

CHAPITRE IV CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE À HAUTE PERFORMANCE (HPLC)

1. Définition

C'est une technique de séparation analytique en fonction de l'hydrophobicité et préparative des molécules d'un composé ou d'un mélange de composés. Pour certains, HP signifie «haute pression». Cette forme de chromatographie est fréquemment utilisée en biochimie, ainsi qu'en chimie analytique. Le «P» du sigle, à l'origine signifiait Pression mais lorsque la méthode a été améliorée (réduction des particules et régulation de la phase stationnaire) le «P» donc été attribué à Performance afin de marquer cette innovation. La fine granulométrie de la phase stationnaire permet une meilleure séparation des composants. Les pics obtenus sont plus étroits donc la résolution est améliorée (les pics sont bien séparés). La combinaison de la rapidité et de la résolution élevées conduit à l'appellation haute performance.

Le champ d'application de ce type de chromatographie recouvre une grande partie du domaine de la chromatographie en phase gazeuse auquel s'ajoute l'analyse:

- * Des composés thermosensibles.
- * Des composés très polaires.
- * Ainsi que des composés de masses molaires élevées.

2. Principe

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 voir (Figure 1).

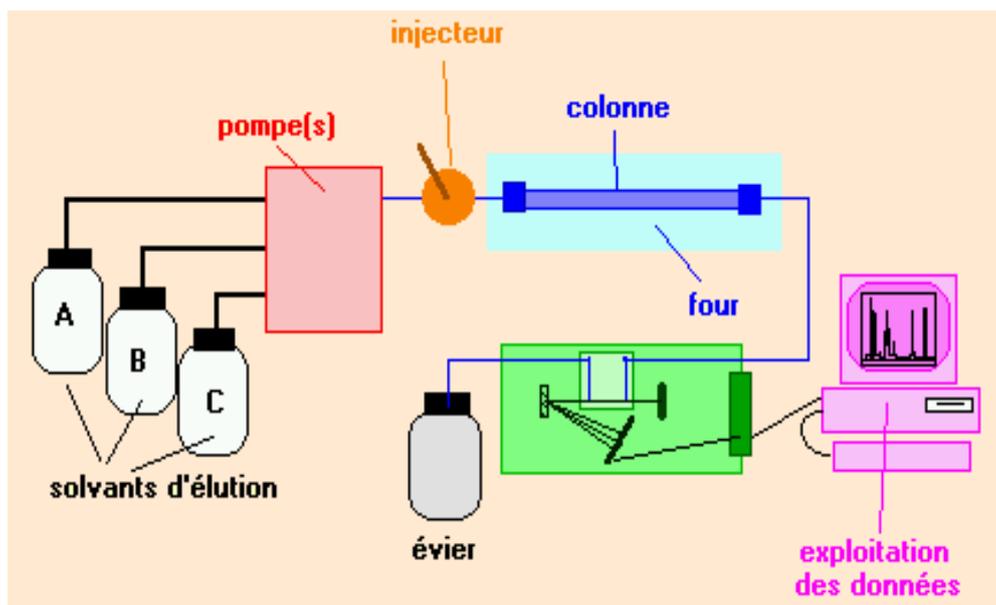


Figure 1. Schéma général d'une chromatographie HPLC.

Selon la nature de la phase stationnaire et son interaction avec les molécules de soluté, les séparations chromatographiques sont classées en 5 principaux types:

1. Chromatographie de partage en phase normale ou inversée,
2. Chromatographie d'adsorption,
3. Chromatographie d'exclusion stérique (Chromatographie de filtration sur gel, Chromatographie par perméation de gel),
4. Chromatographie sur échangeur d'ions (ou échangeuse d'ions),
5. Chromatographie d'affinité,

3. Appareillage

Un appareil de chromatographie en phase liquide comporte quatre parties : système de pompage, injecteur, colonne et détecteur à travers lesquelles un liquide entraîne les substances d'un mélange à séparer.

3.1. Réservoir de la phase mobile

Le plus souvent ce réservoir est une bouteille en verre dans lequel plonge un tube avec une extrémité filtrante en téflon. S'il est nécessaire le dégazage peut se faire par agitation puis conservation du solvant sous atmosphère d'hélium.

3.2. 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'éluant.

3.4 Injecteur

L'injection d'un volume précis de l'échantillon en tête de colonne doit se faire en un temps bref afin de perturber le moins possible le régime de circulation de la phase mobile qui doit être stable de la colonne au détecteur. On utilise pour ce faire, une vanne haute pression à plusieurs voies, manuelle ou motorisée dans le cas des injecteurs automatiques, placée juste avant la colonne (Figure 2). Il s'agit d'une pièce de précision qui doit résister à des pressions pouvant dépasser 30 000 kPa.

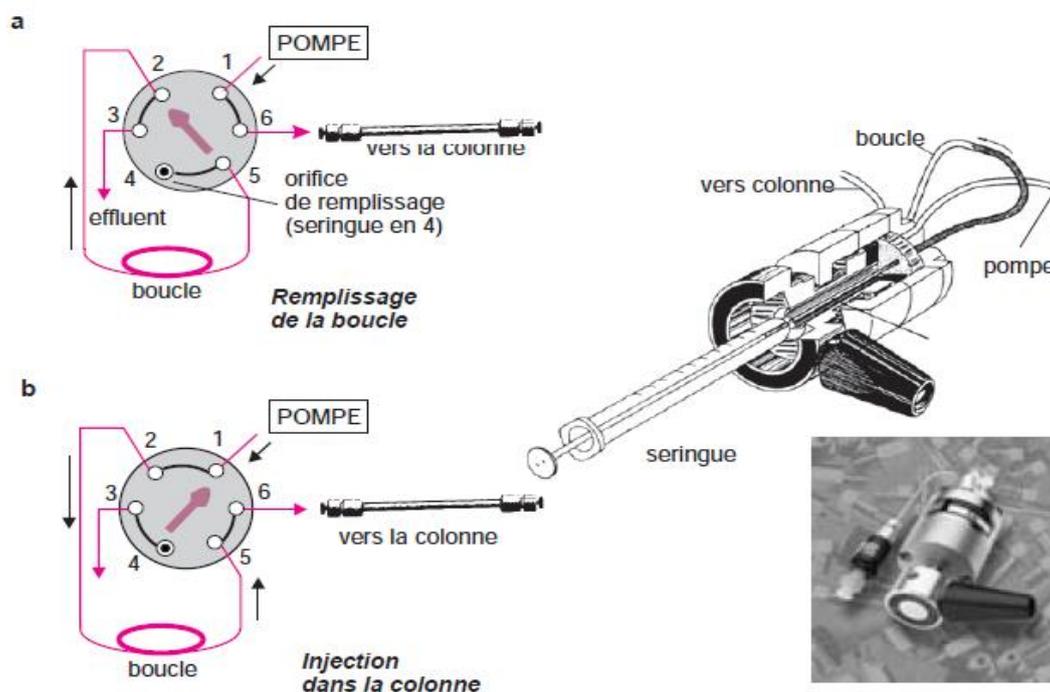


Figure 2. Injection avec une boucle.

Elle fonctionne en deux temps :

1. Remplissage de la boucle : le solvant d'éluion circule librement de la pompe (en 1) à la colonne (en 2). L'injection est réalisée (en 6) dans la boucle (tuyau métallique enroulé en boucle et de volume connu, typiquement de l'ordre de 10 μ l). Le surplus de solvant est évacué dans l'effluent, communément appelé l'évier (en 4).

2. Injection de l'échantillon : On bascule la vanne par action d'un levier et le solvant va alors balayer la boucle (de 1 à 4) et entraîner l'échantillon dans la colonne.

3.5 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. La colonne est souvent précédée d'une précolonne, dite *colonne de garde*, courte (0,4 à 1 cm), remplie de la même phase stationnaire, ce qui sert à retenir certaines impuretés (Figure 3).

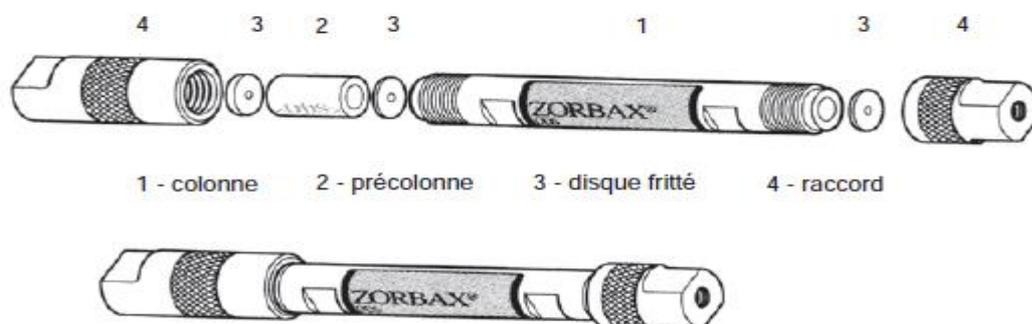


Figure 3. Colonne standard et précolonne de CLHP.

3.6. Phase stationnaire

1.6.1. 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 apolaire 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.

5.5.2. Phase inverse

La phase inverse est majoritairement composée de silice greffée par des chaînes linéaires de 8 ou 18 atomes de carbones (C8 et C18). Cette phase est apolaire et nécessite donc un éluant polaire (ACN, MeOH, H₂O). Dans ce cas, ce sont les composés polaires qui seront élués en premier. Contrairement à une phase normale, il n'y a pas d'évolution de la phase stationnaire au cours du temps, et la qualité de la séparation est donc maintenue constante (Figure 4).

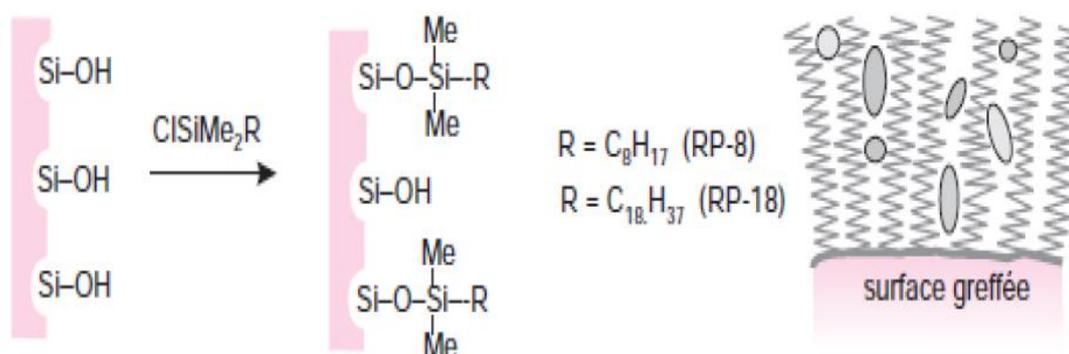


Figure 4. Gel de silice greffé

3.7. 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'éluion 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'éluion 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.

En plus du pouvoir d'élution le choix de la phase mobile dépend aussi d'un certain nombre de facteurs dont les plus importants sont la solubilité de l'échantillon, la compatibilité de la phase mobile avec le détecteur et la viscosité de la phase mobile. Aucun de ces paramètres n'est une variable indépendante et le meilleur solvant est donc celui qui donne une réponse optimale à toutes ces conditions (Figure 5).

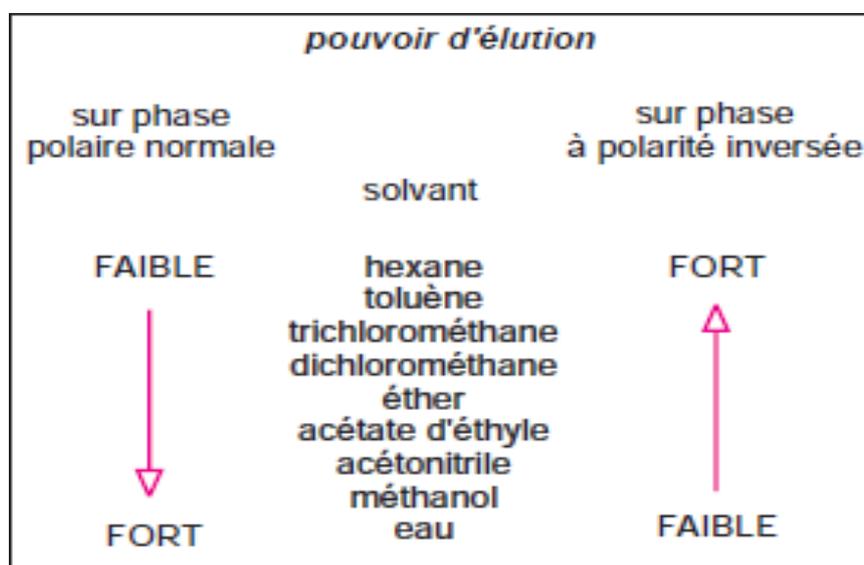


Figure 5. « Force d'élution » des solvants utilisés comme phases mobiles.

3.8. 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 deux types de détecteurs :

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

3.8.1. Détecteurs spectrophotométriques

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).

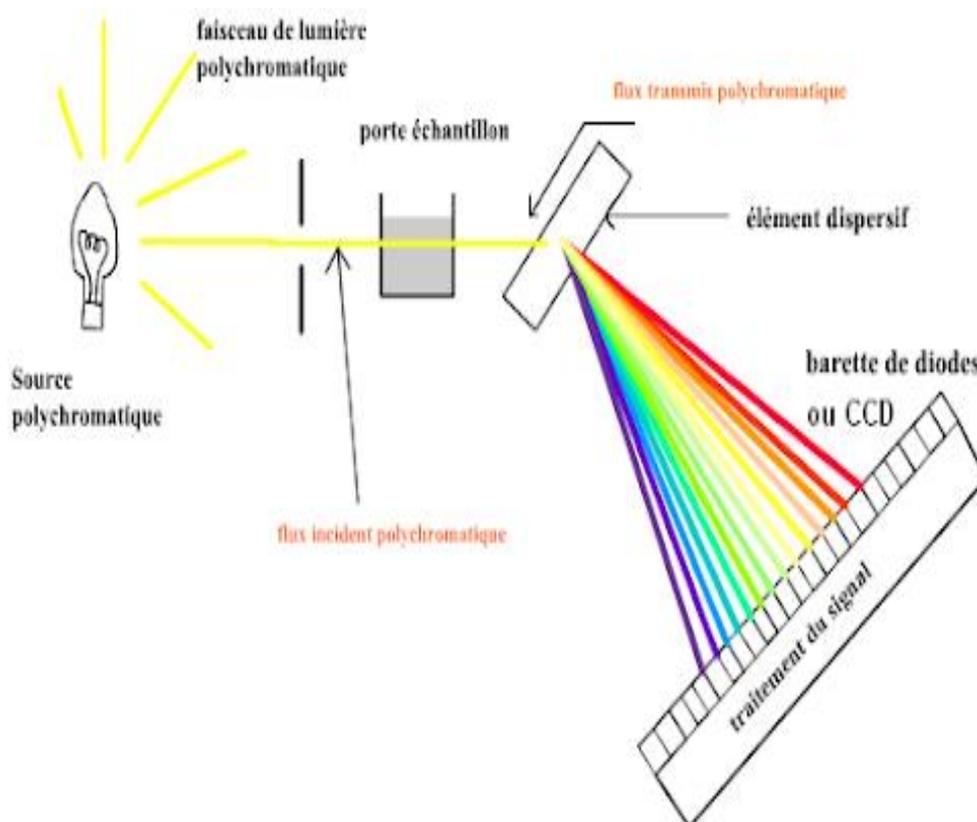


Figure 6. Schéma du principe du spectrophotomètre UV-visible

5.7.2. Détecteur réfractométrique

Ce type de détecteur comporte un réfractomètre différentiel qui a pour objet de mesurer en continu la différence d'indice de réfraction entre la phase mobile et l'effluent de la colonne. Pour cela un faisceau lumineux (mono- ou polychromatique) passe à travers une cellule comportant deux compartiments dont l'un est rempli avec la phase mobile seule et l'autre avec l'effluent en sortie de colonne (figure 7). La différence d'indice entre les deux liquides, qui apparaît lorsqu'un composé est mélangé à l'éluant, se traduit par un déplacement angulaire du rayon réfracté. Dans la pratique, le signal correspond à la mesure en continu de la rétroaction qu'il faut fournir à un élément optique pour compenser la déviation du faisceau réfléchi.

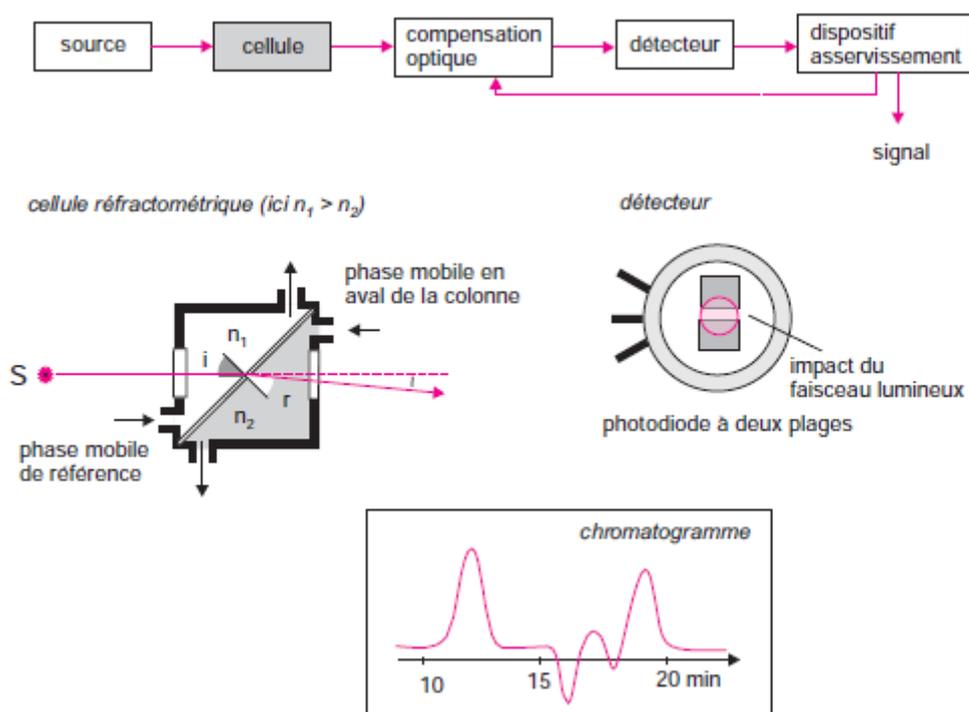


Figure 7. Un détecteur réfractométrique différentiel à déviation.

Trajet optique au niveau de la cellule.

Ce détecteur considéré comme quasi universel présente l'inconvénient d'être beaucoup moins sensible que le détecteur UV, et d'être trop sensible aux variations de température. Il faut que sa température soit parfaitement régulée (à 0,001 °C) et que la colonne soit thermostatée. Il conduit à des pics négatifs ou positifs, ce qui impose un

réglage de la ligne de base à mi-hauteur du graphe. Il ne peut être utilisé qu'en mode isocratique. En effet, en gradient d'élution, la composition de la phase mobile évolue au cours du temps ainsi que son indice, d'où une dérive de la ligne de base. La compensation, facilement obtenue dans le cas d'un éluant de composition fixe, n'est plus réalisable quand la composition de l'éluant en tête de colonne diffère de celle qui en sort. Il n'est donc utilisé que pour les composés qui n'absorbent pas dans l'UV-Visible ou en série avec d'autres détecteurs.

4. Analyse quantitative

L'analyse quantitative consiste à **doser**, c'est-à-dire déterminer la concentration d'un ou de plusieurs composés du mélange inconnu, une fois que ces composés ont été identifiés. La méthode repose essentiellement sur la détermination de la **surface** (parfois la hauteur) des pics. Ensuite, selon les besoins de l'expérimentateur, on pourra soit déterminer les pourcentages relatifs des constituants du mélange, soit déterminer la concentration d'un composé du mélange par la méthode de la courbe d'étalonnage ou par la méthode du standard interne.

4.1. Détermination de la surface des pics

La surface des pics d'un chromatogramme peut être déterminée selon l'une des méthodes suivantes :

1. Méthode par triangulation

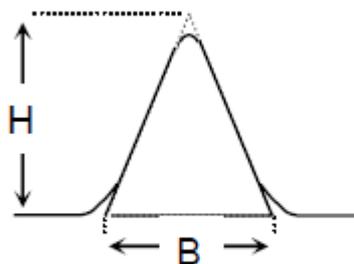
La méthode par triangulation est utilisée lorsqu'on utilise un enregistreur à plume qui ne possède pas d'intégrateur électronique. C'est une méthode qui donne des résultats exacts si les pics sont symétriques. On trace sur le pic deux tangentes qui croisent la ligne de base, de façon à former dans le pic un triangle isocèle. On calcule ensuite la surface du pic par la formule suivante :

$$SA = \frac{B \cdot H}{2}$$

SA = surface du pic A

B = base du triangle

H = hauteur du triangle



2. Méthode par intégration électronique

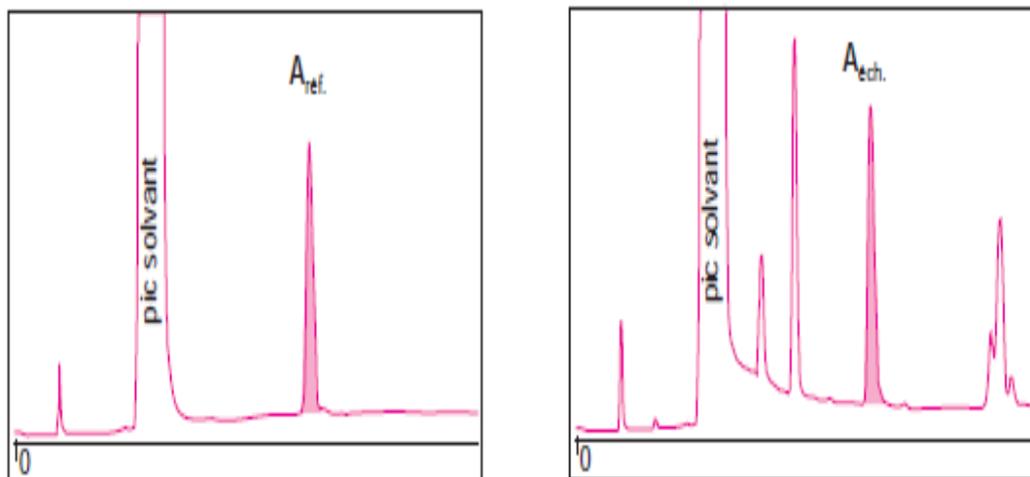
La méthode par intégration électronique est utilisée lorsqu'on possède un enregistreur (ou un logiciel d'application) muni d'un intégrateur électronique. Le chromatogramme est subdivisé en un nombre de points équidistants sur l'axe des X et sur l'axe des Y et l'intégrateur additionne le nombre de points situés à l'intérieur de la surface du pic à partir de la ligne de base. La somme des points du pic, qui est proportionnelle à sa grosseur, est gardée en mémoire pour les calculs ultérieurs de concentration.

4.2. Méthode de l'étalonnage externe

Cette méthode permet de calculer la teneur (en termes de concentration ou de pourcentage massique) d'un ou plusieurs constituants apparaissant séparés sur le chromatogramme, même en présence d'autres composés donnant des pics non résolus. Facile de mise en œuvre, elle correspond à l'application d'un principe commun à beaucoup de dosages. Le procédé repose sur la comparaison de deux chromatogrammes obtenus successivement **sans changer les conditions de réglage** de l'appareil (Figure 8). Le premier est un chromatogramme de référence acquis à partir d'une solution de référence (conc. $C_{réf}$) dans un solvant, du composé qui fait l'objet du dosage. On injecte un volume V de cette solution et on repère sur le chromatogramme l'aire $A_{réf}$ du pic correspondant. Le second résulte de l'injection d'un volume identique V de l'échantillon en solution, contenant le composé à doser (conc. $C_{éch}$). Soit $A_{éch}$ l'aire du pic correspondant. Puisque les volumes injectés sont égaux, il y a proportionnalité entre les aires, qui dépendent des masses injectées, et les concentrations correspondantes ($m_i = C_i \cdot V$).

$$m_{réf} = C_{réf} \cdot V = K \cdot A_{réf} \quad \text{et} \quad m_{éch} = C_{éch} \cdot V = K \cdot A_{éch}$$

$$C_{éch} = C_{réf} \frac{A_{éch}}{A_{réf}}$$



Chromatogramme d'étalonnage C_{ref} Chromatogramme de la solution à doser $C_{éch}$

Figure 8. Méthode de dosage par étalonnage externe.

4.3. Méthode de l'étalonnage interne (étalon interne)

Cette deuxième méthode repose sur l'utilisation du **coefficient de réponse relatif** de chaque composé à doser vis-à-vis d'un marqueur introduit comme référence. Cela permet de s'affranchir de l'imprécision concernant les volumes injectés, un handicap de la précédente méthode.

La méthode nécessite, ici encore, deux chromatogrammes, l'un pour calculer les coefficients de réponse relatifs et l'autre pour l'analyse de l'échantillon.

Les aires des pics des produits à quantifier sont donc comparées avec celle d'un composé de référence, appelé *étalon interne*, introduit à une concentration connue dans l'échantillon.

4.3.1. Calcul des coefficients de réponse relatifs

Supposons que l'échantillon contienne deux composés à doser 1 et 2, et que le composé E désigne un composé supplémentaire à usage d'étalon interne (Figure 9).

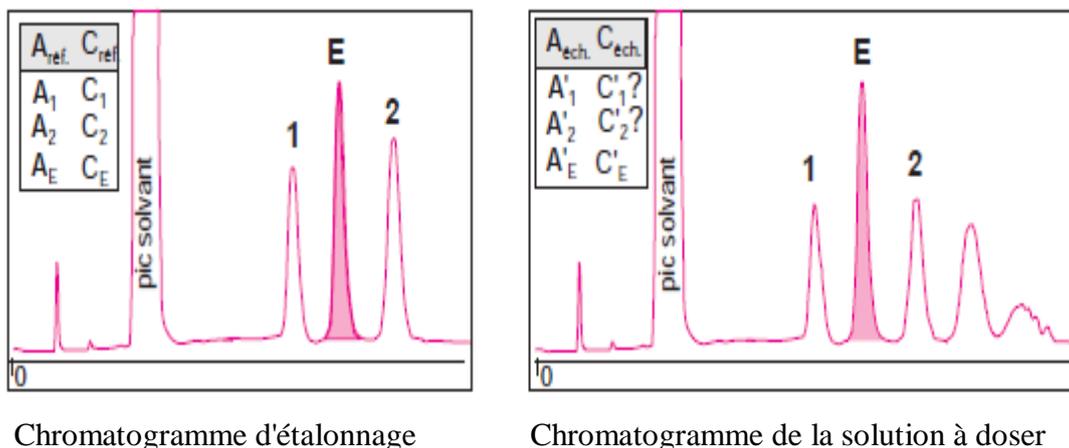


Figure 9. Méthode d'analyse par étalonnage interne.

Dans une première étape, on commence par préparer une solution de concentration C_1 en 1, C_2 en 2 et C_E en E . Appelons A_1 , A_2 et A_E les aires des pics d'éluion repérés sur le chromatogramme obtenu à partir d'une prise d'essai de cette solution. Si m_1 , m_2 et m_E sont les quantités réellement introduites dans la colonne, on peut écrire les trois relations suivantes :

$$m_1 = K_1 \cdot A_1$$

$$m_2 = K_2 \cdot A_2$$

$$m_E = K_E \cdot A_E$$

$$\frac{m_1}{m_E} = \frac{K_1 \cdot A_1}{K_E \cdot A_E} \quad \text{et} \quad \frac{m_2}{m_E} = \frac{K_2 \cdot A_2}{K_E \cdot A_E}$$

Ces rapports permettent de calculer les coefficients de réponse relatifs de 1 et de 2 vis-à-vis de E choisi comme étalon, et désignés par $K_{1/E}$ et $K_{2/E}$:

$$K_{1/E} = \frac{K_1}{K_2} = \frac{m_1 \cdot A_E}{m_E \cdot A_1} \quad \text{et} \quad K_{2/E} = \frac{K_2}{K_E} = \frac{m_2 \cdot A_E}{m_E \cdot A_2}$$

Comme les masses m_i réellement injectées sont proportionnelles aux concentrations massiques correspondantes C_i , ($m_i = C_i \cdot V$), on en déduit les deux expressions suivantes :

$$K_{1/E} = \frac{C_1 \cdot A_E}{C_E \cdot A_1} \quad \text{et} \quad K_{2/E} = \frac{C_2 \cdot A_E}{C_E \cdot A_2}$$

4.3.2. Calcul des concentrations

La seconde étape de l'analyse consiste à chromatographier un volume quelconque d'une solution faite avec l'échantillon à étudier et dans laquelle a été ajoutée une quantité connue du composé E . Soient A'_1 , A'_2 , A'_E , les aires du nouveau chromatogramme obtenu dans les mêmes conditions opératoires. Si m'_1 , m'_2 , m'_E désignent les masses de 1, 2 et E réellement introduites dans la colonne, on aura :

$$\frac{m'_1}{m'_E} = K_{1/E} \cdot \frac{A'_1}{A'_E} \quad \text{et} \quad \frac{m'_2}{m'_E} = K_{2/E} \cdot \frac{A'_2}{A'_E}$$

À partir des coefficients relatifs calculés dans la première expérience ainsi que de la concentration de l'étalon interne dans l'échantillon, C'_E connue, on accède à :

$$C'_1 = C'_E \cdot K_{1/E} \cdot \frac{A'_1}{A'_E} \quad \text{et} \quad C'_2 = C'_E \cdot K_{2/E} \cdot \frac{A'_2}{A'_E}$$

En généralisant à n constituants, on peut calculer la concentration massique du soluté i au moyen de l'expression suivant:

$$C'_i = C'_E \cdot K_{i/E} \cdot \frac{A'_i}{A'_E}$$

et en déduire sa teneur dans l'échantillon, exprimée en %:

$$x_i \% = \frac{C'_i}{\text{Masse d'échantillon prélevée}} \cdot 100$$

Cette méthode est encore plus précise si on fait plusieurs injections de l'étalon ou de l'échantillon à doser. En conclusion cette méthode générale et reproductible exige néanmoins un bon choix de l'étalon interne dont les caractéristiques peuvent se résumer ainsi :

- il doit être pur et ne pas se trouver initialement dans l'échantillon.
- son pic d'éluion doit être bien résolu par rapport à tous ceux qui forment le chromatogramme de l'échantillon.
- son temps de rétention doit être proche de celui (ou de ceux) du (ou des) soluté(s) à doser.
- sa concentration doit être proche ou supérieure à celle des autres solutés pour être dans les conditions d'une réponse linéaire du détecteur.
- il doit être inerte vis-à-vis des composés de l'échantillon.

4.4. Méthode par normalisation interne

Cette méthode, également appelée « 100 % normalisée », est réservée aux mélanges dont on a identifié tous les constituants par autant de pics d'éluion séparés sur le chromatogramme, afin de pouvoir faire le bilan complet de l'échantillon concerné. Supposons qu'il s'agisse de trouver les concentrations massiques d'un mélange de trois composés 1, 2, 3 (Figure 10). On va procéder ici encore en deux étapes.

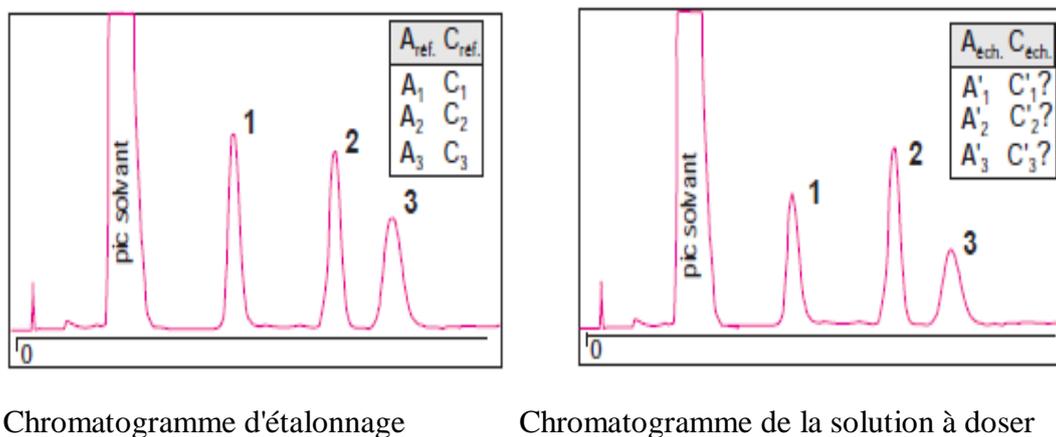


Figure 10. Méthode d'analyse par étalonnage interne.

4.4.1. Calcul des coefficients de réponse relatifs

On prépare une solution d'étalonnage contenant les trois composés 1, 2, et 3 dont les concentrations massiques sont respectivement C_1 , C_2 , C_3 . Le chromatogramme correspondant à l'injection d'un volume V , présente trois pics d'aires A_1 , A_2 et A_3 . Ces aires seront reliées aux masses injectées m_1 , m_2 et m_3 par trois expressions précédemment. On choisit l'un des composés comme substance de normalisation interne, le composé 3 par exemple, afin de déterminer les coefficients de réponse relatifs $K_{1/3}$ et $K_{2/3}$ des composés 1 et 2 par rapport à 3. On trouve comme précédemment :

$$K_{1/3} = \frac{K_1}{k_3} = \frac{m_1 \cdot A_3}{m_3 \cdot A_1} \quad \text{et} \quad K_{2/3} = \frac{K_2}{k_3} = \frac{m_2 \cdot A_3}{m_3 \cdot A_2}$$

Étant donné que $m_i = C_i \cdot V$, on aboutit, pour $K_{1/3}$ et $K_{2/3}$, aux expressions suivantes:

$$K_{1/3} = \frac{C_1 \cdot A_3}{C_3 \cdot A_1} \quad \text{et} \quad K_{2/3} = \frac{C_2 \cdot A_3}{C_3 \cdot A_2}$$

4.4.2. Calcul des concentrations

On procède ensuite à l'injection d'un prise d'essai du mélange à doser contenant les constituants 1, 2 et 3. En désignant les surfaces des pics d'éluion par A'_1, A'_2, A'_3

On aura accès directement à la composition centésimale massique du mélange représentée par x_1, x_2 et x_3 en écrivant trois expressions de la forme :

$$x_i \% = \frac{K_{i/3} \cdot A'_i}{K_{1/3} \cdot A'_1 + K_{2/3} \cdot A'_2 + A'_3} \cdot 100$$

La condition de normalisation étant que $x_1 + x_2 + x_3 = 100$

En extrapolant à n solutés normalisés par rapport à un soluté j , l'expression générale des facteurs de réponse est la suivante (pour un composé choisi i) :

$$K_{i/j} = \frac{C_i \cdot A_j}{C_j \cdot A_i}$$

Il est également possible de déterminer des $K_{i/j}$ moyens par tracé du graphe concentration réponse pour chaque soluté. Pour l'échantillon contenant n solutés, si A'_i désigne l'aire du pic d'éluion du composé i , le composé servant de référence interne étant j , la teneur en composé i obéira à la relation :

$$x_i \% = \frac{K_{i/j} \cdot A'_i}{\sum_{i=1}^n K_{i/j} \cdot A'_i} \cdot 100$$