

LES TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES

HPLC/ CPG

I. CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE C.L.H.P

I.1. Appareillage :

La chromatographie liquide haute performance est très utilisée en chimie analytique et dans divers domaines toxicologiques pharmaceutique, alimentaire, écotoxico Elle utilise des colonnes remplies d'une **phase stationnaire** constituée de particules sphériques de très petites dimensions de diamètre couramment compris entre 2 et 5 μ m ce qui conduit à de grandes efficacité et résolution. L'inconvénient est que plus les particules sont petites et plus il est difficile de faire s'écouler le solvant, on doit donc utiliser des pompes spéciales qui poussent le solvant sous des pressions très élevées.

Les composantes de cet appareillage à haute performance sont(Fig01) :

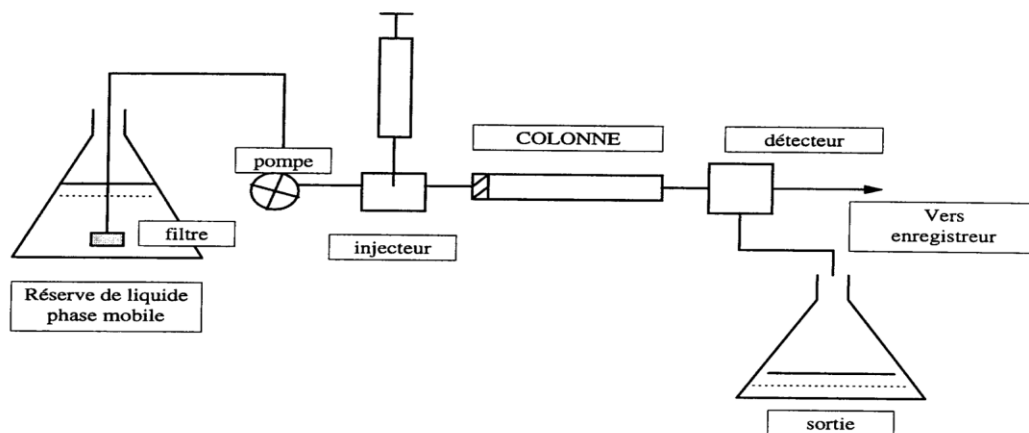


Figure 1. Principe de fonctionnement de l'HPLC.

a) **Un réservoir de solvant (éluant)** qui contient la **phase mobile** en quantité suffisante. Plusieurs flacons d'éluants (solvants de polarités différentes) sont disponibles pour pouvoir réaliser des gradients d'élution (mélange de plusieurs solvants à des concentrations variables) à l'aide de la pompe doseuse.

b) **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'éluants**.

c) **Vanne d'injection** : c'est un injecteur à boucles d'échantillonnage. Il existe des boucles de différents volumes. Le choix du volume de la boucle se fait en fonction de la taille de la colonne et de la concentration supposée des produits à analyser.

d) La 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 30cm.

e) La phase stationnaire

- La phase normale:

La phase normale est constituée de gel de silice. Ce matériau est très **polaire**. Il faut donc utiliser un éluant apolaire.

- La phase inverse :

La phase inverse est majoritairement composée de silice greffée par des chaînes linéaires de 8 ou 18 atomes de carbones (C_8 et C_{18}). Cette phase est **apolaire** et nécessite donc un éluant polaire (Acétonitrile, Méthanol, H_2O).

- La 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**.

f) Détecteurs

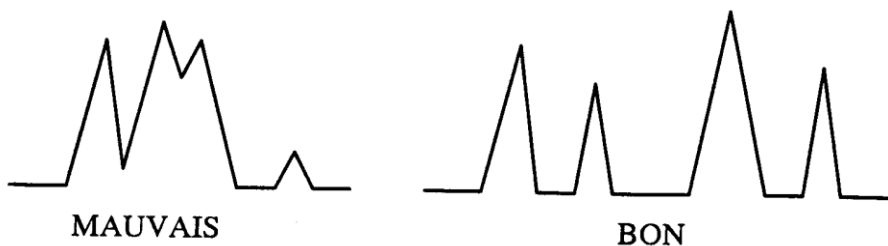
Il existe plusieurs détecteurs dont deux types sont classiquement utilisés :

* détecteur UV-visible: il mesure l'absorption de la lumière par le produit à la sortie de la colonne. Il opère à longueur d'onde constante, celle-ci ayant été fixée par l'opérateur. La lampe Deuterium est utilisée pour des longueurs d'ondes variant de 190-350 nm et la lampe à vapeur de mercure est utilisée à la longueur d'onde non variable de 254 nm.

* réfractomètre : il mesure la variation de l'indice de réfraction du liquide à la sortie de la colonne. Cette mesure, extrêmement précise, dépend néanmoins de la température du liquide. On compare cet indice avec celui de la phase mobile pure : il y a donc une référence d'où le terme de variation de l'indice. Ce détecteur exclut les variations de la composition de la phase mobile ; il n'est donc possible de travailler qu'en mode isocratique avec ce détecteur.

I.2. Analyse des chromatogrammes

Une bonne séparation se traduira par une séparation distincte des pics correspondant à chacun des produits.



Un chromatogramme doit être parfaitement reproductible.

La composition de la phase mobile est un paramètre particulier à la HPLC. Il faut donc préciser pour chaque analyse :

- le type de colonne : marque, nature, diamètre, longueur, support...
- la nature de l'éluant : solvant, si c'est un mélange préciser sa composition, débit, mode de détection en nm.
- la quantité injectée, le début de l'injection sur le chromatogramme, la sensibilité du détecteur, etc

A. Analyse qualitative

Le temps de rétention (tr)

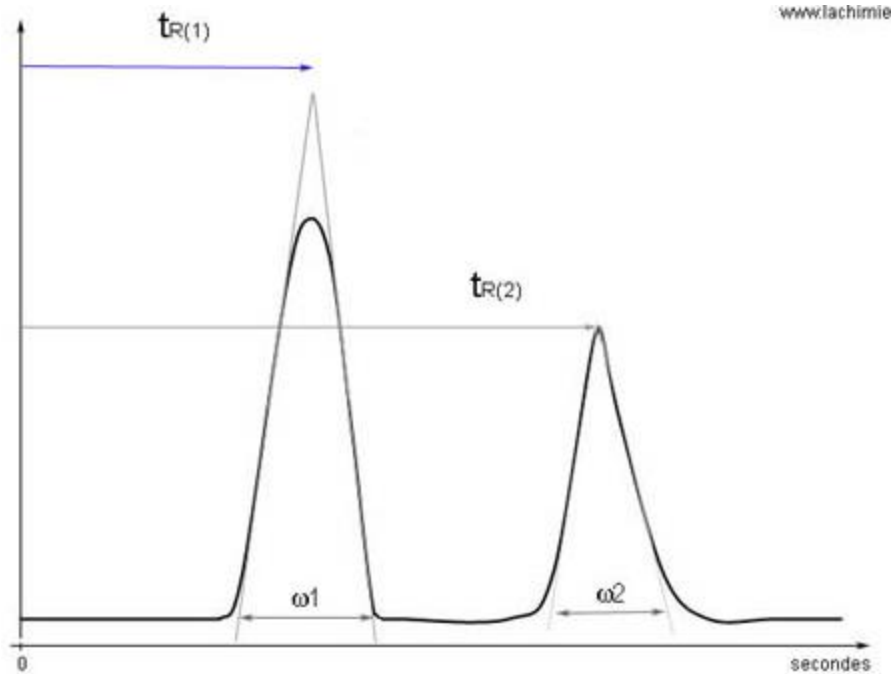
Le temps de rétention est le temps nécessaire à un composé pour éluer de la colonne et être détecté. Conventionnellement, le temps de rétention est déterminé au sommet du pic chromatographique qui correspond généralement à la moitié de l'élution du composé.

*Temps mort (t_m) : le temps mort est le temps minimum, après injection, nécessaire à un composé pour traverser la colonne et être analysé. Pour déterminer le temps mort de la colonne, il faut utiliser un composé qui n'est pas retenu par la colonne et qui élue avec la phase mobile sans interaction avec la phase stationnaire.

La résolution

La résolution R_S d'une colonne est la mesure quantitative de son aptitude à séparer deux analytes A et B. Elle se calcule avec la formule suivante :

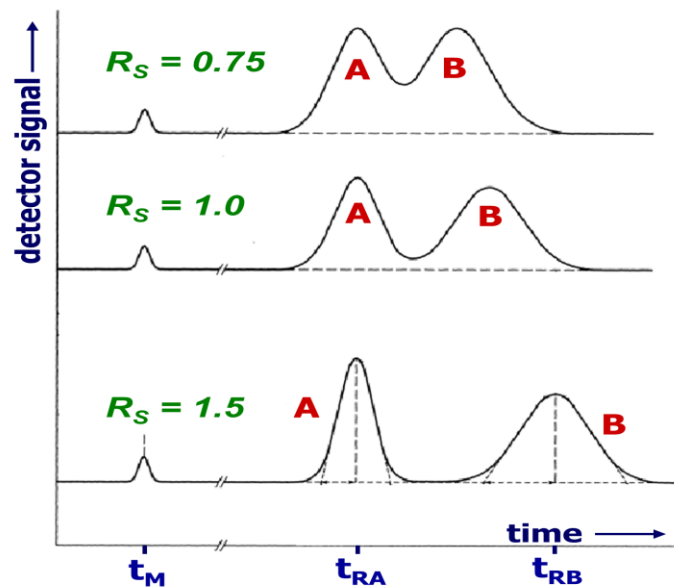
$$R = 2 \times \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{(\omega_1 + \omega_2)}$$



$R > 1$ bonne séparation

$R < 1$ mauvaise séparation

□ donc les paramètres appliqués à la colonne ne sont pas les bons.

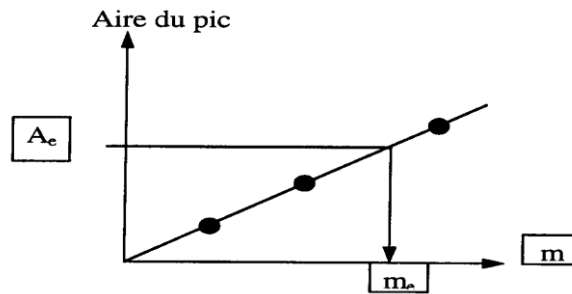


Une résolution supérieure à 1 voire supérieure à 1,5 est nécessaire pour avoir une bonne intégration des pics et donc un bon calcul de l'aire du pic.

B. Analyse quantitative

Cette analyse est basée sur le fait que l'aire des pics chromatographiques est proportionnelle à la concentration ou à la quantité de produit analysé.

Méthode de l'étalonnage externe :



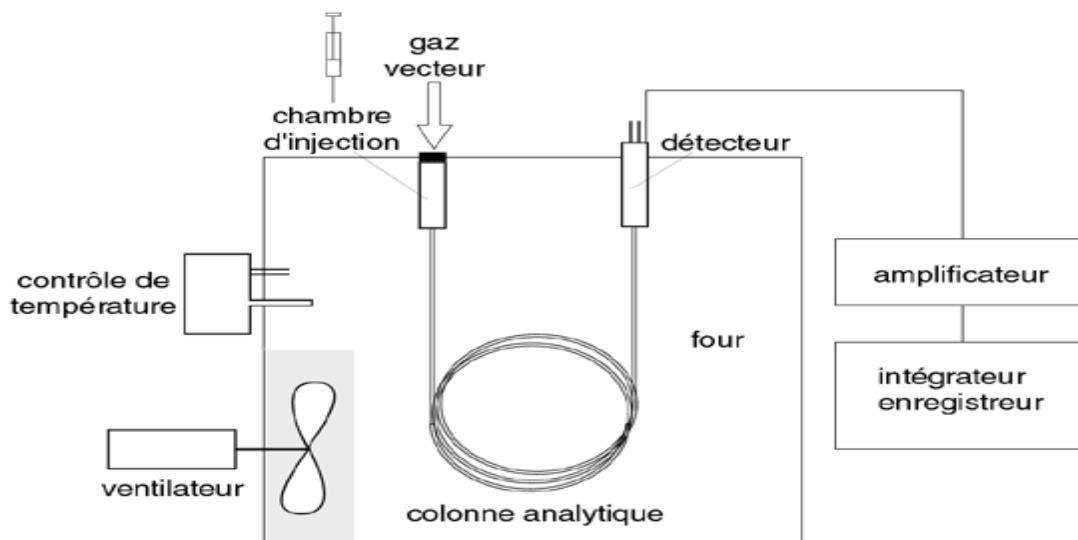
Il est nécessaire de disposer d'une quantité suffisante du produit afin de faire une courbe d'étalonnage $\text{Aire} = f(\text{masse ou concentration du produit})$, pour un volume injecté constant V . L'injection ultérieure du même volume V de l'échantillon à doser permet, à l'aide de la mesure de l'aire du pic reportée sur la courbe d'étalonnage, de connaître la masse ou la concentration recherchée.

II. CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE (CPG):

Le principe de la séparation par C.P.G. consiste à partager l'échantillon à analyser entre deux phases. L'une de ces phases est un liquide stationnaire uniformément réparti sous forme d'une pellicule mince sur un solide inerte, tandis que l'autre phase est un gaz mobile qui s'écoule à travers l'ensemble stationnaire.

II.1 Description d'un chromatographe

Un chromatographe est constitué en première approximation de trois organes essentiels : l'injecteur, la colonne et le détecteur



DISPOSITIF D'UN CHROMATOGRAPHE EN PHASE GAZEUSE

a) Injecteur:

Il permet d'introduire un liquide qui doit être **vaporisé instantanément** avant d'être transféré dans la colonne. Le **gaz porteur** entre dans une chambre chauffée, obturée par une pastille d'élastomère, le *septum*, qui assure l'étanchéité. A l'aide d'une seringue, on pique au travers du septum, afin que l'extrémité de l'aiguille arrive au-dessous du niveau de l'arrivée du gaz porteur, puis on pousse le piston pour réaliser l'injection.

b) Colonne:

C'est l'organe principal. Elle est constituée d'un tube généralement métallique de diamètre intérieur de l'ordre du **millimètre**. Ce tube contient la phase stationnaire constituée par un liquide peu volatil adsorbant fixé sur un solide inerte (alumine etc... soigneusement calibrée).

- On distingue les **colonnes à remplissage** proprement dit, constituées d'une tubulure en verre, acier ou autre métal (les plus fréquentes sont en acier inoxydables), dont les dimensions varient de 2 à 6 mm pour le diamètre intérieur et de 1 à 10 m pour la longueur. Le support remplissant la colonne est constitué de grains dont les dimensions varient de 60 à 70 μm ; ils sont à base de silice. La phase stationnaire est un liquide peu volatil, formant environ 10% de la masse du support non imprégné.

- Par ailleurs, on utilise des **colonnes capillaires**, formées d'un tube de métal, de verre, de silice fondue ou de quartz, dont le diamètre intérieur est de l'ordre de **0,2 à 0,5 mm** et la longueur de 50 à 100 m, ou davantage. L'adsorbant y est fixé sous forme d'une fine couche, ou bien la phase stationnaire est fixée en film mince, sans support, sur cette même paroi. Dans tous les cas, ces colonnes comportent un canal central largement ouvert pour la progression du gaz porteur.

La réussite d'une bonne séparation chromatographique dépend dans une large mesure du choix de la phase stationnaire :

On distingue les phases stationnaire apolaires et les phases polaires.

Les premières sont à base d'hydrocarbures aliphatiques saturés ou de silicones (squalane, apiezon,...). Les secondes sont des polymères possédant des fonctions polaires: polyols, polyesters. En général, les phases polaires retiennent plus les composés polaires, alors que ceux-ci sortent plus rapidement des colonnes apolaires que les composés du même nom. Les adsorbants les plus classiques sont les adsorbants minéraux, tels le charbon actif, l'alumine, les tamis moléculaires.

On utilise aussi des adsorbants organiques à haut poids moléculaire. Ce sont des copolymères (du type styrène + divinylbenzène). Ils ont l'avantage de permettre toutes sortes d'analyses.

On ne doit jamais effectuer d'analyse CPG sans avoir stabilisé l'ensemble de l'appareil en débit de gaz vecteur et en température pendant au moins deux heures.

Le choix de la phase stationnaire conditionne la bonne séparation des constituants. Il faudra la choisir polaire ou apolaire en fonction de la nature des substances à séparer

Le gaz employé (phase mobile) est un gaz inerte (hélium ou azote). Ce gaz vecteur ou gaz porteur pousse les constituants à travers la colonne. En chaque point de cette dernière, il se produit un équilibre entre la fraction du constituant en phase stationnaire et en phase mobile. **Il s'agit de chromatographie de partage.**

En dehors des périodes d'utilisation, les colonnes doivent être bouchées pour éviter l'humidité pouvant se solubiliser dans la phase stationnaire, ainsi que l'oxydation de celle-ci. La température de la colonne est en général inférieure de 20°C à celle du point d'ébullition du soluté le plus volatil. Plus la température de colonne est basse, meilleure est la séparation, mais cela risque d'allonger le temps d'analyse

c) Détecteur:

Il permet de mettre en évidence le passage des différents composés séparés par la colonne. La détection peut être basée sur des techniques de mesures différentes. Le détecteur le plus utilisé en CPG est celui à conductibilité thermique appelé catharomètre. Sa température est généralement la même que celle de l'injecteur.

- Catharomètre

Le catharomètre est un appareil simple et robuste, à réponse universelle, mais relativement peu sensible. Il est fondé sur une comparaison continue entre le flux de chaleur emporté par le gaz vecteur pur et le flux de chaleur emporté par le gaz vecteur chargé des molécules de solutés. Ces flux de chaleurs sont produits par des **résistances**, parcourues par un courant continu de tension fixe, dans une enceinte thermostatée.

En faisant passer le gaz vecteur contenant les constituants séparés sur la cellule du

détecteur, nous obtiendrons un signal chaque fois que l'un des constituants se présentera dans la cellule car la conductibilité thermique du gaz vecteur (qui traverse le détecteur) varie quand le constituant X traverse le détecteur.

Quand un constituant passe dans la cellule de mesure (porté par le gaz vecteur), un déséquilibre apparaît. Il est **amplifié et mesuré par l'enregistreur dont la** déviation est proportionnelle à la différence de potentiel apparue.

Pour obtenir la plus grande réponse pour un soluté donné, il est donc nécessaire qu'il y ait la plus grande différence possible entre la conductivité de ce soluté et celle du gaz porteur. A cet effet, on utilise pratiquement toujours l'hydrogène (danger d'explosion) ou l'hélium comme gaz vecteur.

- **Détecteur à ionisation de flamme.**

C'est un détecteur beaucoup plus sensible que le catharomètre, mais moins universel, car il ne donne de réponse qu'aux composés organiques.

Il a aussi l'inconvénient, contrairement au catharomètre, de détruire le soluté qui le traverse, **car son principe est de brûler, dans une flamme d'hydrogène**, l'effluent apporté par de l'azote (gaz vecteur). Sous l'effet d'un champ électrostatique, il se forme des **ions carbone de charge positive** qui sont précipités sur une électrode où ils créent un **courant d'ionisation** que l'on amplifie grâce à un électromètre amplificateur. Sur un enregistreur, on obtient par conséquent un signal proportionnel au débit-masse du soluté dans le détecteur.

- **Détecteur à capture d'électrons.**

Une source telle que le tritium (^3H) ou le (^{63}Ni) envoie des électrons libres dans le détecteur. Quand ce détecteur est traversé par des substances ayant une affinité pour les électrons libres, il se produit des ions qui, comme pour le détecteur à ionisation de flamme, dans le champ électrostatique existant, sont recueillis par une électrode et forment un courant d'ionisation à amplifier convenablement.

Performances des détecteurs

Catharomètre **1 à 10 ng** (tous composés)

Détecteur à ionisation de flamme **20 à 100 pg** (composés organiques)

Détecteur à capture d'électrons **0,1 pg** (composés halogénés)

II.2 Etape analytique

A/ Analyse qualitative en CPG

Si on injecte un mélange de plusieurs liquides dans la colonne par l'intermédiaire de l'injecteur, ces liquides sont transformés en gaz, lesquels sont entraînés dans la colonne par le gaz vecteur. La phase stationnaire selon sa constitution, va plus ou moins retenir sélectivement chacun des produits. Les vitesses de progression seront différentes pour chaque constituant. Nous arriverons ainsi à éluer le mélange, c'est à dire à séparer dans l'espace et dans le temps les différents composants du mélange.

On appelle coefficient de partage K pour un constituant X :

$$K = \frac{\text{Masse de constituant X par unité de volume de phase stationnaire}}{\text{Masse de constituant X par unité de volume de phase mobile}}$$

Ce coefficient de partage est un des paramètres qui conditionne **la durée de parcours de la colonne par le constituant.**

Si les autres paramètres (température, débit gazeux) sont constants, alors pour un mélange à analyser, la durée de parcours sera différente pour chaque constituant si leurs coefficients de partage sont différents. **Cette durée est appelée temps de rétention.**

Moyennant un étalonnage préalable avec des produits purs : **étalons**, la CPG permet donc l'analyse qualitative des constituants d'un mélange.

Allure du chromatogramme

Un chromatogramme correct est composé de pics de forme symétrique, pas trop larges et bien séparés. C'est en jouant sur les conditions opératoires que l'on arrive à un tel chromatogramme.

Les facteurs favorables à une bonne séparation sont :

- des temps de rétention suffisamment différents (choix de la colonne)
- des pics peu élargis.

Différence entre temps de rétention.

Le principal paramètre est la différence entre les coefficients de partage de chaque constituant. Ce dernier dépend beaucoup de la température et de la longueur de la colonne. Une diminution de la température du four entraîne une augmentation du temps de rétention. Une augmentation de la longueur de la colonne augmente les temps de rétention mais s'accompagne souvent d'un élargissement des pics.

B/ Analyse quantitative en C.P.G:

Après identification(s) du (ou des) soluté(s) séparés(s), le chromatogramme permettra aussi une analyse quantitative grâce à la relation :

$$m_i = K_i A_i$$

m_i : masse du soluté i injecté

A_i : aire du pic représentant ce soluté

K_i : coefficient de proportionnalité

Mesure de l'aire des pics.

On utilise essentiellement l'intégration automatique.

Quand les pics sont très pointus et très étroits, on peut se contenter des mesures des hauteurs H , alors proportionnelles aux aires.