	80
39,1	80	0	20

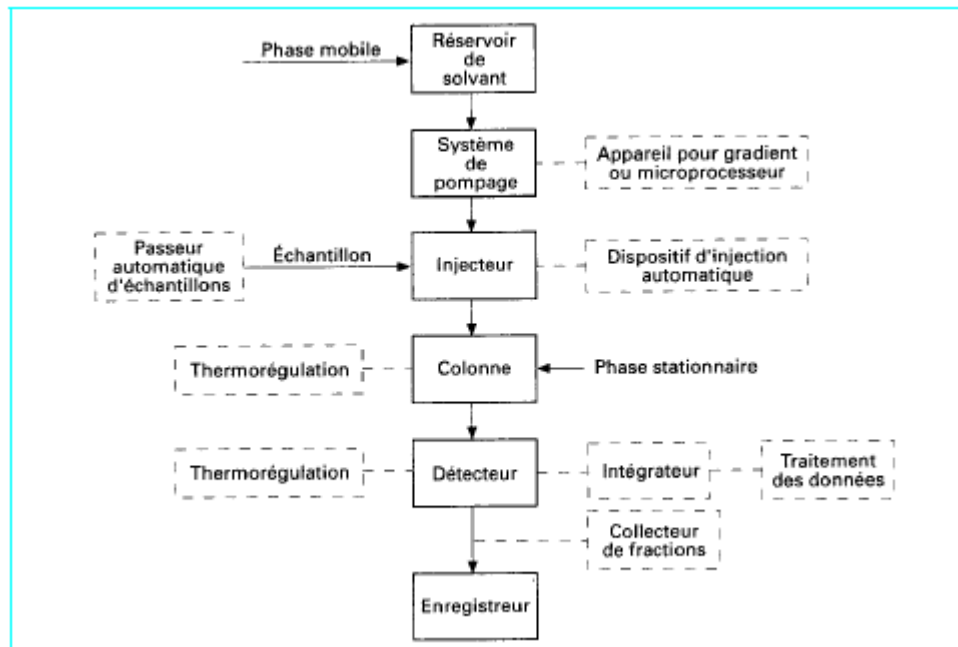
Conditions chromatographiques :

Colonne : longueur : 25 cm ; diamètre intérieur : 0,4 cm
 Phase stationnaire : TSK-GEL C-18, 5 μ m
 A : citrate de sodium 0,02M pH ajusté à 2,85 avec H_3PO_4
 B : même solution que "A", mais pH ajusté à 4,5
 C : acétonitrile

Débit : 1,4 mL/min
 Température : 32°C
 Détection : UV à 269 nm
 Sensibilité : 0,06 UAPE (Unité d'Absorbance Pleine Échelle)
 Volume injecté : 25 μ L

L'APPAREILLAGE EN CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE

L'appareillage classique est composé des modules suivants:



En général, l'ensemble de ces éléments est piloté à l'aide microprocesseurs.

I-RÉSERVOIR

- Le réservoir est important afin d'éliminer des gaz qui sont moins stables aux fortes pressions
 - filtrer sous vide
 - chauffage/agitation
 - barbotage avec gaz de faible solubilité
- Pratiquement, le choix de solvants se fait selon :
 - leur miscibilité
 - les interactions chimiques potentielles
 - la viscosité ne doit pas être trop élevée
 - l'absorbance UV
 - la toxicité
 - l'inflammabilité
 - le coût

II. POMPES

Les pompes équipant la plupart des chromatographes ont des pressions maximales de refoulement voisines de 400 bars. Un système de pompage idéal doit réunir les qualités suivantes :

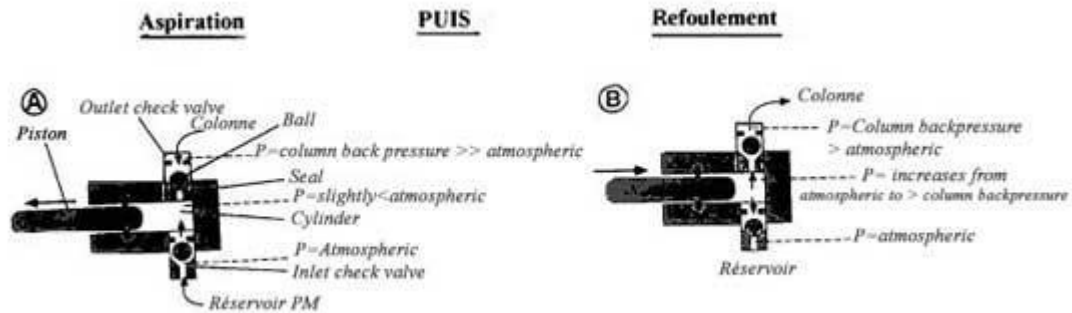
- rendement de la pompe (rapport du débit effectivement délivré au débit demandé) indépendant de la nature du solvant, en particulier avec les solvants apolaires ;
- débit constant et reproductible ;
- absence de pulsations ;
- chambre de mélange très efficace et de faible volume (compositions reproductibles pour les systèmes à plusieurs solvants) ;
- grande gamme de débits (tout en maintenant, pour les forts débits, une pression de refoulement élevée) ;
- faible volume de la chambre du piston pour permettre un changement aisé de solvant ;
- maintien de la pression maximal
- maintien de la pression maximale de refoulement dans le corps de pompe afin d'éviter le dégazage des solvants et pour compenser les différences de compressibilité entre les solvants (ou pour ce dernier aspect, vitesse de remplissage du corps de pompe adaptable).

Ces contraintes ont entraîné la généralisation des pompes à piston à mouvement alternatif assurant l'aspiration et le refoulement de la phase éluante.

Pompe à piston alternatif

Ces pompes représentent plus de 90 % des systèmes utilisés

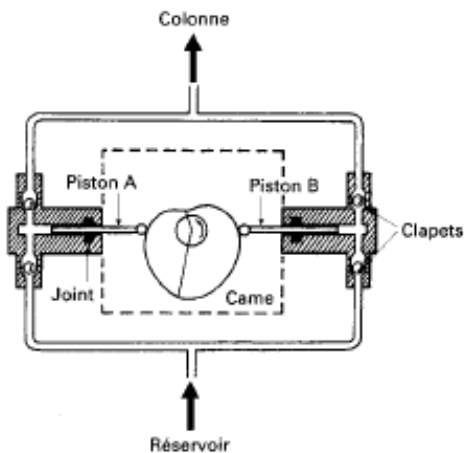
A UNE TETE



A DEUX TÊTES

En parallèle : Une came non circulaire permet d'obtenir le remplissage de l'une des têtes pendant que l'autre est dans sa phase de débit constant, puis la première tête délivre le solvant tandis que l'autre se remplit.

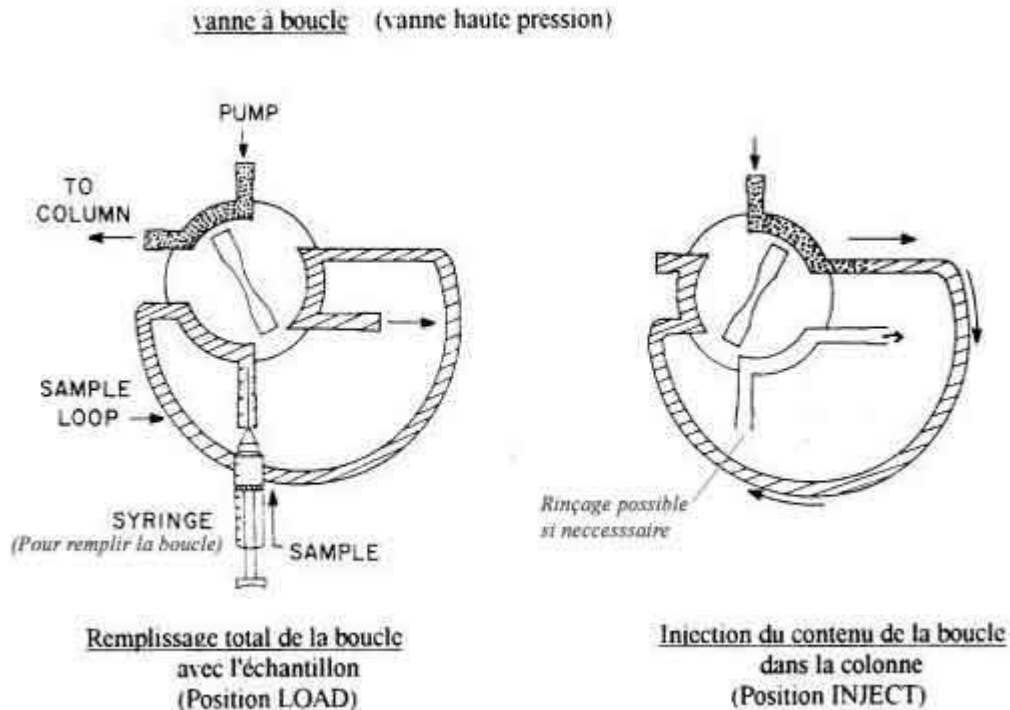
La combinaison des deux valves permet d'avoir un flow plus constant.



Pompe à deux têtes montées en opposition et à came en forme de cardioïde

Module de dégazage sous vide

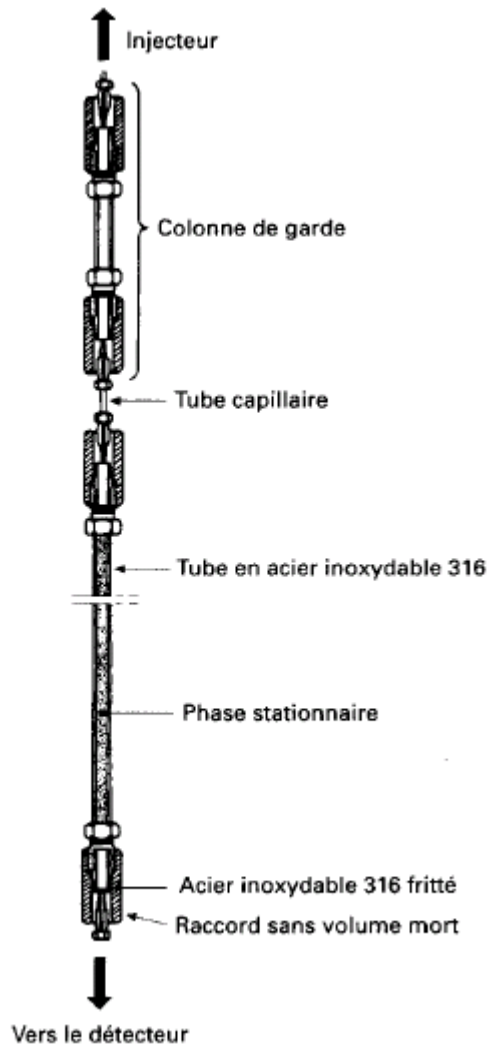
III.INJECTEUR



Le remplissage total de la boucle assure la meilleure reproductibilité du volume d'injection à la condition de s'assurer de la qualité du chargement de la boucle.

III. COLONNE (ET COLONNE DE GARDE)

Le choix, la construction et le remplissage de la colonne chromatographique revêtent une grande importance, car il ne faut jamais oublier que, quel que soit le degré de sophistication du chromatographe, la qualité d'une séparation est toujours fonction de celle de la colonne qui constitue le cœur du système. Quant aux connexions et raccords, on prendra soin de minimiser leur volume mort. Afin de prolonger l'efficacité et la durée de vie des colonnes, on met souvent en oeuvre des colonnes de garde remplies avec la même phase stationnaire que la colonne analytique.



Colonnes conventionnelles

- Remplies de particules de 3 à 10 μm (les plus utilisées 5 et 10 μm)
- Longueur de 3 à 25m et diamètre de 4.6 mm. Plus le diamètre diminue plus l'efficacité augmente (le nombre de plateaux théoriques augmente et TR diminue).
- En acier inoxydable ou en verre.

Avec raccords spéciaux sans volumes mort et frittés (porosité < à la taille des particules) à l'entrée et à la sortie de la colonne pour diminuer la perte de charge.

exemples

Taille des particules	N
10 μm	5000
5 μm	9000

3 μm	15000
-----------------	-------

IV. DÉTECTEURS

Ils permettent de visualiser la séparation, voire d'améliorer la sélectivité dans le cas où celle du système chromatographique est insuffisante et, pour les plus performants d'entre eux, d'apporter des informations quant à l'unicité des pics chromatographiques ou encore l'identification des solutés.

Deux types de détection basés:

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

CARACTÉRISTIQUES D'UN DÉTECTEUR

Les principales caractéristiques d'un détecteur sont les suivantes

- **Bruit** : qui se définit comme la variation du signal de sortie d'un détecteur non attribuable au passage du soluté dans la cellule.
- **Sensibilité** :
 - a) absolue : mesurée par un déplacement sur toute l'échelle de l'enregistreur lorsque la sensibilité du détecteur est maximale sans interférence du 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.
- **Linéarité**: région où il y a une proportion linéaire entre le signal de sortie et la concentration du soluté.
- **Quantité minimale détectable** ; c'est la plus petite quantité du soluté qui soit détectable après injection dans la colonne chromatographique.

- **Temps de réponse** ; c'est le temps nécessaire pour que le signal passe de 10 à 90 % de la réponse à un échelon de concentration correspondant au domaine de linéarité ;

SPECTROPHOTOMÈTRE UV-VISIBLE

La réponse de ce type de détecteur est fondée sur la loi de Lam-bert-Beer :

$$A = \lg \frac{I_0}{I} = \varepsilon_{(\lambda)} l^* C$$

avec	$\varepsilon_{(\lambda)}$	absorptivité molaire du soluté à la longueur d'onde λ ,
	I_0	intensité du rayonnement incident,
	I	intensité du rayonnement transmis,
	l^*	longueur du chemin optique,
	C	concentration du soluté dans l'effluent.

La détectabilité de ce détecteur dépend essentiellement de l'absorptivité du soluté, laquelle peut varier de plusieurs ordres de grandeur selon la nature de celui-ci.

Aussi est-il impossible « d'estimer » la teneur d'un soluté à partir de la seule appréciation de l'aire de son pic d'élution sans étalonnage préalable.

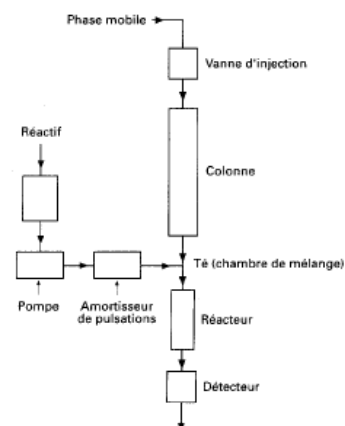
Ce mode de détection est très utilisé dans la mesure où un grand nombre de solutés absorbent dans l'ultraviolet et où des phases éluantes demeurent transparentes jusqu'à des longueurs d'onde de 200 nm.

La classification en fonction du degré d'information conduit à distinguer :

- les spectrophotomètres dont la longueur d'onde est réglée par l'opérateur ;
- les spectrophotomètres programmables en longueur d'onde et en sensibilité dans le temps ;
- les spectrophotomètres à barrette de diodes permettant une saisie en trois dimensions absorbance, longueur d'onde et temps, ce qui autorise l'identification des solutés par comparaison de leur spectres UV avec ceux stockés dans une bibliothèque ou encore la mise en oeuvre d'un critère de pureté du soluté correspondant à un pic d'élution.

Ce dernier est fondé sur une combinaison des absorbances mesurées à différents endroits du pic d'élution et à différentes longueurs d'onde.

Mentionnons enfin que le domaine de mise en oeuvre de la spectrophotométrie UV-visible peut être étendu, dans le cas de solutés transparents, par l'utilisation de réactions de dérivation pré- ou postcolonne



Principe d'un dispositif de dérivation postcolonne

- trajet optique ≈ 1 cm
- sensibilité $\sim 10^{-8}$ M

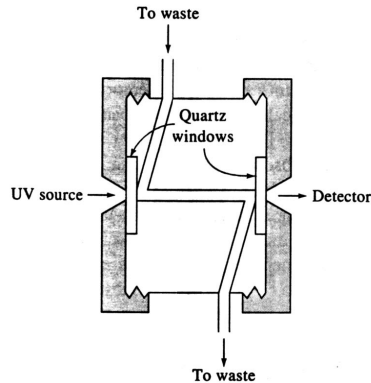


Figure 28-9 Ultraviolet detector cell for HPLC.

RÉFRACTOMÈTRE DIFFÉRENTIEL

Le réfractomètre différentiel mesure en continu la différence d'indice de réfraction entre la phase mobile et l'effluent de la colonne chromatographique. La limite de détection dépend à la fois de la nature du soluté et de celle de la phase éluante. En effet, la réponse R_1 du réfractomètre est donnée par la relation :

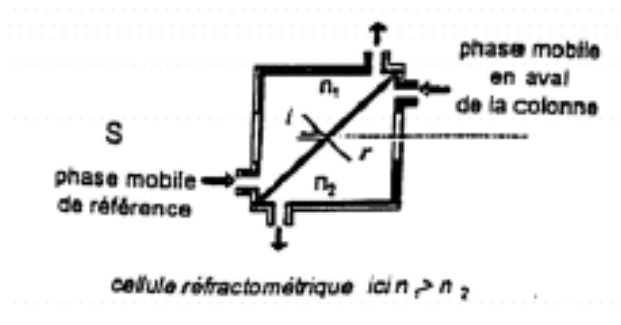
$$R_1 = Z (n - n_0)$$

avec : Z : constante caractéristique de l'appareil,

n : indice de réfraction de l'effluent,

n_0 : indice de réfraction de la phase éluante.

- peu sensible $\sim 10^{-5}$ M
- détecteur universel
- très sensible à T (± 0.0001)
- pas de séparation à gradient (isocratique)



• SPECTROFLUORIMÉTRIQUE

Ce mode de détection a une grande sélectivité et une grande sensibilité. Le principe de la méthode est le suivant : certains composés organiques absorbent des radiations dans l'ultraviolet et réémettent une fraction de la lumière absorbée à une longueur d'onde supérieure (fluorescence naturelle).

La loi fondamentale de la fluorimétrie indique que l'intensité I_f du rayonnement émis par fluorescence est proportionnelle, pour un volume de solution donné, à l'intensité lumineuse absorbée :

$$I_f = k I_{abs} = k (I_0 - I)$$

- sensibilité $\sim 10^{-10}$ M
- dérivation des composés

Intérêt pour l'analyse de traces car :

- Très sélectif
- Grande sensibilité
- Réponse linéaire seulement à faibles concentrations

• DÉTECTEUR ÉLECTROCHIMIQUE

Ces détecteurs sont utilisables seulement pour les espèces conductrices ou électroactives.

Détecteur conductométrique

Utilisé en chromatographie ionique avec électrodes inertes (Pt ou Inox) dans cellule de volume inférieur à 1 μ l. Il mesure de conductivité en chromatographie ionique

Détecteur électrolytique

L'effluent et l'échantillon doit être suffisamment conducteur

2 sortes de détecteurs électrolytiques

- coulométrique
- ampérométrique