

# CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (HPLC)

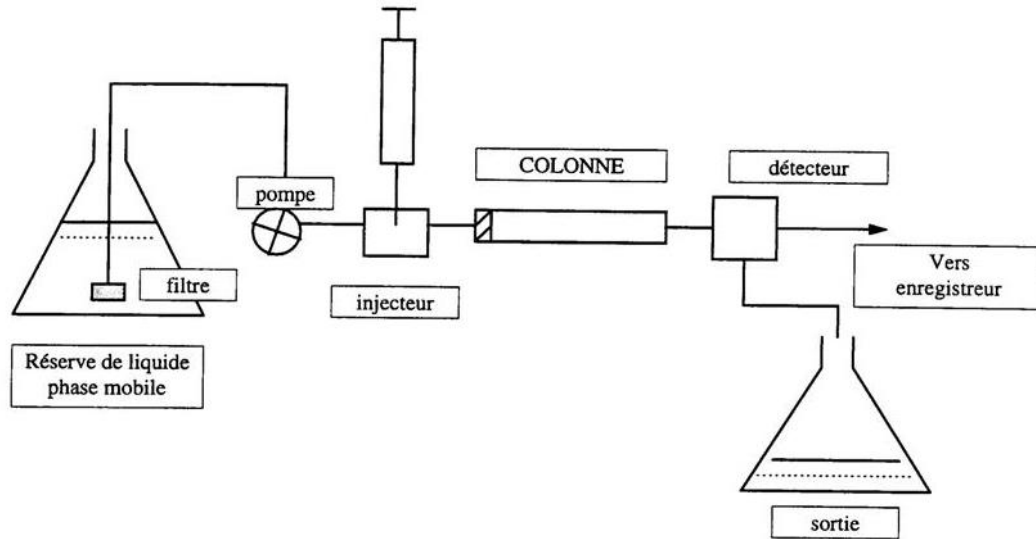
## I) Principe de la chromatographie

La chromatographie est une méthode de séparation des constituants d'un mélange même très complexe.

La chromatographie en phase liquide a permis de réaliser des analyses qui n'étaient auparavant pas possible avec les techniques sur couche mince ou en phase gazeuse. A l'origine la chromatographie en phase liquide se faisait sur des colonnes en verre. Le liquide traversait la phase stationnaire par gravité ou sous faible pression. Puis pour augmenter le débit, des manipulations ont été réalisées sous pression plus forte. C'est ce que l'on a appelé la chromatographie liquide sous haute pression (HPLC). Très rapidement le P de pression est devenu le P de performance lorsque l'on a optimisé la technique (diminution de la taille de particules de la phase stationnaire, régularité de cette phase...).

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant). Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique. La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique.

Le mélange à analyser est injecté puis transporté au travers du système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire. En sortie de colonne grâce à un détecteur approprié les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme.



*principe de fonctionnement de l'HPLC*

## II) La chromatographie liquide haute performance : ELEMENTS

### Les organes

a) **Un réservoir de solvant (éluant)** qui contient la phase mobile en quantité suffisante. Plusieurs flacons d'éluants (solvants de polarités différentes) sont disponibles pour pouvoir réaliser des gradients d'éluants (mélange de plusieurs solvants à des concentrations variables) à l'aide de la pompe doseuse.

b) **La pompe** : elle est munie d'un système de gradient permettant d'effectuer une programmation de la nature du solvant. Elle permet de travailler:

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

Les pompes actuelles ont un débit variable de quelques  $\mu\text{l}$  à plusieurs  $\text{ml}/\text{min}$ .

c) **Vanne d'injection** : c'est un injecteur à boucles d'échantillonnage. Il existe des boucles de différents volumes, nous utiliserons une boucle de  $20\mu\text{l}$ . Le choix du volume de la boucle se fait en fonction de la taille de la colonne et de la concentration supposée des produits à analyser. Le système de la boucle d'injection permet d'avoir un volume injecté constant, ce qui est important pour l'analyse quantitative.

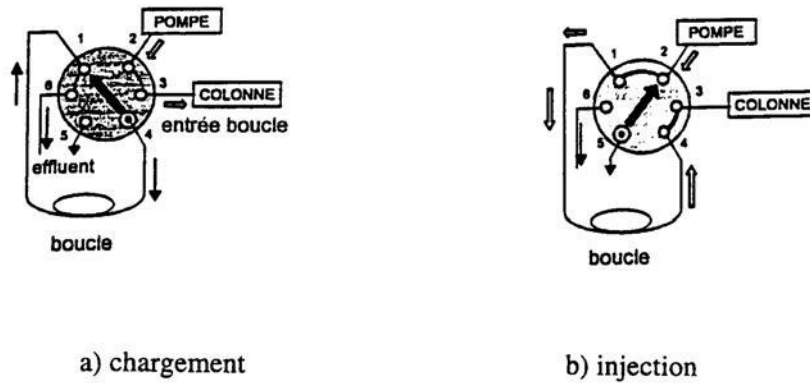


Figure 4 : les deux phases de l'injection avec une boucle

#### d) La colonne

Une colonne est un tube construit dans un matériau le plus possible inerte aux produits chimiques, souvent en inox ou en verre. Sa section est constante, de diamètre compris entre 4 et 20 mm pour des longueurs généralement de 15 à 30 cm. Au delà, les importantes pertes de charges exigeraient des pressions de liquide beaucoup trop élevées.

#### e) La phase stationnaire

##### - La phase normale:

La phase normale est constituée de gel de silice. Ce matériau est très polaire. Il faut donc utiliser un éluant apolaire. Ainsi lors de l'injection d'une solution, les produits polaires sont retenus dans la colonne, contrairement aux produits apolaires qui sortent en tête.

L'inconvénient d'une telle phase, c'est une détérioration rapide au cours du temps du gel de silice, ce qui entraîne un manque de reproductibilité des séparations.

##### - La phase inverse :

La phase inverse est majoritairement composée de silice **greffées par des chaînes** linéaires de 8 ou 18 atomes de carbones (C<sub>8</sub> et C<sub>18</sub>). Cette phase est apolaire et nécessite donc un éluant polaire (ACN, MeOH, H<sub>2</sub>O). 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.

##### - La phase mobile :

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

- si la phase stationnaire est polaire, on utilisera une phase mobile peu polaire la chromatographie est dite en phase normale ;
- si la phase stationnaire est très peu polaire, on choisira une phase mobile polaire ( le plus souvent des mélanges de méthanol ou d'acétonitrile avec de l'eau), c'est la chromatographie en phase inverse. En modifiant la polarité de la phase mobile, on agit sur les facteurs de rétention  $k$  des composés.

Les silices greffées conduisent en général à une perte importante de polarité. Avec une phase greffée, l'ordre d'élution est opposé à celui auquel on est habitué avec les phases normales. Ainsi avec un éluant polaire, un composé polaire migre plus vite qu'un composé apolaire. Dans ces conditions les hydrocarbures sont fortement retenus. On réalise des gradients d'élution en diminuant au cours de la séparation la polarité de l'éluant (ex : mélange eau /acétonitrile dont la concentration en acétonitrile va en croissant au cours de l'élution).

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

phase polaire normale	solvants classes par polarité croissante	phase à polarité inversée
	hexane toluène trichlorométhane dichlorométhane éther acétate d'éthyle acétonitrile méthanol eau	

tableau 1 : pouvoir d'élution de la phase mobile en HPLC

## f) Détecteurs

Deux types de détecteurs sont classiquement utilisés

\* détecteur UV-visible (celui que nous utilisons) : il mesure l'absorption de la lumière par le produit à la sortie de la colonne. E opère à longueur d'onde constante, celle-ci ayant été fixée par l'opérateur. La lampe Deuterium est utilisé pour des longueurs d'ondes variant de 190-350 nm et la lampe à vapeur de mercure est utilisé à la longueur d'onde non variable de 254 nm. Pour que ce type de détecteur soit utilisable, il faut que :

- le produit à détecter absorbe la lumière à une longueur d'onde **accessible à l'appareil**, et que son coefficient d'absorption  $\epsilon$  soit suffisamment grand ;
- la phase mobile n'absorbe pas la lumière à la longueur d'onde choisie par l'opérateur.

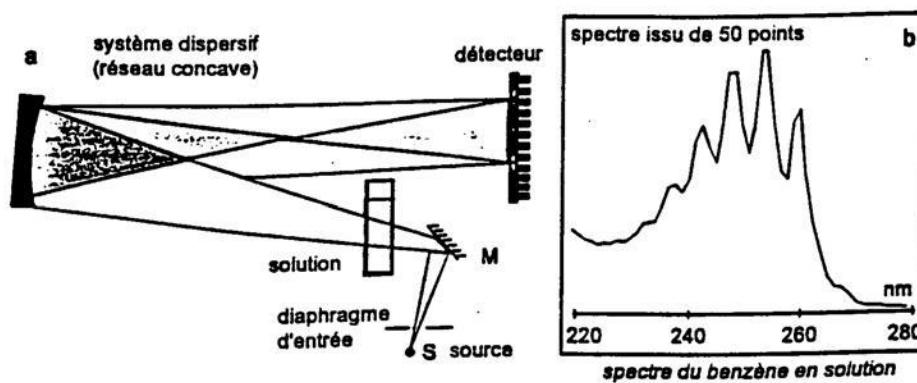
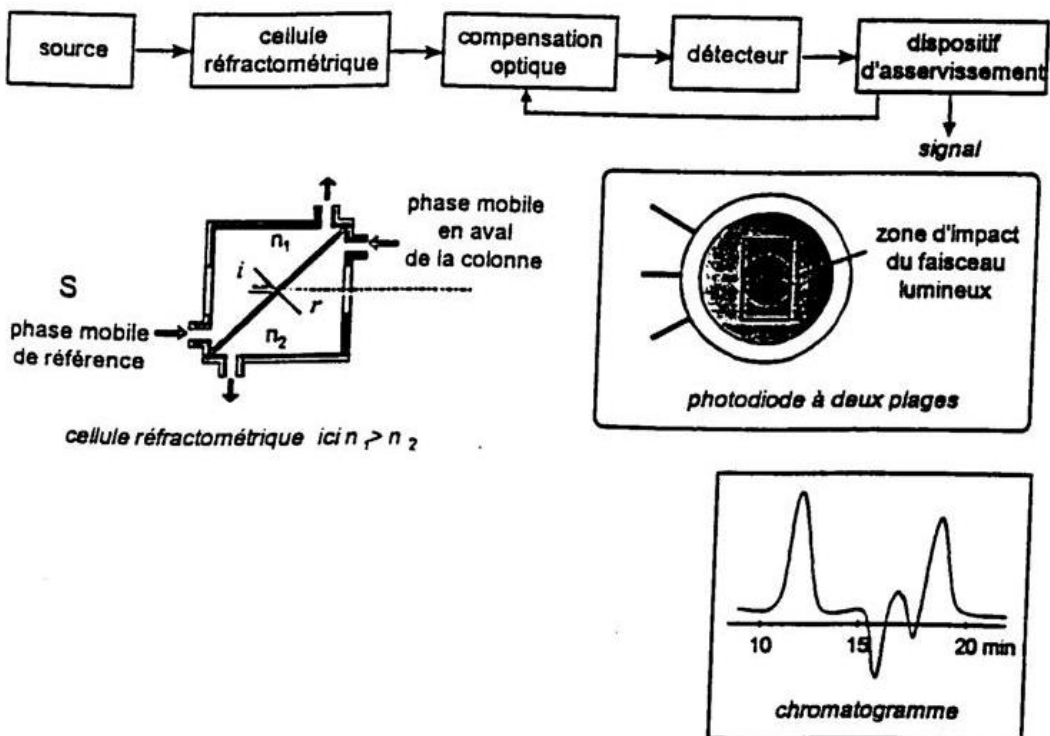


Figure : Principe du détecteur UV



Trajet optique du détecteur RI

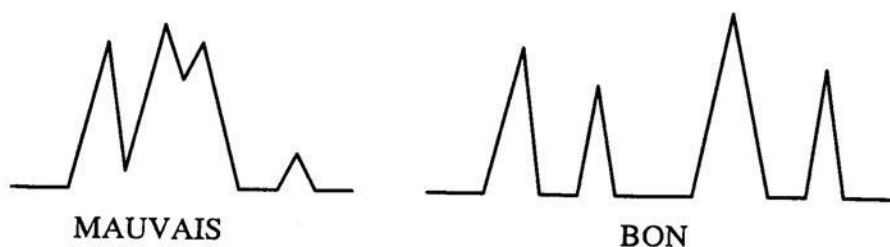
\* réfractomètre : il mesure la variation de l'indice de réfraction du liquide à la sortie de la colonne. Cette mesure, extrêmement précise, dépend néanmoins de la température du liquide. On compare cet indice avec celui de la phase mobile pure : il y a donc une référence d'où le terme de variation de l'indice. Ce détecteur exclut les variations de la composition de la phase mobile ; il n'est donc possible de travailler qu'en mode isocratique avec ce détecteur.

Les données sont collectées par l'intermédiaire soit d'un intégrateur ou d'une -station d'acquisition.

### III) Application de la chromatographie à

#### l'analyse 1) Analyse des chromatogrammes

Une bonne séparation se traduira par une séparation distincte des pics correspondant à chacun des produits.



Un chromatogramme doit être parfaitement reproductible.

La composition de la phase mobile est un paramètre particulier à la HPLC. Il faut donc

préciser pour chaque analyse :

- le type de colonne : marque, nature, diamètre, longueur, support...
- la nature de l'éluant : solvant, si c'est un mélange préciser sa composition, débit, mode de détection  $\lambda$  en nm.
- la quantité injectée, le début de l'injection sur le chromatogramme, la sensibilité du détecteur, etc...

#### 2) Analyse qualitative

Le temps de rétention ( $t_R$  en min) est une caractéristique de chaque

$$\alpha = \frac{t_{R2}}{t_{R1}} \rightarrow \boxed{t_{R2} > t_{R1}}$$

$$\alpha = \frac{K_2}{K_1} = e^{((\Delta rG_{o1} - \Delta rG_{o2})/RT)}$$

si  $\alpha = 1 \Rightarrow$  les pics coïncident  
si  $\alpha = 1.05$  la séparation est possible

colonne qui est mesurée en nombre de plateau théorique :

soluté dans les conditions opératoires fixées.

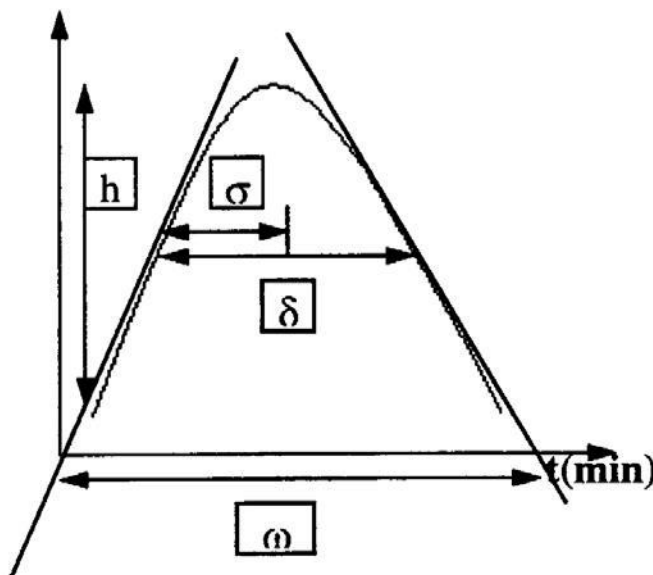
On peut comparer le  $t_R$  de deux solutés en définissant :

- le facteur de sélectivité  $\alpha$  entre les deux solutés :

- l'efficacité d'une

Nombre de molécule sortant

de la colonne en fonction du temps



$\sigma$  : écart type : distance entre le point d'inflexion (point où la dérivée seconde s'annule) et la moitié de la courbe.

$\delta$  : largeur du pic à mi-hauteur

$\omega$  : largeur à la base (unité de temps)

$n$  = nombre de plateaux théoriques :

$$n = (t_R / \sigma)^2 = 5,54(t_R / \delta)^2 = 16(t_R / \omega)^2$$

HEPT (hauteur équivalente de plateaux théoriques)

HEPT =  $L/n$  ( $L$  = hauteur de colonne,  $n$  nombre de plateaux théoriques)

Résolution de la colonne pour la séparation de deux solutés bien déterminés.

$$R = 2 \times \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{(\omega_1 + \omega_2)}$$

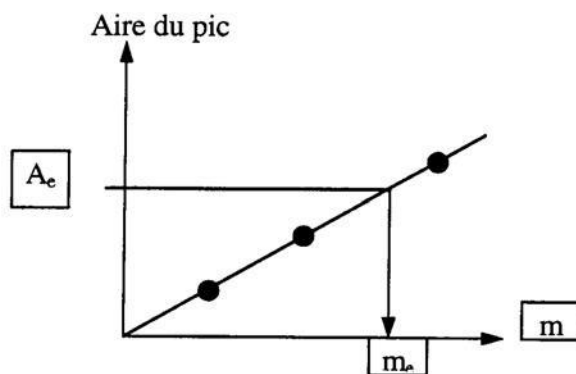
$R > 1$  bonne séparation

$R < 1$  mauvaise séparation  $\Rightarrow$  donc les paramètres appliqués à la colonne ne sont pas les bons.

### 3) Analyse quantitative

Cette analyse est basée sur le fait que l'aire des pics chromatographiques est proportionnelle à la concentration ou à la quantité de produit analysé.

#### Méthode de l'étalonnage externe :



Il est nécessaire de disposer d'une quantité suffisante du produit afin de faire une courbe d'étalonnage  $Aire = f(\text{masse ou concentration du produit})$ , pour un volume injecté constant  $V$ . L'injection ultérieure du

même volume  $V$  de l'échantillon à doser permet, à l'aide de la mesure de l'aire du pic reportée sur la courbe d'étalonnage, de connaître la masse ou la concentration recherchée. Cette méthode est plus précise que celle qui consiste à ne faire **qu'une mesure** avec l'étalon et à utiliser une règle de trois :

$$A_e/M_e = A_{et}/m_{et}$$

A: Aire des pics

e : échantillon

et : étalon

m : masse du produit remplaçable par la concentration

#### Méthode des ajouts :

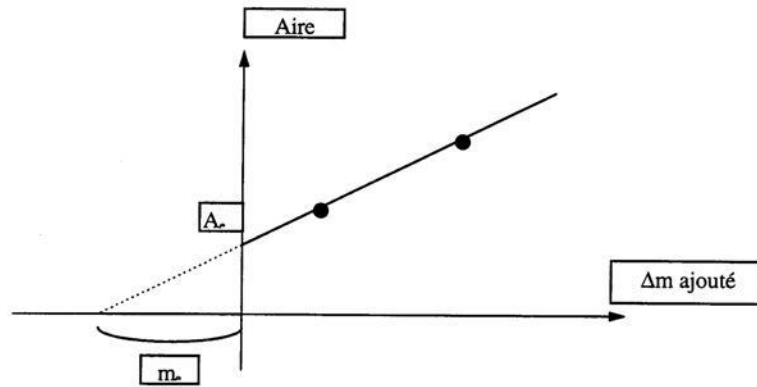
Comme la précédente, cette méthode nécessite de posséder le produit à analyser pur; après avoir analysé l'échantillon, on ajoute à celui-ci des quantités connues  $\Delta m$  du produit avant de le chromatographier à nouveau (faire au minimum deux ajouts), ce qui entraîne une variation de l'aire du pic  $\Delta A$ .

Si  $m$  est la masse contenue dans l'échantillon à analyser,

$$(\Delta A/\Delta m) = a/m \text{ soit } m = A^*(\Delta m/\Delta A)$$

Si le produit ajouté est en solution, il faut tenir compte des effets de dilution.





Méthode de l'étalon interne (utilisée essentiellement en CPG) :

On compare la réponse du ou des produits à analyser à celle d'un étalon interne, donc introduit dans le mélange à doser et convenablement choisi.

Une solution étalon est préparée avec le ou les produits que l'on veut doser. Les masses sont connues  $m'_1, m'_2, \dots, m_e$  pur l'étalon ; à ces masses correspondent les aires  $A'_1, A'_2, \dots, A'_e$ , sur le chromatogramme.

Dans l'échantillon contenant les masses  $m_1, m_2, \dots$  de solutés on ajoute  $m_e$  de l'étalon, ce qui donne les aires  $A_1, A_2, A_e$ .

On obtient :

$$m'_1 = \alpha_1 A'_1$$

$$m'_2 = \alpha_2 A'_2$$

$$m_e = \alpha_e A'_e$$

avec  $\alpha$  coefficient de proportionnalité

$$\text{et } k_1 = (\alpha_1/\alpha_e) = (m'_1 A'_e / m_e A'_1)$$

d'où la valeur  $k_1$  puisque toutes les données sont connues.

Dans l'échantillon inconnu on aura :

$$m_1 = \alpha_1 A_1$$

$$m_e = \alpha_e A_e$$

$$(m_1/m_e) = (\alpha_1 A_1/\alpha_e A_e) = k_1(A_1/A_e)$$

$m_e, k_1, A_1, A_e$  sont connus.