

III.5.4. La chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

Chromatographie liquide haute performance, souvent désignée par son abréviation CLHP – HPLC en anglais –, constitue une technique analytique très générale d'emploi. Elle dérive de la forme la plus ancienne de la chromatographie liquide sur colonne dont les performances, en termes de sélectivité et de résolution, se sont trouvées grandement améliorées par la miniaturisation et l'utilisation de phases stationnaires très élaborées. C'est une méthode de séparation analytique dont développement de phases stationnaires a permis de représenter les différents types de la chromatographie conventionnelle (chromatographie dite basse pression). L'HPLC n'est pas un nouveau type de chromatographie mais résulte de l'aboutissement des progrès de l'instrumentation en ce sens qu'elle met en oeuvre des pressions de pompage élevées, des colonnes de microparticules qui minimisent le temps des cinétiques d'absorption, de partage, d'exclusion ou d'affinité des molécules tout en augmentant la vitesse de flux de la phase mobile.

III.5.4.1. Principe

Ces phases, constituées de la réunion de micro-particules sphériques dont le diamètre est compris entre 2 et 5 micromètres ou de matériaux monolithiques poreux conduisent à une perte de charge importante dans la colonne. Il faut donc exercer sur la phase mobile une forte pression pour obtenir un débit convenable. Pour marquer cette particularité de la technique, la lettre P du sigle CLHP a pendant longtemps correspondu au mot pression. La migration forcée d'une phase liquide au contact d'une phase stationnaire se retrouve dans plusieurs techniques chromatographiques. La particularité de la CLHP est de faire intervenir des mécanismes d'échange soluté/phase mobile/phase stationnaire basés sur les coefficients d'adsorption ou de partage.

III.5.4.2. Appareillage

Une installation de CLHP comporte divers modules spécialisés, qui se présentent dans des boîtiers distincts ou intégrés dans un même châssis pour des raisons de moindre encombrement. L'appareillage se compose d'un réservoir contenant la phase mobile, d'un système de pompage, d'un injecteur, d'une colonne chromatographique (éventuellement thermostatée), d'un détecteur et d'un système d'acquisition des données (avec un logiciel pour traiter les signaux)

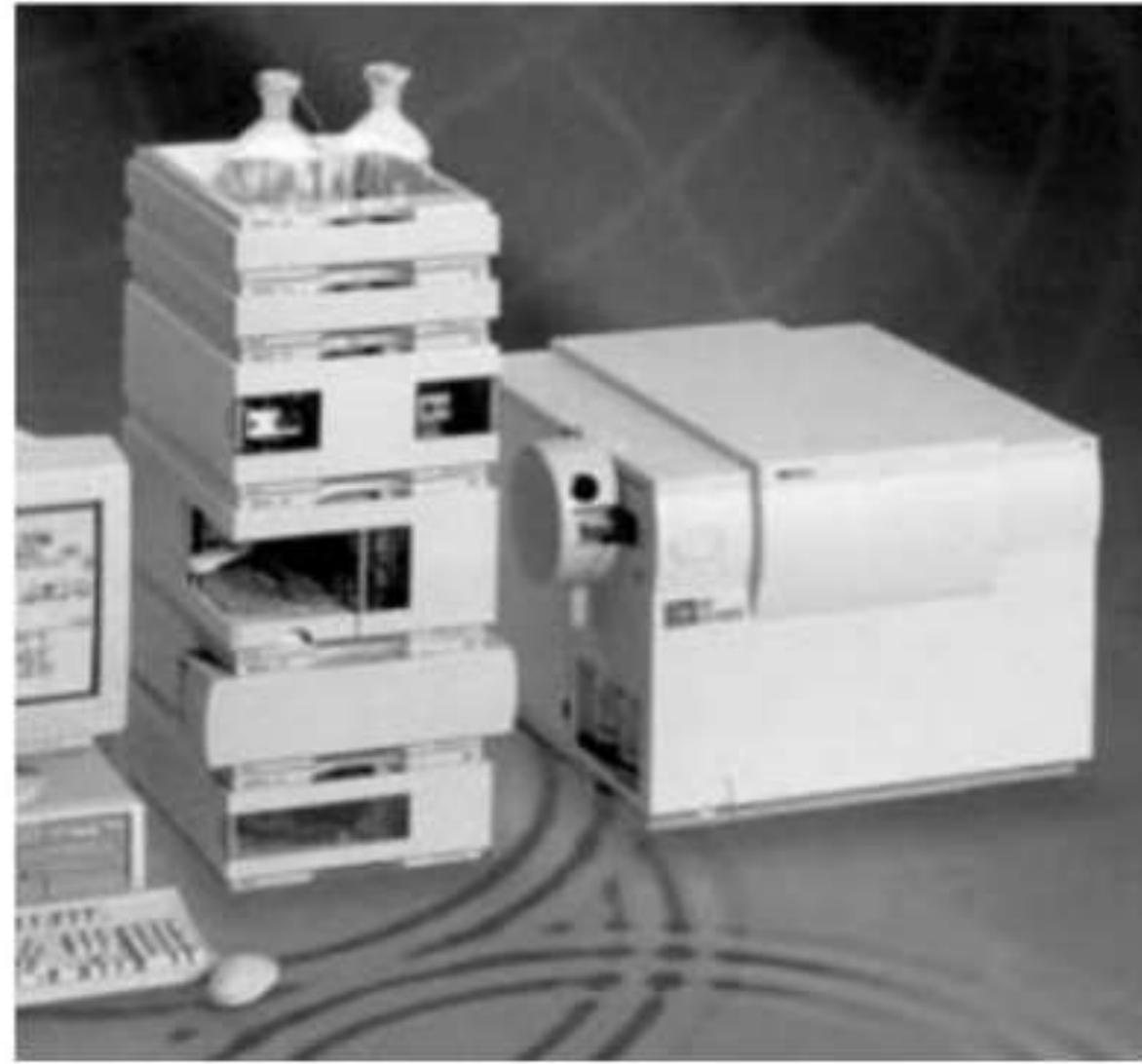
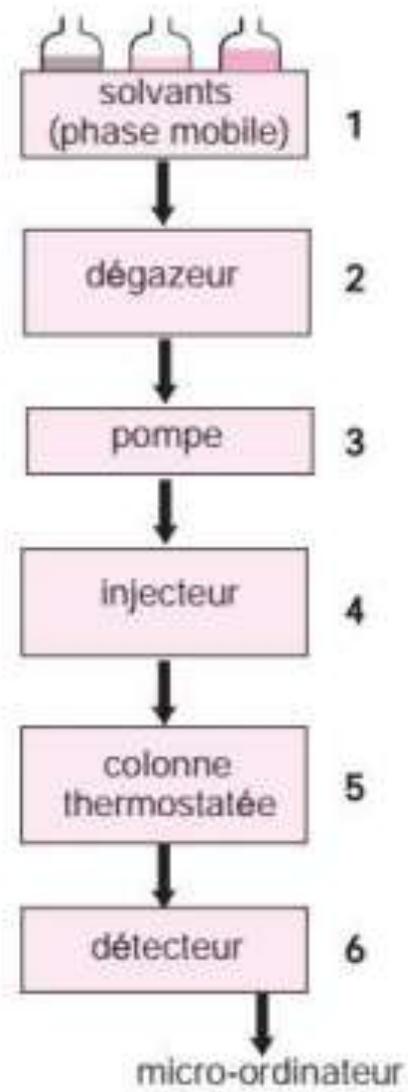


Figure III.21: Schéma d'une installation de HPLC

Le réservoir de la phase mobile Il contient la phase mobile en quantité suffisante. Plusieurs flacons d'éluant (solvant de polarités différentes) sont disponibles pour pouvoir réaliser des gradients d'éluant (mélange de plusieurs solvants à des concentrations variables) à l'aide de la pompe qui réalise le mélange demandé.

La pompe

Toute installation de CLHP comporte au moins une pompe pour forcer le passage de la phase mobile à travers la colonne dont le remplissage est très compact. Il en résulte une pression importante au niveau de l'injecteur. Celle-ci peut atteindre 20 000 kPa (200 bars). Selon la phase mobile on distingue deux types de chromatographie :

- **La chromatographie isocratique** où la composition de la phase mobile est maintenue constante pendant la séparation
- **La chromatographie en gradient** où la composition de la phase mobile varie progressivement ou par paliers

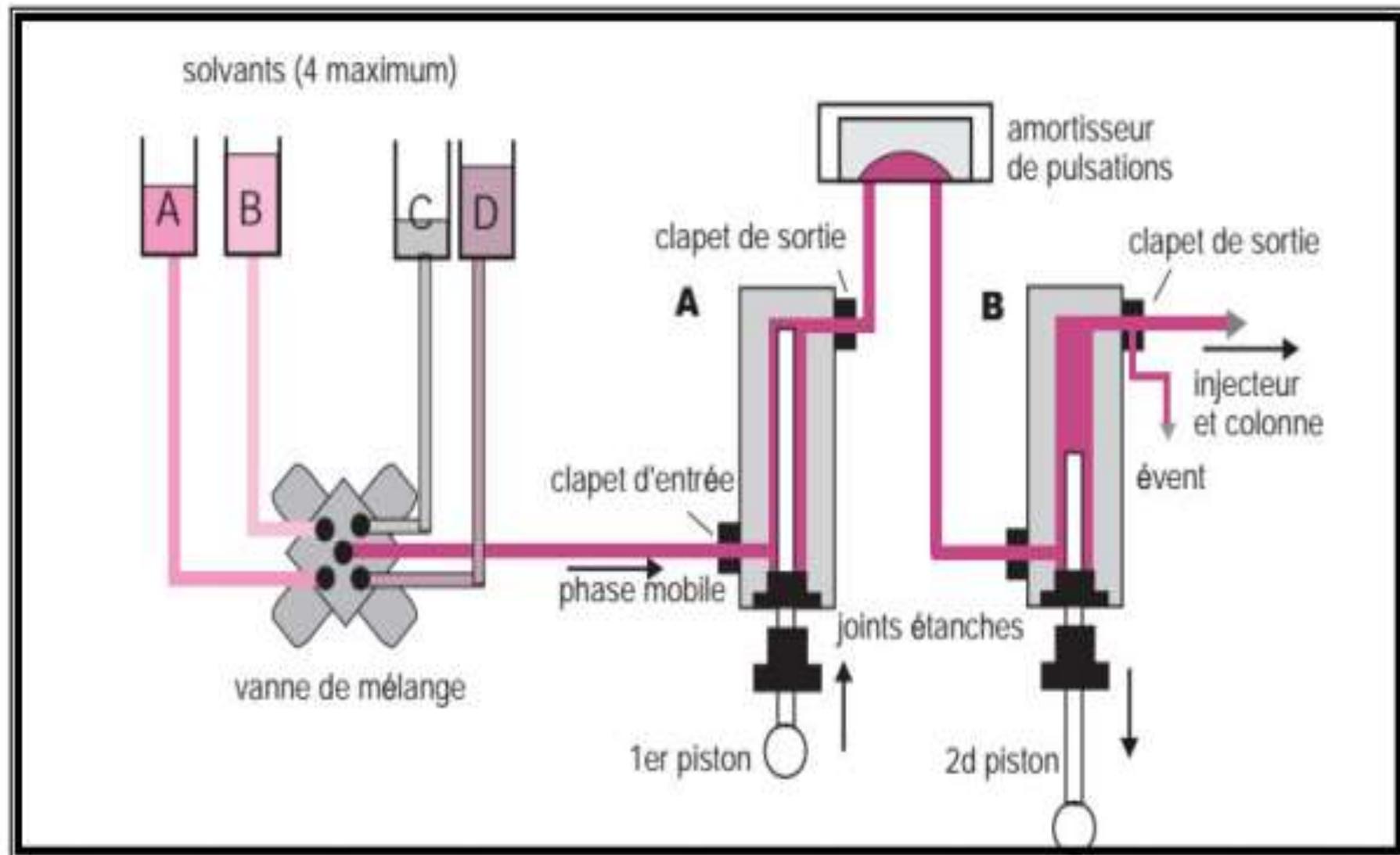


Figure III. 22 : Principe de fonctionnement d'une pompe à deux têtes en série.

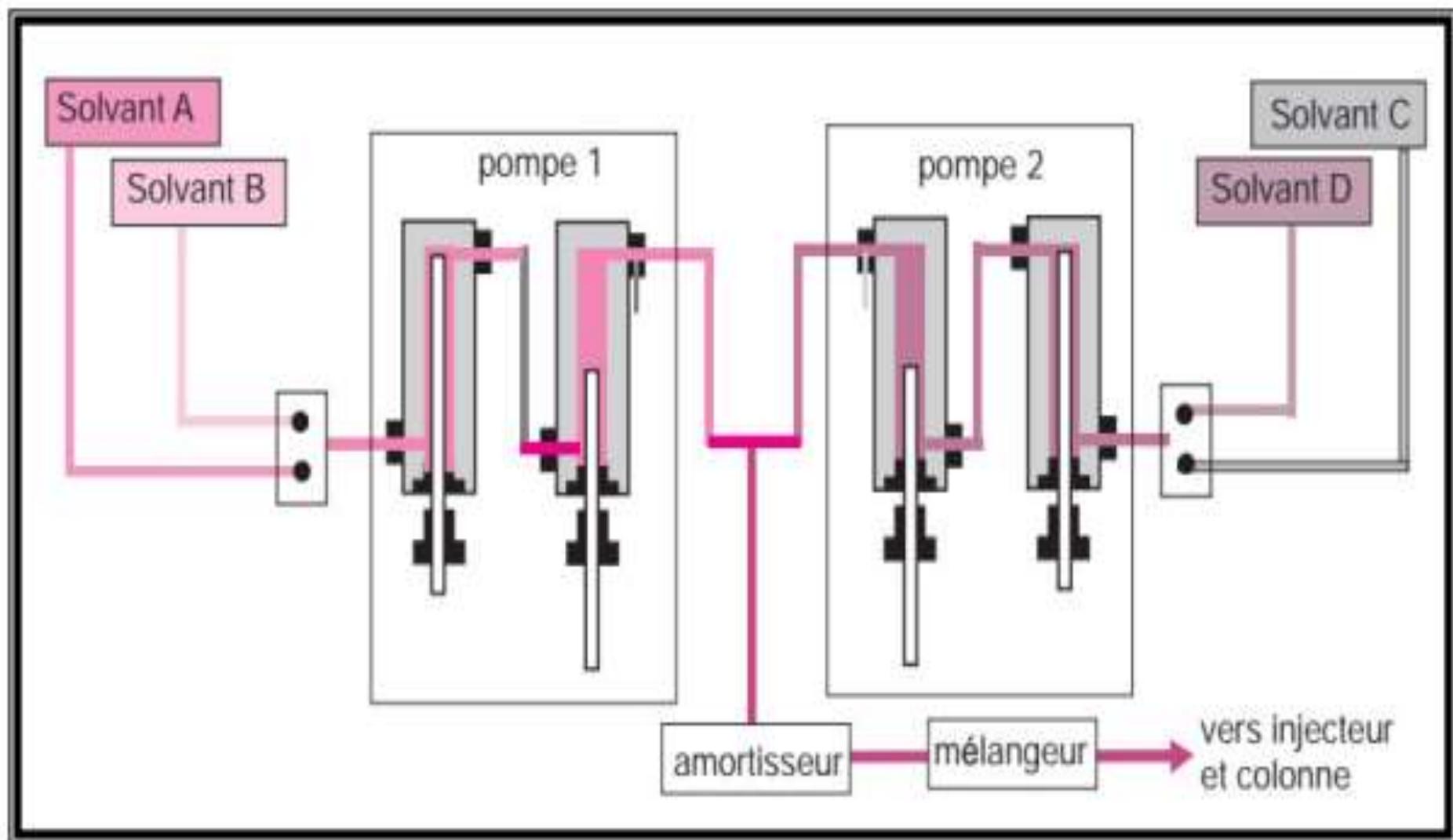


Figure III.23 : Exemple de configuration pour gradient haute pression.

L'injecteur

L'injection de l'échantillon se fait de deux manières :

□ **Manuelle** : l'injecteur comporte une vanne à plusieurs voies montée sur le parcours de la phase mobile, juste avant la colonne.

L'échantillon à analyser est introduit avec une micro-seringue dans un petit volume tubulaire appelé boucle ; l'échantillon est ainsi inséré avec un flux de phase mobile (FigIII.24).

□ **Automatique** : l'injection se fait automatiquement, l'injecteur utilisé comporte une vanne à boucle d'échantillonnage d'une capacité fixe, cette boucle permet d'introduire l'échantillon sans modifier la pression dans la colonne



Figure III.24 : Vanne d'injection pour CLHP et boucles assorties

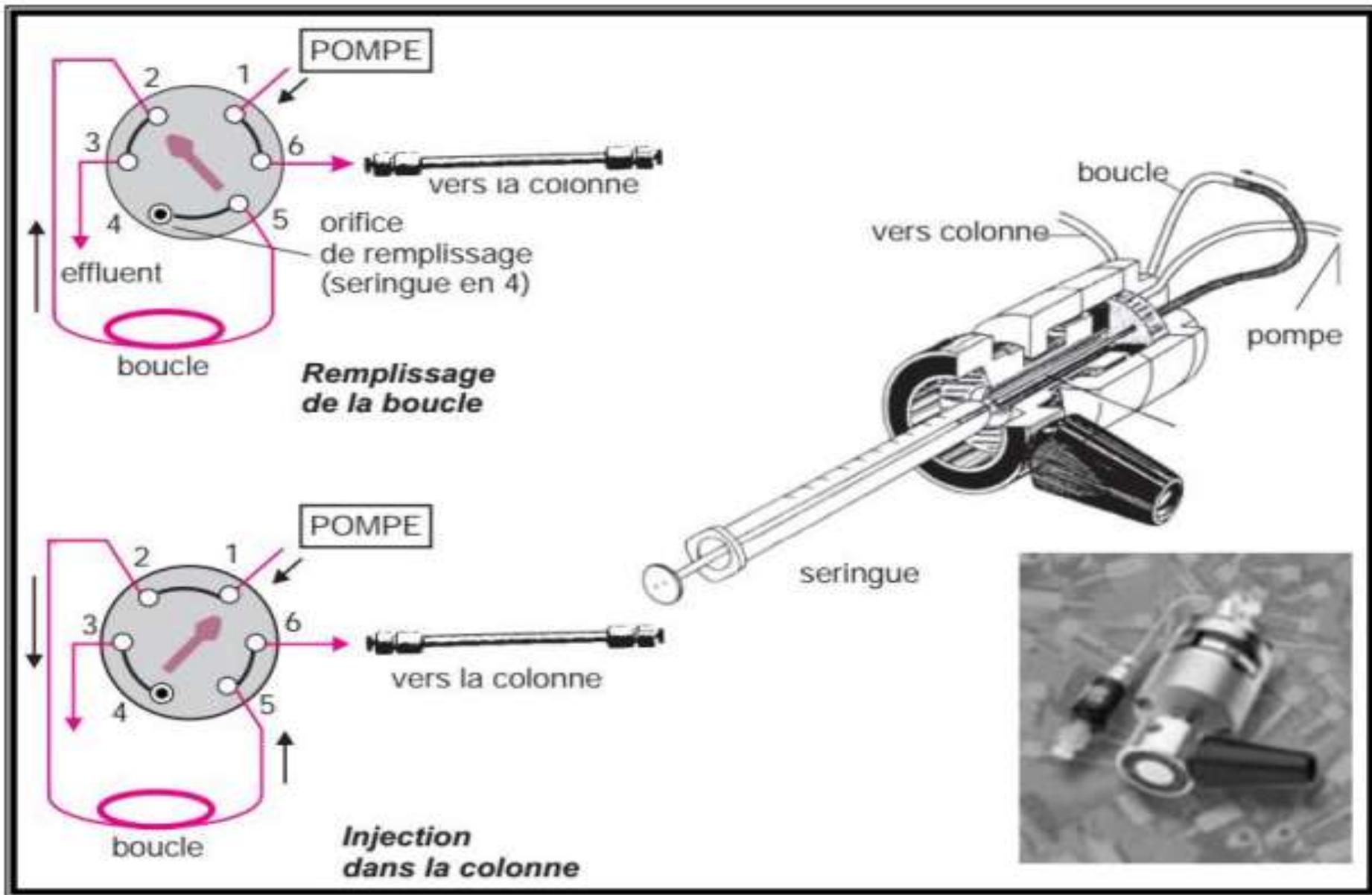


Figure III.25 : Injection avec une boucle.

La colonne

La colonne se présente comme un tube, le plus souvent en acier, dont la longueur et le diamètre présentent des différences selon les modèles. Les colonnes « standard » dont le diamètre interne (DI) est d'environ 4,5 mm et la longueur de 10 cm, sont de plus en plus supplantées par des colonnes de plus faibles diamètres, baptisées narrow-bore (DI 2-4 mm), micro-bore (DI 1-2 mm), capillaires remplies (DI 0,1-1 mm). Ces modèles sont apparus suite à l'évolution des phases stationnaires customisées et pour simplifier les problèmes de couplage avec la spectrométrie de masse (FigIII.26).

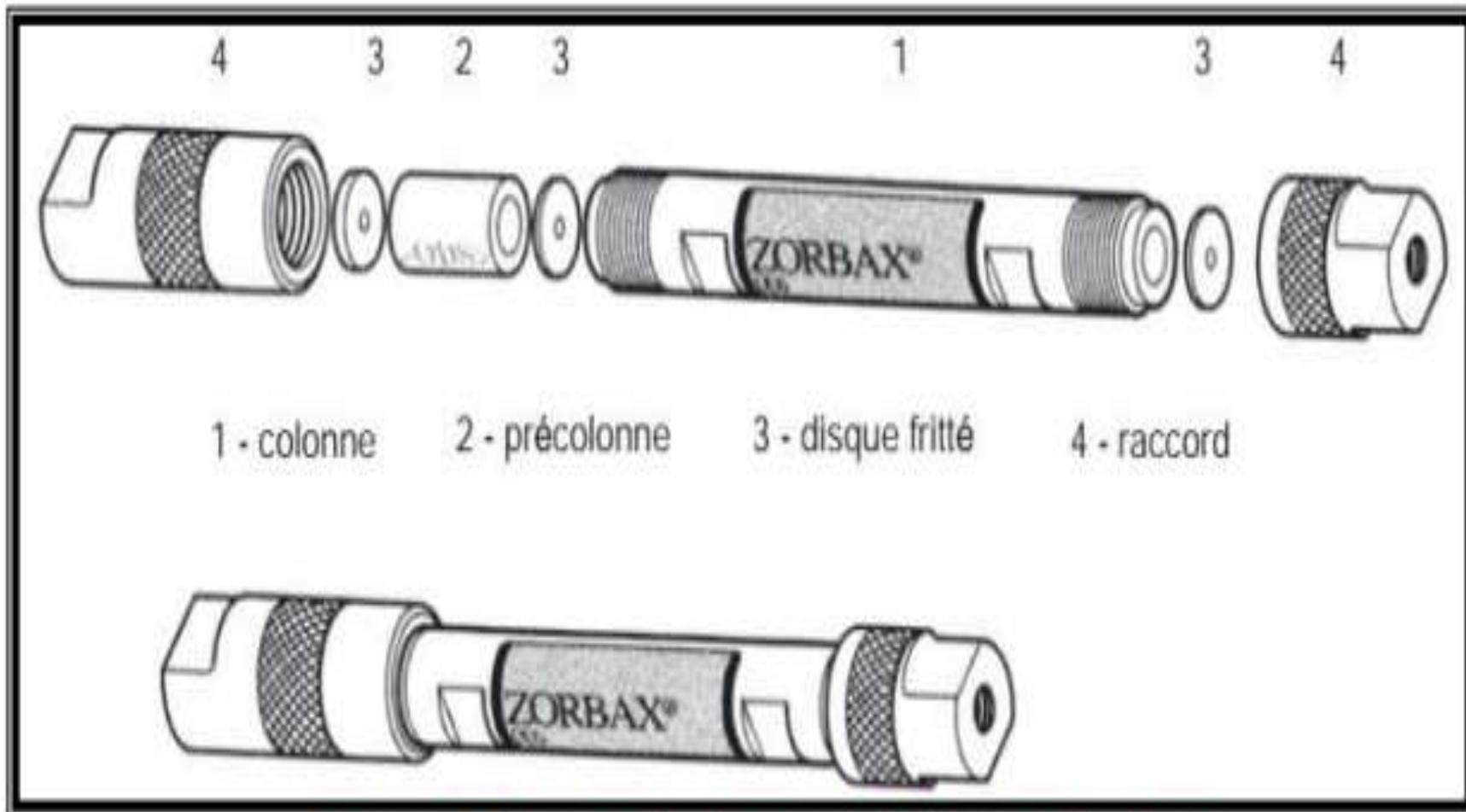


Figure III.26 : Colonne standard et précolonne de CLHP.

Phases stationnaires

La recherche d'une bonne résolution chromatographique et par voie de conséquence d'une efficacité élevée, a conduit à la création de phases stationnaires de nature et de structures variées. Pour raccourcir les temps d'analyse, il faut tenter d'accélérer dans la colonne les transferts entre les phases mobile et fixe. Parmi tous les matériaux qui ont été ou sont actuellement utilisés pour la confection des phases stationnaires, le gel de silice tient une place prépondérante

Le détecteur

Les systèmes de détection doivent avoir une sensibilité suffisamment haute et stable pour mesurer une quantité d'échantillon appliquée sur la colonne souvent très faible. En outre, cette détection se faisant dans une cellule de faible volume nécessite une énergie lumineuse importante. Les modes de détection les plus courants reposent sur les propriétés optiques des composés : absorption, fluorescence et indice de réfraction.

L'enregistreur

L'enregistreur reçoit un signal électrique proportionnel à la concentration de l'analyte qui traverse le détecteur. Ce signal est traité, amplifié puis utilisé pour tracer le chromatogramme. Pour qu'un pic soit exploitable, on considère généralement que le rapport 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 :

- La variation de température
- La pression
- L'instabilité électronique

III.5.4.3. Les grandeurs caractérisant la qualité de séparation et la performance de la colonne L'efficacité de la colonne L'efficacité d'une colonne analytique d'une chaîne HPLC peut s'exprimer par le nombre N de plateaux théoriques. Plus le nombre des plateaux théoriques N est élevé, plus la colonne est efficace. On définit également HEPT, la hauteur équivalente à un plateau théorique, et L , la longueur de la colonne. Plus la hauteur du plateau HEPT est faible, plus la colonne est efficace. Il existe une équation dite équation de Knox en chromatographie liquide à haute performance qui relie la hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT) à la vitesse linéaire moyenne de la phase mobile. L'efficacité N traduit la finesse des pics.

$$\text{HEPT} = H = L / N$$

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

- De sa géométrie : plus une colonne sera longue et plus elle sera efficace.
- De son garnissage : plus les particules de silice seront fines et plus la colonne sera efficace.
- Du débit de l'éluant : Il existe un débit optimal d'utilisation d'une colonne pour lequel son efficacité est la plus grande. Dans le cas où les pics sont symétriques et gaussiens, le nombre de plateaux théoriques sera calculé selon la relation:

Si les pics sont non symétriques:

$$N = 16(\text{tr}/\omega)^2$$

Avec :

$$N = 5,54 (\text{tr}/\omega_{1/2})^2$$

Tr : temps de rétention.

ω : largeur de pic à la base.

$\omega_{1/2}$: largeur de pic à mi-hauteur.

La résolution Rs

La résolution est une mesure de la qualité d'une séparation de point de vue chevauchement de deux signaux consécutifs. Elle est exprimée à partir des temps de rétention. La résolution est calculée à partir de la relation suivante :

$$R_s = 2 (tr_2 - tr_1) / (\omega_{1/2}(1) + \omega_{1/2}(2))$$

Avec

Si $R_s < 1$: une mauvaise résolution.

Si $1 < R_s < 1,5$: une résolution acceptable.

Si $R_s \geq 1,6$: une bonne résolution.

Si $1,4 < R_s < 1,6$: une résolution optimale.

- Deux caractéristiques déterminent le degré de recouvrement des pics: la distance séparant les sommets de deux pics mesurés par les temps de rétention t_{r2} et t_{r1} .
- La largeur des pics à la base $\omega_1/2$ (pic1) et $\omega_2/2$ (pic2).

La Sélectivité α

On définit la sélectivité α d'une séparation par le rapport de facteur de distribution (k_1 et k_2) de deux solutés. Plus k est grand, plus le composé est adsorbé fortement dans la phase stationnaire et plus la rétention est grande et inversement. La valeur de k dépend de la structure du composé qui détermine son affinité pour chacune des deux phases.



$$\alpha = k_2 / k_1$$

α est égale à 1 lorsque n'a pas une séparation entre les deux signaux consécutifs.

Les grandeurs de rétention

□ Temps de rétention Le temps de rétention est une grandeur caractéristique d'un analyte dans des conditions opératoires données, c'est le temps écoulé entre l'injection et le maximum du pic du composé élué, noté t_r et exprimé en minutes. On utilise ce paramètre pour identifier les composés dans un chromatogramme. Il varie en fonction du débit de la phase mobile et de leur composition, de la température d'élution et de la nature de colonne utilisée.

Le temps de rétention t_r d'un soluté est fonction de son affinité avec l'éluant d'une part et avec la phase stationnaire d'autre part. A un instant t , le soluté est à la concentration C_m dans la phase mobile et à la concentration C_s dans la phase stationnaire, leur rapport est appelé coefficient de partage noté K .

$$K = C_s / C_m$$

