

La Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP)

Historique:

1960s: développement de la HPLC comme technique d'analyse

1974: début de la technique couplée LC-MS

1990s: développement et mise au point de la LC-MS

2000s: nouveaux matériaux de garnissage et de détecteurs

2006: nouvelles performances: UPLC, RRLC, UFLC, RSLC,



Historique:

HPLC est la technique de séparation la plus utilisée; elle recouvre le domaine d'analyse des composés thermosensibles ou de masses moléculaires à la fois très grandes et même polaires.

En principe, CL et HPLC fonctionnent de la même manière sauf que la vitesse, l'efficacité, la sensibilité et la facilité de fonctionnement de la CLHP sont largement supérieures.

HPLC: abbreviation de '*High Performance Liquid Chromatography*'

CLHP: Chromatographie Liquide à Haute Performance

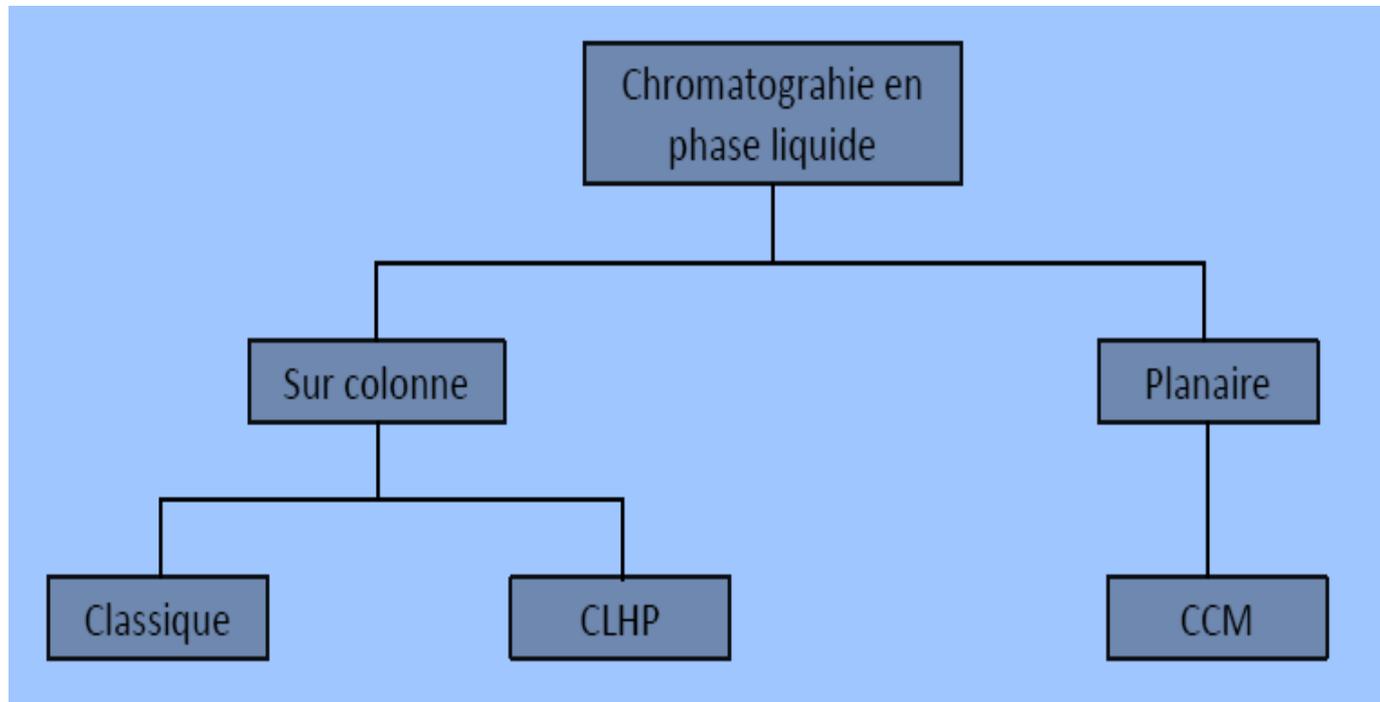
(ou **CL** à Haute Pression)

Définition:

La CLHP dérive de la chromatographie liquide sur colonne.

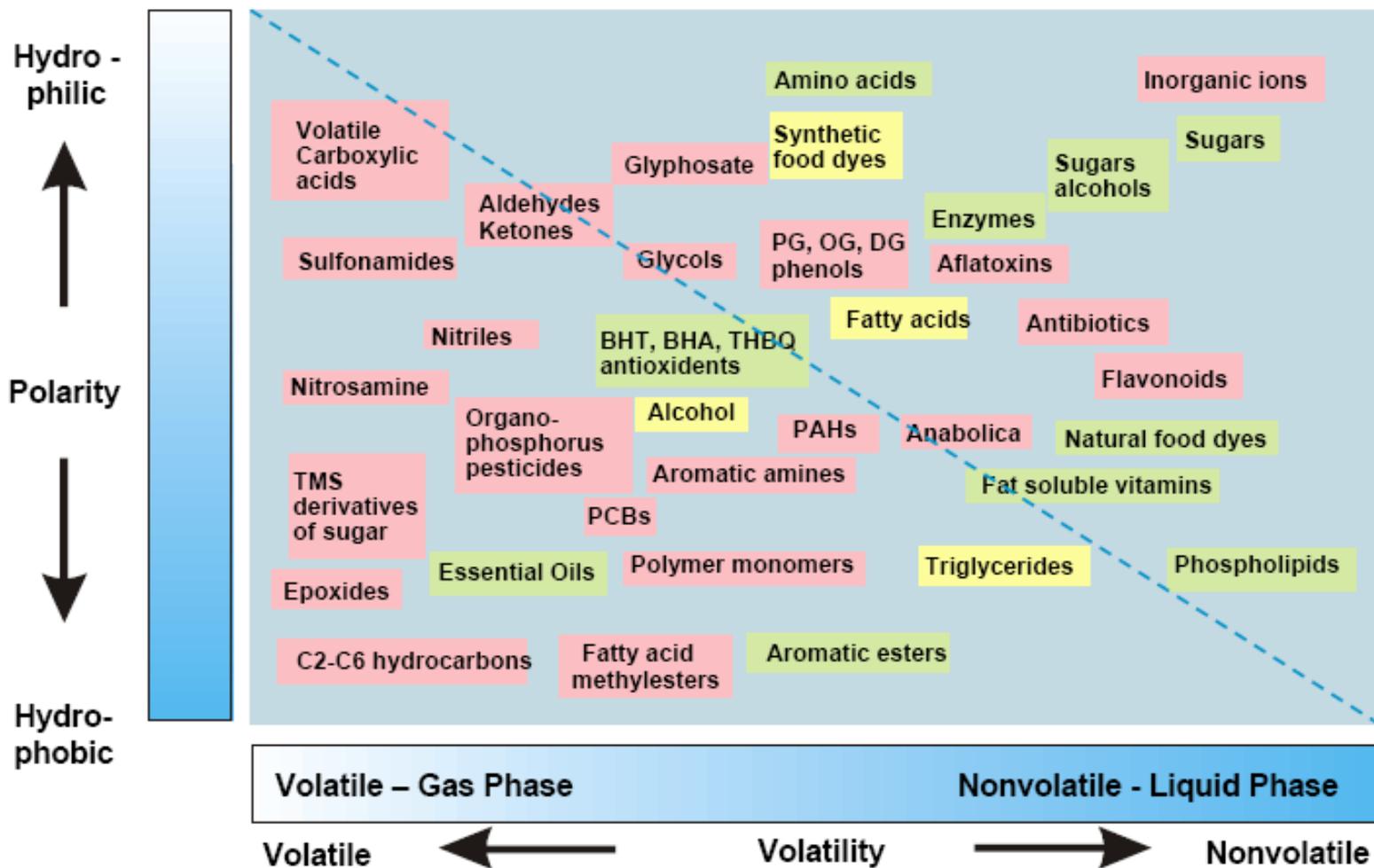
La HPLC inclut:

- Liquide/liquide (partage),
- Liquide/solide (adsorption),
- par échange d'ions
- et d'exclusion stérique



Définition:

Chromatographie: Quelle technique de séparation pour quel composé?



Modes de séparation:

Il existe 4 modes principaux de séparation des composés

1. Chromatographie à Phase-Inverse
2. Chromatographie d'adsorption à Phase-Normale
3. Chromatographie à échange ionique
4. Chromatographie d'exclusion

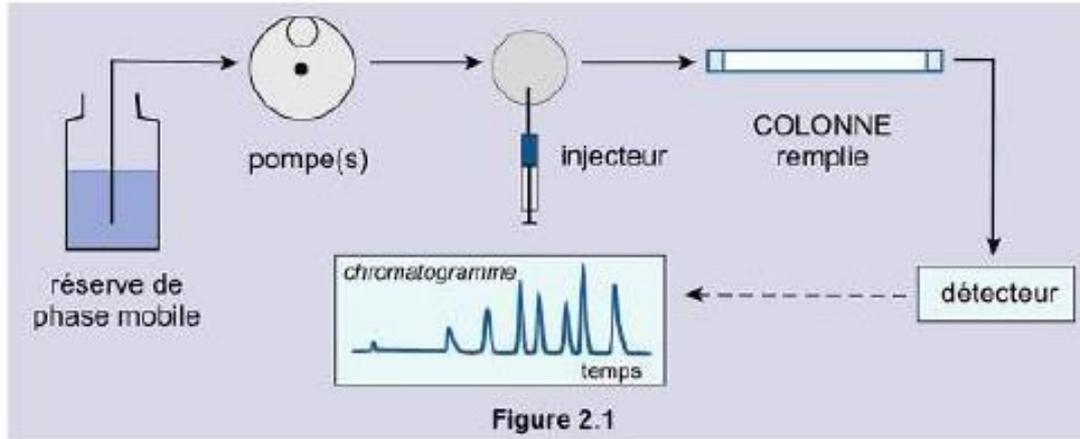
Avantages:

- Capacité de séparation très élevée
- Réduction très importante du temps d'élution
- Très sensible
- Facilement adaptable à des analyses quantitatives précises
- Permet la séparation de molécules non volatiles ou thermiquement sensibles:
conditions de séparations modérées
- Consommation d'échantillon faible
- Séparation préparative et purification facile
- Polyvalente
- Permet la séparation d'une large variété de composés

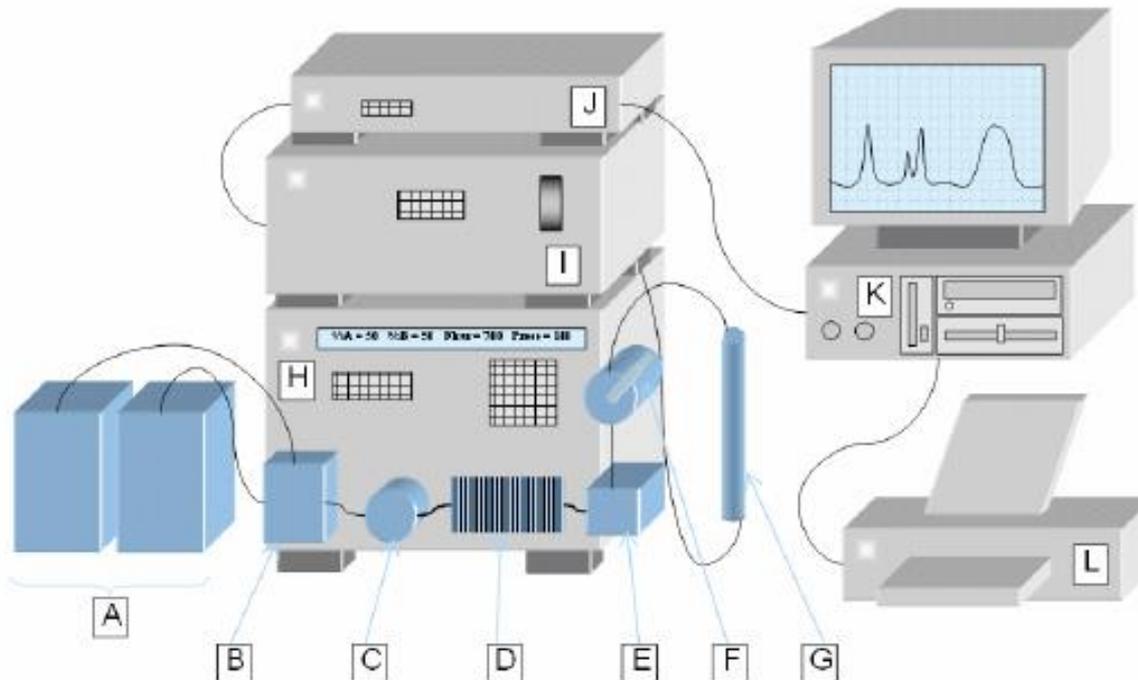
Dans quel domaine est utilisée la HPLC?

- ⊙ **Substances biogéniques:** Sucres, lipides, acides nucleiques, acides aminés , protéines, peptides, stéroïdes, amines, etc.
- ⊙ **Produits Medicaux:** Drogues, antibiotiques, etc.
- ⊙ **Agroalimentaire :** Vitamines, additifs alimentaires, sucres, acides organiques, acides aminé, etc.
- ⊙ **Environnement:** Ions inorganiques, Substances organiques dangeureuse, etc.
- ⊙ **Produits organiques industriels :** Polymères synthéticques, additifs, surfactants, etc.

Appareillage

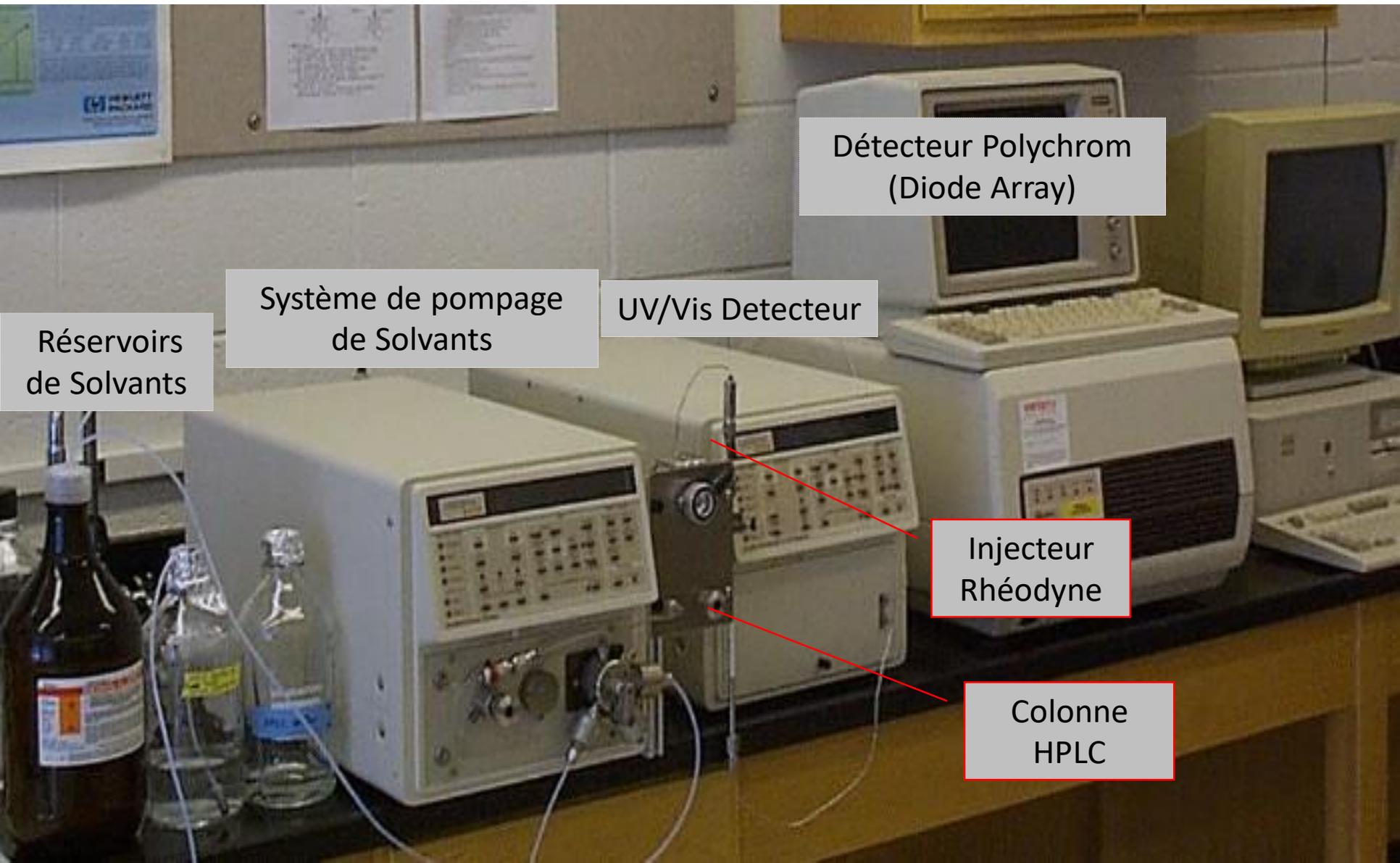


Éléments reliés par tubes
(\varnothing 0,1 mm) en inox ou PEEK



- A : réservoir de PM
- B : Vanne électro
magnétique de
mélange des PM
- C : Pompe
- D : Egaliseur de pression
- E : Chambre de mélange
- F : Injecteur
- G : colonne
- H : Unité HPLC
- I : Détecteur
- J : Interface PC

Appareillage



Réservoirs
de Solvants

Système de pompage
de Solvants

UV/Vis Detecteur

Détecteur Polychrom
(Diode Array)

Injecteur
Rhéodyne

Colonne
HPLC

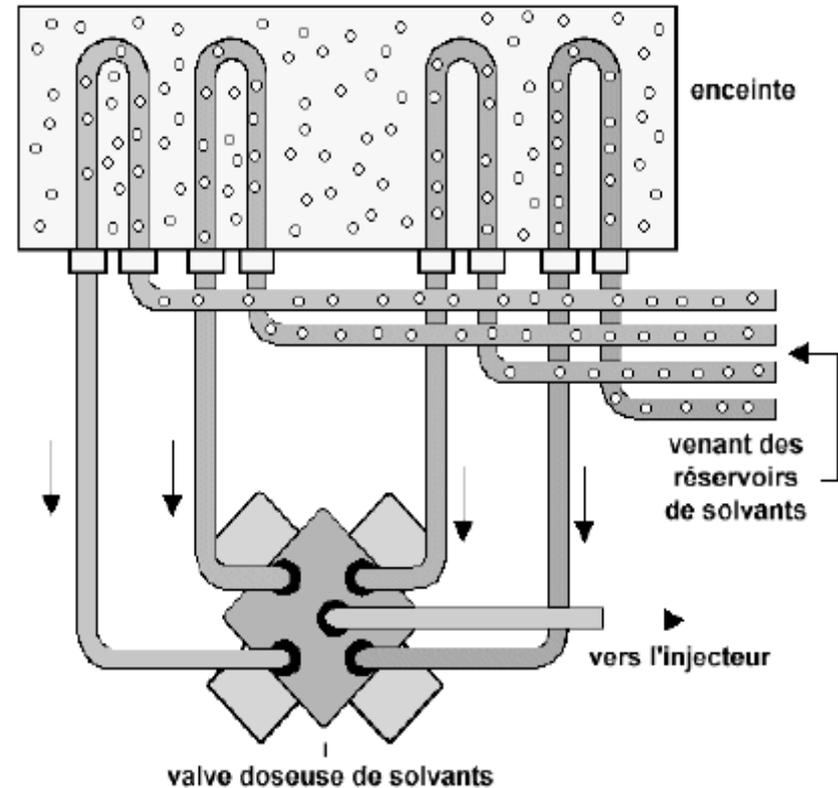
Appareillage

1. Réservoir contenant la phase mobile

- Étanche afin d'éviter l'évaporation des solvants ou leur contamination (et de modifier la composition du mélange).
- Ces réservoirs sont souvent équipés de dispositifs de dégazage permettant d'éliminer les gaz dissous et en particulier l'oxygène.

Le dégazage se fait soit:

- Filtration avant d'introduire les solvants dans leur réservoir,
- Ultrasons,
- Barbotage d'hélium.



Module de dégazage sous vide

Appareillage

L'**oxygène** est souvent **nuisible** à l'analyse chromatographique :

- risque de dégradation des échantillons et des colonnes phases stationnaires facilement oxydables.
- risque de formation de bulles de gaz dans le détecteur ce qui conduit à un bruit de fond important .
- corrosion des pièces en contact avec la phase mobile.
- diminution du seuil de détection: détection par spectroscopie d'absorption à faible longueur d'onde, par fluorimétrie ou par électrochimie.

Appareillage

2. Système de pompage: assure l'écoulement de la phase mobile dans la colonne.

- Les pompes utilisées en CLHP sont très puissantes car la viscosité des solvants et la granulométrie fine de la phase stationnaire entraînent des pertes de charges entre l'entrée et la sortie de la colonne qui peuvent parfois être importantes (50 à 100 bars).
- En général, les appareils CLHP sont équipés de pompes à pistons alternatifs.
- Avantages :
 - petit volume interne,
 - pression de sortie élevée (jusqu'à 700 bars),
 - adaptabilité à la technique de gradient d'élution,
 - constance de leur débit qui est pratiquement indépendante de la pression dans la colonne et de la viscosité du solvant.

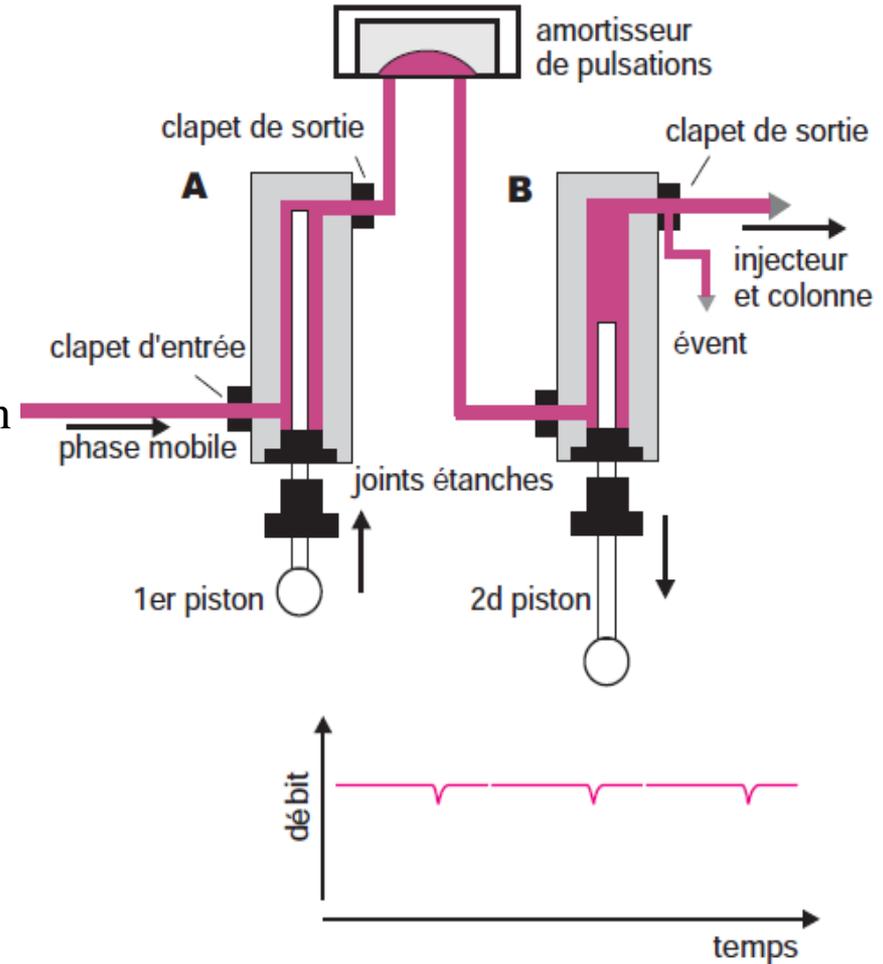
Appareillage

2.1. Pompe à deux têtes en série

-Le piston (A) refoule une quantité de solvant deux fois plus importante que le piston (B) (diamètre plus grand ou course est plus grande).

- Les deux pistons sont déphasés : quand le piston (A) aspire une quantité d'éluant, le piston (B) refoule la phase mobile dans la colonne.

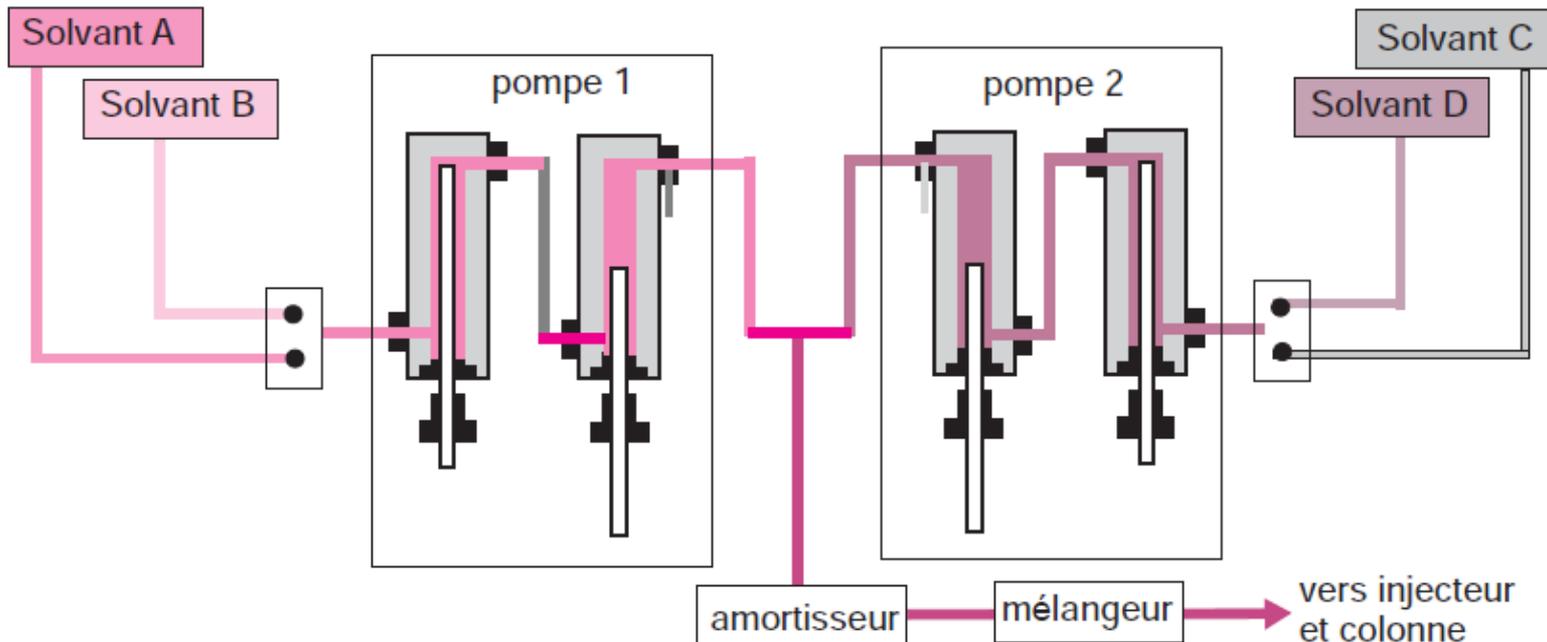
- Ensuite, lorsque le piston (A) refoule l'éluant, une partie de ce dernier vient remplir le cylindre du piston (B) qui règle ainsi le débit nominal et l'autre partie est refoulée dans la colonne.



Appareillage

2.2. Gradients basse-pression ou haute pression

- *Installation à une pompe unique*: elle doit être précédée d'une chambre de mélange **basse pression** dans laquelle des électrovannes font rentrer les différents solvants selon un programme.
- *Installation à plusieurs pompes*: chacune pour un ou deux solvants (pompes binaires), le mélange final est obtenu sous **haute-pression**, dans une sorte de té placé avant la colonne .



Gradient d'éluant

L'éluant gradué : en modifiant la composition de l'éluant

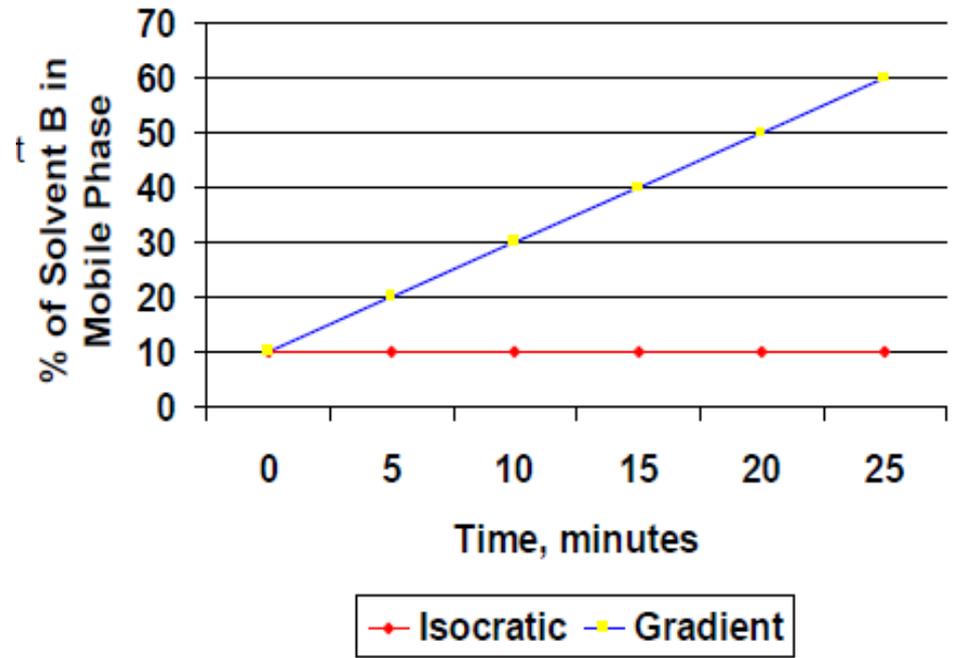
- optimiser les k'
- réduire les t_R .

Mode isocratique: composition constante

- meilleure pour des séparations simples,
- utilisé dans le contrôle de qualité.

Mode gradient: composition variable

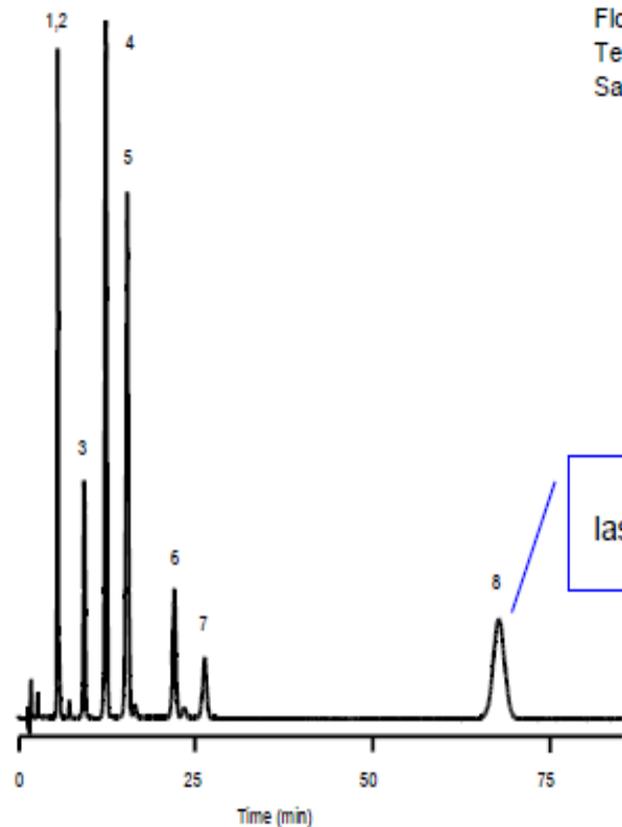
- meilleure pour l'analyse d'échantillons complexes,
- souvent utilisé pour des mélanges de composition inconnue,
- gradients linéaires sont les plus utilisés.



Separation of Herbicides on ZORBAX StableBond-C18

Isocratic Elution

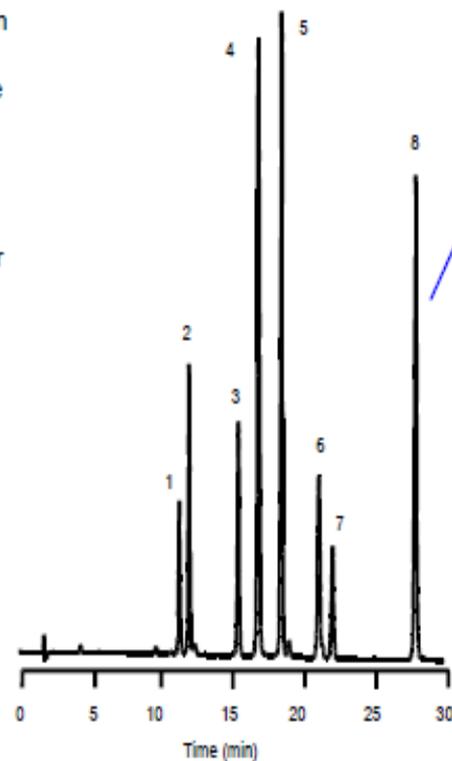
70% water/30% Acetonitrile



Column: ZORBAX SB-C18
4.6 x 150 mm, 5 μ m
Mobile Phase: A: H₂O with 0.1% TFA, pH 2
B: Acetonitrile
Flow Rate: 1.0 mL/min
Temperature: 35°C
Sample: 1. Tebuthiuron
2. Prometon
3. Prometryne
4. Atrazine
5. Bentazon
6. Propazine
7. Propanil
8. Metolachlor

Gradient Elution

20 – 60% Acetonitrile in water
in 30 min.



Note:
last peak eluted
in ~ 28 minutes
and it is sharper

Note:
last peak eluted in
~70 minutes

3 Injecteur: sert à introduire l'échantillon liquide dans le flux d'écoulement de la phase mobile.

- volumes d'échantillons typiques sont de 5 à 20 microlitres (μl).
- injecteur doit résister aux pressions élevées.
- échantillonneur automatique lorsque le nombre d'échantillons est élevé.
- utilisation d'une vanne haute pression à plusieurs voies (boucle d'injection).

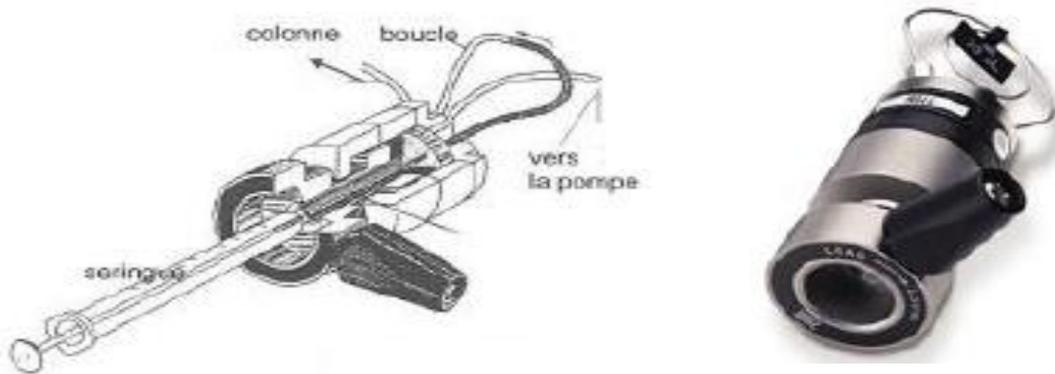
Appareillage

1. Remplissage de la boucle:

Le solvant d'éluion circule librement de la pompe (en 1).

L'injection est réalisée (en 6) dans la boucle.

Le surplus de solvant est évacué dans l'effluent (en 4).

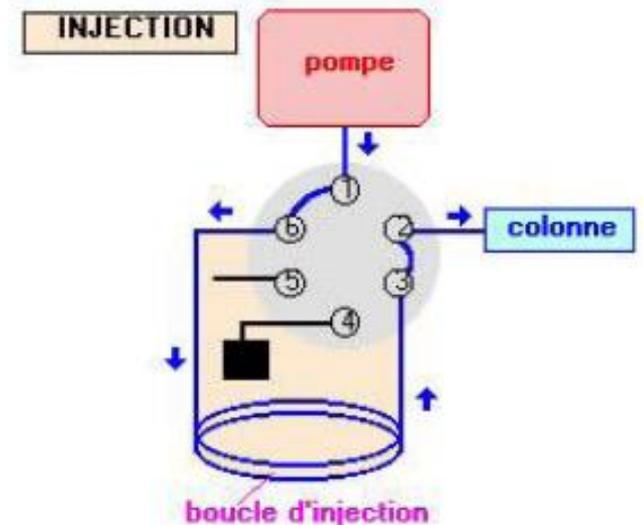
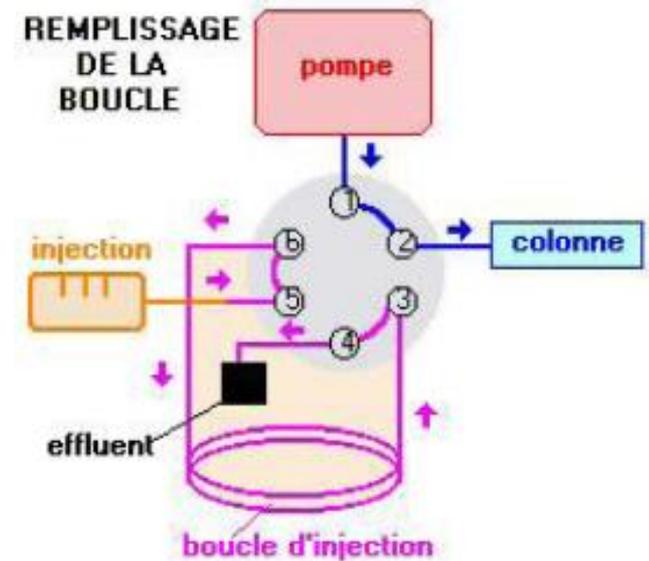


2. Injection de l'échantillon:

On bascule la vanne par action d'un levier et le solvant va

alors balayer la boucle (de 1 à 4) et entraîner

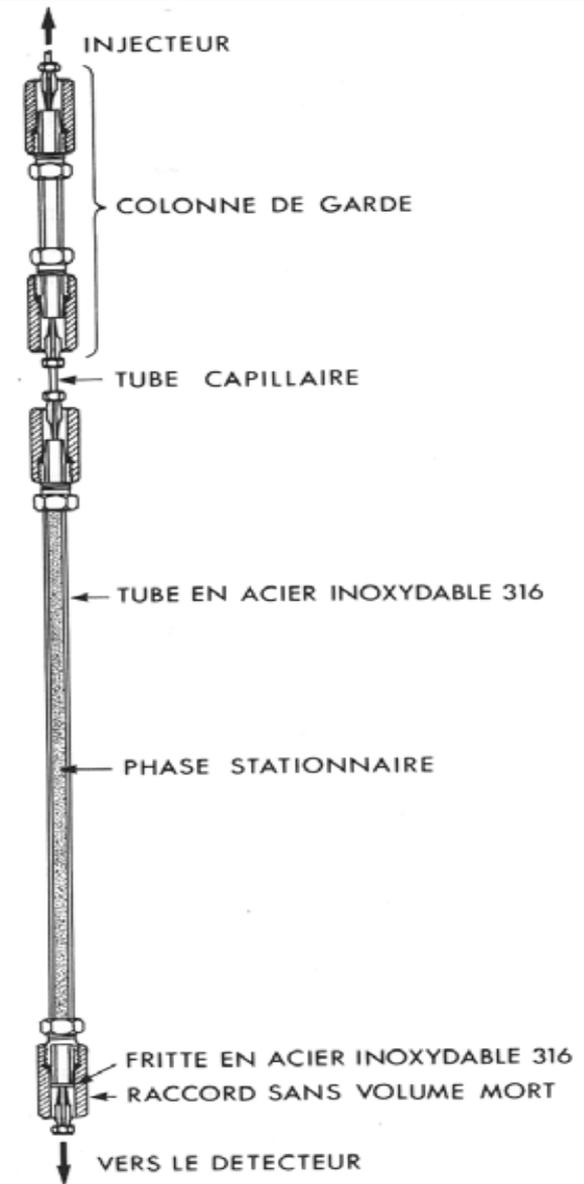
l'échantillon dans la colonne.



Appareillage

- 4. Colonne:** c'est le «cœur du chromatographe», la phase stationnaire sépare les composants de l'échantillon.
- Les microparticules à l'intérieur de la colonne causent une contre-pression élevée aux débits normaux.
 - La pompe doit pousser fort pour déplacer la phase mobile à travers la colonne et cette résistance provoque une forte pression dans le chromatographe.
 - Les colonnes HPLC résistent aux fortes pressions (en inox, ou en PEEK).
 - longueur de 10 à 25 cm;
 - diamètre de 4 à 5 mm;
 - taille des particules varie de 5 à 10 μm .
 - efficacité de 40 000 à 60 000 plateaux par mètre.

- La colonne est précédée d'une **colonne de garde**, ou **pré-colonne** (rôle: retenir tous les composés non élués et augmenter la durée de vie de la colonne).
- Elle est plus courte (0,4 à 1 cm) et est remplie de la même phase stationnaire.
- La pré-colonne doit être changée périodiquement.



Appareillage

Types de colonnes HPLC:

- Analytiques [diamètre interne 1,0-4,6-mm; longueur 15 –25 cm]
- Préparatives (d.i. > 4,6 mm; longueur 5 –25 cm)
- Capillaires (d.i. 0,1 -1,0 mm; longueurs variables)
- Nanocolonnes (d. i. < 0,1 mm).

Avantages :

- rapidité de l'analyse,
- faible consommation de solvants (souvent très coûteux),
- meilleure résolution de l'analyse (suite d'une moindre diffusion),
- possibilité de couplage HPLC/MS.

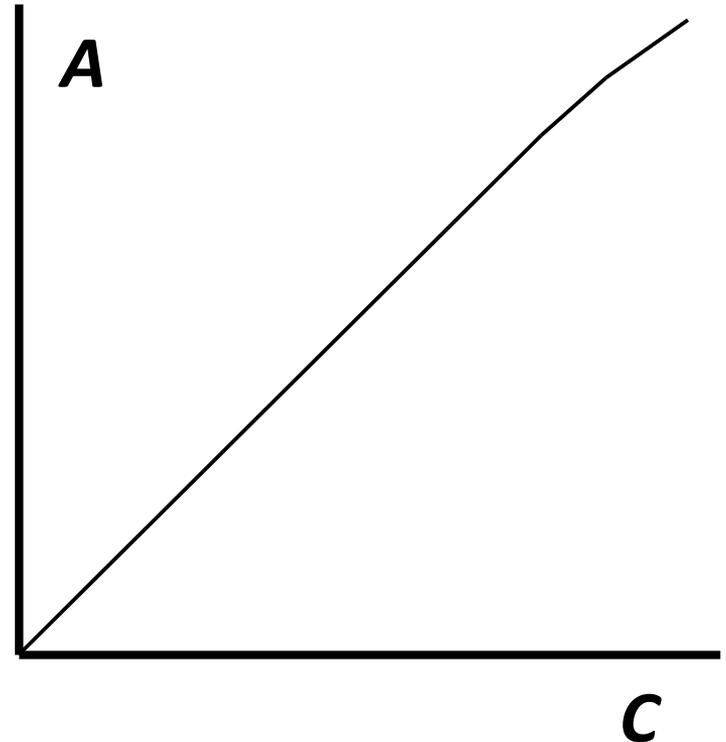
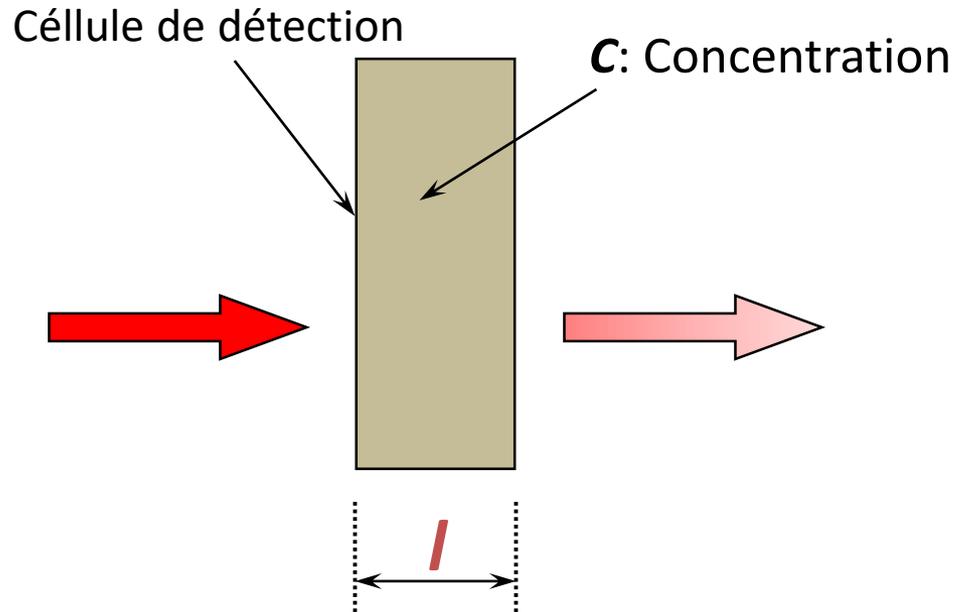
Appareillage

5. **Détecteur:** sert à mesurer la quantité des molécules éluées à la sortie de la colonne.
- Il n'existe pas de détecteurs universels en HPLC mais des détecteurs spécifiques très sensibles. Le tableau ci-dessous présente quelques détecteurs courants.
 - Les détecteurs absorptiométriques dans l'ultraviolet ou le visible et le réfractomètre différentiel sont les plus utilisés en HPLC.

Détecteur CLHP	Disponible sur le marché	Limite de détection (détecteurs commerciaux) [†]	Limite de détection (limites actuelles) [‡]
Absorbance	oui [§]	100 pg–1 ng	1 pg
Fluorescence	oui [§]	1–10 pg	10 fg
Électrochimique	oui [§]	10 pg–1 ng	100 fg
Indice de réfraction	oui	100 ng–1 µg	10 ng
Conductivité	oui	500 pg–1 ng	500 ng
Spectrométrie de masse	oui	100 pg–1 ng	1 pg
IR à transformée de Fourier	oui	1 µg	100 ng
Diffusion de la lumière	oui	10 µg	500 ng
Activité optique	non	–	1 ng
Sélectif par élément	non	–	10 ng
Photoionisation	non	–	1 pg–1 ng

Appareillage

1. Détecteur spectrophotométrique

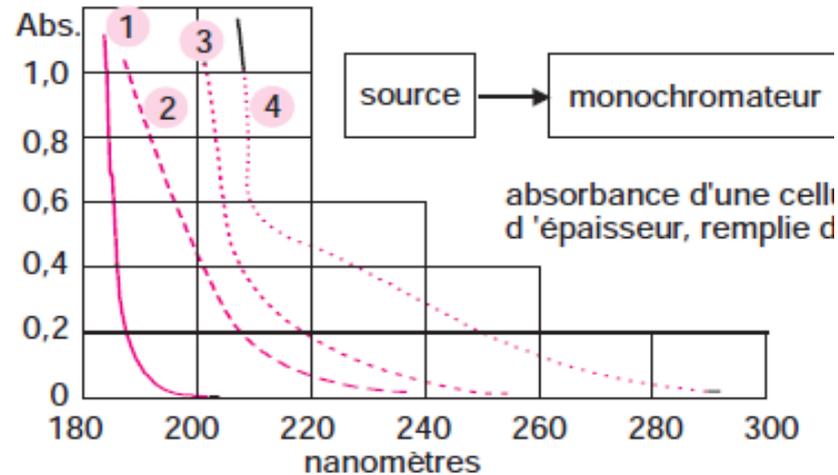


$$A = \varepsilon \cdot C \cdot l = -\log (E_{tr} / E_{inc})$$

(A : absorbance, ε : coefficient d'absorption)

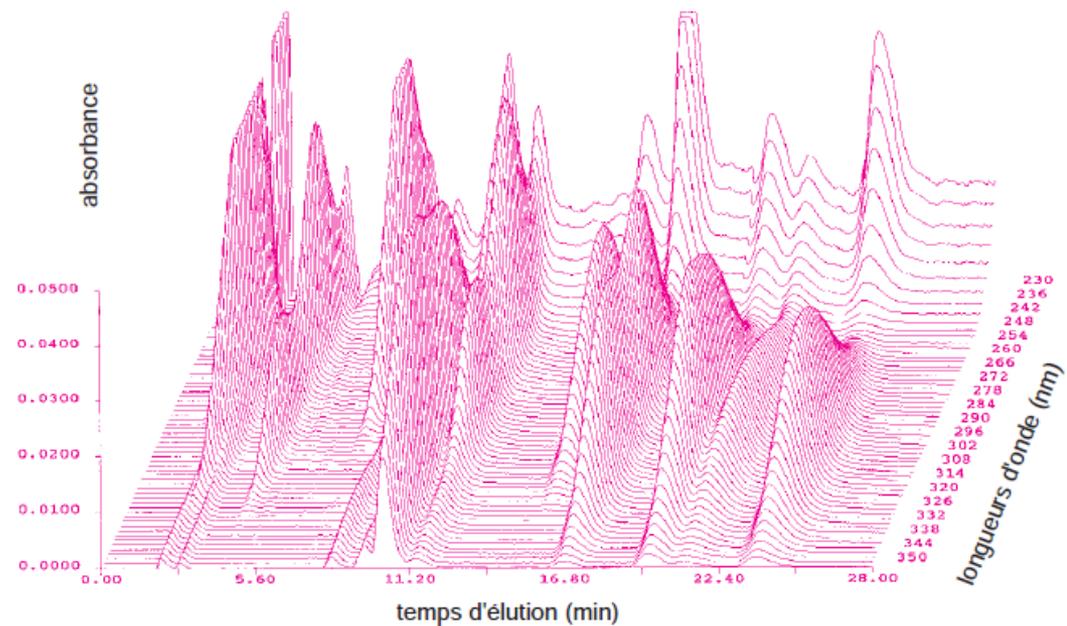
Appareillage

Détecteur monochromatique:



Détecteur polychromatique:

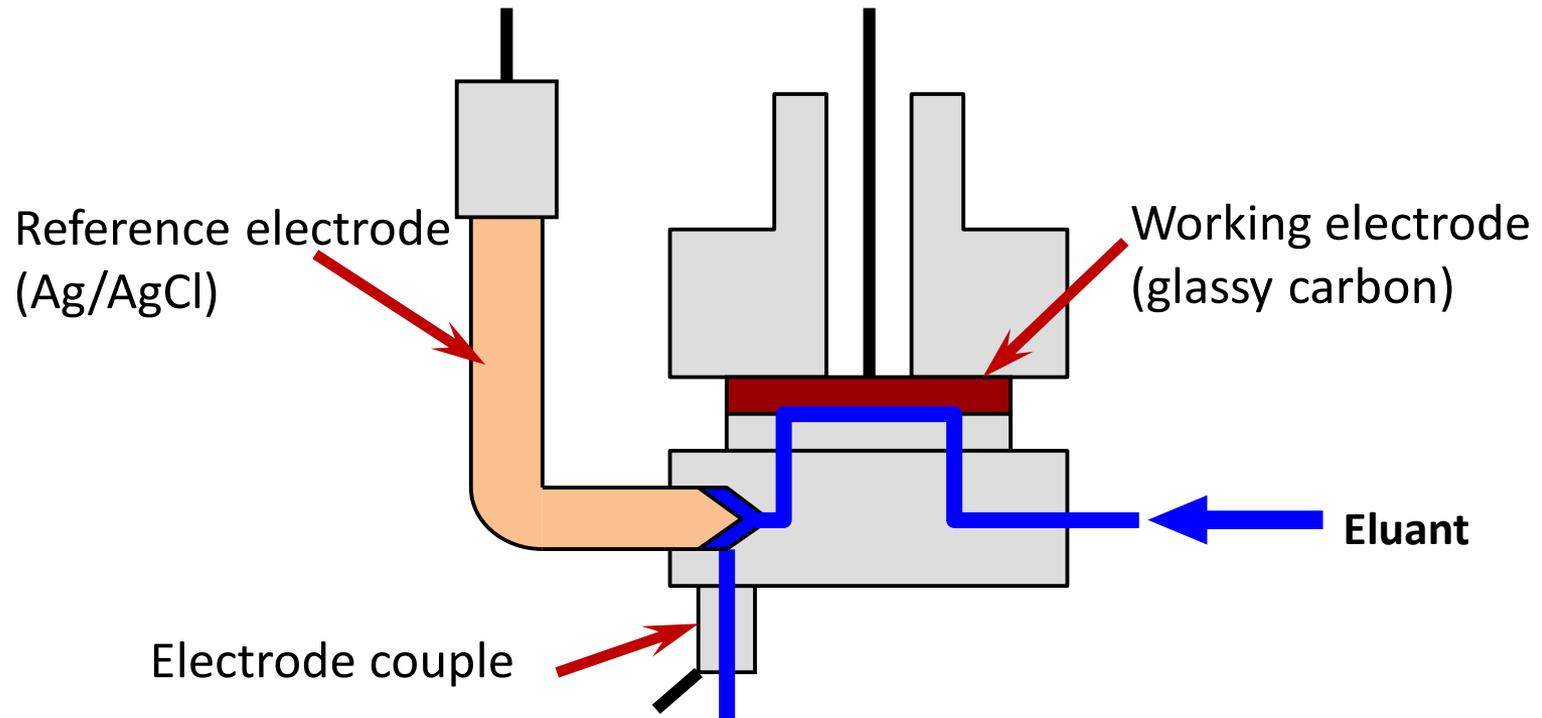
détecteurs à barettes de diodes
(35 à 100 diodes par barettes:
1 barette référence et 1 barette
dosage)



Appareillage

2. Détecteur électrochimique

- Un potentiostat impose à l'électrode de travail un potentiel fixe par rapport à celui de l'électrode de référence tel que le soluté à détecter soit oxydé ou réduit.
- Au cours du passage du soluté dans la cellule, un courant d'électrode proportionnel à sa concentration circule entre l'électrode de travail et sa contre électrode.



Appareillage

5. Système d'acquisition de données souvent appelé système de données, l'ordinateur contrôle tous les modules de l'appareil et exploite le signal pour déterminer le t_R des analytes (analyse qualitative) et leurs quantités (analyse quantitative).

SEPARATION DE 7 DERIVES DE LA PHENOTHIAZINE:

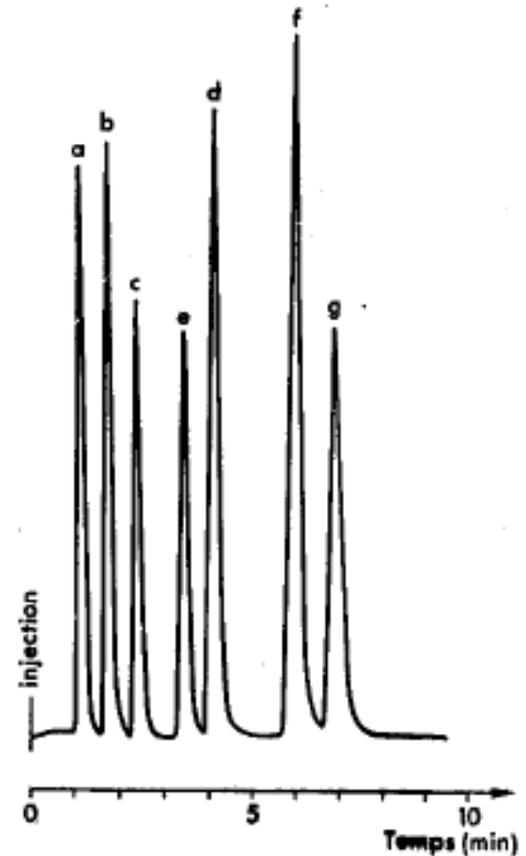
- Phase mobile:

solvant a = 65% [iso-octane (50%) + ether isopropylique (50%) + triethylamine 0,2 %]

solvant b = 35% [ether isopropylique (50%) + methanol (50%) + triethylamine 0,2%]

- **Colonne** : silice type spherosil (6-7 μm) (**l**:15 cm x **di**:0,6 cm),

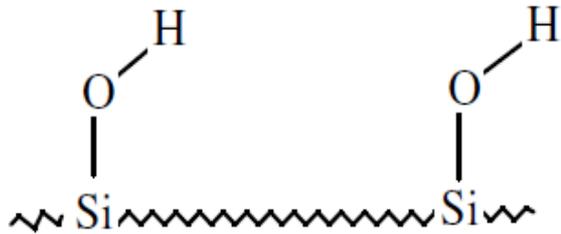
- **Débit**: 1 ml/min.



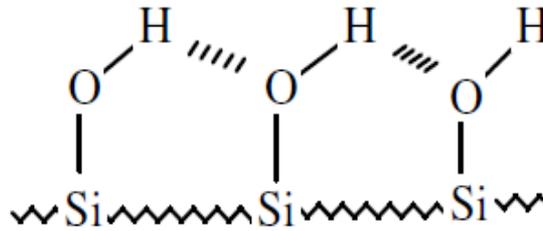
Phases stationnaires

6. Phases stationnaires SNYDER distingue 4 types d'adsorbants:

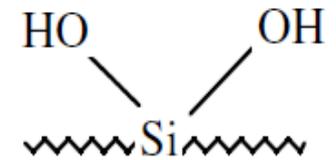
1. type I: Inorganiques polaires silice, alumine



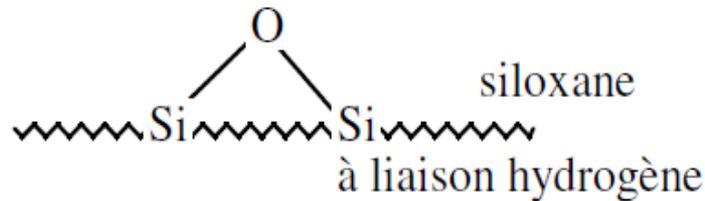
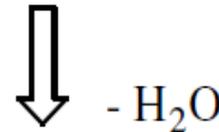
silanol isolés



silanols à liaison hydrogène



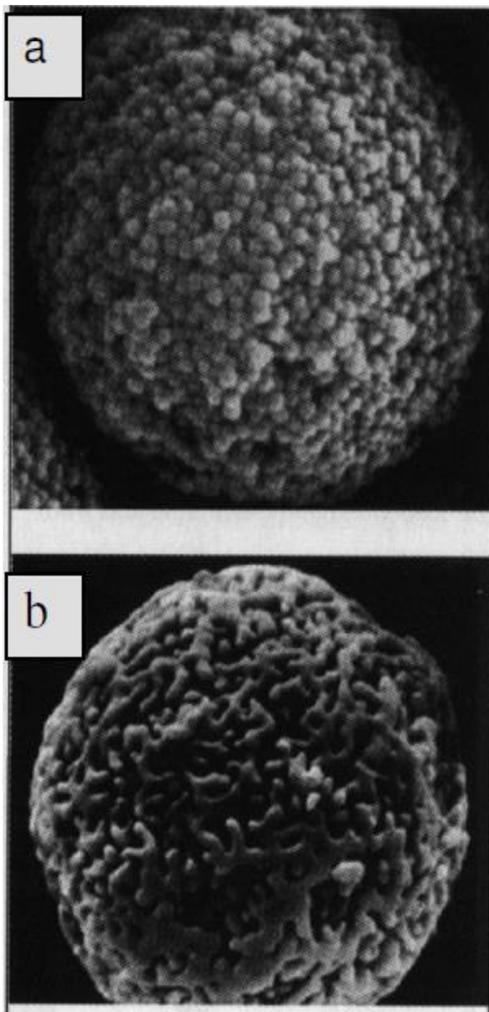
silanols géminaux



isolé

siloxane
à liaison hydrogène

Phases stationnaires



Les gels de silice présentent une structure poreuse.

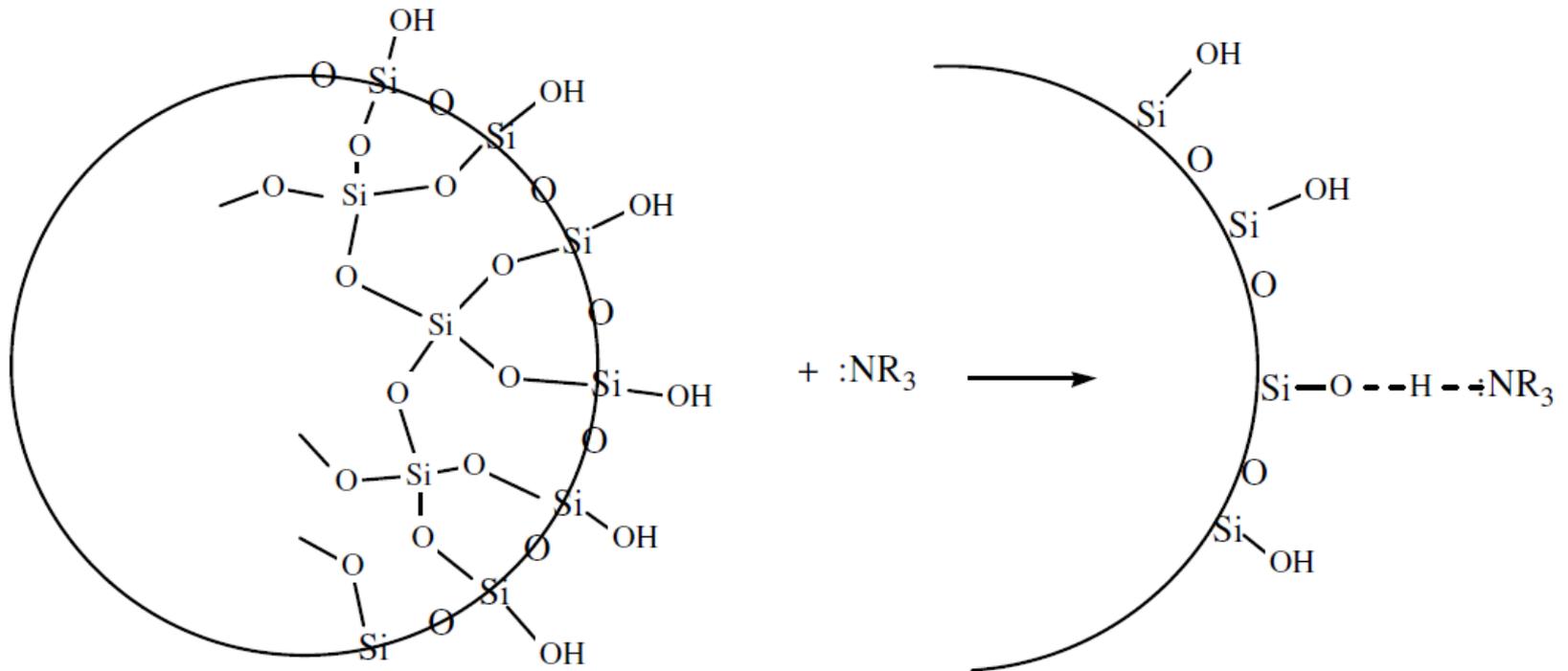
KIRKLAND J.J. (LC.GC, 1996, 14, (6), 486-500) a obtenu la gélification de silicates solubles par coalescence avec formation de structures de type sil-gel (photographie **a** obtenue par microscopie électronique à balayage). Les subparticules de ce gel sont homogènes; la porosité est de 50%; le gel a une surface de $150 \text{ m}^2 / \text{g}$ et les pores ont 10 nm de diamètre. Relativement stables aux pH élevés.

Le xérogel **b** est spongieux; sa porosité est de 70% et sa surface de $300 \text{ m}^2 / \text{g}$. Les pores ont un diamètre de 10 nm

Quand la surface est complètement hydroxylée, le gel de silice a une densité de groupements silanols de $8 \mu\text{mole} / \text{m}^2$. Ces silanols sont localisés pour la plupart dans des micropores de 1 nm de diamètre ce qui ne les rend accessibles qu'à des analytes de faibles dimensions moléculaires

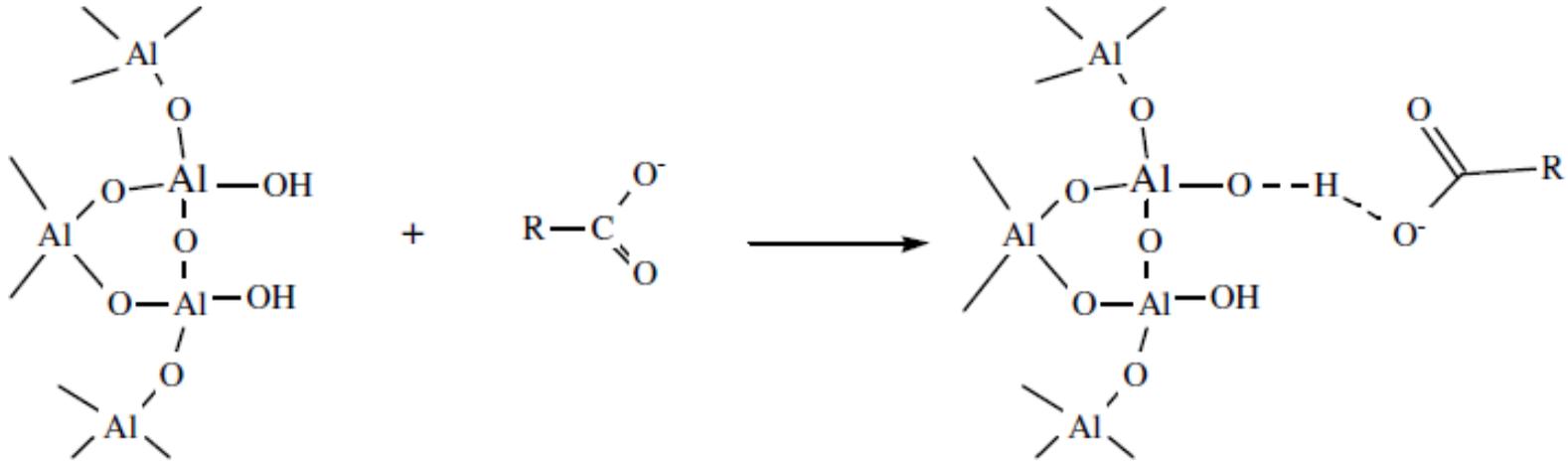
Phases stationnaires

- La silice convient bien à la séparation de solutés qui sont des bases au sens de Brønsted (exemple : amines qui se fixent néanmoins de façon souvent de façon irréversible) ; on dit que cet adsorbant a un caractère acide.



Phases stationnaires

- L'**alumine** convient bien pour la séparation de solutés acides (phénols, acides carboxyliques); cet adsorbant est dit basique.



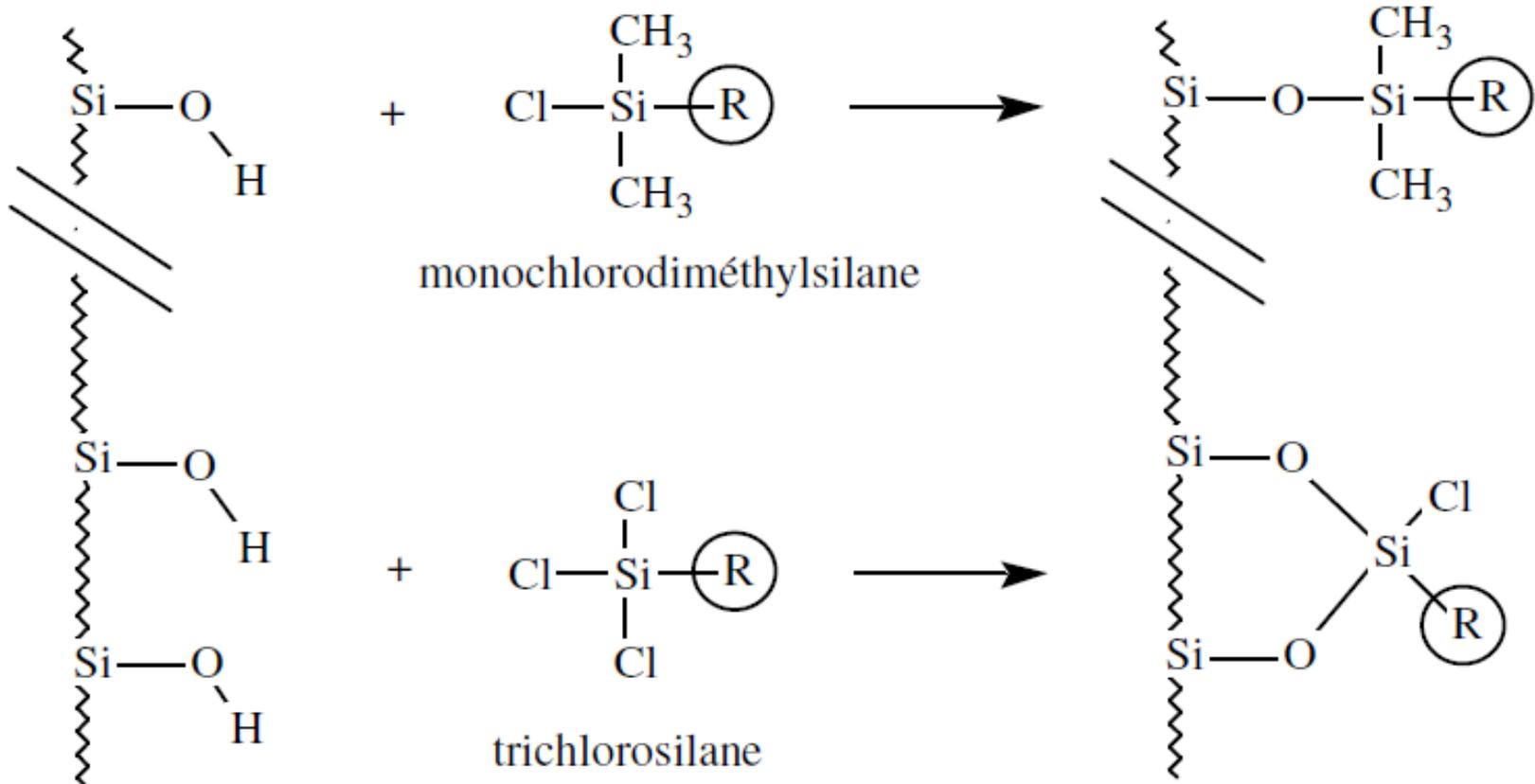
Avec ces **adsorbants de type I**, les molécules polaires sont toujours plus adsorbées que les molécules non polaires.

amides > amines > acides carboxyliques > alcools > cétones > esters > composés nitrés > éthers > hydrocarbures aromatiques > hydrocarbures non saturés > hydrocarbures saturés.

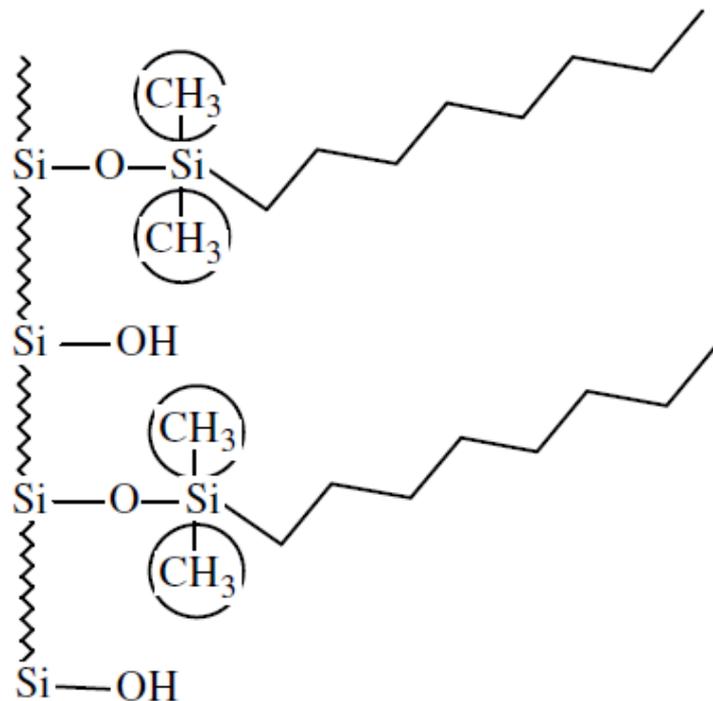
Phases stationnaires

2. type II: Les phases greffées sur les particules de silice.

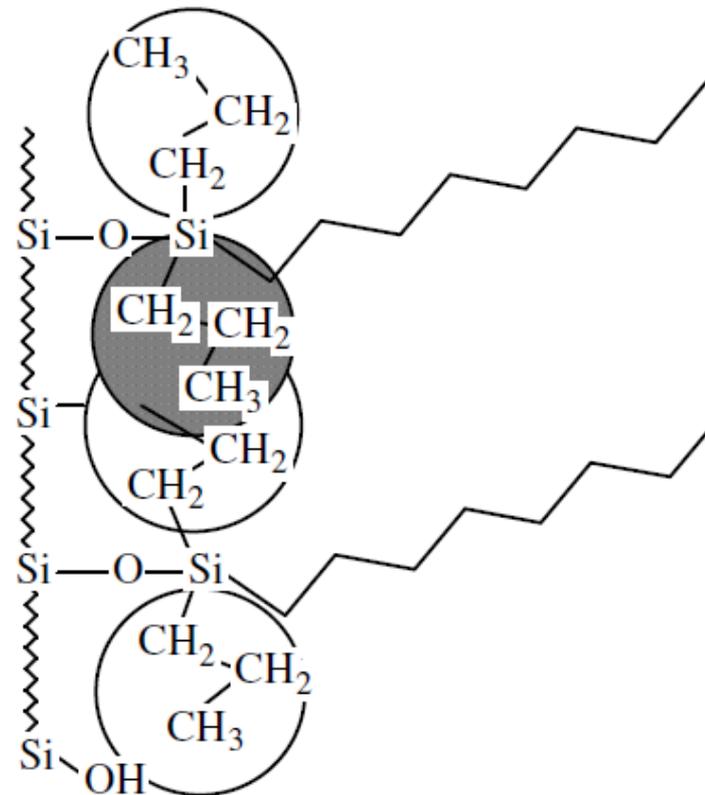
Ces phases reposent sur l'établissement d'une liaison silyléther. Elle est obtenue par réaction de la silice avec des dérivés du type monochlorodiméthylsilane ou trichloro silane pour les plus importants.



Phases stationnaires



silice greffée avec du chlorodiméthyl-octadécyl silane



silice greffée avec du chlorodipropyl-octadécylsilane

NB: La plage d'utilisation des phases greffées s'étend donc de pH 2 à pH 8.

Phases stationnaires

3. **type III:** Phases greffées polaires

Les principaux groupes fonctionnels des phases greffées polaires sont indiqués ci dessous. Ces phases sont classées en fonction de leur polarité.

		analyse de :
- faiblement polaires (glycophase ou diolphase diméthylamino)		composés carbonylés
- moyennement polaires	(cyano)	phénols , amines , esters
- fortement polaires	(amino, diamino)	oses, osides, peptides, nucléotides

Phases stationnaires

Type de phase	Structure du greffon	Applications
glycophase (Diol)	$\text{Si} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{O-Si} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-O-CH}_2\text{-CH} \begin{array}{l} \text{CH}_2\text{OH} \\ \text{OH} \end{array}$	quinones, flavones, amines, peptides, protéines, etc...
amino	$\text{Si} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{O-Si} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-NH}_2$	glucides (oses), vitamines, isomères D-L, peptides, alcools, nucléosides, etc...
diméthylamino	$\text{Si} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{O-Si} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-N} \begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{array}$	cf diol
diamino	$\text{Si} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{O-Si} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-NH-(CH}_2\text{)}_2\text{-NH}_2$	cf amino
cyano	$\text{Si} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{O-Si} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{-(CH}_2\text{)}_2\text{-C}\equiv\text{N}$	lipides, stéroïdes, pesticides, phénols, amines, esters, etc..

Phases stationnaires

4. type IV: Phases greffées apolaires

Les plus utilisées en HPLC (phases **inverses**)

- **RP 8** implique $R = (\text{CH}_2)_7 - \text{CH}_3$ (octyl),

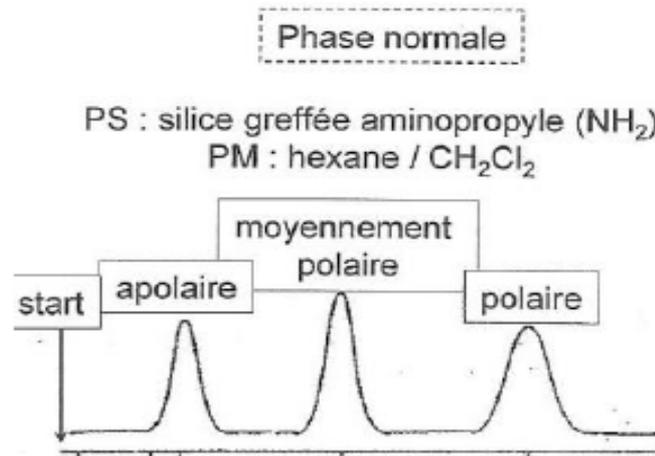
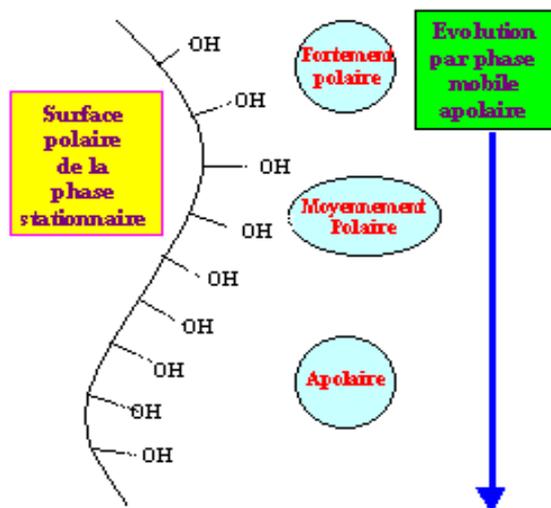
- **RP18** implique $R = (\text{CH}_2)_{17} - \text{CH}_3$ (octadécyl).

Les phases RP 8 et RP 18 sont les plus répandues et les plus utilisées.

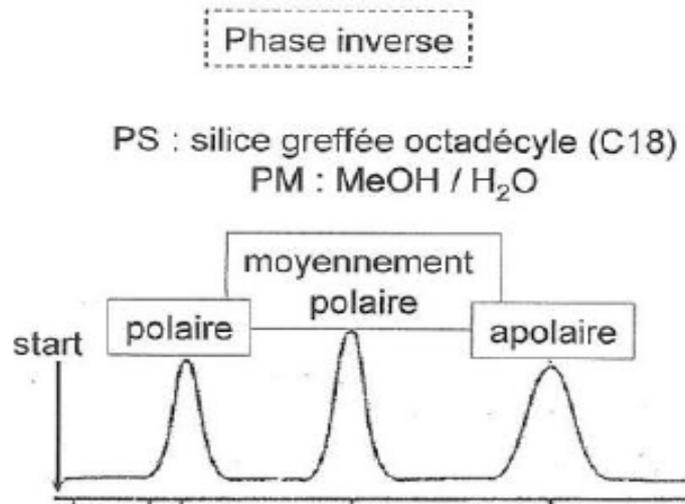
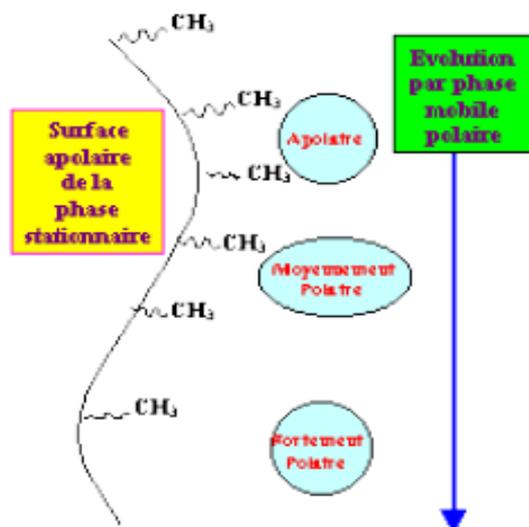
Les solutés les plus polaires seront les moins retenus, les solutés apolaires seront retenus d'autant plus fortement que leur hydrophobicité est élevée.

Chromatographie en phase normale ou inversée

Phase normale

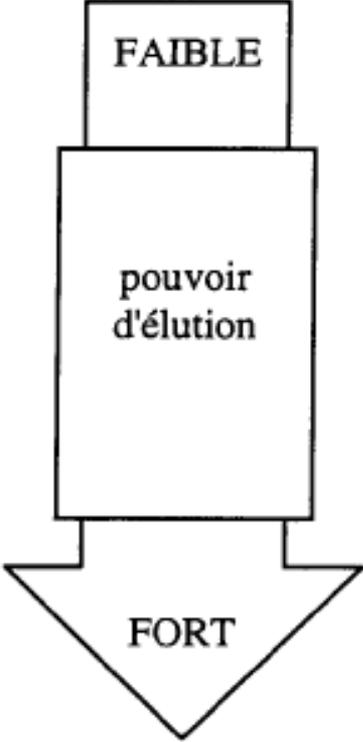
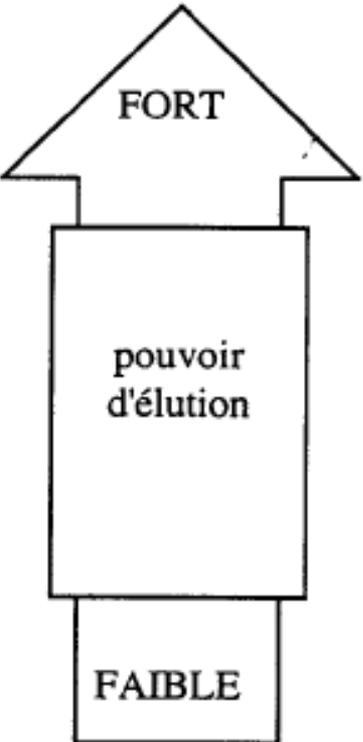


Phase inverse



Phases mobiles

Pouvoir d'élution des solvants

sur phase polaire normale	solvants classes par polarité croissante	sur phase à polarité inversée
 <p>FAIBLE</p> <p>pouvoir d'élution</p> <p>FORT</p> <p>t_R diminue</p>	hexane toluène trichlorométhane dichlorométhane éther acétate d'éthyle acétonitrile méthanol eau	 <p>FORT</p> <p>pouvoir d'élution</p> <p>FAIBLE</p> <p>t_R augmente</p>