

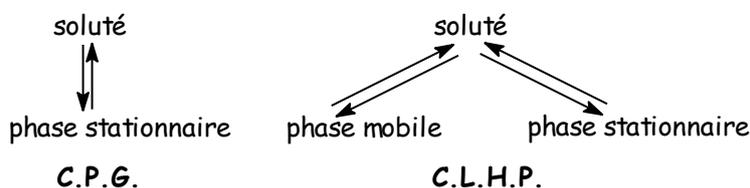
Chromatographie liquide haute performance (CHLP)

La chromatographie liquide haute performance (CHLP en français, HPLC en anglais) est une technique analytique très générale d'emploi. Elle correspond à une évolution de la chromatographie sur colonne. Pour améliorer les performances de celle-ci (en particulier l'efficacité de la résolution), il faut diminuer la taille des particules utilisées pour constituer la phase stationnaire ; mais plus les grains sont petits, plus la durée de l'élution et de la séparation est grande. Il faut donc utiliser **des pompes très performantes pour maintenir un débit d'éluant suffisant et constant à travers la colonne**. Des pressions de plusieurs centaines de bars sont nécessaires pour assurer des débits raisonnables avec les nouveaux supports dont la taille des particules est comprise entre 3 et 10 μm . Alors, la vitesse de la phase mobile de l'ordre de 0,1 à 1 $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$, vitesses comparables à celles de la CPG.

I. Comparaison avec la chromatographie en phase gazeuse (CPG)

1. La CHLP est souvent plus efficace que la CPG dans le cas de séparations difficiles.

Il n'y a en CPG que des interactions du soluté avec la phase stationnaire alors qu'en CHLP il y a des interactions du soluté avec la phase stationnaire et avec la phase mobile d'où des possibilités beaucoup plus grandes.



Les phases stationnaires sont beaucoup plus variées en CHLP qu'en CPG, en particulier on peut opérer par échange d'ions, par exclusion, alors que c'est impossible en CPG. La température est beaucoup moins élevée qu'en CPG, la CHLP se pratiquant le plus souvent à température ordinaire.

2. Différences avec la CPG

Les coefficients de diffusion dans les liquides sont 10^4 à 10^5 fois plus faibles que dans les gaz. De ce fait, la vitesse des échanges entre phase stationnaire et phase mobile est faible ce qui fait que l'on est obligé de travailler avec des vitesses lentes, ce qui explique la lenteur des séparations. La viscosité des liquides est environ 100 fois plus grande que celle des gaz. Les liquides sont incompressibles jusqu'à 300 bars environ alors que les gaz sont compressibles.

3. Avantages de la CHLP par rapport à la CPG

Seulement 20% des substances organiques connues peuvent être analysées en CPG. On ne peut pas utiliser cette méthode pour séparer des substances peu volatiles (cas des substances telles que $M > 300 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), des substances sensibles à une élévation même modérée de la température, des substances ionisées. Un avantage important de la CHLP tient à ce que la préparation de l'échantillon avant son injection est souvent plus simple qu'en CPG. Ainsi, il n'est pas toujours nécessaire, préalablement à l'analyse, d'extraire les substances à chromatographier du milieu où elles se trouvent. Certaines séparations difficiles peuvent être obtenues en CHLP alors qu'elles ne peuvent pas l'être en CPG.

II. Description de l'appareillage

1. Schéma de principe d'un système de CHLP

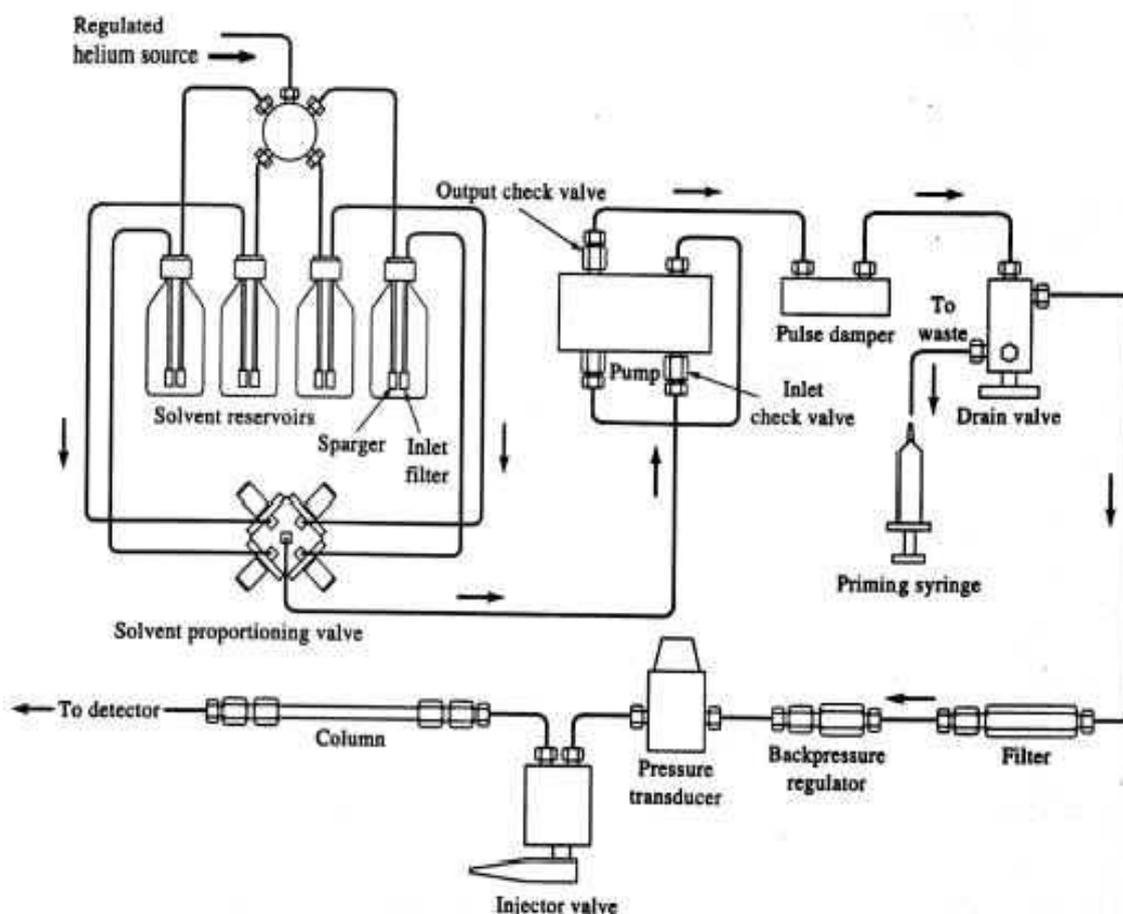


Figure 28-4 Schematic of an apparatus for HPLC. (Courtesy of Perkin-Elmer Corporation, Norwalk, CT)

2. Réservoir de phase mobile et traitement de la phase mobile

Les appareils sont équipés d'un ou plusieurs réservoirs contenant chacun au moins 500 mL de solvant. On y adjoint souvent des dispositifs qui permettent d'en éliminer les poussières et les gaz dissous qui sont gênants à la fois pour la résolution des pics et aussi pour le fonctionnement du détecteur. L'élution peut se faire avec un seul solvant de composition constante, elle est dite *isocratique* ou à l'aide d'un mélange de deux solvants de polarités différentes en proportions variables, elle est dite alors à *gradient d'élution*. Le rapport des volumes des deux solvants qu'on mélange est modifié de manière continue ou discontinue, selon un programme préétabli. La programmation de solvant est destinée à améliorer l'efficacité de la séparation, tout comme la programmation de température du four en chromatographie en phase gazeuse.

3. Pompes

Les pompes demeurent la partie la plus délicate de l'appareillage car elles doivent répondre à des critères rigoureux :

- obtention de pressions pouvant aller jusqu'à 420 bars,
- débit compris entre $0,1$ et $10 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ et le plus régulier possible,
- résistance à la corrosion quel que soit le solvant utilisé ...

Les pompes les plus utilisées comportent deux pistons, ce qui permet de régulariser le débit.

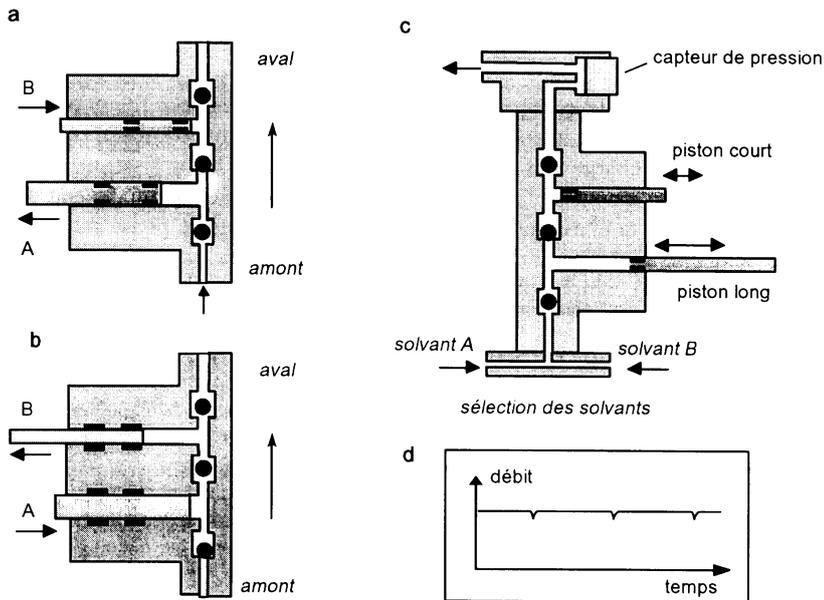


Schéma d'un corps de pompe à deux têtes en série

a. aspiration par le gros piston et refoulement par le petit

b. situation inversée, pour régulariser le débit

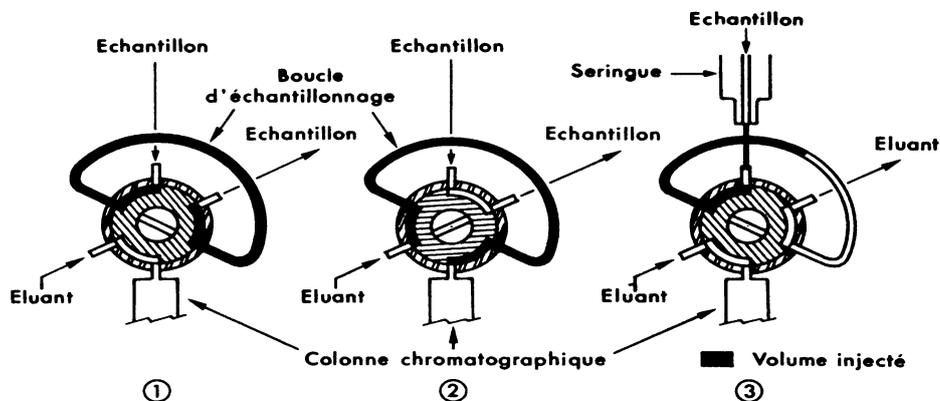
c. montage à deux pistons de même diamètre mais dont l'un a une course (et une vitesse) double de celle de l'autre

d. graphe montrant les variations de débit en fonction du mouvement des pistons au cours du temps

Si l'éluant a une composition fixe pendant toute la durée de l'élution (chromatographie en mode isocratique), une seule pompe suffit. Par contre, si on fait varier la composition de l'éluant au cours de l'analyse, plusieurs pompes sont nécessaires.

4. Injecteur

L'injecteur le plus courant est une vanne d'injection à boucle représenté ci-dessous.



① remplissage total de la boucle avec l'échantillon

② injection du contenu de la boucle sur la colonne

③ remplissage partiel de la boucle avec l'échantillon

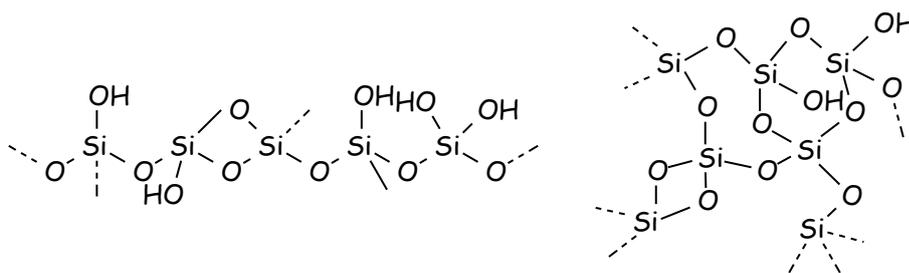
Dans la position chargement, la vanne fait communiquer la pompe et la colonne. L'échantillon, en solution, est introduit à l'aide d'une seringue dans un petit volume tubulaire appelé boucle. Dans la position injection, l'échantillon, gardé dans la boucle à pression atmosphérique, est inséré dans le flux de phase mobile. Des conditions de bonne reproductibilité sont atteintes si la boucle est totalement remplie par l'échantillon. L'injection doit se faire en un temps très bref afin de perturber le moins longtemps possible le régime établi dans la colonne et le détecteur. Il faut introduire en tête de colonne, sans stopper la circulation de la phase mobile, un volume précis d'échantillon (compris entre 5 et 500 μL), là où la pression dépasse souvent 10^4 kPa.

5. Colonne et phase stationnaire

La colonne est un tube droit, en acier, d'une longueur de 3 à 25 cm et d'un diamètre intérieur de 0,5 à 5 mm. La phase stationnaire est maintenue entre deux disques poreux situés aux extrémités. Le débit de la phase mobile ne peut dépasser quelques $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Il existe des microcolonnes d'une longueur de 5 cm et d'un diamètre de 0,3 mm pour lesquelles le débit de la phase mobile ne peut dépasser quelques $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Ces colonnes ont l'avantage de consommer très peu d'éluant et de conduire à une meilleure résolution.

5.1. Le gel de silice est le matériau de base pour le remplissage des colonnes

Le gel de silice utilisé a très peu de choses à voir avec la silice cristalline SiO_2 qui sert de matière première à son élaboration. Il est sous forme de microsphères d'un diamètre le plus constant possible, de l'ordre de 2 à 5 μm .

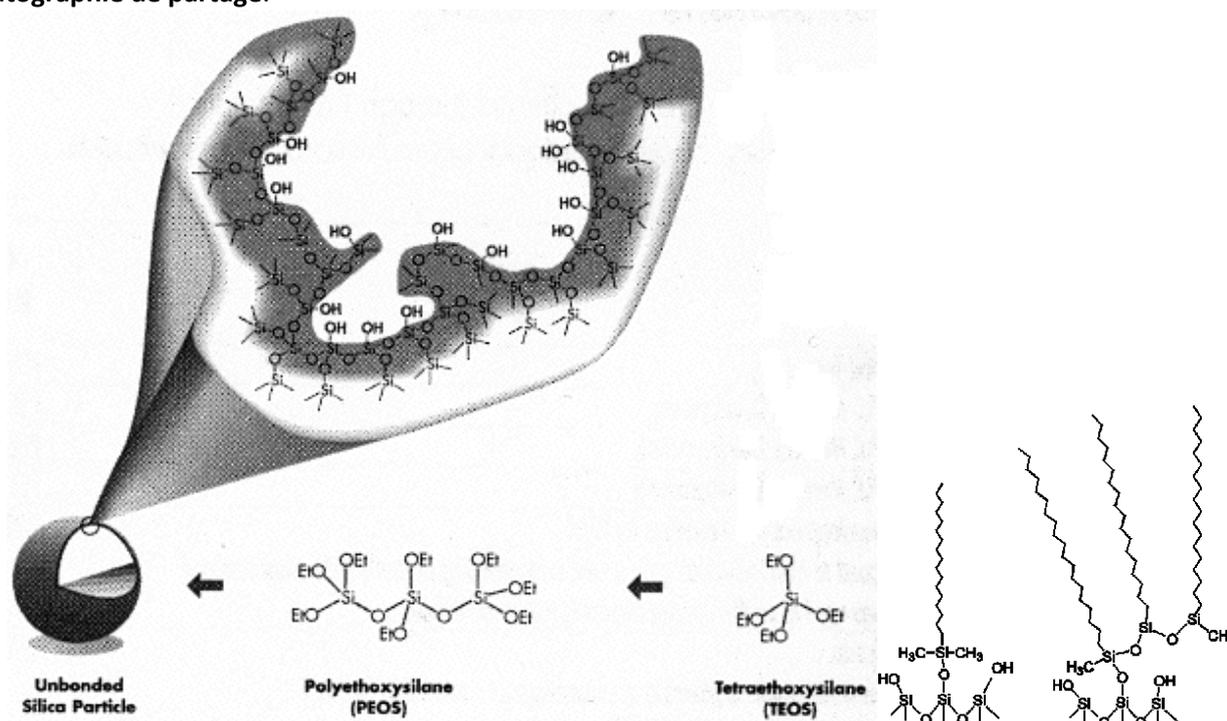


Représentations de la surface du gel de silice employé en chromatographie

La qualité du gel de silice dépend de plusieurs paramètres parmi lesquels la structure interne, la taille des grains, la dimension et la répartition des pores, la surface spécifique, la résistance à l'écrasement et la polarité. Le **gel de silice** étant **très polaire** (les groupements silanols $-\text{Si}-\text{OH}$ ont un pK_a comparable à celui du phénol, de l'ordre de 10), son mécanisme d'action repose sur l'**adsorption**.

5.2. Les silices greffées

Le gel de silice évolue au cours du temps, ce qui entraîne un manque de reproductibilité des séparations. Pour y remédier et pour diminuer la polarité du gel de silice, on fixe des molécules organiques par des liaisons covalentes sur les fonctions silanols. La **phase stationnaire greffée** se comporte alors comme un liquide et la séparation est due à une **chromatographie de partage**.

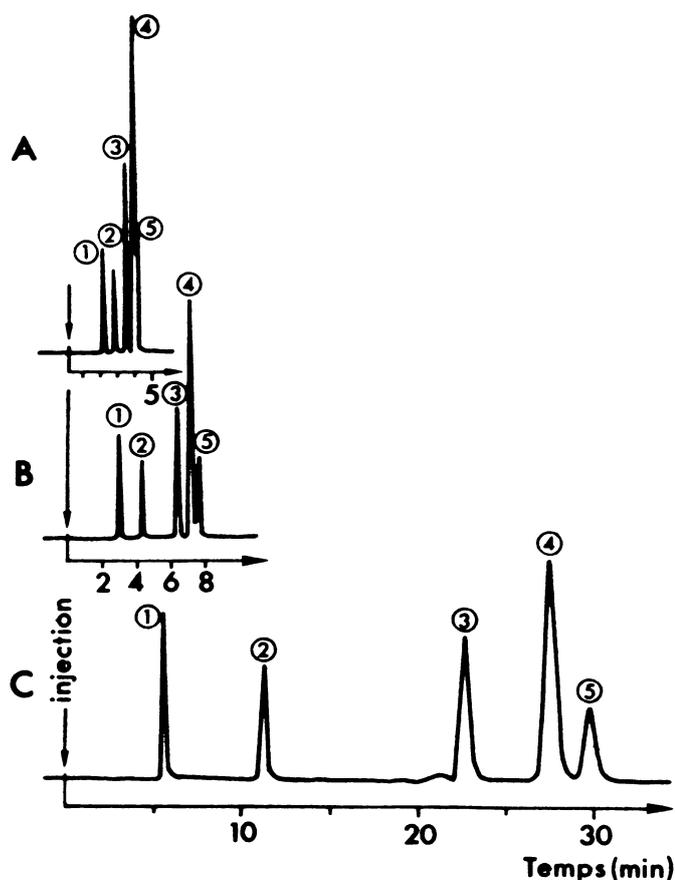


Ces phases greffées, dont la polarité peut être ajustée avec une très grande souplesse, sont à l'origine de la **chromatographie de partage à polarité de phase inversée** (éluant polaire et phase stationnaire apolaire). Parmi les transformations les plus classiques, on trouve la réaction des alkylchlorosilanes, en présence d'un agent basique.

A côté des phases greffées comportant des chaînes linéaires à 8 ou 18 atomes de carbone de type alkyle, il en existe d'autres dont les chaînes portent des fonctions (amines, nitriles, éthers ou hydrocarbures aromatiques), ce qui permet de changer la polarité de la phase stationnaire.

5.3. Exemple d'influence de la surface spécifique de la phase stationnaire

Influence de la surface spécifique d'une silice Sphérosil sur la séparation d'un mélange d'hydrocarbures aromatiques.



Colonne : longueur, 10 cm
diamètre intérieur, 4 mm.

Phase stationnaire : silice de type Sphérosil expérimental de 5,6 μm et de surfaces spécifiques variées :

A : 470 $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$; B : 590 $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$; C : 900 $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$

Phase mobile : hexane sec.

Débit : 0,9 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$.

Température : ambiante.

Nature des solutés :

① : toluène ; ② : naphthalène ; ③ : biphenyle ;

④ : anthracène et ⑤ : phénanthrène

Remarques :

- On place souvent une courte colonne de protection (nommée colonne de garde) en amont de la colonne analytique afin d'en augmenter la durée de vie, en éliminant les poussières et les contaminants contenus dans les solvants. Dans le cas d'une chromatographie liquide-liquide, la colonne de garde sert également à saturer la phase mobile en phase stationnaire afin de minimiser les pertes en phase stationnaire de la colonne analytique. La composition de la colonne de garde doit être semblable à celle de la colonne analytique mais la granulométrie est plus grande afin de minimiser les pertes de charge.

- On obtient de meilleurs chromatogrammes en maintenant la température de la colonne constante à quelques dixièmes de degré Celsius. Pour cela, les colonnes sont souvent placées dans une enceinte thermostatée.

6. Phase mobile

6.1. Généralités

Il est recommandé de toujours employer des solvants traités spécifiquement pour la CHLP. Il faut, de plus, les dégazer et les filtrer avant usage. Si la **phase stationnaire** est **polaire**, on choisit une **phase mobile peu polaire** : la chromatographie est dite **chromatographie en phases normales**. Si la **phase stationnaire** est **très peu polaire**, on choisit une **phase mobile polaire**, le plus souvent un mélange méthanol/eau ou acétonitrile/eau : la chromatographie est dite **chromatographie à polarité de phase inversée**. Il existe quatre types d'interactions entre les molécules du solvant et celles du soluté :

- dipolaires quand soluté et solvant ont tous deux des moments dipolaires
- de dispersion due à l'attraction entre elles des molécules voisines
- par liaison hydrogène, quand sont réunis un solvant et un soluté dont l'un est donneur et l'autre accepteur de protons
- diélectriques, qui favorisent la dissolution des composés ioniques dans les solvants polaires

| phase polaire normale | solvants classés par polarité croissante | phase à polarité inversée |
|--|--|--|
| FAIBLE ↓ pouvoir d'éluion ↓ FORT | hexane toluène trichlorométhane dichlorométhane éther acétate d'éthyle acétonitrile méthanol eau | FORT ↓ pouvoir d'éluion ↓ FAIBLE |

On peut, en mélangeant plusieurs solvants, ajuster le pouvoir d'éluion de la phase mobile.

Un paramètre qui détermine la pression à utiliser (pour la pompe) est la viscosité de l'éluant.

| Eluant | acétonitrile | acétate d'éthyle | méthanol | eau | acide éthanoïque | propan-2-ol |
|------------------------|--------------|------------------|----------|------|------------------|-------------|
| Viscosité (cP à 20 °C) | 0,37 | 0,45 | 0,60 | 1,00 | 1,22 | 2,30 |

La faible viscosité de l'acétonitrile est une des raisons de son utilisation fréquente.

7. Détecteurs

Le détecteur doit fournir un signal électrique reflétant en continu les variations de la composition de l'éluat à la sortie de la colonne, ce qui permet de détecter le passage des composés successifs. Aucun détecteur n'est universel, mais un bon détecteur doit réunir les qualités suivantes :

- donner une réponse proportionnelle à la concentration instantanée pour un même composé
- être sensible
- avoir une faible inertie
- être stable dans le temps
- avoir peu de bruit de fond

Il existe plusieurs types de détecteurs dont les plus courants sont cités ci-dessous.

7.1. Détecteur spectrophotométrique

Les détecteurs spectrophotométriques peuvent faire une détection monochromatique (détecteur UV avec lampe au deutérium) ou polychromatique (détecteur à barrette de diodes ce qui permet d'obtenir des renseignements spectraux pouvant servir à l'identification des composés). On mesure en permanence l'absorbance de la phase mobile à la sortie de la colonne à une ou plusieurs longueurs d'onde dans l'UV/visible. Pour pouvoir repérer les solutés, il faut qu'ils absorbent et que la phase mobile n'absorbe elle-même pas ou très peu. L'absorbance d'un composé est proportionnelle à sa concentration à condition que celle-ci reste faible (loi de Beer Lambert).

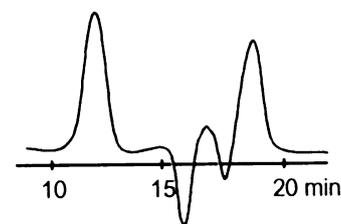
7.2. Détecteur spectrofluorimétrique

Certains composés sont fluorescents et l'intensité de la fluorescence d'un composé est proportionnelle à sa concentration à condition que celle-ci reste faible.

7.3. Détecteur réfractométrique

Son principe est basé sur la différence d'indice de réfraction entre la phase mobile et l'effluent à la sortie de la colonne. C'est un détecteur assez peu sensible et qui doit être thermostaté ainsi que la colonne car sa réponse est très sensible aux variations de température.

Il ne peut être utilisé qu'en mode isocratique car la variation de la composition de l'éluant au cours de l'analyse entraîne une dérive de la ligne de base. Il conduit à des pics soit négatifs soit positifs, ce qui implique un réglage de la ligne de base à mi-hauteur du graphe.



III. Application à la détermination du degré de pureté d'un produit brut de synthèse

La technique utilisée est une CHLP de partage à polarité de phase inversée : la phase fixe, de fine granulométrie, est une silice greffée rendue apolaire et la phase mobile est souvent un mélange acétonitrile-eau utilisé dans des conditions isocratiques. L'élution est suivie par spectrométrie UV à 254 nm dès qu'il y a un noyau aromatique dans les molécules étudiées. Le dosage est effectué par la **méthode de l'étalon interne**. **La méthode de l'étalon interne est basée sur l'utilisation du coefficient de réponse relatif de chaque composé à doser vis-à-vis d'un constituant supplémentaire, introduit pour servir de référence et appelé étalon interne** ; il est introduit à une concentration connue dans la solution de l'échantillon à analyser et dans la solution du mélange de composition connue qui sert à obtenir le chromatogramme d'étalonnage. **Les compositions des solutions injectées sont alors exprimées à l'aide des concentrations massiques** et on peut en déduire le % en masse d'un composé dans l'échantillon à analyser. Ceci permet de s'affranchir de l'imprécision concernant le volume injecté et de certaines erreurs expérimentales difficilement contrôlables, comme les dérives d'appareil ou les perturbations mécaniques. Le choix de l'étalon interne est assez complexe. Cet étalon interne doit répondre aux critères suivants :

- il doit être pur, chimiquement inerte vis à vis des solutés et de la phase mobile,
- il doit avoir un temps de rétention différent de celui de tous les constituants de l'échantillon, mais le plus proche possible de la substance à doser,
- il ne doit pas être présent comme impureté dans l'échantillon,
- il doit être ajouté à une concentration qui donne une aire de pic sensiblement équivalente à celle du produit à doser.
- il doit être détecté de la même manière que la substance à doser, donc il doit avoir un spectre d'absorption proche de la substance à doser aux environs de la longueur d'onde retenue.