

<http://www2.univ-reunion.fr/~briere>

COURS DE CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE

**Dr Thierry BRIERE - Professeur agrégé – Département de Chimie
Université de La Réunion**

MASTER “VALORISATION DES RESSOURCES NATURELLES” et ESIDAI 3

Ce document est mis à disposition sous un contrat CREATIVE COMMONS



Vous pouvez l'utiliser à des fins pédagogiques et NON COMMERCIALES sous certaines réserves dont la citation obligatoire du nom de son auteur et l'adresse

<http://www2.univ-reunion.fr/~briere> de son site d'origine pour que vos étudiants puissent y accéder. Merci par avance de respecter ces consignes. Voir contrat (lien en page d'accueil) ...

J'ai moi même utilisé des sources “internet” vous en trouverez la liste non exhaustive en liens externes. Certaines illustrations proviennent de sources diverses je me suis efforcé de les citer mais il peut y avoir quelques oublis, que les auteurs originaux veuillent bien m'en excuser...

PREMIERE PARTIE

Principes généraux de la séparation

NATURE DE LA PHASE STATIONNAIRE

MISE AU POINT DES SEPARATIONS

THEORIE SIMPLIFIEE

CHROMATOGRAPHIE

Procédé de séparation et d'analyse des constituants d'un mélange à l'aide d'un solvant mobile qui les entraîne à travers une phase fixe.

La chromatographie permet de séparer et d'analyser les constituants d'un mélange en le faisant circuler à travers un milieu fixe inerte (alumine, silice...) à l'aide d'un solvant mobile (gaz, liquide) qui l'entraîne.

Chaque constituant adopte une vitesse de migration qui lui est propre en fonction de sa solubilité dans la phase mobile et de son affinité pour la phase fixe qui tend à le retenir.

Enfin, on obtient donc la séparation des constituants du mélange initial.

Les divers type de chromatographie :

Les méthodes chromatographiques, bien que très diverses, mettent en jeu un certain nombre de principes communs :

- les substances se répartissent entre deux phases non miscibles, selon un équilibre lié à un coefficient de partition, qui dépend à la fois de la nature des composés et de celle des deux phases considérées.
- le renouvellement continu de la phase mobile remet en cause cet équilibre et entraîne une succession d'autres équilibres, ce qui se traduit par une migration des substances le long de la phase stationnaire.
- la séparation est obtenue car chaque composé migre avec une vitesse qui lui est propre et dépend du coefficient de partition.

On peut classer les différents types de chromatographies de plusieurs façons différentes selon que l'on considère la nature des phases utilisées ou les mécanismes de séparation des composés.

Classification selon la nature des phases :

- la phase mobile est un fluide, donc soit un liquide, soit un gaz ,soit encore un fluide supercritique
- la phase stationnaire est soit un solide, soit un liquide (fixé sur un support solide).

La combinaison de ces possibilités conduit à diverses possibilités :

- chromatographie liquide—solide (LSC)
- chromatographie liquide—liquide (LLC)
- chromatographie gaz—solide (GSC ou GC)
- chromatographie gaz—liquide (GLC ou GC)
- la chromatographie supercritique (SFC)

La SFC représente un cas intermédiaire entre LC et GC, les fluides supercritiques possédant des propriétés à la frontière entre celles des liquides et celles des gaz.

Classification selon le phénomène chromatographique :

Ce dernier dépend de la nature (et de la structure) de la phase stationnaire utilisée. On distinguera donc :

- la chromatographie d'**adsorption** (LSC, GSC) (lorsque la phase stationnaire est un solide); par extension on pourrait y rattacher la chromatographie d'affinité, qui correspond à un cas où les propriétés d'adsorption de la phase stationnaire sont spécifiques vis-à-vis d'un (ou une famille de) composé(s).
- la chromatographie de **partage** (LLC, GLC), lorsque la phase stationnaire est un liquide non miscible avec la phase mobile (mise en jeu de coefficients de partage).
- la chromatographie **d'échange d'ions** (IEC), où la phase stationnaire porte des groupes fonctionnels acides ou basiques, destinée à séparer des composés ionisés.
- la chromatographie d'**exclusion** (SEC) où la phase stationnaire (poreuse) se comporte comme un tamis et sépare les composés en fonction de leur taille; on parle aussi de chromatographie de perméation de gel (GPC).

Classifications selon les procédés utilisés :

Selon le conditionnement de la phase stationnaire, on distinguera :

- la chromatographie sur colonne
- la chromatographie sur papier
- la chromatographie sur couche mince.

Selon les modalités de migration de la phase mobile, on distinguera

- la chromatographie par développement (les constituants de l'échantillon restent sur la phase stationnaire)
- la chromatographie d'élution (les substances sont entraînées hors de la phase stationnaire).

Classification selon les paramètres intervenant dans la séparation.

Les paramètres physico-chimiques sur lesquels reposent les principes de séparation sont :

- la polarité et/ou l'hydrophobicité : polarité de phase normale ou inversée
- la charge électrique : échange d'ions
- la taille et la forme (en fait, le volume) : exclusion ou perméation de gel
- l'existence de structures particulières qui permettent d'établir des liaisons spécifiques : chromatographie d'affinité

Les gels de silice :

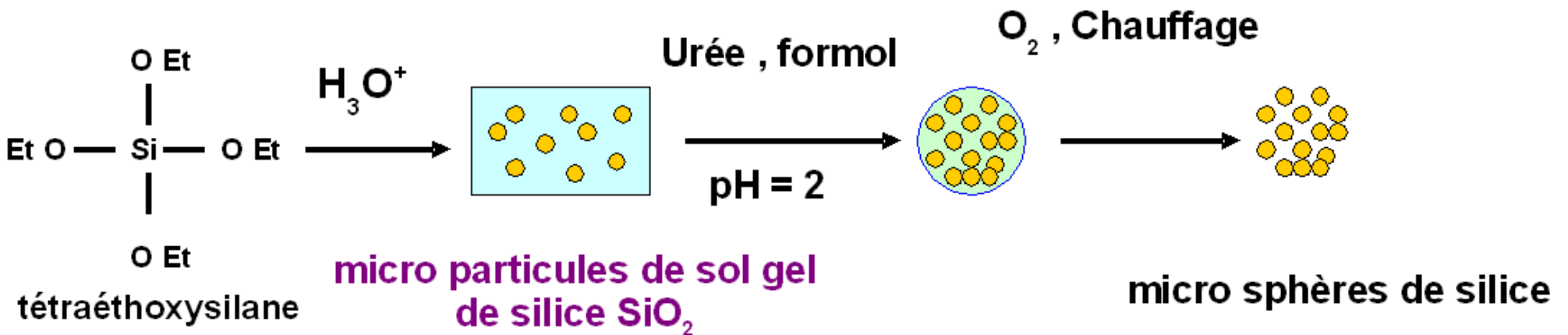
C'est la phase stationnaire la plus utilisée en chromatographie et notamment en C.L.H.P.

Le gel de silice est constitué de micro sphères de diamètre sensiblement constant pouvant varier de 2 à 5 μm .

Le diamètre doit être le même pour toutes les particules si on veut éviter la création de chemins préférentiels

Ces micro sphères sont obtenues par agglutination en présence d'un liant organique urée/formol de microparticules (appelées sol-gel) elles mêmes obtenues par polymérisation puis hydrolyse contrôlée du tétraéthoxysilane. (voir schéma).

Le traitement final est une pyrolyse qui conduit au micro sphères de silice qui seront utilisées pour le garnissage des colonnes.



Remarque :

Les gels de silice sont stables dans une grande gamme de pH mais ils ne supportent pas des pH trop extrêmes.

Il y a des risques de dissolution pour des pH trop acides ou trop basiques, on se limite donc à la gamme $2 < \text{pH} < 12$.

Des gels spéciaux existent pour une utilisation à pH extrêmes.

Une vue agrandie d'une micro sphère ressemblerait à la figure suivante ou l'on voit que ces sphères ne sont en réalité pas homogènes et régulières et qu'il existe des lacunes appelées pores.

Ces pores jouent un grand rôle car elles constituent des zones d'adsorption préférentielles.

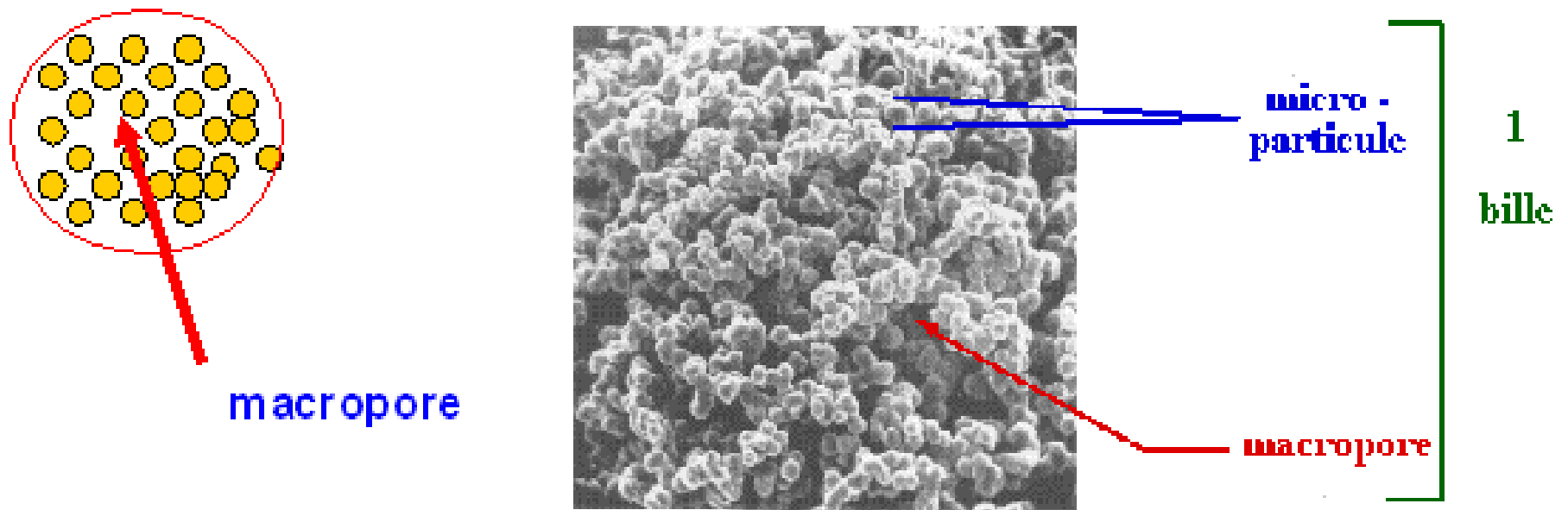
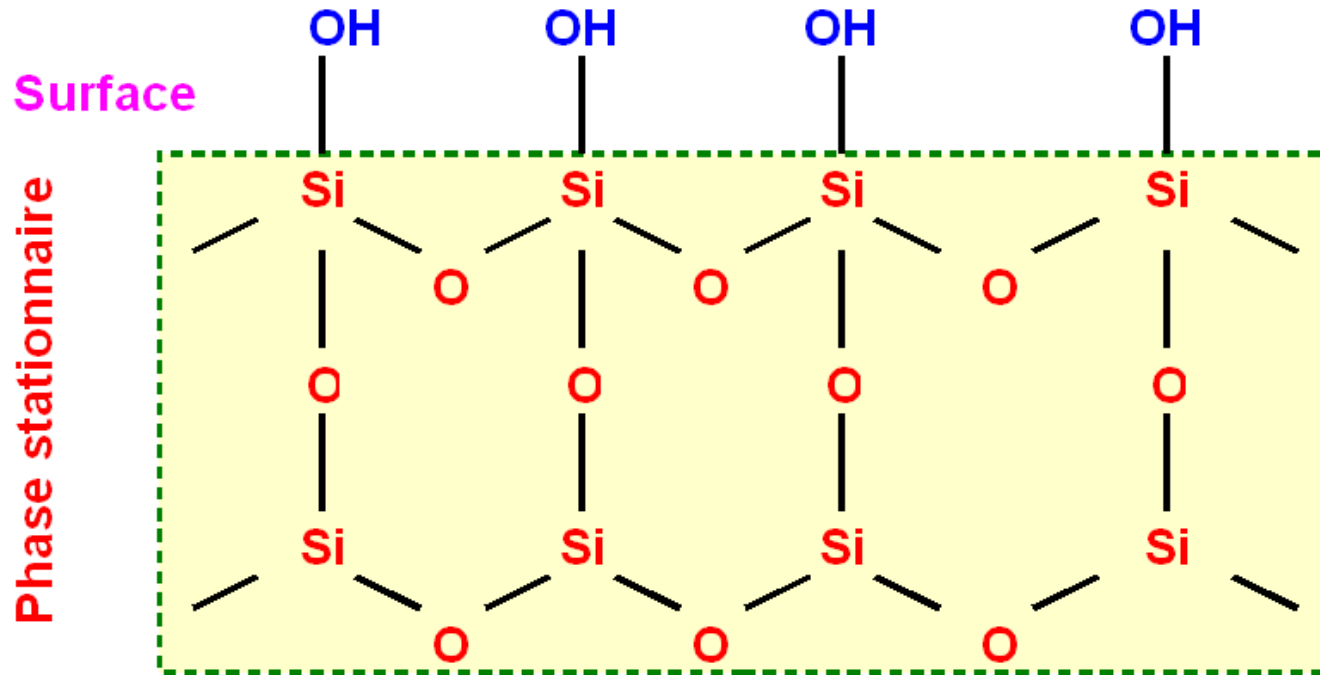


Schéma et photographie d'une micro sphère de silice montrant leur porosité.

La surface des micro sphères de silice comporte des groupement silanol : Si – OH qui sont essentiels au phénomènes d'adsorption en particulier parce qu'il permettent la formation de liaisons hydrogène (chimiesorbtion) et sont responsables de la polarité et de l'acidité de la silice.

Ces groupement silanol s'ils sont trop nombreux entraînent de trop importantes adsorption et leur nombre doit être soigneusement contrôlé. Pour de nombreuses application on préfère désactiver une partie de ces sites par hydratation, l'eau est alors prioritairement adsorbée.

Groupements Silanol

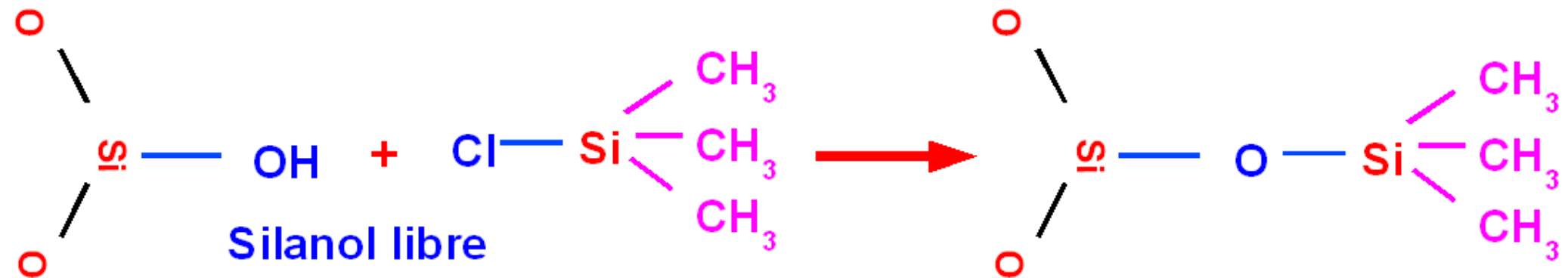


Les groupements silanols libres sont des sites préférentiels d'adsorption.

En chromatographie en phase inverse, ils sont très gênants car ils sont très polaires et ont donc une grande affinité avec les solutés polaires, et vont donc les retarder énormément.

On doit donc les éliminer au maximum en phase inverse.

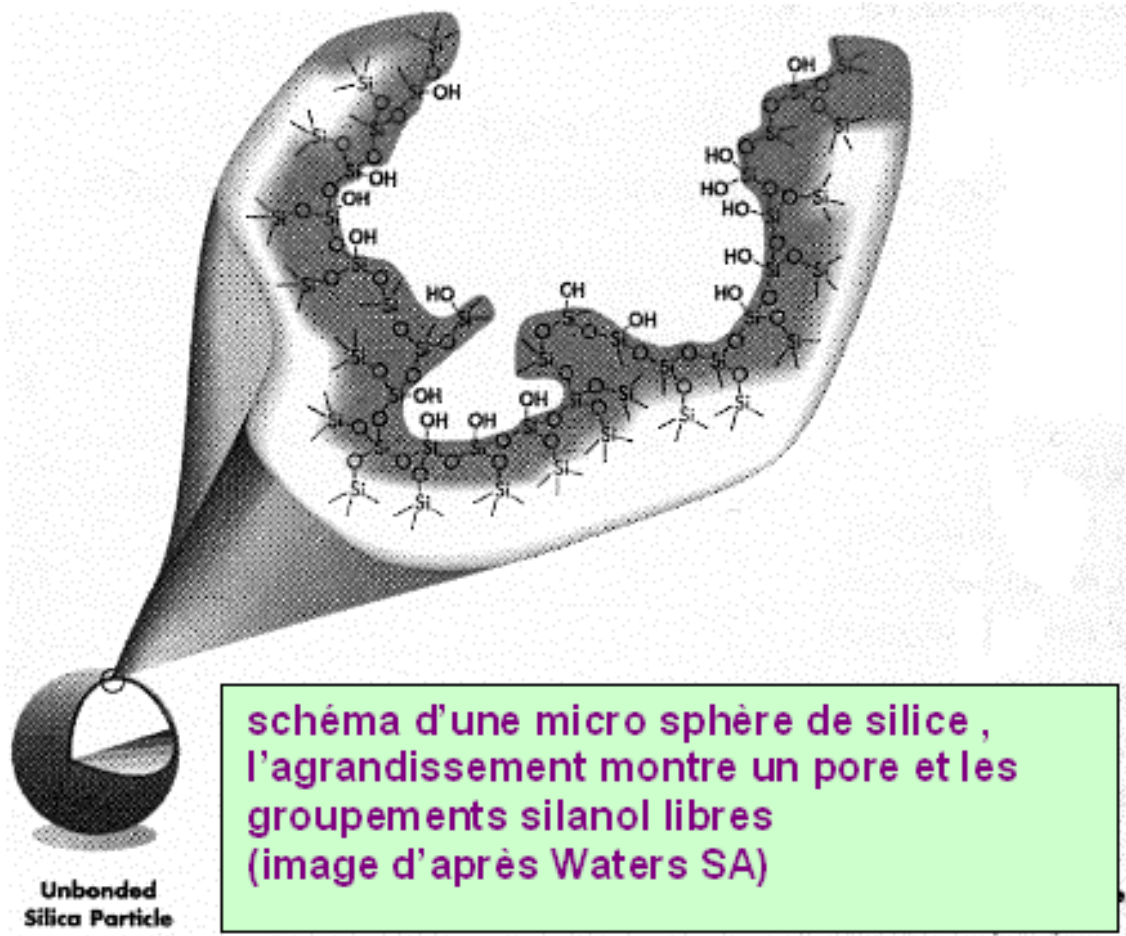
On utilise un procédé nommé "end capping" qui consiste à retraiter la phase greffée par un silane porteur de groupements méthyle. Une grande partie des groupements silanols est alors éliminée.



Procédé dit "end capping" : élimination des silanols libre pour la chromatographie en phase inverse

La qualité d'un gel dépend de plusieurs paramètres : taille des grains, porosité ouverte (dimensions et répartition des pores), résistance à l'écrasement, surface spécifique...

Les gels courants pour C.L.H.P ont les caractéristiques suivantes :
diamètre de 2 à 5 μm , résistance à l'écrasement sous 1000 bars, surface spécifique 350 m^2/g , porosité 0,7 mL / g , taille des pores 10 nm .



Les gels de silice ainsi obtenus sont utilisés tels quels dans la chromatographie d'adsorption

L'adsorption est le phénomène qui consiste en l'accumulation d'une substance à l'interface entre deux phases (gaz-solide, gaz-liquide, liquide-solide, liquide-liquide, solide-solide).

Il a son origine dans les forces d'attraction intermoléculaires, de nature et d'intensité variées, qui sont responsables de la cohésion des phases condensées, liquides ou solides.

Une molécule attirée inégalement par les autres molécules de deux phases trouvera une position énergétiquement favorable à la surface de la phase qui l'attire le plus ; celle-ci sera appelée l'*adsorbant*, les molécules ainsi adsorbées constituant l'*adsorbat*.

On distingue deux processus différents selon que l'adsorption est d'origine purement physique : physisorption ou qu'il y a formation de liaison chimique : chimisorption.

Les processus de physisorption sont dus essentiellement à des interactions faibles de type Van der Waals.

- Interactions entre dipôles permanents : Force de Keesom
- Interactions dipôle permanent - dipôle induit : forces de Debye
- Interactions entre dipôles instantanés : force de London

Ces processus correspondent à des énergies faibles les composés sont alors peu retenus.

Les interactions impliquant la formation de liaison hydrogène (chimisorption) sont beaucoup plus fortes et les composés sont alors fortement retenus.

La phase stationnaire est un solide finement divisé et de nature fortement polaire.

En chromatographie liquide classique on utilise essentiellement la silice ou l'alumine.

En H.P.L.C c'est surtout les gels de silice qui sont utilisés.

Chromatographie de partage ou d'absorption :

Ce type de chromatographie est basé sur la différence de solubilité d'un soluté entre deux liquides non miscibles, il s'agit d'un équilibre de partage.

Initialement, les phase stationnaires utilisées étaient constituées d'un solide poreux imbibé d'un liquide, cette technique est toujours utilisée en chromatographie gazeuse mais est quasiment abandonnée en chromatographie liquide.

En effet, il se produit un phénomène de lessivage par le solvant et le liquide imbibant le solide poreux est à la longue emporté par l'éluant.

Actuellement on utilise des gels de silice sur lesquels ont à greffé chimiquement une fonction (autre que le groupement silanol déjà présent) fixée par liaison de covalence et qui va se comporter comme un liquide fixé sur la phase stationnaire solide.

On distingue deux types différents selon la polarité de la phase stationnaire et celle de la phase mobile :

Chromatographie en phase normale :

La phase stationnaire est très polaire (la phase mobile est alors généralement peu polaire), les substances sont alors élués en sens inverse de leur polarité propre. Les composants peu polaires ont une plus grande affinité pour la phase mobile et sont donc élués rapidement. Inversement les solutés polaires ont une plus grande affinité pour la phase stationnaire et sont élués lentement.

Principaux greffons utilisés en phase normale :

Il s'agit de greffons comportant des fonctions de nature polaire :

- Amine NH_2
- Nitrile : CN
- Diols : $\text{CH}_2 - \text{CHOH} - \text{CH}_2\text{OH}$

Remarque : c'est la nature **polaire** de la phase stationnaire qui prime, la polarité de la phase mobile peut être quelconque on sera toujours en **Phase Normale**

Chromatographie en phase inverse :

La phase stationnaire est peu polaire ou apolaire (la phase mobile est alors généralement polaire), les substances sont alors élués dans le sens de leur polarité propre.

Les composants polaires ont une plus grande affinité pour la phase mobile et sont donc élués rapidement.

Inversement les solutés peu polaires ont une plus grande affinité pour la phase stationnaire et sont élués lentement.

Principaux greffons utilisés en phase inverse :

Il s'agit de greffons comportant des fonctions de nature apolaire :

C_2 : Diméthylsilyl

C_8 : Octylsilyl

C_{18} : Octadécylsilyl

ϕ : phénylsilyl

Remarque : c'est la nature **apolaire** de la phase stationnaire qui prime, la polarité de la phase mobile peut être quelconque on sera toujours en **Phase Inverse**

Préparation des silices greffées :

La préparation de ces silices greffées se fait par réaction entre les groupements silanol de surface et un composé portant la fonction qu'on désire greffer à la surface de la silice. On utilise généralement un composé de type méthylchlorosilane ClSiMe_2R ou méthyldichlorosilane Cl_2SiMeR .

Le groupement R représente la fonction greffée : $\text{R} = \text{NH}_2, \text{CN}, \text{CH}_2\text{CHOHCH}_2\text{OH}, \text{CH}_3, \text{C}_8\text{H}_{17}, \text{C}_{18}\text{H}_{37}, \text{C}_6\text{H}_5$ etc

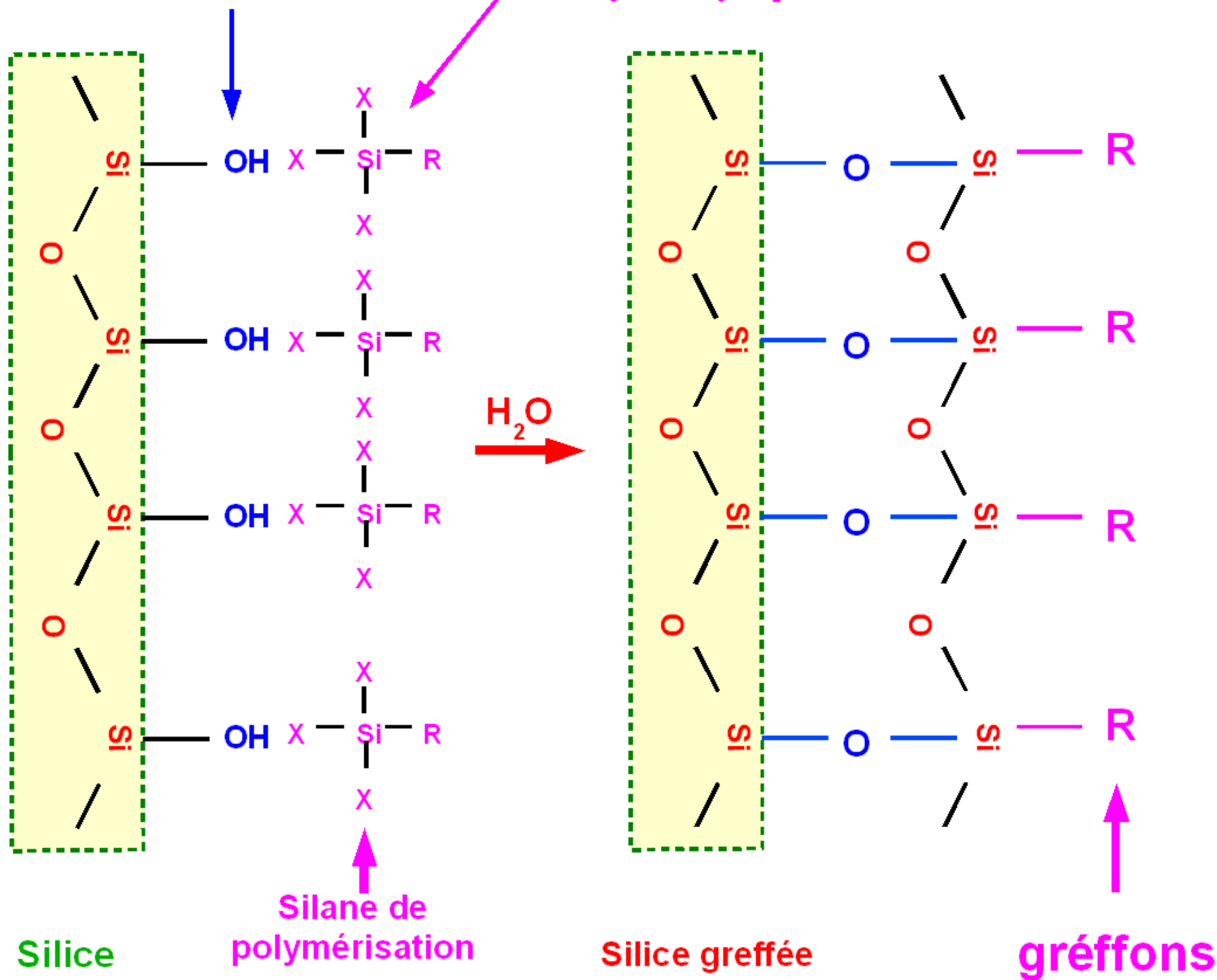
Le processus réactionnel est en fait très complexe et nous n'allons pas ici le décrire précisément mais en donner une idée globale simplifiée. Il se produit des réactions de polymérisation plus ou moins importantes qui vont conduire à une structure externe complexe, dans laquelle les groupes silanols initiaux seront en partie reliés entre eux... (Voir les figures)

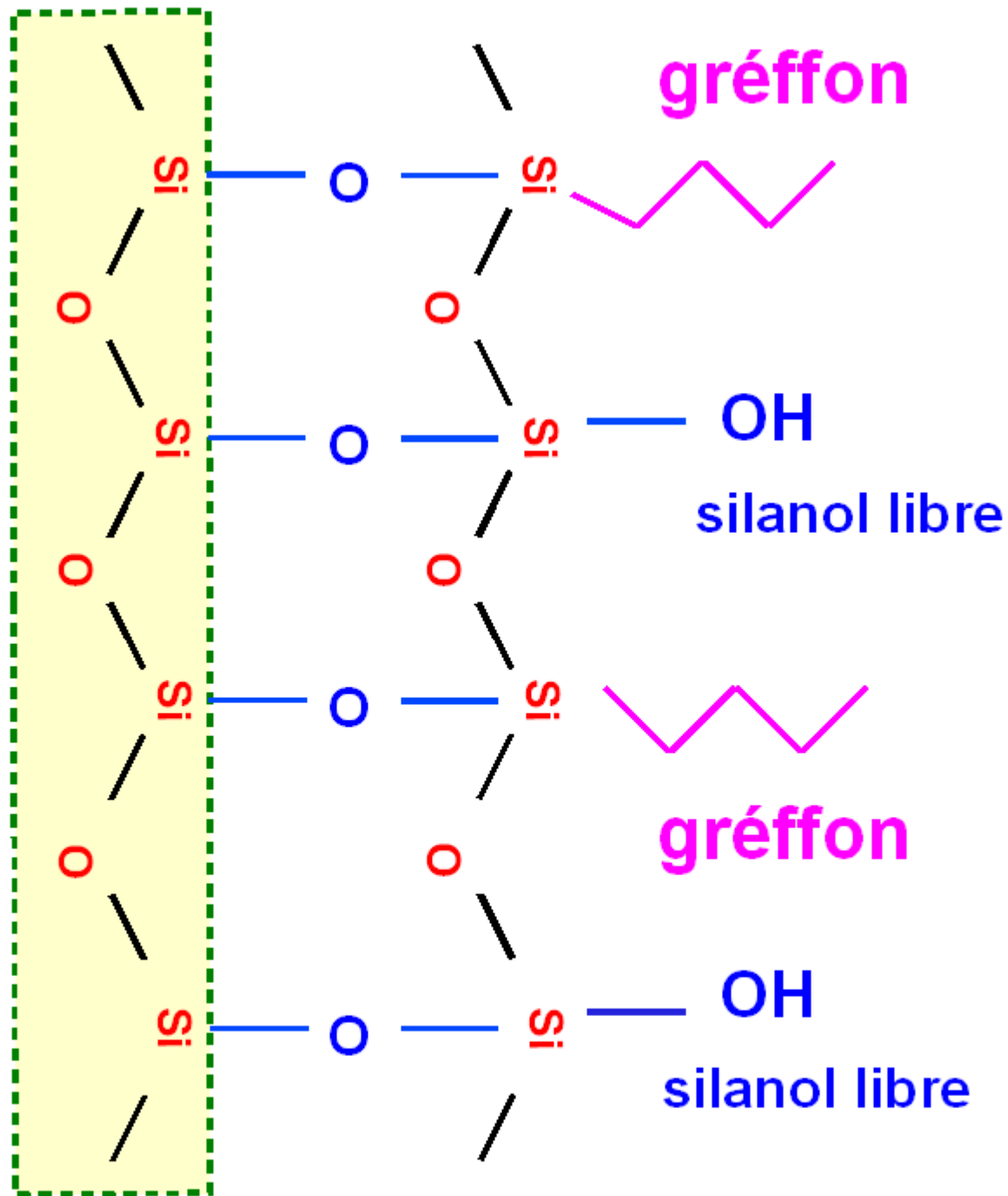
La réaction se produit en surface des grains de silice, le greffage n'est que partiel et se répartit aléatoirement sur toute la surface.

On peut finalement atteindre de l'ordre de 5% en masse de carbone dans la silice finale après greffage, cela représente un greffage de l'ordre de 40 à 50% de la surface totale.

Groupements Silanol

X = CH₃O ; CH₃CH₂O ; Cl





Silice greffée : Les groupements silanols libres et les greffons se répartissent aléatoirement sur environ 40 à 50 % de la surface.

Mécanisme de partage liquide/liquide :

Les phases greffées ne sont pas de véritables liquides puisqu'elles sont constituées d'un film liquide de très faible épaisseur (mono-couche moléculaire).

Le partage entre phase fixe et phase mobile fait donc intervenir l'adsorption des solutés et du solvant organique sur la couche monomoléculaire du greffon.

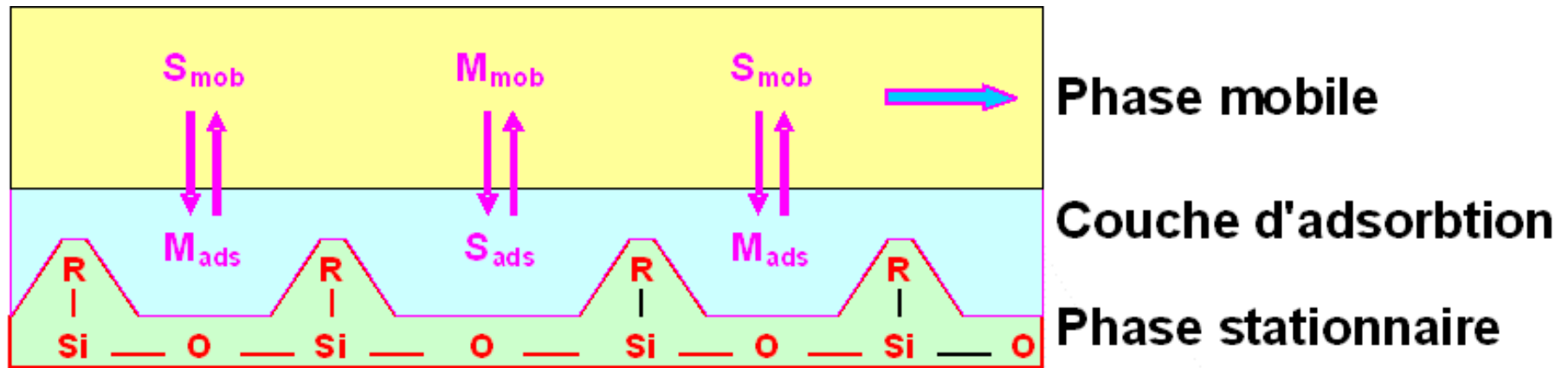
Rappelons que la phase mobile en phase inverse est constituée d'un solvant organique (méthanol ou acétonitrile) et d'eau.

Le solvant organique moins polaire a une affinité avec la phase greffée elle-même apolaire.

Les solutés qu'on cherche à séparer sont eux-mêmes apolaires et présentent donc une affinité importante avec le greffon apolaire. Le solvant organique M et les solutés S vont donc pouvoir être adsorbés à la surface de la phase stationnaire. Il va s'établir ensuite un équilibre de partage entre les composés adsorbés et les composés restés libres dans la phase mobile.

Solvant adsorbé + Soluté mobile = Solvant mobile + Soluté adsorbé

Madsorbé + Smobile = Mmobile + Sadsorbé

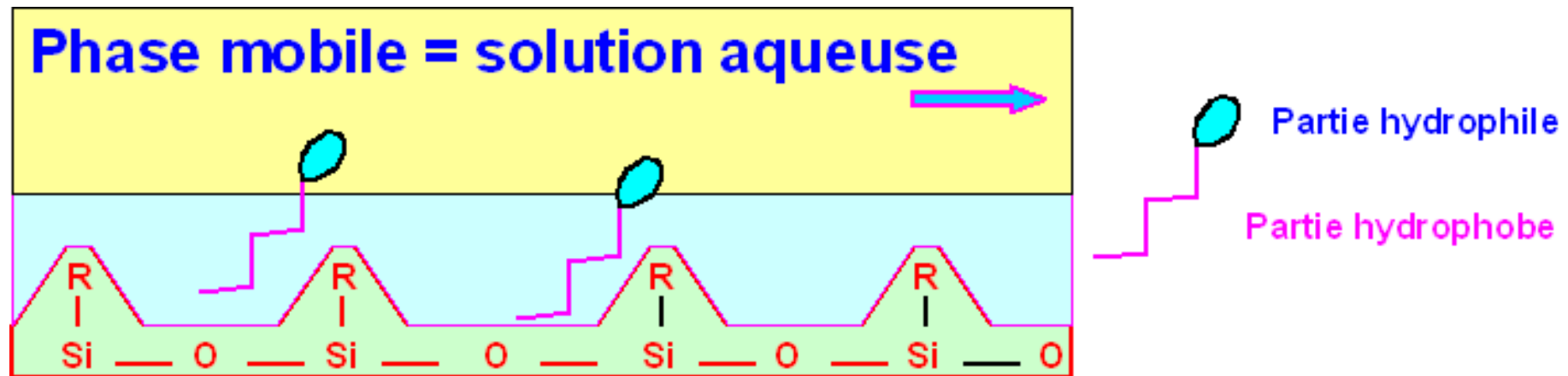


Il s'établit ainsi une suite d'équilibres successifs entre couche d'adsorption et phase mobile. Les solutés les plus polaires ayant une plus grande affinité pour la phase mobile vont être élués plus rapidement que les moins polaires ayant une plus grande affinité pour la phase stationnaire.

Ce mécanisme va être complété par le jeu des interactions entre les solutés et la phase mobile.

Interactions hydrophobes :

Les solutés présentent généralement une extrémité hydrophile et une autre hydrophobe et vont donc s'orienter en présentant leur partie hydrophobe vers la phases stationnaire et leur partie hydrophile vers la phase mobile. C'est en fait la répulsion entre la partie hydrophobe de la molécule de soluté et la phase mobile aqueuse qui oblige le soluté à pénétrer plus ou moins profondément dans la couche d'adsorption ce qui va augmenter son temps de rétention. La géométrie de cette partie hydrophobe joue aussi un rôle important, plus la surface hydrophobe est grande et plus le temps de rétention sera élevé.



La composition de l'éluant et en particulier sa tension superficielle joue aussi un grand rôle, plus la tension superficielle sera forte et plus le temps de rétention sera long.

L'eau est de tout les solvants celui qui présente la plus forte tension superficielle, aussi, plus la teneur en eau sera importante et plus les composés seront retenus par la phase stationnaire.

On pourra donc jouer sur les séparations en modifiant la teneur en eau de l'éluant, une forte proportion en solvant organique diminuera le temps d'analyse mais cela au dépend de la résolution.

Influence de la teneur en solvant organique dans la phase mobile :

On fait varier la polarité et la tension superficielle de la phase mobile en faisant varier sa teneur en solvant organique. Cela joue à la fois sur les temps de rétention et sur les facteurs de rétention k et modifie donc la qualité de la séparation.

On observe souvent une corrélation linéaire entre les logarithmes des facteurs de rétention et le logarithme de la teneur en solvant organique.

$$\log k = a \log x + b$$

x est la teneur en solvant organique exprimée en pourcentage volumique

Nous définirons plus précisément les facteurs de rétention k ultérieurement.

Aussi bien en chromatographie d'adsorption qu'en chromatographie de partage la polarité joue le plus grand rôle, il est donc important de savoir classer les diverses fonctions organiques par ordre de polarité, ce qui permettra de prévoir leur ordre d'élution relatif.

Polarité relative des principales fonctions organiques :

L'ordre relatif croissant des polarités des principales fonctions est le suivant :

**Alkyle < fluoro < chloro < nitro < aldéhyde < acétyle < hydroxyle < cétone
< amine < carboxyle < amide**

R < F < Cl < NO₂ < CHO < O-CO-CH₃ < OH < CO-R < NH₂ < COOH < CO-NH₂

Pour les groupes alkyle (interactions hydrophobes) c'est la longueur de chaîne ou la surface pour les cycles qui fixe la polarité plus les chaînes ou les surfaces seront importantes et plus la polarité sera faible.

Quand un composé comporte plusieurs fonctions on considère en premier lieu sa fonction la plus polaire.

La double liaison C = C est très polaire.

Théorie simplifiée de la chromatographie de partage

Le soluté est en équilibre entre la phase mobile et la phase stationnaire.

$$A(m) = A(s)$$

Cet équilibre de partage est régi par la constante de partage

$$K = C_S / C_M$$

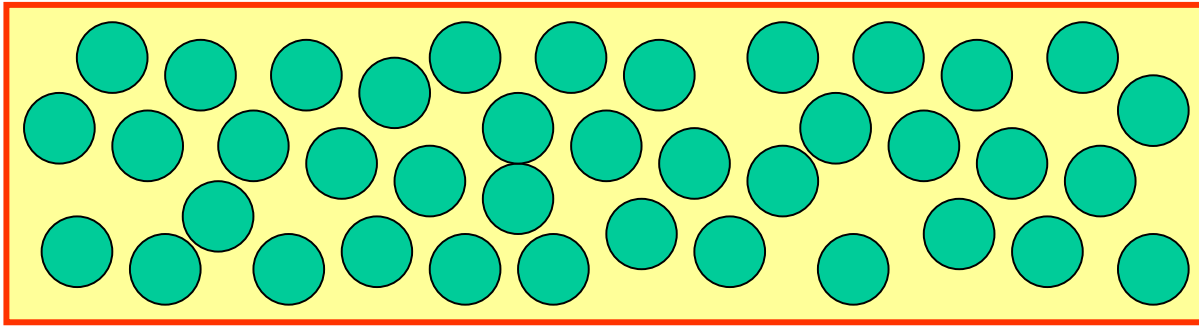
Cette constante ne dépend que de la température.

En chromatographie on utilise plutôt une grandeur proportionnelle à K qu'on désigne par le terme de facteur de rétention k .

La relation entre K et k est : $k = K V_S / V_M$

V_S est le volume de phase stationnaire contenu dans la colonne et V_M est son volume mort c'est à dire le volume « vide » de celle-ci et occupé par le solvant lors de l'utilisation de la colonne.

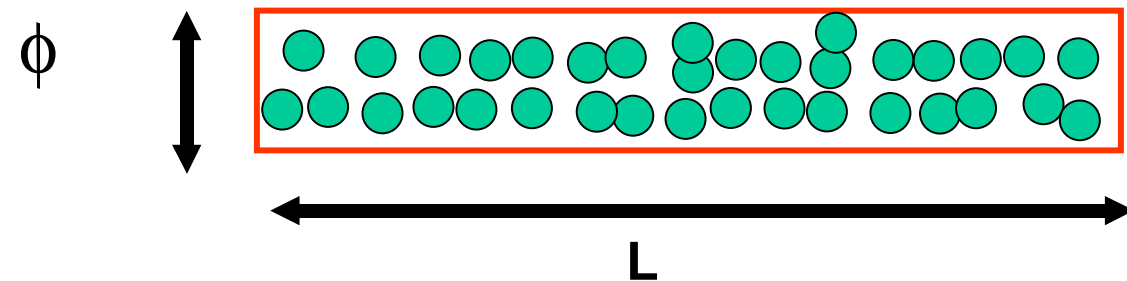
On définit la porosité de la colonne par : $p = V_M / V_S$



Volume mort V_M

Occupé par le solvant

 **Sphères de silice : Phase stationnaire - Volume occupé V_S**



Volume interne de la colonne

$$V_{int} = 1/4 L \pi \phi^2 = V_S + V_M$$

L = longueur de la colonne

ϕ = diamètre interne de la colonne

Plus le soluté aura une grande affinité avec la phase stationnaire et plus k et K seront élevés, le composé sera fortement retenu.

Son temps de rétention sera grand.

Plus le soluté aura une grande affinité avec la phase mobile et plus k et K seront faibles, le composé sera faiblement retenu.

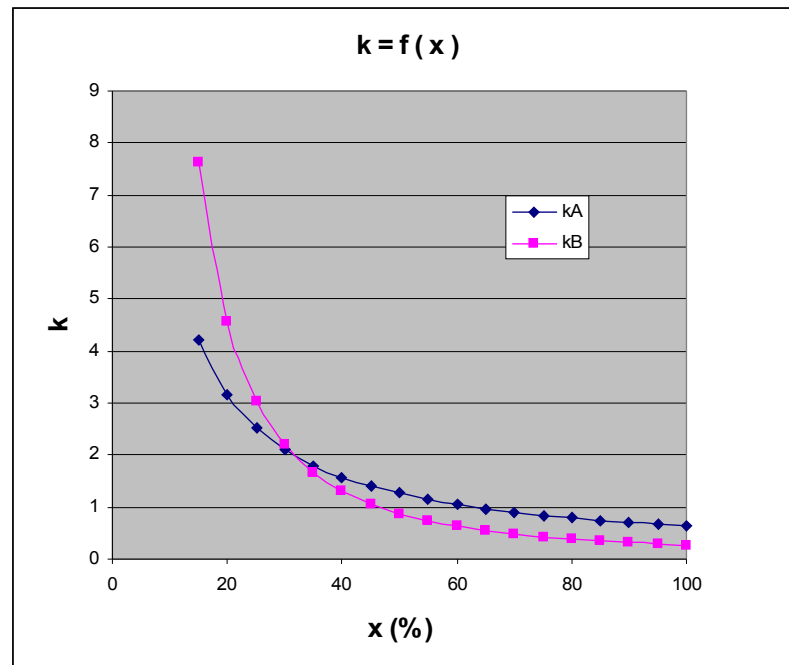
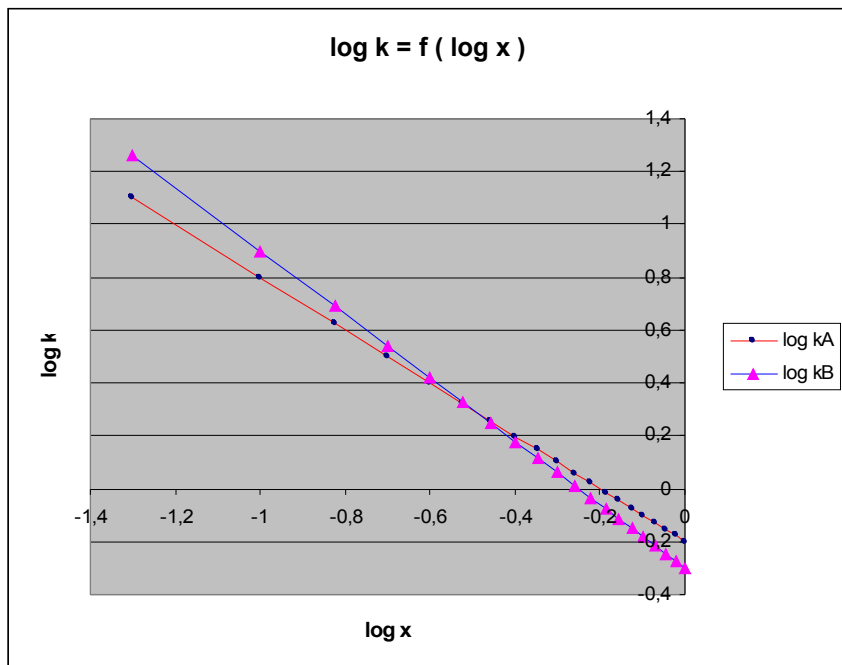
Son temps de rétention sera faible.

En phase inverse, le solvant est polaire et aqueux.

Les substances polaires et/ou peu hydrophobes seront éluées rapidement.

Les substances peu polaire et/ou très hydrophobes seront éluées tardivement.

La teneur en solvant organique du solvant permettra de jouer sur les temps de rétention des diverses substances.



On obtient généralement une corrélation linéaire, dite équation d'Everett :

$$\log k = a \log x + b$$

L'augmentation de la teneur en solvant organique x permet généralement de raccourcir les temps de rétentions et donc la durée d'analyse.

Mais les composés sont alors moins bien séparés car les valeurs de k sont proches.

On observe souvent une « inversion » de l'ordre des rétentions.

Nous reviendrons en détail sur tout cela dans la suite du cours

Sélectivité α de la séparation

On définit la sélectivité α d'une séparation par le rapport k_2/k_1 des facteurs de rétention de deux composés.

Plus α sera élevé et meilleure sera la séparation.

Efficacité N de la colonne

Par analogie avec la distillation, on définit l'efficacité N d'une colonne par son nombre de plateaux.

L'efficacité d'une colonne dépend de trois facteurs :

- 1) de sa géométrie : Plus une colonne sera longue et/ou plus son diamètre interne sera gros et plus elle sera efficace.
- 2) de son garnissage : Plus les particules de silice seront fines et plus la colonne sera efficace.
- 3) du débit de l'éluant : Il existe un débit optimal d'utilisation d'une colonne pour lequel son efficacité est la plus grande. **Loi de Van Deemter ou de Knox**

Résolution R d'une séparation

On définit la résolution R d'une séparation.

On peut montrer que cette résolution est reliée aux trois paramètres principaux : efficacité N ; sélectivité α et facteur de rétention k.

C'est la relation de Purnel :

$$R = \frac{1}{4} N^2 * (1 - \alpha) / \alpha * k_2 / (1 + k_2)$$

Pour qu'une séparation soit suffisante pour une utilisation analytique, on considère généralement que la résolution R doit être supérieure à 1,5.

Toutes ces notions, seront revues en détail dans la suite de ce cours

CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE : C.L.H.P

H.P.L.C en anglais

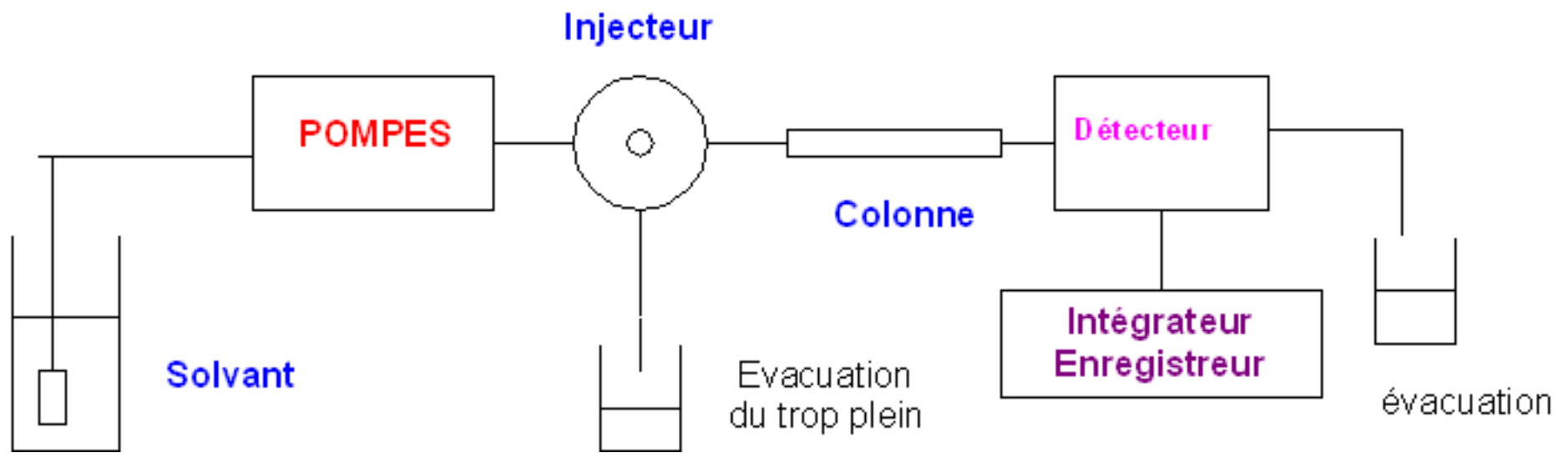
La chromatographie liquide haute performance est très utilisée dans tous les domaines de la chimie analytique.

Son succès est dû au fait qu'il est possible de modifier la résolution en jouant sur la composition de la phase mobile.

Elle utilise des colonnes remplies d'une phase stationnaire constituée de particules sphériques de très petites dimensions de diamètre couramment compris entre 2 et 5 μm ce qui conduit à de grandes efficacité et résolution. L'inconvénient est que plus les particules sont petites et plus il est difficile de faire s'écouler le solvant, on doit donc utiliser des pompes spéciales qui poussent le solvant sous des pressions très élevées.

A l'origine le P de C.L.H.P correspondait donc au mot Pression.

La grande efficacité de la technique font que le P désigne actuellement le mot Performance.



Chaîne H.P.L.C



Les pompes :

La pompe force la phase mobile à traverser la colonne dont la phase fixe très compacte crée une perte de charge qui peut atteindre 2 M Pa en utilisation courante.

On doit donc maintenir une pression extrêmement élevée en amont de l'injecteur pour vaincre cette perte de charge et permettre la traversée de la colonne par l'éluant.

La pression à imposer dépend des facteurs suivants :

- débit de la phase mobile
- viscosité de l'éluant
- taille des grains de la phase stationnaire
- géométrie de la colonne

Le tableau suivant donne une idée des pressions à imposer en fonction de ces paramètres pour un débit de 1 mL.min⁻¹ :

Eluant : Eau (Viscosité : 1,00 mPa.s)

d _{int} colonne (mm)	d particules (μm)	P (MPa)	P (bar)	P (psi)
4,6	5	10 à 15	100 à 150	1450 à 2175
2,6	10	10 à 12	100 à 120	1450 à 1740
4,6	10	2 à 5	20 à 50	290 à 725
2,6	37	0,5 à 2	5 à 20	72,5 à 290

Eluant : Hexane (Viscosité : 0,33 mPa.s)

d _{int} colonne (mm)	d particules (μm)	P (MPa)	P (bar)	P (psi)
4,6	5	3 à 5	30 à 50	435 à 725
2,6	10	3 à 4	30 à 40	435 à 580
4,6	10	0,7 à 1,6	7 à 16	101 à 232
2,6	37	0,2 à 0,7	2 à 7	29 à 101

Remarques :

Unités de pression

psi unité de pression anglo-saxonne 1 psi = 6895 Pa = 0,069 bar

1 bar \simeq 1 atm \simeq 105 Pa \simeq 14,5 psi

viscosité : Dans le système MKSA, l'unité du coefficient de viscosité η est le kg/m/s ou poiseuille. Un poiseuille est aussi équivalent à une pression multiplié par un temps soit Pa.s. En pratique, on utilise l'unité du système CGS qui est le g/cm/s ou poise.

Il en résulte que : 1 poiseuille = 10 poises = 1 Pa s

Pour donner un exemple, la valeur de η de l'eau à 20°C est de 0,01 poise ou 1 centipoise ou un millipoiseuille ou 1 mPa.s.

Les pompes doivent répondre aux exigences suivantes :

- fournir des pressions élevées jusqu'à 400 bars
- débit stable, non pulsé et réglable de 0,1 à 10 mL/min avec un contrôle meilleur que 0,5 %
- résistance à la corrosion quelque soit le solvant utilisé.

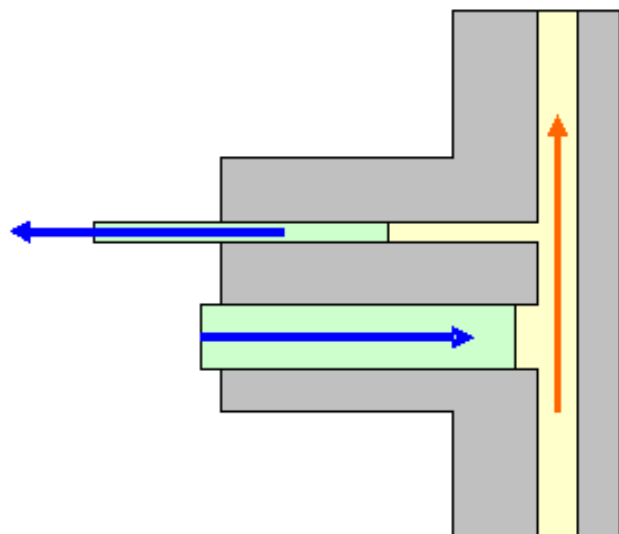
Pour des débits standard (0,1 à 10 mL/min), On utilise des pompes débitmétriques conçues pour maintenir un débit stable et non pulsé, on utilise pour cela deux pistons de tailles ou de courses différentes.

Un des pistons situé en amont a un volume deux fois plus important que l'autre situé en aval.

Pendant que le gros piston amont refoule il remplit le petit piston aval.

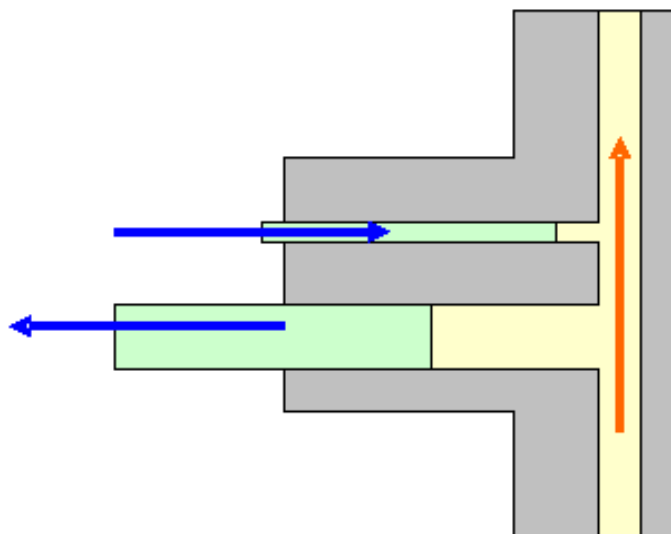
Pendant qu'il aspire, le petit piston refoule à son tour et le débit est donc maintenu constant. (Voir la figure)

Aval = aspiration



Amont = refoulement

Aval = refoulement



Amont = aspiration

- Phase 1** : le gros piston **Amont** refoule le liquide.
- La moitié du volume part dans le circuit
 - La moitié du volume remplit le petit piston **Aval**

- Phase 2** : le gros piston **Amont** aspire le liquide.
- La moitié du volume part tout de même dans le circuit
 - par le petit piston **amont** qui refoule

Allure de la courbe du débit en fonction du temps :
le débit est quasiment constant à part de petites
oscillations périodiques à chaque inversion du rôle
des pistons.

Remarques :

- 1) Pour des débits très faibles (de 1 μL à 0,1 mL/min) on utilise des pompes « seringues » mues par un moteur à vitesse linéaire constante.
- 2) Les pressions élevées utilisées en HPLC ne présentent pas de risque d'explosion en raison de l'incompressibilité des liquides et des solides, un problème mécanique se traduit généralement par une simple fuite du solvant.

Il existe deux modes de fonctionnement :

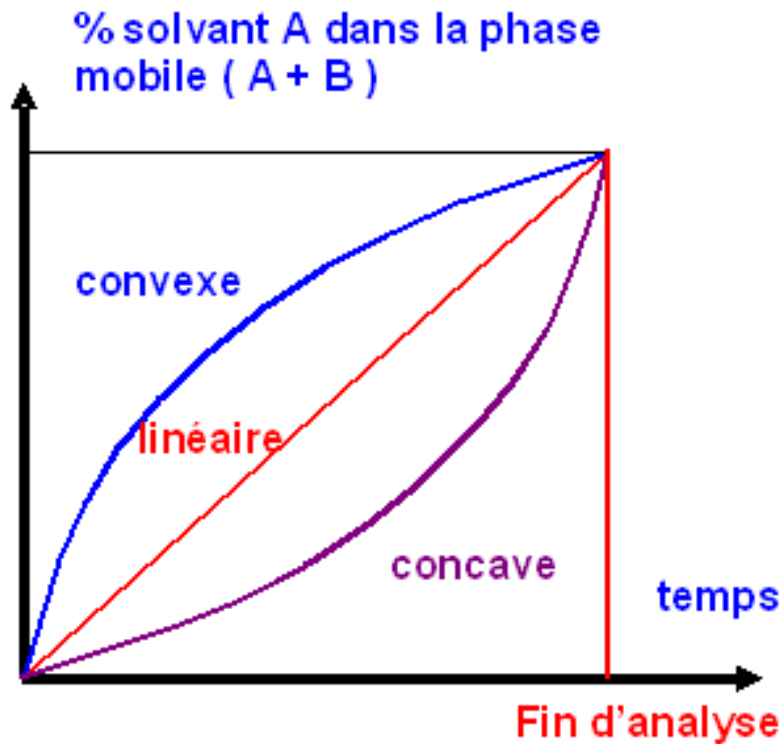
- Le mode isocratique pour lequel la composition de la phase mobile est fixe.
- Le mode gradient de solvant pour lequel on fait varier la composition du solvant en cours d'analyse en vue d'améliorer les séparations et surtout de raccourcir les temps d'analyse.

Les gradients de solvant nécessitent des pompes particulières permettant de faire varier la composition du mélange éluant.

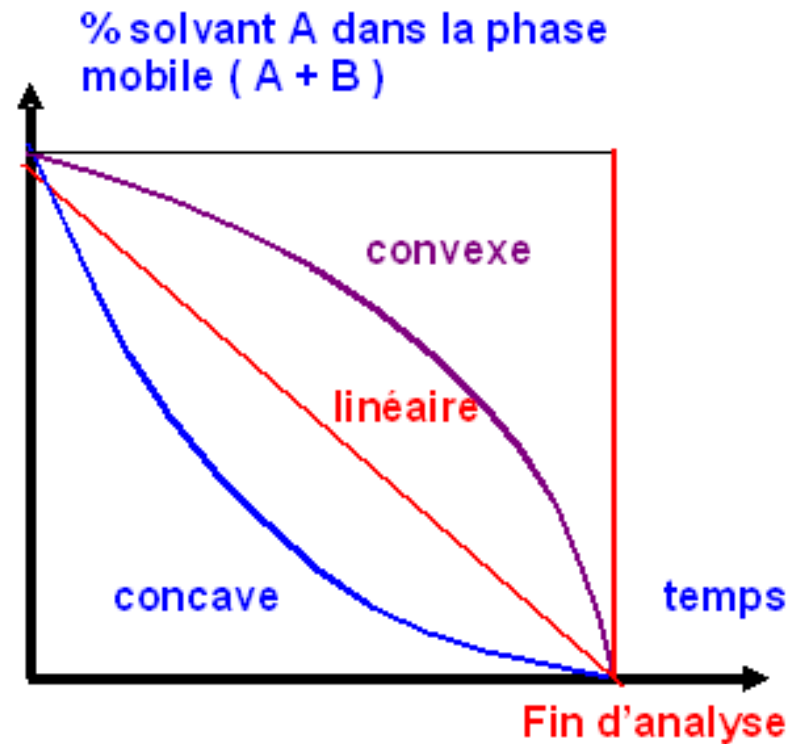
Cette variation est programmable, l'utilisateur définissant à l'avance le profil du gradient désiré selon les objectifs prévus.

On utilise principalement trois types de profil : linéaire – concave ou convexe

On peut aussi les combiner entre eux.



Gradient avec élévation de la teneur en A au cours du temps

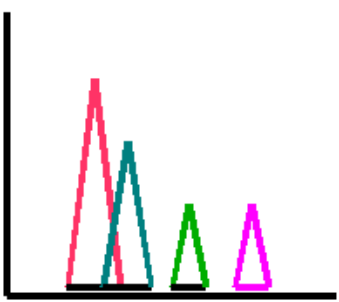


Gradient avec diminution de la teneur en A au cours du temps

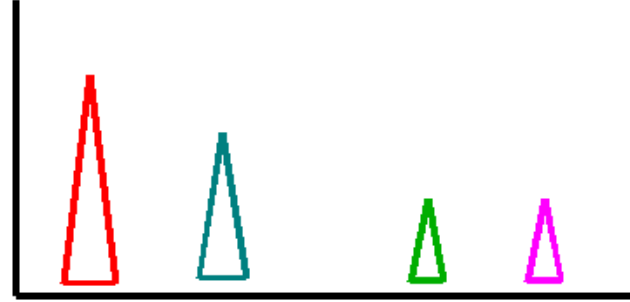
La programmation d'un gradient d'élution a pour principal intérêt de modifier la polarité du solvant en cours d'analyse pour obtenir la meilleure séparation possible dans un temps d'analyse raisonnable.

Exemple

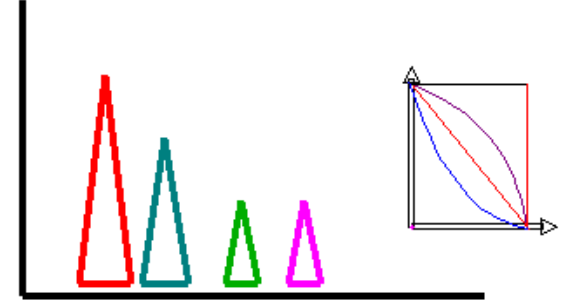
Intérêt d'un gradient de solvant



Solvant A
Mauvaise séparation mais
temps d'analyse raisonnable



Solvant B
Bonne séparation mais
temps d'analyse excessif

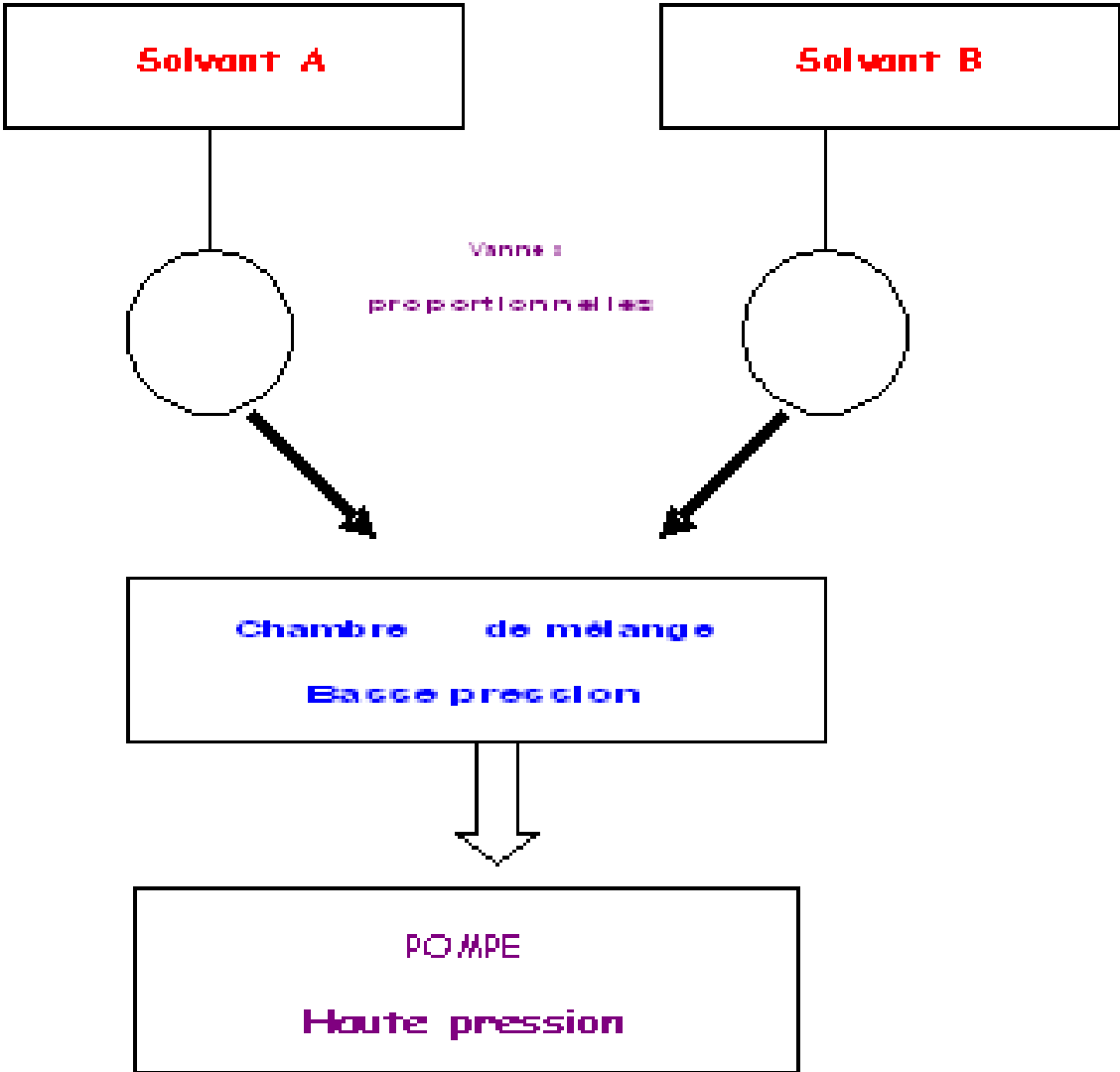


Gradient de solvant
Bonne séparation et temps
d'analyse raisonnable

Dans la pratique on procède par tâtonnement pour obtenir le résultat le plus satisfaisant. Les appareils actuels peuvent ainsi mélanger jusqu'à 4 solvants différents dont chacun peut lui-même être déjà un mélange de solvants différents il y a donc de grandes possibilités en ce domaine.

Nous reviendrons plus précisément sur ces gradients de solvant dans la suite de ce cours.

Bien entendu ce type de chromatographie nécessite des pompes particulières. On utilise le plus souvent un jeu de vannes proportionnelles pour mélanger les divers solvants dans une chambre de mélange à basse pression avant d'envoyer le mélange dans la pompe à haute pression.



Dans tous les cas on complète le dispositif avec divers éléments de régulation de la pression et du débit en particulier pour amortir les pulsations. Nous ne rentrerons pas plus dans les détails ici....

Injecteurs :

L'injection doit se faire de manière très rapide afin de perturber le moins longtemps possible le régime de circulation du solvant.

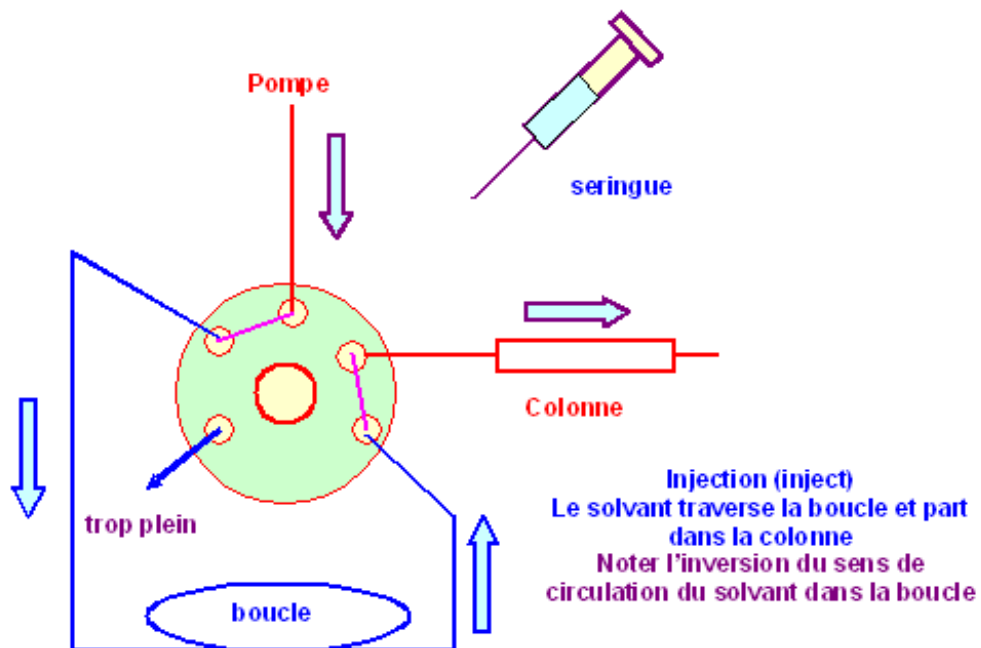
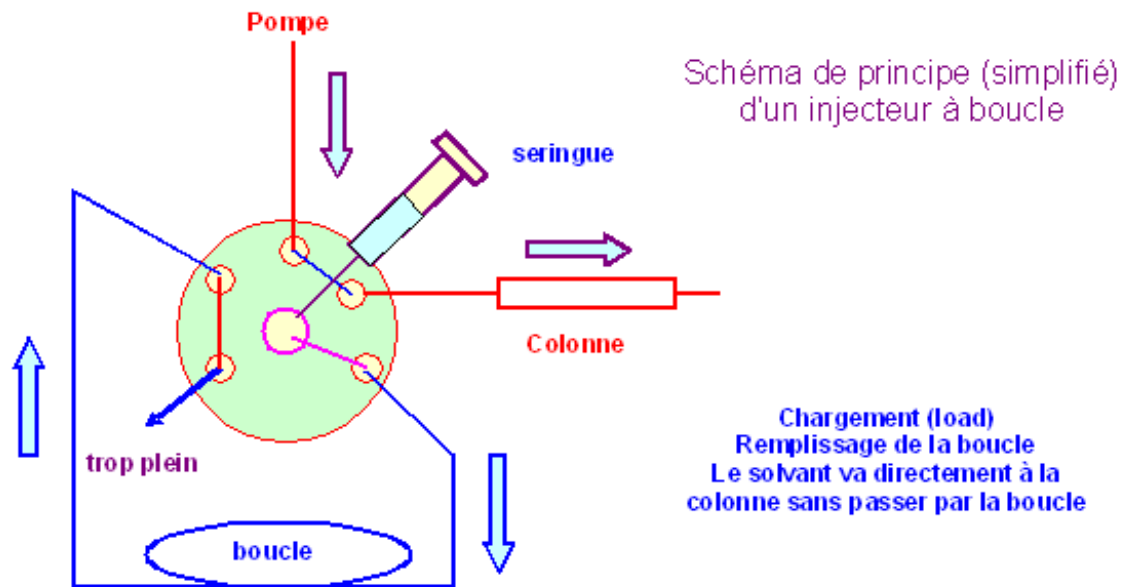
On doit injecter rapidement un volume précis sans stopper l'écoulement du solvant à un endroit où règne une pression très élevée ($P > 100$ bars).

L'injecteur le plus répandu est l'injecteur à boucle :

On utilise une vanne haute pression à plusieurs voies qui permet d'isoler la boucle du circuit pour la remplir puis de la remettre dans le circuit pour l'injection, avec inversion du sens de circulation du solvant dans la boucle (voir schémas).

Ce système permet une bonne reproductibilité à condition de remplir entièrement la boucle.

Le remplissage de la boucle se fait grâce à une seringue, le volume de la boucle est variable de 1 à 100 μL la seringue utilisée est de capacité plus grande et le trop plein est évacué.



La colonne

C'est la partie active du système, c'est elle qui joue le rôle prépondérant. La colonne est un cylindre calibré généralement en acier inoxydable parfois doublé d'un matériaux inerte (verre ou plastique spéciaux). Son diamètre varie de 0,5 à 5 mm et sa longueur de 0,5 à 30 cm. La phase stationnaire est maintenue entre deux disques frittés.

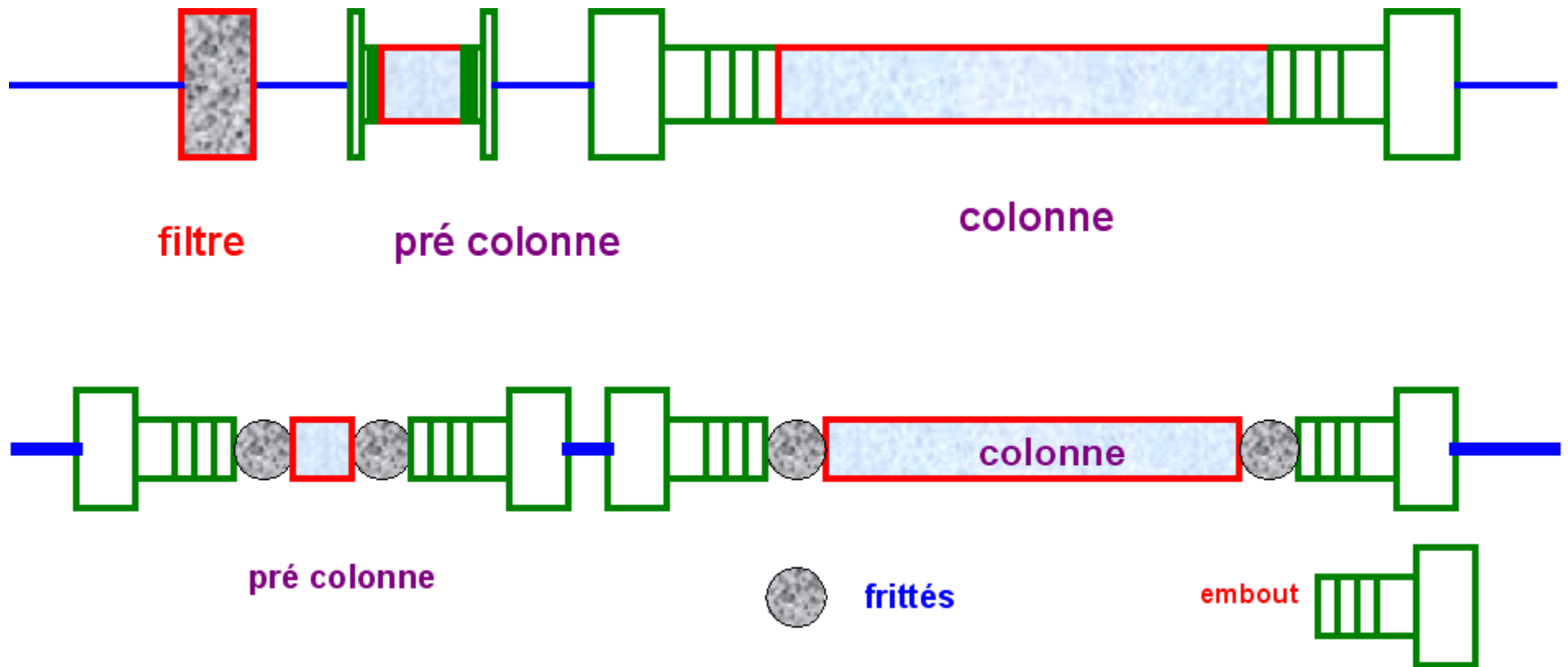
Performance moyenne des colonnes :

Les colonnes standard on une longueur comprise entre 10 et 30 cm avec un diamètre intérieur de 4 à 10 mm. Elles sont remplie de phase stationnaire de granulométrie de 5 à 10 μm . Leur efficacité est de l'ordre de 50000 plateaux/m soit une H.E.P.T de l'ordre de grandeur de 20 μm .

Remarque : Il existe aussi des micro colonnes de longueur 3 à 7 cm et de diamètre interne de 1 à 5 mm, remplie de phase stationnaire de granulométrie de 3 à 5 μm . Leur efficacité est alors de 100000 plateaux / m. Ces micro colonnes présentent le double intérêt de la rapidité et de l'économie de solvant.

Protection de la colonne :

La colonne est souvent précédée d'une pré colonne remplie de la même phase stationnaire très courte (0,5 à 1 cm). Le rôle de la pré colonne est de fixer les composé dont l'affinité avec la phase stationnaire est trop élevée et qui ne migrent pas dans les conditions utilisées. La pré colonne est changée périodiquement.

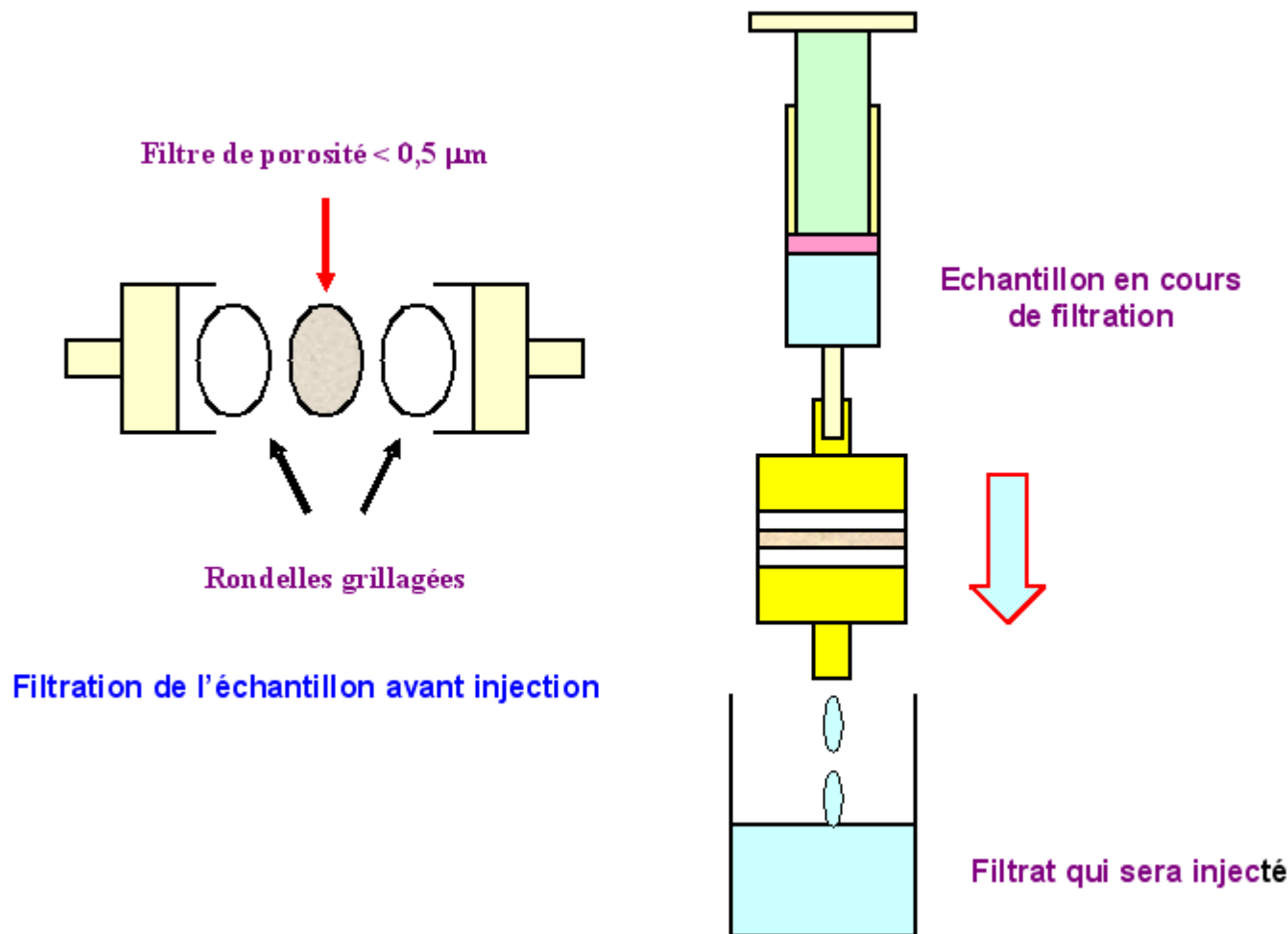


Filtration de l'échantillon :

On utilise souvent un système de filtration de porosité inférieure à $0,5 \mu\text{m}$ pour fixer les micro particules qui à la longue pourrait colmater la colonne, ce système de filtration peu être intégré au circuit H.P.L.C entre injecteur et colonne, mais on peu aussi procéder en amont en filtrant l'échantillon avant injection.

On utilise alors une seringue pour pousser l'échantillon à travers un filtre de très faible porosité dont la nature dépend du solvant utilisé (aqueux ou purement organique) , une fois l'échantillon filtré on procède à son injection.

On protège ainsi également l'injecteur qui peut être obstrué par des particules insolubles.



Vieillesse des colonnes :

Les colonnes si elles sont bien utilisées avec les précautions décrites précédemment ont une grande durée de vie. Elle vieillissent néanmoins et perdent de leur efficacité.

On constate souvent après plusieurs heures d'utilisation une dérive de la ligne de base qui est souvent due à des composés fortement retenus qui passent petit à petit.

On peut alors procéder à un lavage (ou purge) de la colonne avec un éluant de grande force qui va entraîner tous les composés retenus.

D'autre part, on procède à l'enregistrement d'un chromatogramme de référence le jour de la première mise en service d'une colonne neuve, ce chromatogramme de référence est gardé et quand on a un doute sur l'efficacité de sa colonne il suffit de procéder dans les mêmes conditions à l'enregistrement du chromatogramme du même mélange pour vérifier le bon état de sa colonne.

Stockage des colonnes :

Les colonnes non utilisées doivent être hermétiquement bouchées imprégnées avec un solvant approprié (très souvent le méthanol) pour éviter un assèchement très néfaste. Selon le type de phase stationnaire on utilisera un solvant de stockage différent comme le précise le tableau suivant :

Type de colonne	Solvant de stockage
C1, C2 , C6, C8, C18, phényle	Méthanol
Silice, CN, NH2, PAC, Diol	Héxane ou méthanol
DEAE, CM, SAX, SCX	Méthanol

Avant stockage on procède généralement à une séquence de nettoyage avec plusieurs solvants : Ces séquences sont aussi utilisées pour les séquences de purge décrites précédemment.

Séquences pour les colonnes les plus courantes :

Silices vierges :

Hexane 50 mL – Dichlorométhane 50 mL – Isopropanol 50 mL – dichlorométhane 30 mL – solvant de stockage 50 mL (ou éluant si purge)

Phase inverse : **C1, C2 , C6, C8, C18, phényle,**

Eau distillée 50 mL – Méthanol 50 mL – Acétonitrile 50 mL –THF 50 mL – Méthanol 50 mL – (Eluant si purge)

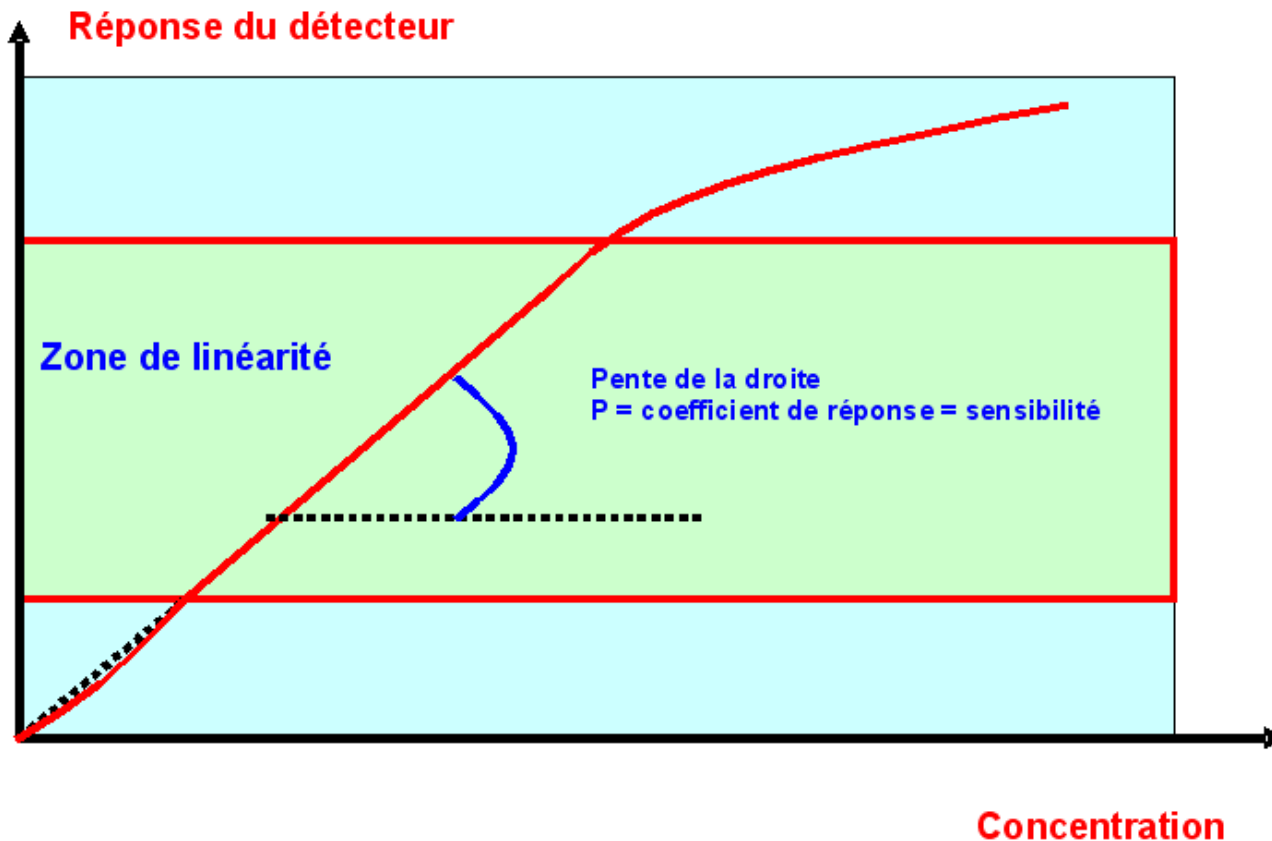
Phase normale : CN, NH2, Diol, PAC

Chloroforme 50 mL – Dichlorométhane 50 mL – Isopropanol 50 mL – dichlorométhane 30 mL – solvant de stockage 50 mL (éluant si purge)

Le détecteur :

Il existe de nombreux types de détecteurs mais tous doivent avoir un certain nombre de caractéristiques pour pouvoir être utilisés :

1) Réponse proportionnelle à la concentration de la substance détectée



2) Sensibilité élevée. C'est la pente de la droite. Réponse = k (Concentration) plus cette pente sera élevée et plus le détecteur sera sensible à de faibles variations de concentration.

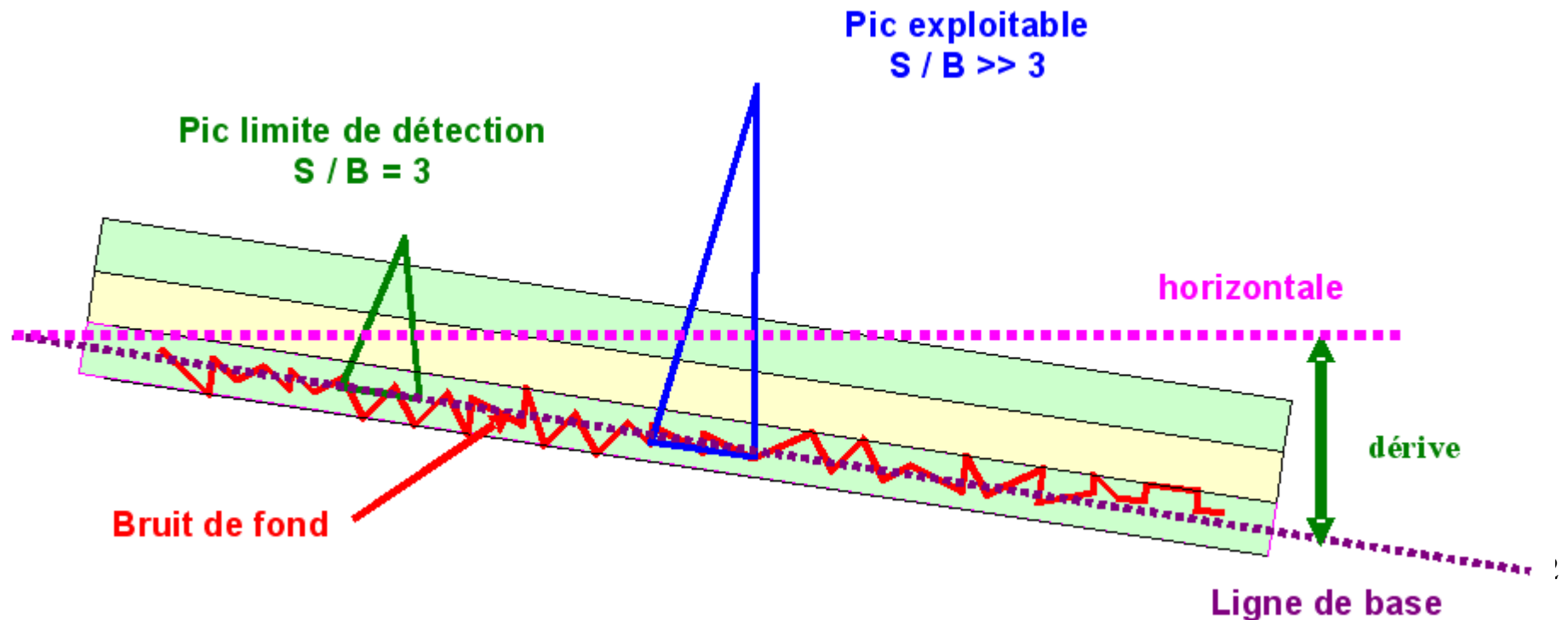
3) Inertie la plus faible possible : le détecteur doit avoir une réponse rapide et réagir instantanément aux variations de la concentration. Il doit également avoir un volume mort aussi petit que possible.

4) Grande stabilité du signal : ligne de base horizontale (dérive minimale) et la moins bruitée possible

Pour qu'un pic soit exploitable on considère généralement que son rapport S/B signal / bruit doit être au moins de trois.

Le bruit se traduit par des oscillations plus ou moins marquées autour de la ligne de base, ce bruit de fond aléatoire provient de diverses causes : variation de température, de la pression, instabilité électronique, etc..

Par ailleurs on doit avoir une ligne de base aussi proche que possible de l'horizontale c'est la dérive de la ligne de base.



Détecteur par spectroscopie UV-Visible

Il 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 longueur d'ondes fixe de 254 ou 280 nm ou à longueur d'ondes variable entre 190 et 800 nm ou à longueurs d'ondes multiples comme les réseaux de diodes.

Ce type de détection U.V est la plus répandue, elle présente de nombreux avantages :

- Très forte sensibilité on peut détecter des analytes jusqu'à des concentrations de l'ordre de 10^{-8} mole.L⁻¹.
- Grande sélectivité : on peut en choisissant bien sa longueur d'onde ne détecter que le produit qu'on veut analyser ce qui simplifie le chromatogramme en supprimant les pics indésirables.
- Les détecteurs pouvant mesurer l'absorbance à quatre longueurs d'ondes simultanément ou ceux à réseau de diodes traçant le spectre permettent de s'assurer de l'homogénéité d'un pic et ainsi se rendre compte d'une possible co-élution simultanée de deux composés différents non résolus.
- 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 utiliser en mode gradient d'élution.

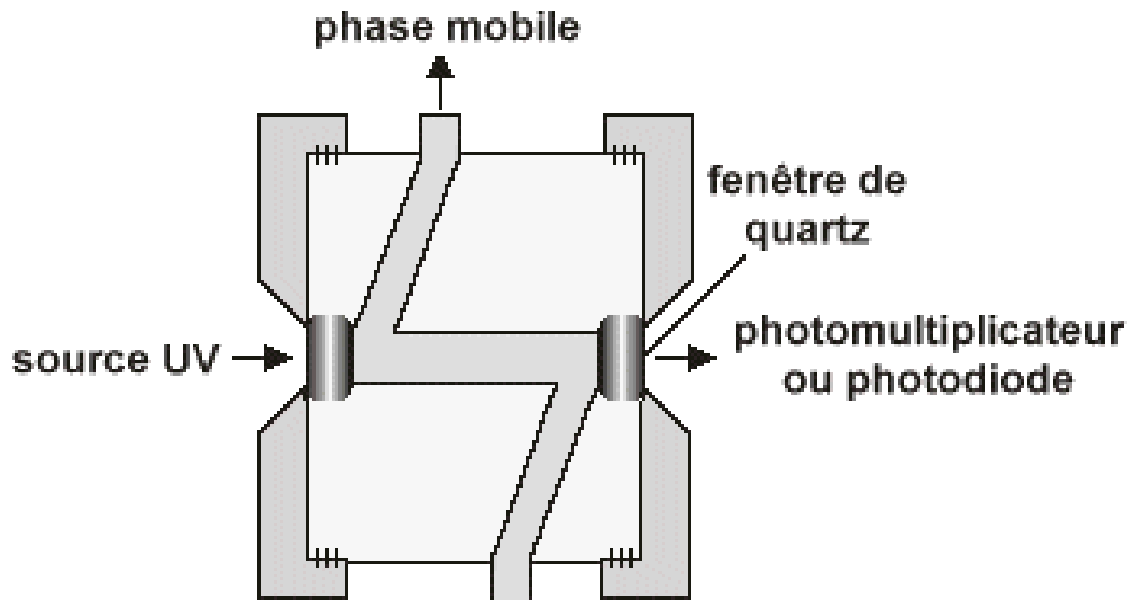
L'inconvénient principal est que pour pouvoir être détectée la substance doit posséder des groupement chromophores (doubles liaisons par exemple).

Détection monochromatique :

La détection ne se fait alors que pour une seule longueur d'onde.

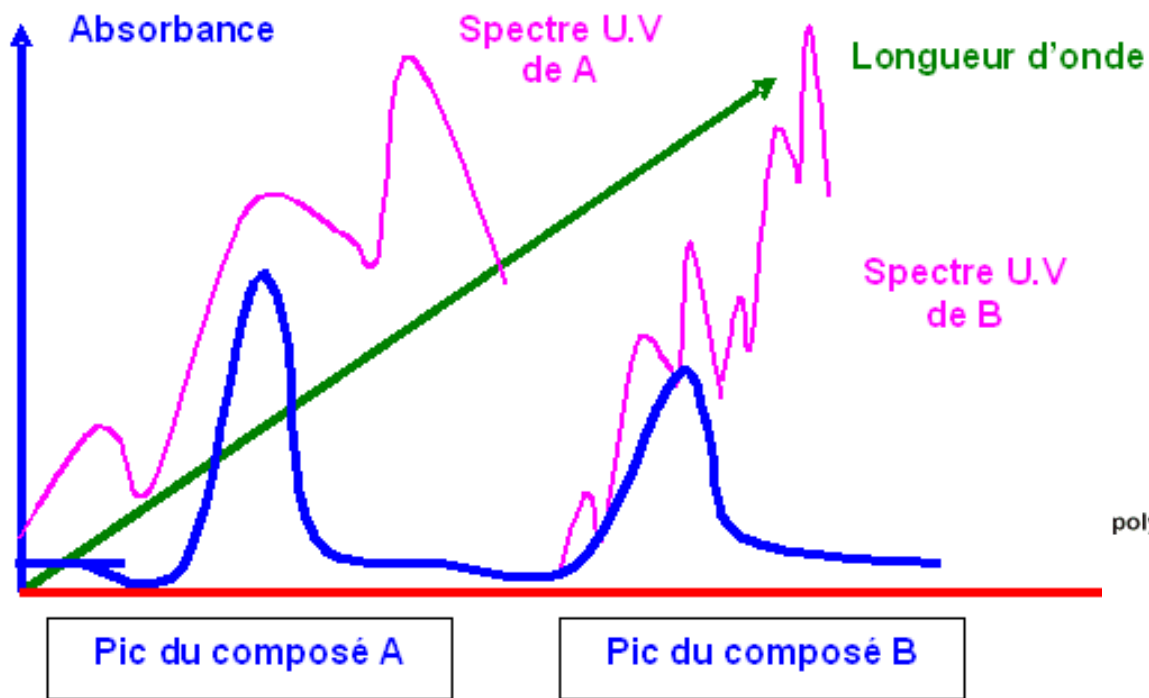
Le modèle de base est composé de :

- une source monochromatique (lampe au deutérium ou au mercure)
- monochromateur isolant une bande étroite (10 nm) ou une raie (raie à 254 nm du mercure par exemple)
- d'une cellule de circulation de volume faible (5 mL) avec un trajet optique de 1 mm à 1 cm.
- d'un analyseur optique (photo multiplicateur ou photodiode)

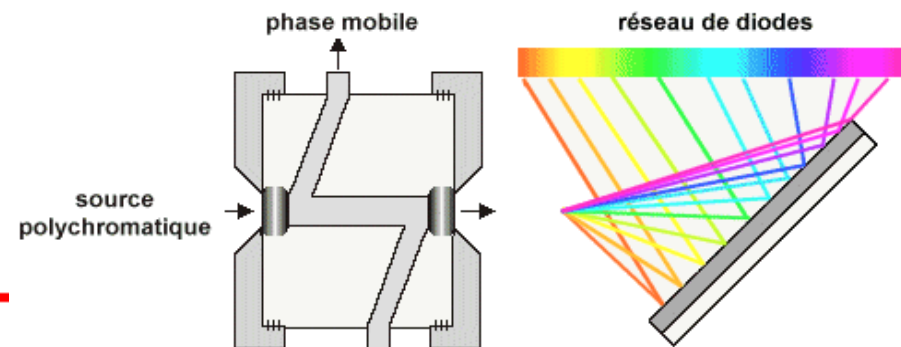


Détection polychromatique :

Les détecteurs plus perfectionnés permettent d'acquérir simultanément le spectre à plusieurs longueurs d'ondes ou de changer de longueur d'onde en cours d'analyse. On peut aussi grâce à un réseau de diodes mesurer l'absorbance simultanément dans tout un domaine du spectre, on obtient ainsi le spectre UV de l'analyte ce qui permet son identification. Dans la pratique les spectres sont stockés en mémoire et sont visualisables par la suite à l'aide d'un logiciel approprié. On obtient un « spectro-chromatogramme en trois dimension » : t_R , A , λ



chromatogramme

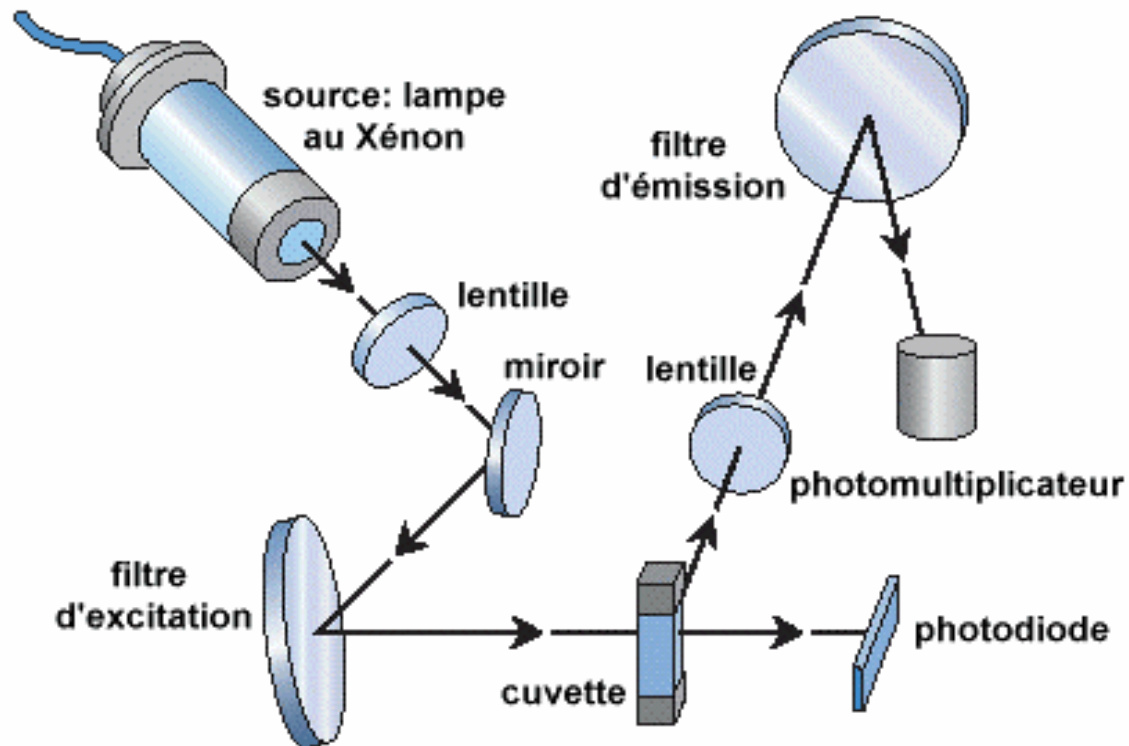


Détecteur fluorométrique :

Certaines substances sont fluorescentes, c'est à dire qu'elle réémettent sous forme de lumière une partie de l'énergie qu'elle reçoivent d'une source lumineuse excitatrice.

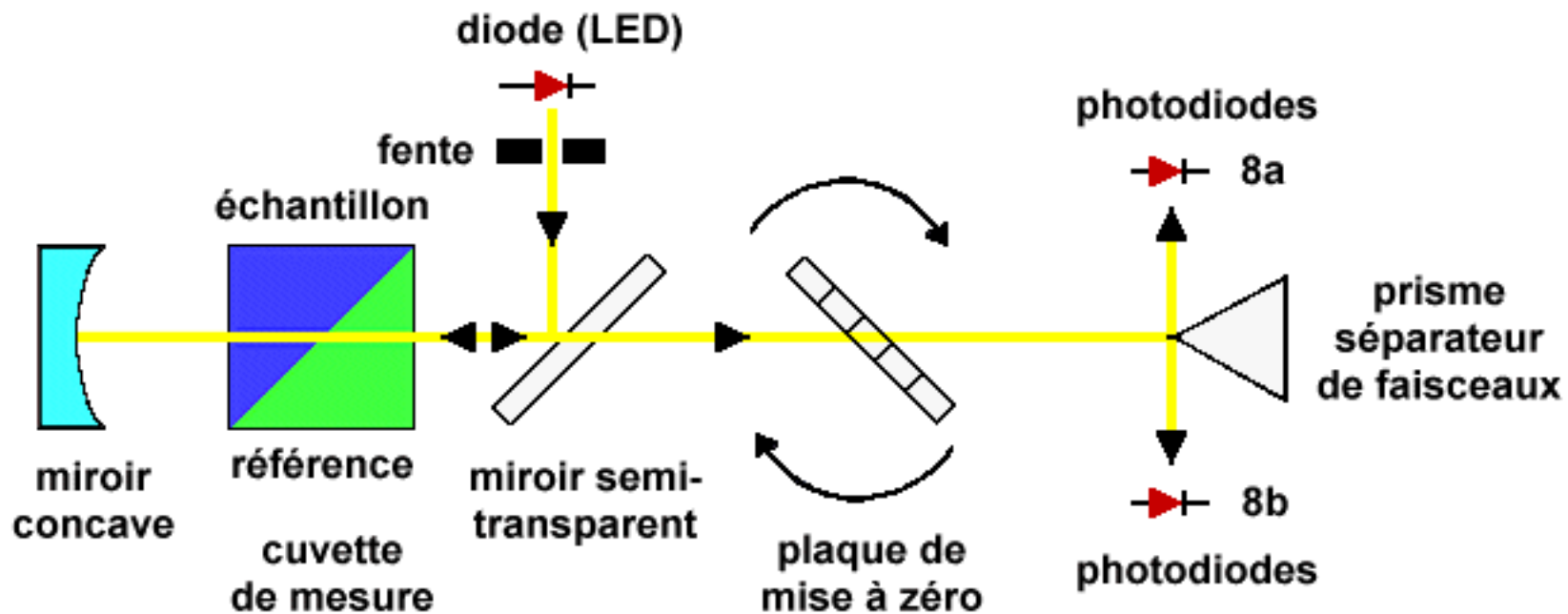
On observe la lumière réémise dans une direction perpendiculaire à celle de la source excitatrice, l'intensité lumineuse est proportionnelle a la concentration de la substance si cette concentration est suffisamment faible.

Ce type de détecteur est très sensible (100 à 1000 fois plus que le détecteur U.V) et très sélectif. On peut étendre son champ d'application en transformant par une réaction appropriée une substance non fluorescente en une autre qui le sera. Environ 15% des composés chimiques sont naturellement fluorescent ce qui restreint quelque peu son utilisation. Ce type de détecteur est utilisable en mode gradient.



Détecteur réfractométrique :

Il mesure la variation de l'indice de réfraction entre l'éluant pur et l'éluant en sortie de colonne. La présence d'un analyte modifie l'indice de réfraction et le composé peut être détecté. Il est pratiquement universel mais très peu sensible, il est de plus sensible aux variations de températures. Il est inutilisable en mode gradient sauf si les solvants utilisés ont des indices de réfraction très proches. Les pics obtenus peuvent être positifs ou négatifs selon que l'indice de réfraction augmente ou diminue



Autres détecteurs :

Il existe d'autres types de détecteurs :

Conductimétriques ; infra-rouge ; light scattering ; électrochimiques ; RMN et spectro de masse etc dont nous ne parlerons pas ici.

Si vous vous désirez en savoir plus à ce sujet voyez les sites internet donnés dans l'outil favori en particulier :

<http://www.rocler.qc.ca/pdubreui/chromatographie/HPLC/chroma4.html> dont j'ai utilisé certains schémas pour illustrer ce paragraphe.

L'intégrateur- enregistreur :

Il s'agit en fait d'un petit ordinateur qui récupère toutes les données issues des détecteurs, trace les chromatogrammes et intègre la surface des pics. Il imprime un rapport d'analyse donnant les temps de rétentions et les surfaces de chaque pic.

On peut le programmer pour qu'il fasse seul les divers calculs conduisant aux concentrations à partir de chromatogrammes étalon et des chromatogrammes des mélanges analysés. Lorsque les pics sont mal séparés on peut par approximation gaussienne déduire la surface des pics individuels et donc évaluer tout de même les concentrations. Ce type d'appareil évolue constamment et nous n'en feront donc pas de description qui serait de toute façon rapidement obsolète.

Application analytique de l'H.P.LC

La CLHP est très utilisée comme méthode d'analyse qualitative et quantitative, la plupart des contrôles de qualité et divers dosages de l'industrie chimique, la plupart des analyses biologique etc.. sont actuellement largement effectués grâce a cette technique qui peut être entièrement automatisée pour toutes les analyses de routine dont les conditions opératoires sont parfaitement connues et maîtrisées.

On utilise alors des injecteurs automatiques des échantillons dont le principe est le même que celui décrit plus haut. Toute l'analyse est automatisée et c'est l'intégrateur-enregistreur ou un micro ordinateur qui pilote tout le processus : injection, pilotage des pompes en cas de gradient, tracé et exploitation quantitative du chromatogramme. On prépare à l'avance tous les échantillons à analyser et les étalons utilisés, tous ces échantillons sont placés sur un système automatique (souvent un plateau tournant), l'analyse est lancée (souvent pendant la nuit) et il ne reste plus qu'à récupérer les résultats (le lendemain matin !).

L'analyse qualitative consiste à identifier les analytes par leur temps de rétention qui pour des conditions données (solvant, débit, colonne etc) est caractéristique du composé. Il peut bien sur arriver que deux composés différents mais très proches aient le même temps de rétention. On doit donc s'assurer préalablement qu'un pic donné correspond bien à un seul analyte. C'est l'objet de toute la phase de mise au point des conditions opératoires utilisées.

On admet ici pour la suite que chaque pic correspond à un seul composé.

Analyse quantitative

Principe : La surface d'un pic est proportionnelle à la quantité injectée de l'analyte correspondant. On doit au préalable s'assurer que cette condition indispensable est bien remplie. Comme vu plus haut, le détecteur ne donne une réponse linéaire que pour une certaine gamme de concentration, on doit donc impérativement se placer dans cette zone de réponse linéaire et mettre au point les dilutions nécessaires de l'échantillon et des étalons pour qu'il en soit ainsi.

On a alors :

$$A = k_m m$$

A = aire du pic

m : masse du composé injectée.

k_m : coefficient de réponse massique du détecteur dans les conditions utilisées.

Dans la pratique, on injecte les composés en solution et on préfère utiliser les concentrations plutôt que les masses. Il y a proportionnalité entre la masse injectée et la concentration du soluté, à condition de toujours injecter le même volume de solution. On écrira donc :

$$A = k_c C$$

A = aire du pic

C : concentration du composé injectée.

K_c est le coefficient de réponse du détecteur.

Méthode de l'étalon externe :

On doit disposer du produit à doser à l'état pur pour pouvoir déterminer son coefficient de réponse k_C .

Pour cela on prépare une gamme de solutions étalons que l'on injecte tour à tour.

Si la gamme des concentrations a été bien choisie, on obtient une droite d'étalonnage passant par l'origine. Si ce n'est pas le cas on modifie la gamme des concentrations utilisée pour se placer au cœur de la zone de réponse linéaire du détecteur. On peut alors par régression linéaire déterminer l'équation de la droite d'étalonnage. $A = a C + b$

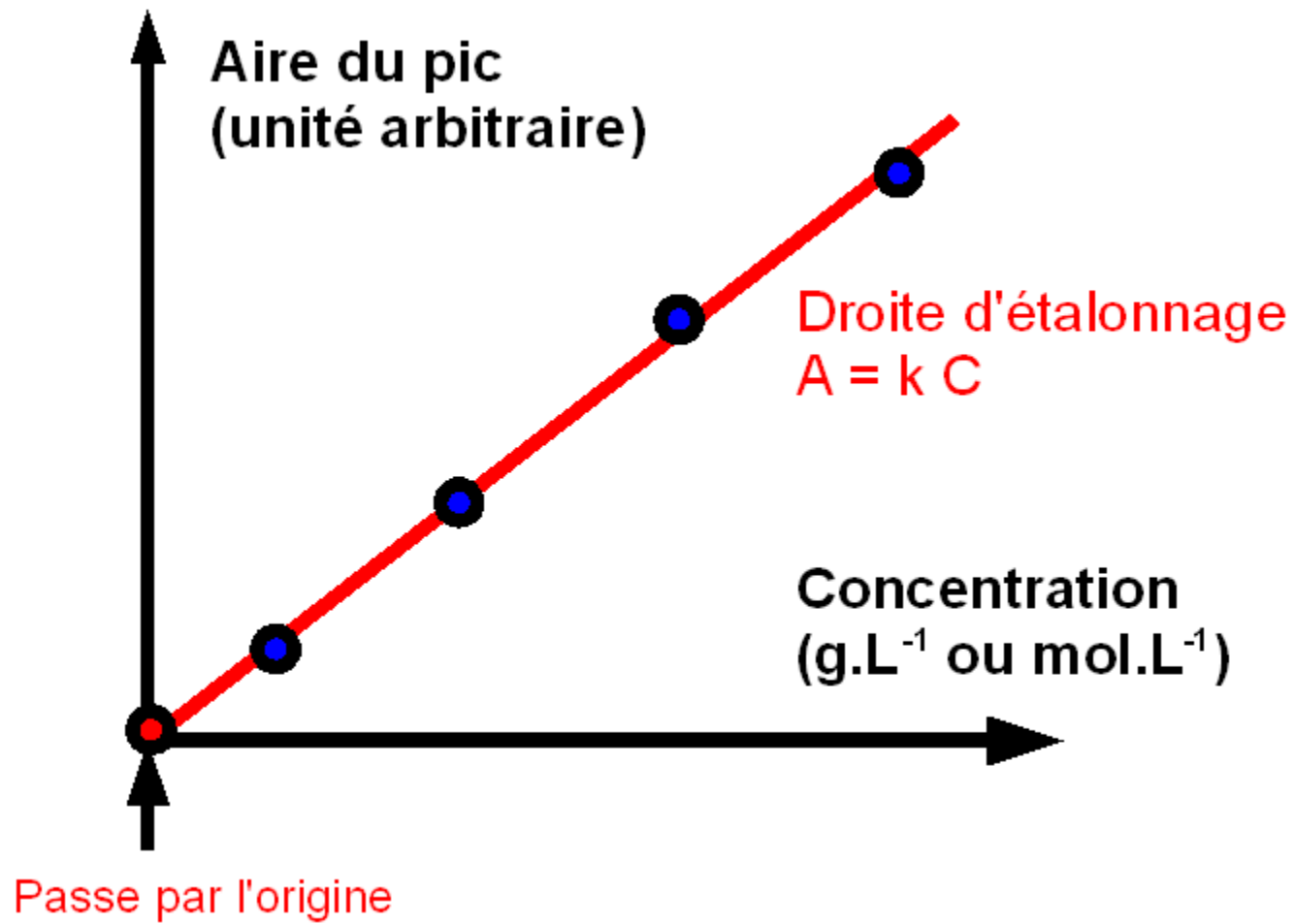
Si les conditions chromatographiques ont été bien choisies on obtient bien une droite passant par l'origine : $b = 0$ et $k_C = a$

Il peut arriver si les pics ne sont pas parfaitement résolus que la droite d'étalonnage ne passe pas parfaitement par l'origine. On pourra alors déterminer le terme b et en tenir compte par la suite. Il peut arriver aussi que par erreur un des points ne soit pas aligné, on pourra éventuellement supprimer ce point et ne pas en tenir compte.

Il suffit ensuite d'injecter la solution inconnue, à partir de l'aire du pic A_x on pourra calculer la concentration correspondante : $C_x = A_x / k_C$.

Si la droite d'étalonnage ne passe pas par l'origine :

$$A_x = a C_x + b \text{ et } C_x = (A_x - b) / a$$



Cette méthode est la plus précise et la plus fiable mais on préfère parfois simplifier le processus en n'injectant qu'une seule solution étalon.

La droite d'étalonnage est obtenue en supposant qu'elle passe par l'origine et on pose donc $k_C = A_{\text{étalon}} / C_{\text{étalon}}$
Soit $C_X = A_X / k_C = C_{\text{étalon}} A_X / A_{\text{étalon}}$

Si les conditions chromatographiques sont correctes et bien reproductibles, on obtient de très bons résultats avec cette méthode simplifiée qui est très largement utilisée pour les analyses de routine.

On fait toujours par principe, plusieurs analyses du même échantillon pour s'affranchir d'erreurs expérimentales et on calcule une valeur moyenne de la concentration sur plusieurs injections.

La solution étalon est de même injectée à intervalles réguliers pour évaluer et corriger une éventuelle dérive de l'appareillage...

Aplication N°1 : Analyse H.P.L.C d' amines aromatiques

Conditions

Column: Discovery C18, 15 cm x 4.6 mm, 5 µm particles

Mobile Phase: methanol/water (60:40)

Flow Rate: 1 mL/min

Temp: 30°C

Det: 254 nm UV

Inj: 10µL, 1 µg/mL each analyte

Analyte Data

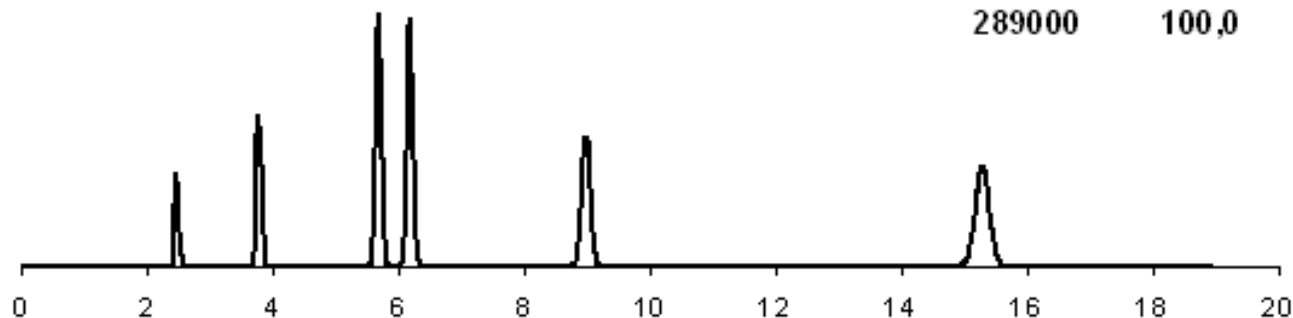
- 1. Aniline**
- 2. N-Ethylaniline**
- 3. N-Propylaniline**
- 4. N,N-Dimethylaniline**
- 5. N-Butylaniline**
- 6. N,N-Diethylaniline**

Voir les chromatogrammes obtenus page suivante

A partir des chromatogrammes déterminer quand cela est possible, la nature et la concentration des composés présents dans l'échantillon.

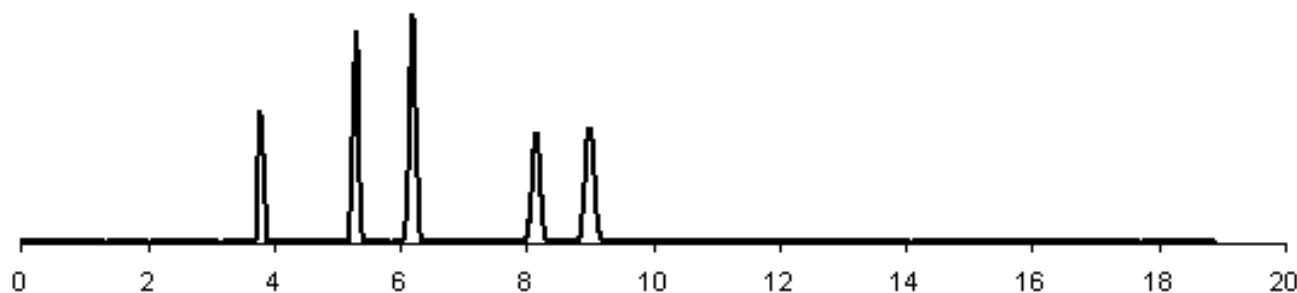
Chromatogramme Etalon

		RAPPORT D'ANALYSE			
Aniline	Pic 1 : C = 1 mg/L	Pic	tR	AREA	% AREA
II-éthylaniline	Pic 2 : C = 1 mg/L	1	2,50	25000	8,7
II-propylaniline	Pic 3 : C = 1 mg/L	2	3,80	35000	12,1
II-II-diméthylaniline	Pic 4 : C = 1 mg/L	3	5,70	57000	19,7
II-butylaniline	Pic 5 : C = 1 mg/L	4	6,20	62000	21,5
II-II-diéthylaniline	Pic 6 : C = 1 mg/L	5	9,00	50000	17,3
		6	15,30	60000	20,8
				289000	100,0



Chromatogramme Echantillon

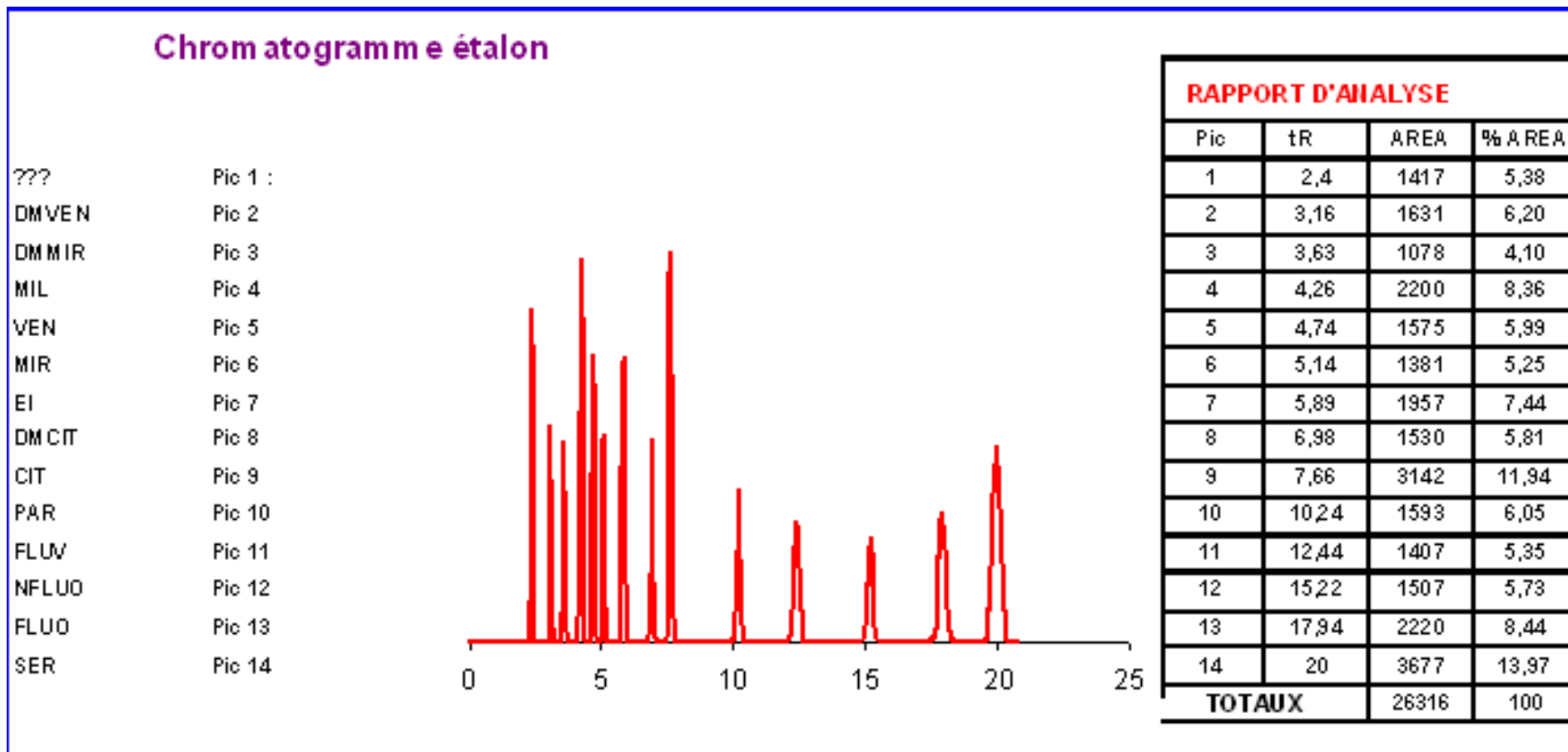
RAPPORT D'ANALYSE			
Pic	tR	AREA	% AREA
1	3,80	26250	13,7
2	5,30	42400	22,1
3	6,20	49600	22,1
4	8,15	31000	16,1
5	9,00	37500	26,0
		186750	100



Exercice d'application N°2 : Analyse HPLC d'antidépresseurs

On obtient le chromatogramme suivant pour une solution étalon contenant 13 antidépresseurs à la même concentration de 20 mg/L.

Le premier pic correspond à une impureté contenue dans le solvant.



Méthode de l'étalon interne :

Cette méthode est très utilisée en chromatographie gazeuse, elle consiste à ajouter à la solution à doser une substance (absente naturellement) à une concentration connue, toujours la même dans tous les échantillons à doser. Elle présente l'avantage de s'affranchir des erreurs au niveau du volume injecté qui peut varier légèrement d'une injection à l'autre.

On prépare une gamme de solutions étalon contenant le produit à doser à une concentration connue (mais variable) C_e et l'étalon interne à la concentration connue et toujours la même C_{int} .

On injecte la gamme des solutions étalon et on porte le rapport des aires des pics obtenus A_e / A_{int} en fonction de C_e

On obtient une droite d'étalonnage dont on peut déterminer l'équation par régression linéaire :

$$A_e/A_{int} = a C_e + b$$

Comme précédemment cette droite passe généralement par l'origine et il est possible d'opérer avec une seule solution étalon.

L'intérêt de la méthode est que si le volume d'injection varie A_e et A_{int} sont modifiés dans les mêmes proportions et leur rapport n'est donc pas modifié, on s'affranchit donc des erreurs d'injection.

Exercice d'application

On désire analyser une poudre contenant entre autres deux substances A et B.
On procède de la manière suivante :

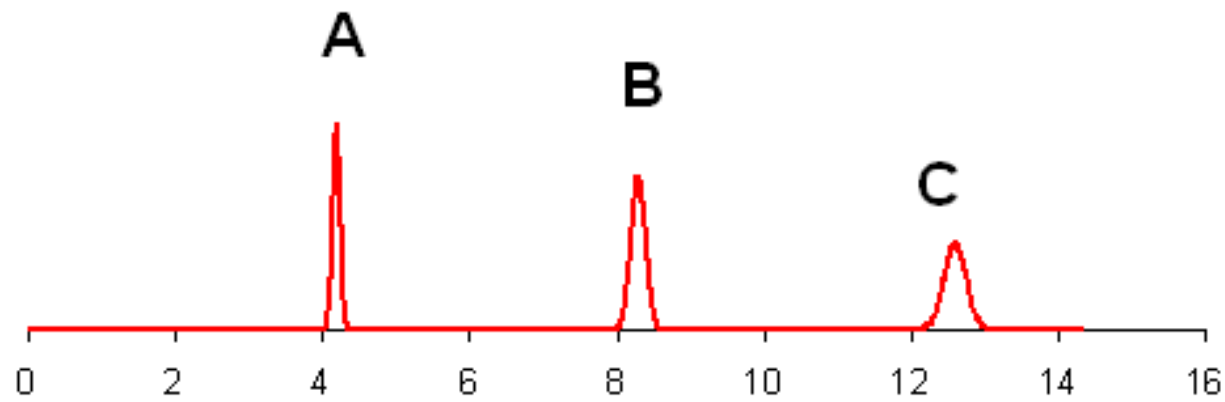
Préparation l'échantillon à analyser.

- On prélève 1,015 g de poudre qu'on traite par extraction liquide-solide.
- La totalité de l'extrait alcoolique obtenu est transvasé dans une fiole jaugée de 50 mL et on complète à 50 mL avec de l'alcool. On obtient ainsi l'extrait alcoolique (E).
- On prélève 5 mL de cet extrait alcoolique (E) qu'on introduit dans une fiole jaugée de 100 mL.
- On ajoute alors 5 mL d'une solution de la substance C de concentration $C_C = 2 \text{ g/L}$
- On complète à 100 mL avec de l'eau distillée.
- On obtient ainsi la solution (S).
- On injecte la solution (S) obtenue en HPLC et on obtient le chromatogramme échantillon.

On prépare ensuite une solution étalon en introduisant dans une fiole jaugée de 50 mL :

- 10 mL d'une solution de la substance A de concentration $C_A = 1 \text{ g/L}$
- 10 mL d'une solution de la substance B de concentration $C_B = 2 \text{ g/L}$
- 2,5 mL d'une solution de la substance C de concentration $C_C = 2 \text{ g/L}$
- On complète à 50 mL avec de l'eau distillée.
- Cette solution est injectée en HPLC et on obtient le chromatogramme Etalon.

Chromatogramme étalon



RAPPORT D'ANALYSE			
Pic	tR	AREA	% AREA
1	4,2	2562124	26,99
2	8,3	3763512	39,65
3	12,6	3166326	33,36
TOTAUX		9491962	100

QUESTIONS

- 1) Quel est l'intérêt d'ajouter la substance C pour tracer les chromatogrammes ?
- 2) Au vu des rapports d'analyse est-il nécessaire d'utiliser la méthode de l'étalon interne ?
- 3) Déterminer la concentration des substances A et B dans la solution (S).
- 4) Déterminer la concentration des substances A et B dans l'extrait alcoolique (E).
- 5) Déterminer les teneurs en A et B de la poudre initiale (on exprimera le résultat sous forme de pourcentages en masse de A et B) .