

## **Chromatographie en phase liquide à haute performance**

La chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) appelée plus fréquemment par l'abréviation anglaise HPLC (*high performance liquid chromatography* ou plus rarement *high pressure liquid chromatography*) (voir Figure 1 et 2 à la fin du cours) est une technique de séparation analytique et/ou préparatrice de molécules présentes dans un mélange. Cela permet d'adapter les méthodes chromatographiques usuelles (voir Colonne) sur un montage 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 a été attribué à Performance afin de marquer cette innovation.

### **1. Principe**

L'échantillon à analyser est poussé par un liquide (appelé phase mobile) dans une colonne remplie d'une phase stationnaire de fine granulométrie (les « grains » sont 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 (les protéines absorbent à 275-280nm) 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), le seuil de détection est également plus bas (des pics étroits et hauts sont plus faciles à isoler du bruit de fond que des pics larges et bas).

**La combinaison de ces attributs - rapidité et résolution élevées - conduit à l'appellation « haute performance».**

**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, dichlorométhane...) miscibles entre eux.**

**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).**

Par exemple, sur une colonne apolaire, en utilisant un mélange eau/méthanol comme phase mobile, les composants les plus hydrophobes sont élués avec une concentration élevée en méthanol alors que les composants plus hydrophiles sont élués préférentiellement avec une concentration faible en méthanol. Selon la nature de la phase stationnaire et la nature des composés à séparer, on commencera par une concentration élevée en méthanol ou le contraire. L'HPLC est applicable à tous les principes chromatographiques : adsorption, partage, gel-filtration, échange d'ions, affinité, etc.

## **2.Appareillage et fonctionnement**

### **2.1 Pompe**

C'est la partie qui sert à stocker l'éluant et à l'injecter sous pression dans la colonne. Elle est composée de :

- Deux pistons alternatifs
- Réservoirs de phase mobile
- Électrovannes
- Amortisseur de pulsations
- Système de purge et d'amorçage
- Capteur de pression

On utilise une pompe pour une élution isocratique ou plusieurs pour une élution par gradient.

### **2.2 Injecteur**

Des tubes en acier inoxydable, en Teflon, en PEEK ou en silice fondue permettent de relier la ou les pompes à l'injecteur chromatographique. 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

## 2.3 Détecteur

Un détecteur de chromatographie est un appareil utilisé en chromatographie en phase gazeuse (CPG) ou en phase liquide (CPL) pour détecter les composants du mélange qui sont élués de la colonne de chromatographie. Il existe deux familles de détecteurs : destructif et non destructif.

### 2.3.1 Détecteurs destructifs

Les détecteurs destructifs effectuent une transformation continue de l'éluant (combustion, évaporation ou mélange avec des réactifs) avec mesure ultérieure de certaines propriétés physiques de la matière obtenue (plasma, aérosol ou mélange réactionnel).

En chromatographie liquide :

- Détecteur d'aérosols chargés (CAD) ;
- Détecteur à diffusion de lumière par évaporation (DEDL ou ELSD en anglais).

En chromatographie en phase gazeuse :

- Détecteur à ionisation de flamme (FID) ;
- Détecteur photométrique à flamme (FPD) ;
- Détecteur azote-phosphore (NPD) connu aussi sous le nom de détecteur thermoionique spécifique (DTS) ;
- Détecteur d'émission atomique (AED).

Dans tous les types de chromatographie :

- Détection spectrale avec couplage à la spectrométrie de masse (MS) donnant la chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse et la chromatographie en phase liquide-spectrométrie de masse.

### 2.3.2 Détecteurs non destructifs

Les détecteurs non destructifs mesurent directement certaines propriétés de l'éluant (par exemple, l'absorption UV) et permettent ainsi une plus grande récupération de l'analyte.

**En chromatographie liquide :**

- **Spectroscopie** :

-Spectroscopie d'absorption : ultraviolet-visible (comprenant un détecteur à barrette de diodes (DAD ou PDA)). Les longueurs d'ondes peuvent être fixes ou variables. L'absorption UV de l'éluant est mesurée en continu à une ou plusieurs longueurs d'onde. Les détecteurs ultraviolet-visible sont de loin les détecteurs les plus populaires en CPL<sup>1</sup>.

-Spectroscopie de fluorescence : irradie l'éluant avec une lumière de longueur d'onde définie et mesure sa fluorescence obtenue à une ou à plusieurs longueurs d'onde.

- **Réfractométrie (RI ou RID)** : mesure en continu l'indice de réfraction de l'éluant. Il a la plus faible sensibilité de tous les détecteurs. Il est souvent utilisé en chromatographie d'exclusion stérique pour l'analyse des polymères.
- **Détecteur de flux de radioactivité** : mesure la radioactivité de l'éluant. Ce détecteur peut être destructeur si un cocktail de scintillation est ajouté en permanence à l'éluant.
- **Détecteur chiral** : mesure en permanence le pouvoir rotatoire de l'éluant. Il est utilisé uniquement lorsque des composés chiraux sont en cours d'analyse.
- **Moniteur de conductivité** : mesure en continu la conductivité de l'éluant. Il est utilisé uniquement lorsque des éluants conducteurs (eau ou alcools) sont utilisés.

### **En chromatographie en phase gazeuse :**

- **Détecteur à thermo-conduction (TCD)** : mesure la conductivité thermique de l'éluant.
- **Détecteur à capture d'électrons (ECD)** : c'est le détecteur le plus sensible connu. Il permet la détection de molécules organiques contenant des halogènes, des groupes nitro, etc.
- **Détecteur à photoionisation (PID)** : mesure l'augmentation de la conductivité obtenue en ionisant le gaz éluant avec un rayonnement UV.

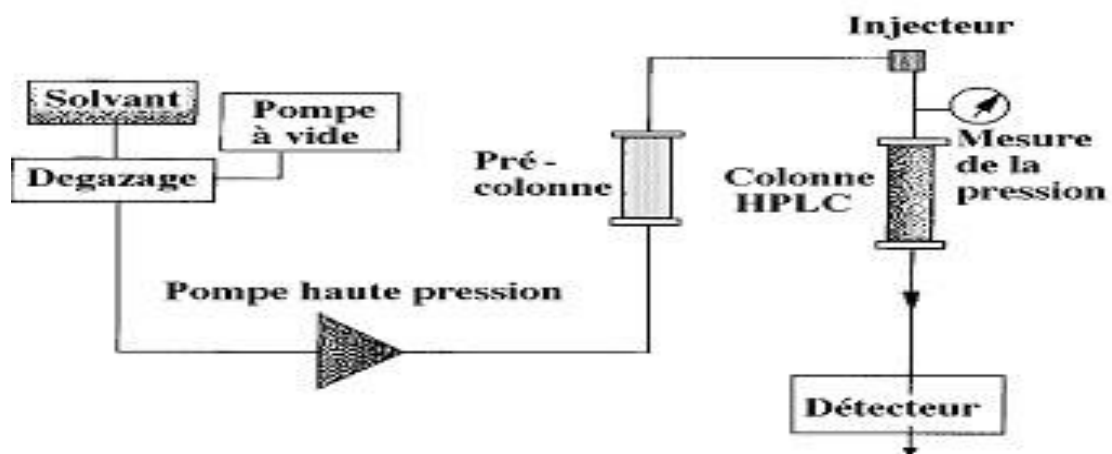
### **2.4 Dégazeur**

Comme son nom l'indique, ce composant permet de retirer le gaz (dioxygène) 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.



**Figure 1** : Image illustrant une HPLC.



**Figure 2** : Schéma simplifié d'une chromatographie de type HPLC