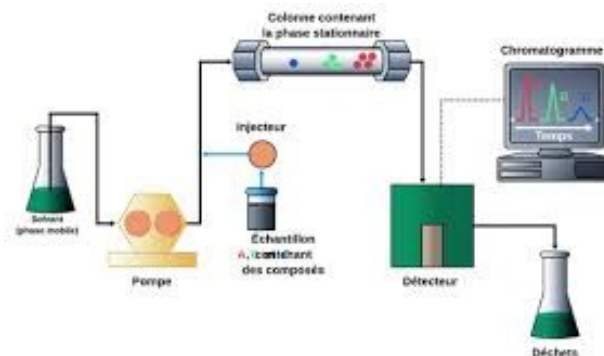


II.2 Chromatographie en Phase Liquide Haute Performance (HPLC)



Introduction :

La chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC) est une technique analytique puissante utilisée pour séparer, identifier et quantifier les composants d'un mélange complexe. Son développement a permis de surmonter les limitations de la chromatographie liquide classique en améliorant la résolution, la rapidité et la sensibilité. Aujourd'hui, elle est incontournable dans les domaines pharmaceutique, alimentaire, environnemental et de la recherche.

(HPLC) (*high performance liquid chromatography*) ou plus rarement (*high pressure liquid chromatography*) : 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 a été attribué à Performance afin de marquer cette innovation.

II.2.1 Types de chromatographie en phase liquide

Il y a plusieurs types de chromatographie en phase liquide. La nature de la phase stationnaire dépend du type de chromatographie en phase liquide que l'on veut faire ainsi que de la nature et du nombre de composés que l'on veut séparer.

(a) Chromatographie d'adsorption

Dans cette chromatographie, la phase stationnaire consiste en une matière solide à grand pouvoir d'adsorption, telle que l'oxyde d'aluminium, les silicates de magnésium, les gels de silice. Les composants sont simplement plus ou moins retenus à la surface de la phase stationnaire par [adsorption](#) physique. C'est une technique qui prend en compte la [polarité](#) des composants.

(b) Chromatographie de partage

Dans cette chromatographie les [analytes](#) sont séparés en fonction de leur affinité avec les phases stationnaire et mobile. L'affinité dépend de la polarité des analytes et des phases. En mode normal la phase stationnaire est polaire, en mode inverse elle est apolaire. Il y a deux types de chromatographie de partage :

- *liquide - liquide* : la phase stationnaire consiste en une très fine couche de liquide répartie par adsorption physique à la surface du matériau support le plus inerte possible. Les composants sont séparés comme dans une [extraction liquide-liquide](#), sauf que la répartition des composants se fait lors du passage dans la phase liquide et non par agitation ;
- *liquide - solide* ou *liquide - phase greffée* : la phase stationnaire consiste en une espèce organique liée par des liaisons chimiques à la surface des particules du matériau support.

(c) Chromatographie en phase normale

La chromatographie en phase normale (NPLC) consiste à séparer différents analytes selon leur polarité. Cette technique de séparation découle de l'expérience de Tswett et de son montage de chromatographie réalisé avec des pigments végétaux. Au cours des années, cette dernière a été développée davantage afin de séparer des mélanges de plus en plus complexes, en modifiant la polarité des phases et en améliorant la méthodologie de séparation analytique (ajout d'une pompe pour augmenter la pression du système et accélérer l'élution, automatisation du procédé, etc.). Celle-ci est basée sur les interactions hydrophiles et les affinités d'un analyte envers la phase mobile et stationnaire dans le but de les séparer en fonction de leur polarité.

■ Principe

La chromatographie en phase normale (NPLC) est un type de chromatographie qui fait intervenir les interactions polaires, contrairement à la chromatographie en phase inverse (RPLC), qui fait intervenir les interactions hydrophobes. Il s'agit d'un mécanisme de compétition entre la rétention d'un soluté dans la phase stationnaire et l'élution du soluté dans la phase mobile, donc des affinités de chaque analyte envers la phase mobile et la phase stationnaire. On fait donc passer un solvant non polaire ou modérément polaire dans la colonne. Les solutés les plus retenus dans la phase stationnaire seront élués en dernier alors que les solutés les moins retenus seront élués en premier. Différents types d'interactions sont exploités tels que les ponts hydrogène, les interactions dipôle-dipôle et les interactions acide-base

II.2.2 Principes de Base de la HPLC :

La HPLC repose sur le principe de séparation des composants d'un mélange en fonction de leurs interactions différentielles avec une phase stationnaire et une phase mobile. Ces interactions incluent des forces hydrophobes, ioniques et polaires.

L'échantillon à analyser est poussé par un liquide (appelé phase mobile) dans une colonne remplie d'une phase stationnaire de fine granulométrie de très petite taille. Le débit d'écoulement de la phase mobile est élevé ce qui entraîne une augmentation de la pression dans le système. Ce débit élevé diminue le temps nécessaire pour séparer les composants le long de la phase stationnaire. La fine granulométrie de la phase stationnaire permet une meilleure séparation des composants. En effet, pour un même volume de phase stationnaire la surface d'échange augmente si les « grains » qui la composent sont de diamètre plus petit. Les pics obtenus (via un détecteur à UV relié à un système d'intégration et de calcul) sont plus étroits donc la résolution est améliorée (les pics sont bien séparés, on peut donc bien les différencier).

Les phases mobiles utilisées sont des mélanges d'eau et d'un solvant organique miscible (acétonitrile, méthanol) ou des combinaisons de solvants organiques (alcools, hexane). Souvent, la composition de la phase mobile est modifiée au cours de l'analyse, c'est le mode dit « gradient » ou « élution graduée » (en opposition au mode « isocratique », pour lequel la composition de la phase mobile reste la même tout au long de la séparation

II.2.3 Conception générale d'un appareil de HPLC (CLHP) :

Une installation de CLHP (HPLC) comporte divers modules spécialisés, qui se présentent dans des boîtiers distincts ou intégrés dans un même châssis pour des raisons de moindre encombrement (fig.1). Ces modules sont reliés entre eux par l'intermédiaire de canalisations de très faible diamètre interne (0,1 mm) pour assurer la circulation de la phase mobile. Elles peuvent être en acier inoxydable. L'écoulement des faibles débits obéit à la loi de Poiseuille. La vitesse de la phase mobile est maximum au centre des canalisations et nulle au contact des parois. Une dispersion des composés se produit donc inévitablement. Pour

améliorer les séparations on fait donc en sorte que le volume de phase mobile hors-colonne soit le plus réduit possible (10 % du volume mort de la colonne)

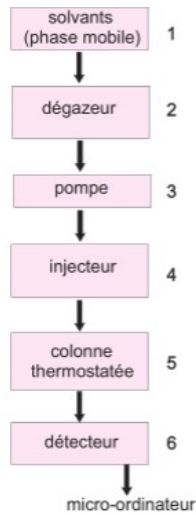
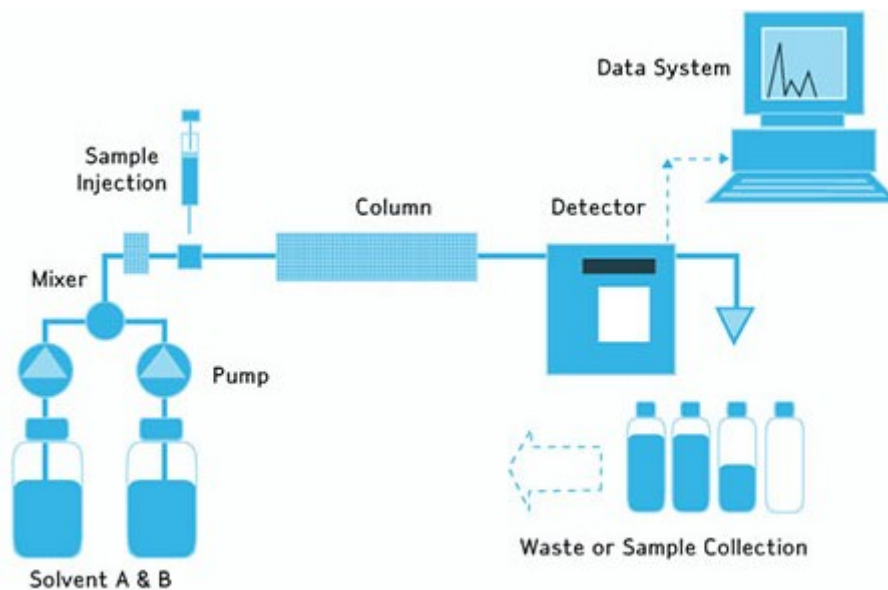


Fig 1: Schema d'une installation de HPLC



Donc : Les Composants Essentiels d'un Système HPLC :

- ❖ **Pompe** : Garantit un flux constant à haute pression (jusqu'à 6000 psi).
- ❖ **Injecteur** : Permet l'introduction précise de l'échantillon dans la colonne.
- ❖ **Phase mobile** : Liquide utilisé pour entraîner les analytes dans la colonne. Elle peut être aqueuse, organique ou un mélange des deux.
- ❖ **Colonne** : Remplie de phase stationnaire, elle est le cœur de la séparation.

❖ **Détecteurs** : Convertissent la réponse chimique en signal (ex : détecteurs UV-visible pour les composés absorbants la lumière).

❖ **Système informatique** : Acquiert et traite les données chromatographiques.

(a) Pompes pour éluant :

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 le débit imposé à la phase mobile ou sa viscosité ainsi que selon la nature de la phase stationnaire. On utilise des pompes conçues pour maintenir un débit non pulsé et stable, même si la composition de la phase mobile varie. Ces pompes débit-métriques comportent généralement deux pistons : ces deux pistons alternatifs fonctionnant en opposition pour éviter les interruptions de débit dues au remplissage du cylindre.

(b) 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.

➤ Où, l'échantillon est inséré dans le flux de phase mobile par rotation de 60° d'un levier qui permet d'inverser le sens de circulation dans la boucle. Une bonne reproductibilité des volumes n'est atteinte que si la boucle a été totalement remplie par l'échantillon. Le volume prélevé avec la seringue est donc toujours largement supérieur à celui de la boucle.

Il y a plusieurs types d'injecteurs :

- ❑ Boucle d'injection : permet la répétabilité du volume d'injection
- ❑ Injecteur seringue
- ❑ Extraction sur phase solide en ligne

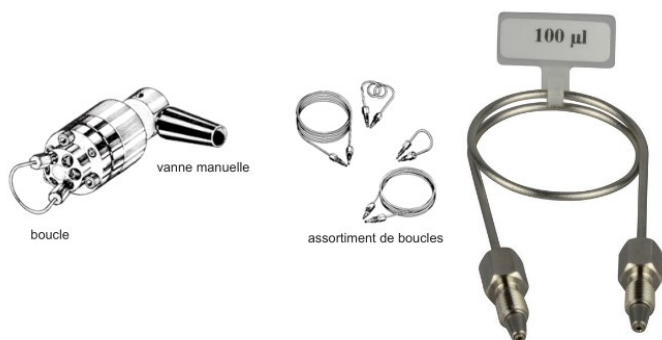


Fig 2 : Vanne d'injection pour CLHP et boucles assorties. Vanne vue de l'arrière (vanne à 6 entrées/sorties avec une boucle raccordée) et assortiment de boucles de différents volumes

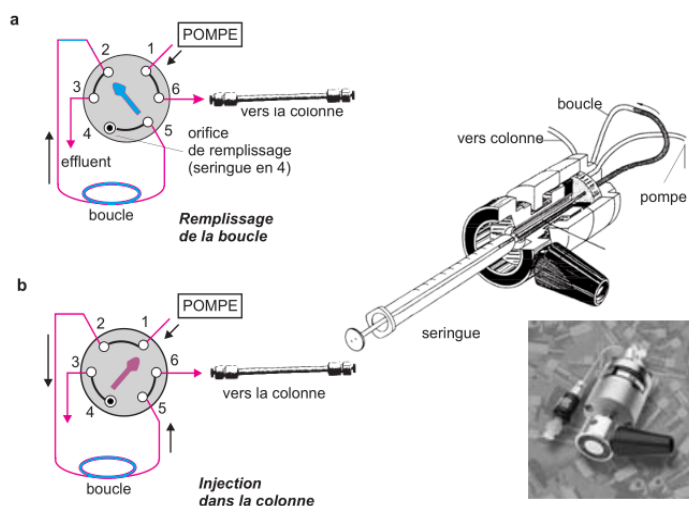


Fig 3 : Injection avec une boucle. a) Remplissage de la boucle. Dans cette étape, la seringue est introduite à la position n ° 4; b) injection dans la colonne (noter la nouvelle position de la manette). Vanne modèle 7125. Les vannes sont motorisables.

(c) Colonnes

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. 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 (Fig. 4).

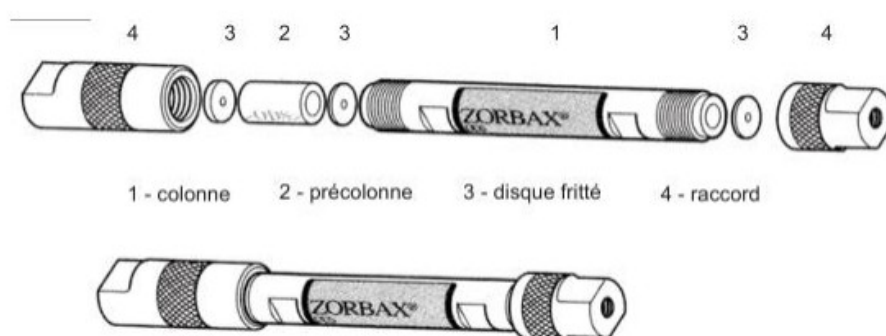


Fig 4 : Colonne standard et précolonne de HPLC



(d) Phases stationnaires :

Généralement constituées de silice modifiée chimiquement. Elles offrent des interactions spécifiques avec les analytes (C18, C8, phases chirales, etc.).

Les phases stationnaires utilisées pour une chromatographie en phase normale sont des phases polaires. Un avantage de cette chromatographie est qu'il est possible de modifier les interactions, autant celles entre les analytes et la phase stationnaires, que celles avec les analytes et la phase mobile et la phase mobile avec la phase stationnaire. Puisque l'analyte se déplace en fonction de son affinité pour la phase mobile et la phase stationnaire, il est possible de choisir les deux phases afin d'optimiser la séparation d'un système complexe. On peut

directement utiliser la silice puisqu'elle contient des groupements silanols (Si-OH) en surface. Selon la méthode utilisée pour la synthèse de la silice, la surface spécifique des particules, le diamètre des particules ainsi que le diamètre des pores varie grandement. Chaque type de silice possède ses propres propriétés de séparation. Des types des silices contenant plus de groupement silanols libres (plus acide) ou moins de groupements silanols peuvent aussi être utilisés en fonction du type de séparation désiré.

Il est aussi possible de fonctionnaliser la silice afin de faire varier la polarité ou le caractère de la silice en surface, tout en rendant sa surface plus homogène. Selon le type de séparation que l'on désire faire, on doit choisir entre trois classes de silice fonctionnalisée suivant le triangle de sélectivité suivant :

1. Accepteur de proton ;
2. Donneur de proton ;
3. Interactions dipôle-dipôle.

Si la séparation ne fonctionne pas avec un type de silice, on choisit un second type qui se situe dans une autre classe afin d'engendrer le changement le plus drastique des interactions entre la phase stationnaire et les analytes. Les silices fonctionnalisées les plus souvent utilisées pour la chromatographie en phase normale sont la silice cyanopropylée, la silice aminopropylée et la silice 1,2-hydroxypropylée (diol). D'autres groupements peuvent aussi être utilisés pour la fonctionnalisation de la silice pour des applications plus spécifiques, mais ceux-ci suffisent en général. La colonne diol est une colonne acide, la colonne amino est une colonne plutôt basique alors que la colonne cyano fait des interactions dipôle dipôle modérées.

■ Le gel de silice, matière de base des phases actuelles

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. Ce matériau de base est un solide amorphe ayant pour formule de composition $\text{SiO}_2 (\text{H}_2\text{O})_n$ (avec n très proche de 0). Il est tout à fait différent de la silice naturelle cristalline (SiO_2) qui n'est qu'un précurseur très éloigné de sa préparation. Cette dernière fait appel à des procédés de polymérisation sol-gel d'un tétraalcoxysilane (ex. tétraéthoxy-silane) au sein d'un liquide, sous l'effet d'une hydrolyse catalysée.

Le gel de silice n'a pas la structure ordonnée de la silice cristalline, mais il reste néanmoins bâti autour de l'agencement tétraédrique des quatre liaisons issues de l'atome de silicium. C'est un polymère inorganique réticulé. Il comporte des groupements silanols, Si-OH en nombre variable, qui ont résisté à la phase finale de déshydratation thermique.

Ces groupements sont responsables des propriétés catalytiques acides de ce matériau très polaire car Si-OH a un pK de 10, comparable à celui du phénol. Leur concentration peut être établie par RMN du ^{29}Si ou par analyse centésimale du carbone pour les phases greffées.

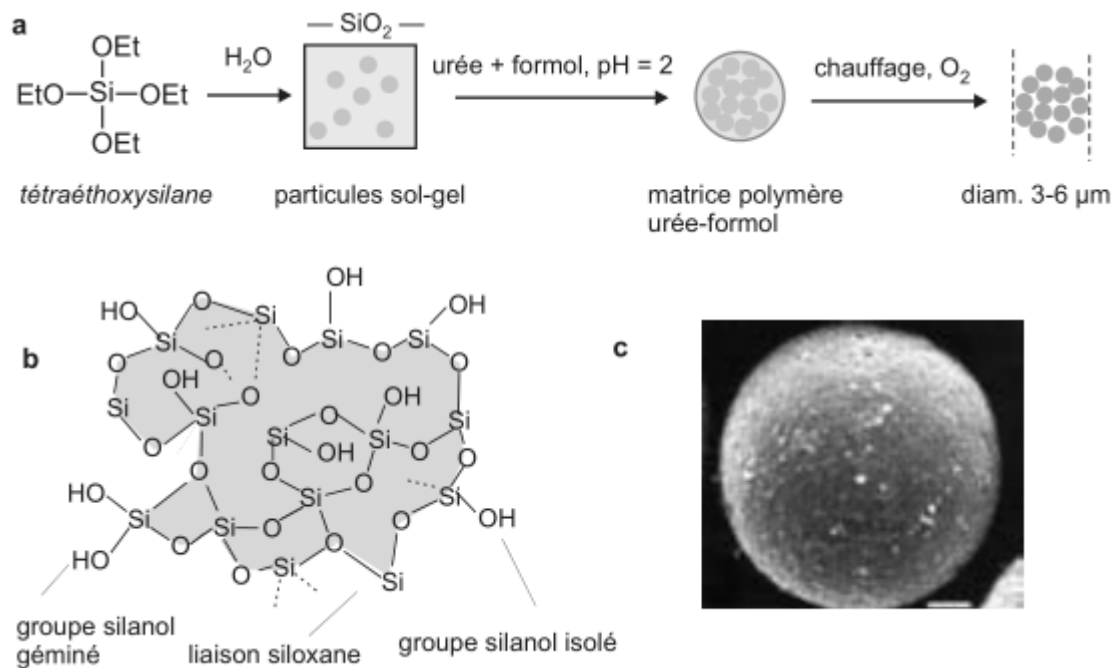


Figure 5. Le gel de silice pour chromatographie. a) préparation de grains sphériques de gel de silice via un sol-gel. La dispersion, appelée sol, constituée de particules sphériques de quelques nm de diamètre, s'agglutine en présence d'un liant organique urée/formol jusqu'à atteindre la taille voulue (3-7 μm). Le traitement final consiste en une pyrolyse pour éliminer la matrice organique. b) représentation du réseau, correspondant à un maillage tridimensionnel, d'un gel de silice porteur de groupements silanols. c) image d'une particule sphérique de gel de silice issu d'un assemblage compact de sphères submicroniques

▣ Porosité

Le gel de silice comporte des pores de tailles différentes. Pour remplir la colonne d'une manière homogène, il est préparé sous forme, soit de microparticules sphériques, soit d'un monolithe poreux (fig.8 et 10). Il est nécessaire en effet d'éviter la formation de chemins préférentiels pour la phase mobile et par suite pour les composés qui y sont dissous.

- Les micro-sphères ont un diamètre constant dans une même colonne mais il en existe plusieurs types allant de 1 à 12 μm .
- Les monolithes, apparus plus récemment, sont ainsi nommés parce qu'il s'agit d'un gel de silice formé d'une seule pièce dans la colonne même. La reproductibilité des caractéristiques de ce second type de colonne est plus difficile à maîtriser.

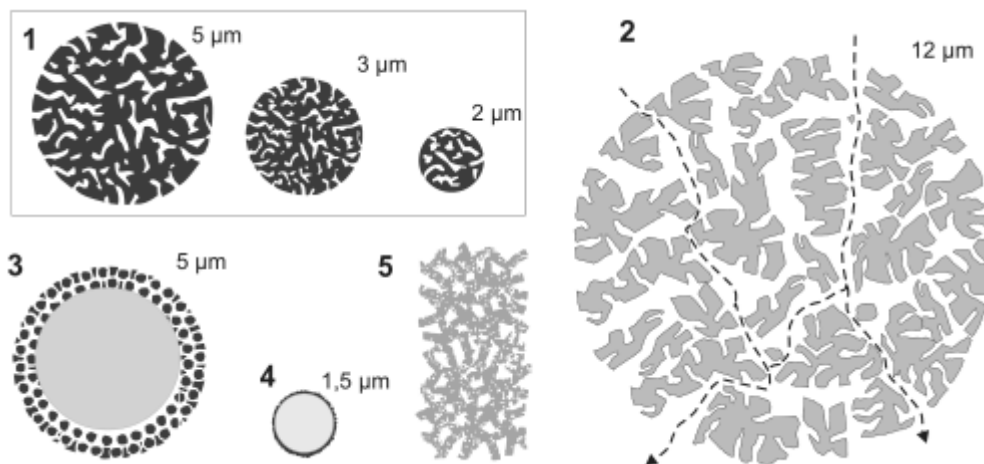


Fig 6 : Représentations imagées de quelques types de gels de silice (porosité et dimensions). 1- structure comportant des pores de diffusion répartis dans la totalité de la particule. 2- structure comportant des fissures de perfusion pour accélérer le processus de transfert. 3 et 4- Particules poreuse en surface avec un noyau non poreux. 5- détail de structure d'un remplissage du type monolithique.

▣ Les silices greffées

Bien qu'ayant une capacité d'adsorption élevée, le gel de silice décrit précédemment n'est plus utilisé tel quel en chromatographie analytique. Hydrophile par nature, ses caractéristiques évoluent au cours du temps, entraînant un manque de reproductibilité des séparations.

Pour diminuer sa polarité jugée excessive dans de nombreux cas on le rend essentiellement hydrophobe. Les modifications classiques mettent à profit la réactivité des fonctions silanols présentes en surface pour fixer des molécules organiques par des liaisons covalentes. Le gel de silice ainsi modifié devient assimilable à un liquide immobilisé, la séparation mettant en jeu les coefficients de partage et non plus les coefficients d'adsorption.

Ces phases greffées, dont la polarité peut être ajustée avec précision, sont à l'origine de la chromatographie de partage à polarité de phase inversée, utilisée dans quasiment toutes les séparations.

Ces modifications de la surface du gel conduisent à deux types de phases:

- ✓ Phases monomériques (10–15 µm d'épaisseur) : Elles sont obtenues en faisant réagir un monochlorosilane en présence d'une base sur les fonctions silanols de surface. On prépare ainsi les phases classiques RP-8 (groupement diméthyl-octylsilane) et RP-18 (groupement diméthyl-octadécylsilane, ou ODS). Une fraction des groupements Si-OH demeure cependant intacte. Elle peut être la cause d'interactions polaires gênantes. D'autres réactifs silylés tels le chlorotriméthylsilane (ClSiMe₃) ou l'hexaméthyl-disilazane (Me₃SiNH-SiMe₃), conduisent à une réaction plus complète. Les quelques sites restants non transformés, car inaccessibles au réactif, le sont également aux analytes.
- ✓ Phases polymériques (25 µm ou plus en épaisseur) : On utilise cette fois un di- ou trichlorosilane en présence de vapeur d'eau qui provoque une polymérisation en solution du réactif avant dépôt et greffage sur la silice. On obtient ainsi une couche polymérique réticulée.

L'architecture finale du revêtement est difficile à se représenter. Mono- ou multicouche, sa représentation à l'échelle moléculaire relève plutôt de la spéculation.



Fig 2 : Vanne d'injection pour CLHP et boucles assorties. Vanne vue de l'arrière (vanne à 6 entrées/sorties avec une boucle raccordée) et assortiment de boucles de différents volumes

(e) Détecteur

Il existe plusieurs types de détecteurs :

- ❑ détecteurs spectroscopiques :
 - par spectroscopie d'absorption : ultraviolet-visible ou infrarouge,
 - par spectroscopie de fluorescence ;
- ❑ réfractométrie ;
- ❑ détecteurs électrochimiques (DEC) :
 - ampérométriques,
 - coulométriques,
 - polarographiques,
 - potentiométriques ;
- ❑ conductimétrie ;
- ❑ UV à barrette de diodes (DAD) ;
- ❑ évaporatif à diffusion de la lumière (DEDL) ;
- ❑ détection spectrale avec couplage :
 - à la spectrométrie de masse (MS), exemples : chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse et chromatographie en phase liquide-spectrométrie de masse ;
 - à la spectroscopie atomique.

Fig 10. Détecteur HPLC



❑ Détecteurs à barrettes de photodiodes

Le détecteur à barrette de photodiodes (DAD) est un détecteur UV avancé. En fonction de la longueur d'onde, une lampe au tungstène et une lampe au deutérium sont utilisées comme

sources lumineuses. Le faisceau de lumière polychromatique est focalisé sur une cellule d'écoulement (volume de 8 à 13 μL) et ensuite dispersé par un réseau holographique ou un prisme de quartz. La lumière spectrale atteint alors une puce qui contient 100 à 1000 diodes photosensibles disposées côte à côte. Chaque diode enregistre seulement une fraction bien définie de l'information et de cette manière toutes les longueurs d'onde sont mesurées en même temps. Il convient de noter que si la présence de plus de diodes dans un réseau augmente la résolution des spectres UV, elle diminue la sensibilité absolue car une moindre quantité de rayonnement est absorbée par chaque diode. La résolution en longueur d'onde des détecteurs les plus récents est de l'ordre de 1 nm par diode, avec une précision de longueur d'onde supérieure à ± 1 nm et une sensibilité inférieure à 10^{-4} unités d'absorption. Toutes les opérations du détecteur sont commandées par un ordinateur: correction des fluctuations de l'énergie de la lampe, collecte des signaux ($I\lambda$) de toutes les diodes, stockage des données de la phase mobile ($I_0\lambda$, mesurée au début du chromatogramme) et calcul de l'absorbance selon la loi de Beer-Lambert de $I\lambda$ à $I_0\lambda$. Le nombre de spectres enregistrés par seconde peut être choisi entre 0,1 et 10; habituellement, un spectre / seconde est optimal en ce qui concerne la résolution chromatographique et le bruit. En fin de parcours, un spectrochromatogramme tridimensionnel (absorbance en fonction de la longueur d'onde et du temps) est stocké sur l'ordinateur et peut être évalué qualitativement et quantitativement. Une description détaillée de l'opération DAD est donnée dans Huber et George (1993).

La détection des barrettes de diodes offre plusieurs avantages. La connaissance des spectres des composés d'intérêt permet d'éliminer les pics d'interférence de sorte qu'une quantification précise des pics d'intérêt peut être obtenue malgré une résolution moins qu'optimale. La détection simultanée à deux longueurs d'onde permet de calculer un rapport d'absorbance. Si ce rapport n'est pas constant à travers un pic, le pic n'est pas pur, quel que soit son aspect. Un avantage supplémentaire de la détection par réseau de diodes est la soustraction d'une longueur d'onde de référence. Cela réduit la dérive de la ligne de base pendant l'élution du gradient. Les systèmes HPLC-DAD liés aux banques de spectres UV sont particulièrement utiles en toxicologie clinique et médico-légale pour le criblage de médicaments dans des échantillons biologiques et son utilisation dans ce contexte est décrite plus loin (Pragst et Herzler, communication personnelle). Refractive index detector The RI le détecteur est un détecteur universel, en ce sens que les changements de RI (positifs ou négatifs) qui résultent de la présence d'un composé dans l'éluant sont enregistrés. Cependant, c'est aussi le détecteur le moins sensible (jusqu'à 100 fois moins sensible que la détection UV). Des détecteurs d'IR peuvent être utilisés pour des excipients tels que des sucres dans des produits pharmaceutiques. De nombreux facteurs influencent l'IR et doivent être contrôlés pendant la séparation, tels que la température, la composition de l'éluant et la pression.

❖ Dégazeur

Le Dégazeur est un composant permet de retirer l'oxygène présent dans le(s) solvant(s) afin d'éviter d'endommager les échantillons ou la phase stationnaire. Deux types de dégazeurs sont utilisés en HPLC :

- ❑ Dégazeur à gaz inerte : On fait barboter un gaz inerte dans la PM (Phase Mobile) pour retirer le gaz dissous dans le liquide. L'hélium est le gaz inerte le plus utilisé pour cette application.
- ❑ Dégazeur par vide : Cette méthode consiste à descendre en pression dans une enceinte où se trouve le solvant à l'aide d'une pompe à vide primaire, et ainsi séparer le gaz dissous dans le fluide. Elle est bien plus efficace, ne requiert plus de gaz inerte, et remplace de plus en plus l'ancienne technique dans le domaine de l'analyse HPLC. La pression dans l'enceinte est de l'ordre du millibar.