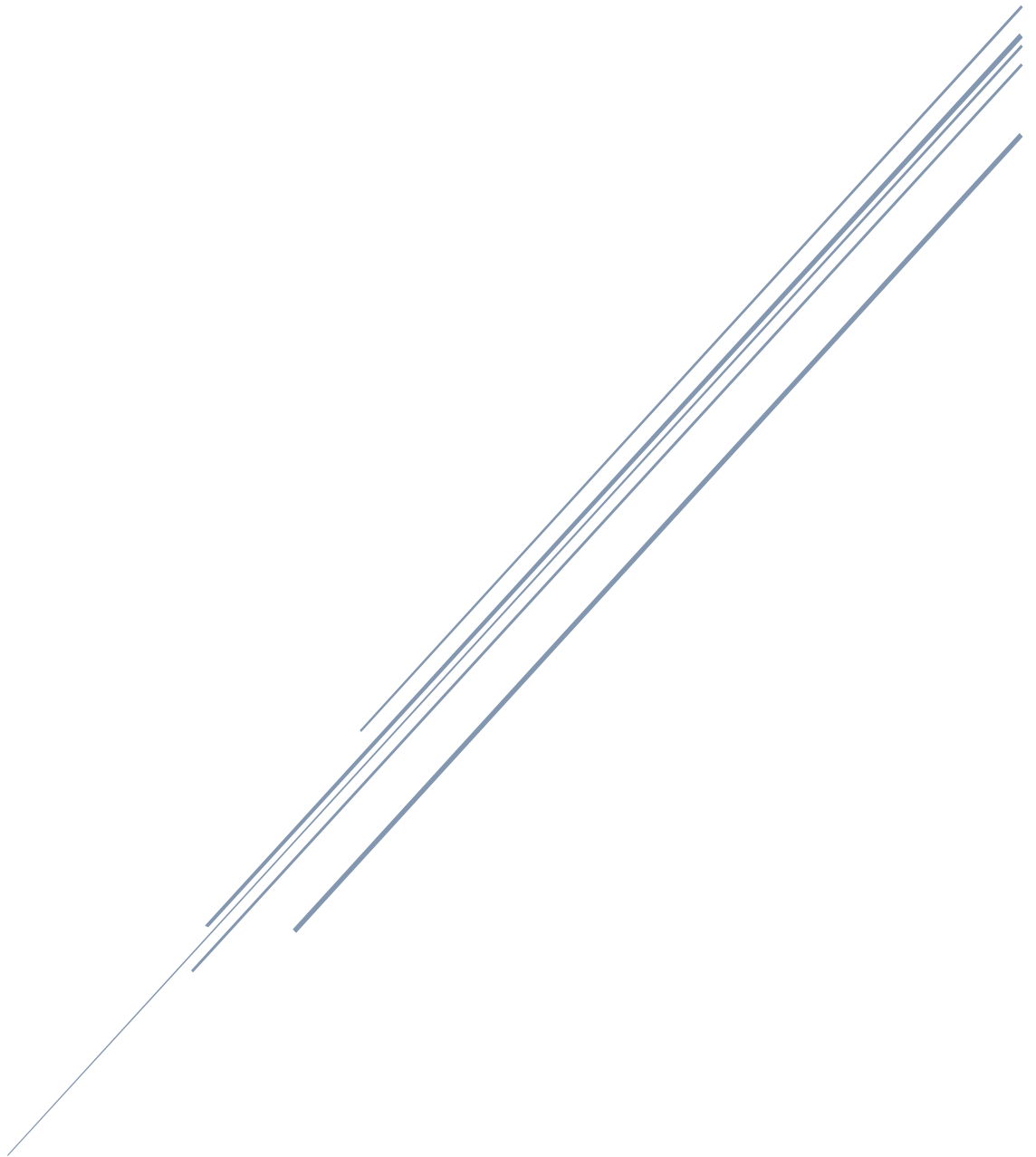


CHAPITRE VI. CHROMATOGRAPHIE EN : PHASE GAZEUSE (CPG) ET EN PHASE LIQUIDE (HPLC)

CPG & HPLC



UNIVERSITE DE JIJEL

I. Chromatographie en phase gazeuse (GC)

La chromatographie gazeuse est une méthode séparative où les molécules d'intérêt sont retenues par une phase stationnaire liquide ou solide contenue dans une colonne dont la température est régulée. Ces molécules seront éluées par la suite grâce à un gaz vecteur qui les entraîne vers un détecteur de grande sensibilité.

Elle est largement utilisée tant pour la détection que pour la quantification d'un très large nombre de composés surtout depuis l'avènement des colonnes capillaires dotées d'un grand pouvoir séparateur et d'une forte stabilité. Aussi, les données de rétention de la GC sont reproductibles dans le temps et entre manipulateurs et laboratoires.

Elle est aussi utilisée pour le screening de certaines classes thérapeutiques. La GC-MS reste la meilleure méthode pour l'identification des huiles essentielles.

I.1. Principe

Un appareil de CPG réunit dans un bâti unique, outre les trois modules classiques, injecteur, colonne et détecteur, un four thermostaté qui permet de porter, si nécessaire, la colonne à une température élevée (fig. 1).

La phase mobile qui entraîne l'échantillon dans la colonne est un gaz, appelé gaz vecteur. Les débits, contrôlés avec précision, permettent une grande répétabilité des temps de rétention.

L'analyse débute à l'instant où on introduit une très petite quantité de l'échantillon, sous forme liquide ou gazeuse, dans l'injecteur, qui a la double fonction de le porter à l'état de vapeur et de l'amener dans le flux gazeux en tête de la colonne. Celle-ci se présente comme un tube de faible section enroulé sur lui-même, de 1 à plus de 100 m de longueur suivant les cas et contenant la phase stationnaire.

Cette colonne est placée dans une enceinte à température régulée. Elle peut servir à des milliers d'injections successives. La phase gazeuse qui a traversé la colonne passe dans un détecteur avant de sortir à l'air libre.

Certains modèles de chromatographes ont une alimentation autonome ainsi qu'une taille réduite pour faciliter l'emploi en milieu extérieur, sur le terrain.

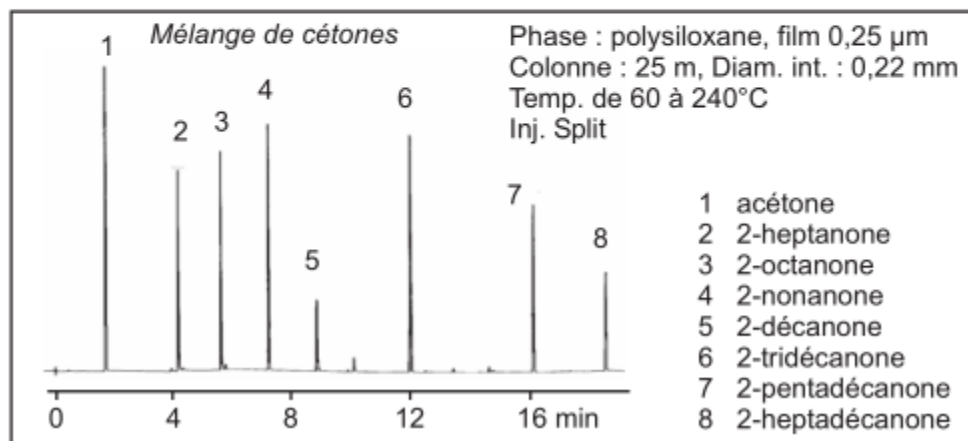
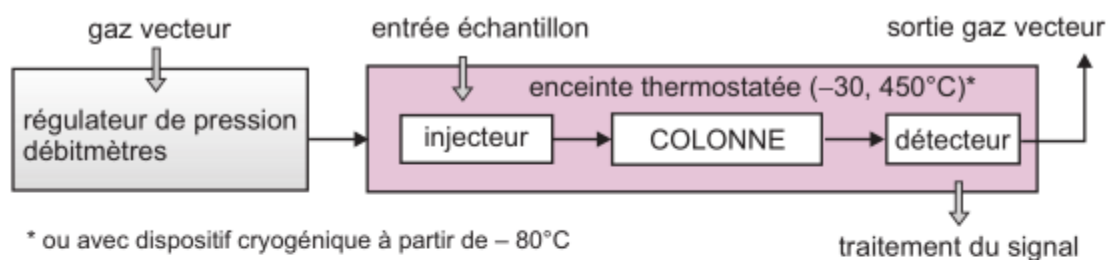
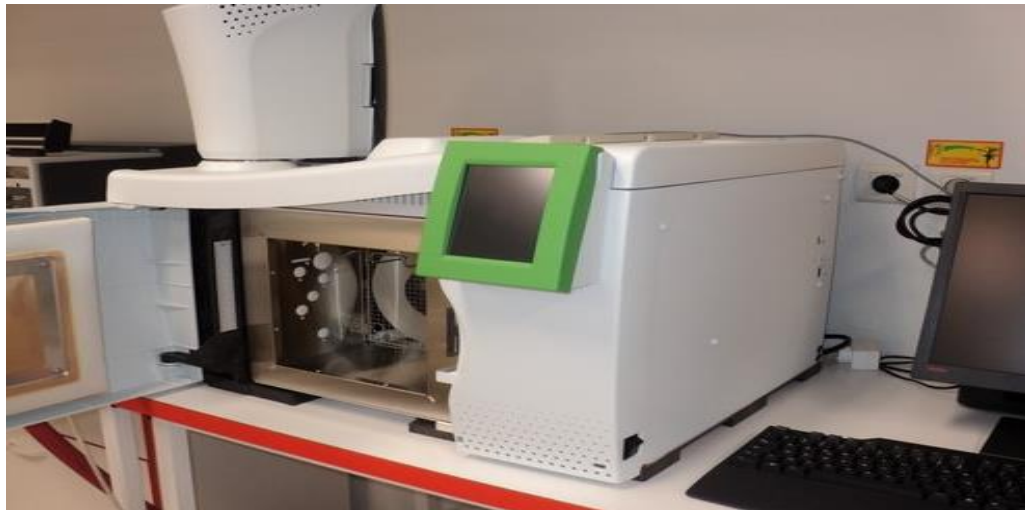


Fig. 1. Une installation de CPG. L'instrument représenté comporte également un porte-échantillons et un injecteur automatique. Schéma fonctionnel d'un appareil de CPG. Chromatogramme d'un mélange de cétones.

I.2. Gaz vecteur et régulateur du débit

On utilise comme phase mobile l'un des trois gaz suivants : l'hélium, le diazote ou le dihydrogène. Ils proviennent soit d'un cylindre sous pression soit d'un générateur (électrolyse de l'eau pour H_2 et séparation de l'air pour N_2), ce qui a l'avantage de fournir sur place un gaz très pur.

Ce gaz vecteur doit être exempt de traces d'hydrocarbures, de vapeur d'eau et de dioxygène qui se comportent comme des impuretés préjudiciables pour certaines phases stationnaires polaires et qui réduisent la sensibilité des détecteurs. C'est la raison pour laquelle on place un double filtre, desséchant et réducteur, juste en amont du chromatographe.

I.2.1. Influence de la nature et de la vitesse du gaz vecteur

La nature du gaz vecteur ne modifie pas de manière significative les valeurs des coefficients de distribution K des composés par suite de l'absence d'interaction entre gaz et solutés, la température étant le seul facteur de modification important.

En revanche, la viscosité et la vitesse du gaz dans la colonne ont une influence sur la dispersion des composés dans la phase stationnaire et sur la diffusion dans la phase mobile (cf. équation de Van Deemter), donc sur le paramètre d'efficacité N et sur la sensibilité de la détection (fig. 2). La pression en tête de colonne (quelques dizaines à quelques centaines de kPa) est soit stabilisée avec un système mécanique, soit asservie électroniquement afin que le débit demeure constant (système EPC, pour electronic pressure control).

Il est donc préférable que la pression soit corrigée pour conserver au gaz vecteur une vitesse constante et optimale. Il en résulte une analyse plus rapide et une longévité accrue des colonnes.

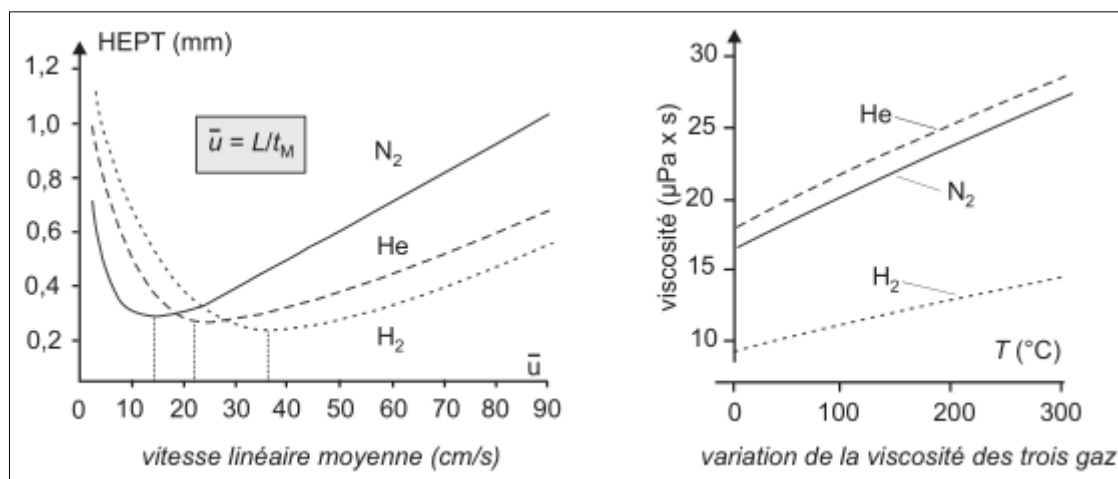


Fig. 2. Efficacité en fonction de la nature et de la vitesse linéaire du gaz vecteur. Ces courbes typiques de van Deemter montrent que l'hydrogène est, parmi les 3 gaz étudiés, celui qui permet les séparations les plus rapides, à performances égales, tout en donnant plus de souplesse en ce qui concerne le débit, ce qui est très utile en mode programmation

I.3. Introduction de l'échantillon dans la chambre d'injection

Une très petite quantité d'échantillon en solution (ex. 0,5 mL), est introduite dans l'appareil avec une micro-seringue (fig. 3) dont il existe de nombreux modèles adaptés aux divers injecteurs et colonnes. Pour les échantillons gazeux on utilise des vannes à boucles semblables à celles que l'on rencontre en chromatographie liquide haute performance (HPLC).

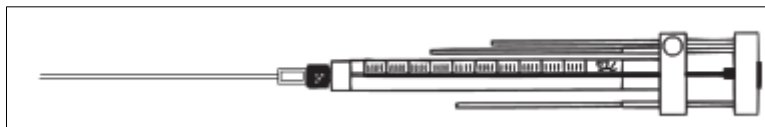


Fig 3. Seringue de 10 mL d'un type courant, utilisé en CPG. Un guide évite de tordre le piston, très fragile. Dans d'autres modèles (0,5 à 1 mL), le piston rentre dans l'aiguille pour libérer la totalité de l'échantillon et éviter tout volume mort.

I.4. Injecteurs

L'injecteur est la porte d'entrée de l'échantillon dans le chromatographe. Il a deux autres fonctions : vaporiser et entraîner en tête de colonne l'échantillon mélangé au gaz vecteur. Les caractéristiques des injecteurs, ainsi que les modes d'injection, diffèrent suivant les types de colonnes auxquels ils sont réunis.

La qualité des séparations dépend de cette phase de l'analyse. En règle générale, la chambre d'injection doit être à une température plus élevée que celle de la colonne pour faciliter l'évaporation des échantillons.

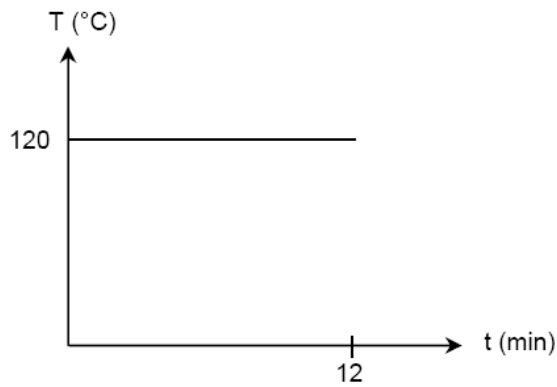
Le choix de l'injecteur est dicté par le type de colonne utilisée (remplie ou capillaire) et par la nature des produits à séparer (leur résistance à la décomposition lorsqu'ils sont soumis à de hautes températures).

I.5. Four

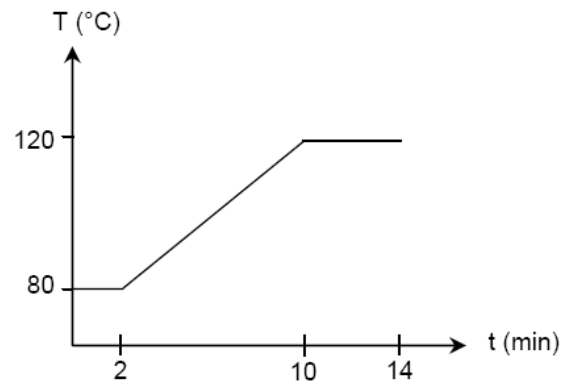
Le four principal est un compartiment, placé entre la chambre d'injection et le détecteur, qui contient la colonne chromatographique. Il est muni d'éléments chauffants pouvant contrôler la température du four avec une très grande précision.

Des contrôles permettent également de travailler à température programmée pour la séparation de mélanges de composés ayant des capacités de rétention très différentes sur la phase stationnaire.

- **Exemples de graphique :**



Température isotherme



Température programmée

I.6. Colonne

Ils existent deux catégories de colonnes en CPG, les colonnes remplies et les colonnes capillaires.

I.6.1. Colonnes remplies (à garnissage) :

Les colonnes à garnissage (les plus répandues) proprement dit, constituées d'une tubulure en verre, acier ou autre métal (les plus fréquentes sont en acier inoxydable), dont les dimensions varient de 2 à 6 mm pour le diamètre intérieur et de 1 à 10 m pour la longueur.

Elles sont remplies d'un lit continu et homogène de granules soit de produit absorbant, soit de produit inactif appelé support imprégné d'un film mince du liquide lourd, à faible pression de vapeur saturante, appelé phase stationnaire.

I.6.2. Colonnes capillaires

Les colonnes capillaires sont formées d'un tube de métal, de verre, de silice fondue ou de quartz, dont le diamètre intérieur du tube fabriquer ces colonnes varie de 100 à 530 μ m et son épaisseur est de 0.05 mm et la longueur de 12 à 100 m enroulés en spirale. Ces colonnes sont rendues moins fragiles par revêtement extérieur d'un polymère thermiquement stable (polyamide, $T_{\max} = 370^{\circ}\text{C}$). La phase stationnaire recouvre la paroi interne sur une épaisseur contrôlée de 0.05 à 5 μ m.

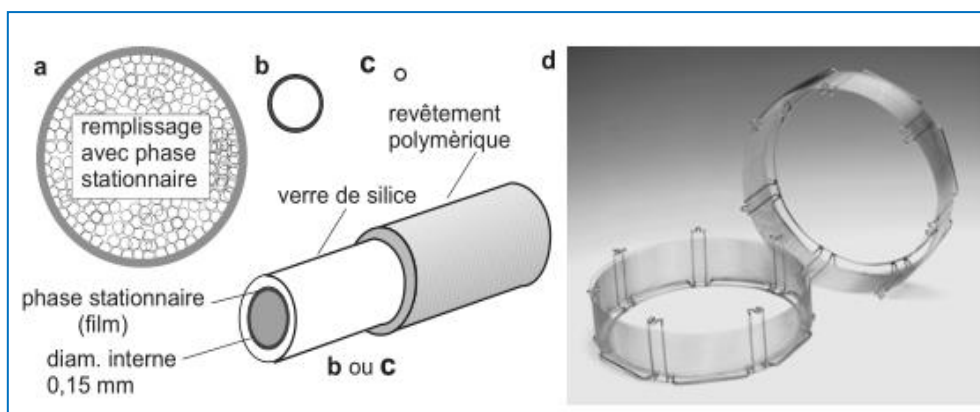


Fig.4. Colonnes de CPG. Représentation à la même échelle des sections des trois types de colonnes. a) Colonne remplie de 2 mm de diamètre; b) colonne capillaire « 530 » de 0,53 mm; c) colonne capillaire de 0,1 mm; détail d'une colonne capillaire. À cette échelle, l'épaisseur de phase stationnaire serait à peine visible; d) colonnes commerciales de 50 m de longueur.

I.6.3. Détecteurs

Le détecteur du chromatographe à gaz est situé dans un compartiment immédiatement à la sortie de la colonne. Comme la chambre d'injection, la chambre à détection peut être chauffée à des températures très élevées. Son rôle est de détecter les composés à la sortie de la colonne et de transmettre l'information sous forme d'un signal électrique à l'enregistreur.

Comme les pulsions électriques sont très faibles, un amplificateur est branché au détecteur pour multiplier ou diviser l'intensité des signaux d'un certain facteur, généralement des multiples de 10. Un détecteur est caractérisé principalement par sa sensibilité et sa capacité de donner une réponse proportionnelle à la concentration du composé détecté.

Les principaux détecteurs sont :

- Catharomètre
- Détecteur à Ionisation de Flamme (FID).
- Détecteur thermo-ionique.
- Détecteur à capture d'électrons.
- La spectrométrie de masse

II. Chromatographie liquide à haute performance CLHP

II.1. Introduction

La chromatographie liquide haute performance, souvent désignée par son abréviation CLHP – HPLC en anglais –, constitue une technique analytique très générale d'emploi. Elle dérive de la forme la plus ancienne de la chromatographie liquide sur colonne dont les performances, en termes de sélectivité et de résolution, se sont trouvées grandement améliorées par la miniaturisation et l'utilisation de phases stationnaires très élaborées.

A l'origine la chromatographie en phase liquide se faisait sur des colonnes en verre. Le liquide traversait la phase stationnaire par gravité ou sous faible pression. Puis pour augmenter le débit, des manipulations ont été réalisées plus forte. C'est ce que l'on a appelé la chromatographie liquide sous haute pression (HPLC). Très rapidement le P de pression est devenu le P de performance lorsque l'on a optimisé la technique (diminution de la taille de particules de la phase stationnaire, régularité de cette phase...)

Elle met en œuvre, selon la nature de la phase stationnaire, des phénomènes de partage, d'adsorption, d'échange d'ions ou d'exclusion. Son développement très rapide, à partir de 1970, réside dans le fait qu'elle n'a pas les inconvénients de la chromatographie liquide classique ; cette dernière a toujours été peu utilisée, en raison de la lenteur de la séparation ; de l'absence de détecteur qui aurait permis de suivre facilement le développement de chromatogramme et la quantité considérable d'échantillon nécessaire.

II.2. Appareillage

Dans tout appareil de chromatographie liquide haute performance on retrouvera toujours les éléments de base suivants (Fig.5) : un réservoir contenant la phase mobile, un système de pompage, un injecteur, une colonne, un détecteur à travers lesquels un liquide entraîne les substances d'un mélange à séparer et un système d'acquisition de données. Il nécessite également un dispositif de dégazage. Les différents éléments s sont reliés par des canalisations courtes et de très faible diamètre interne (0,1 mm).

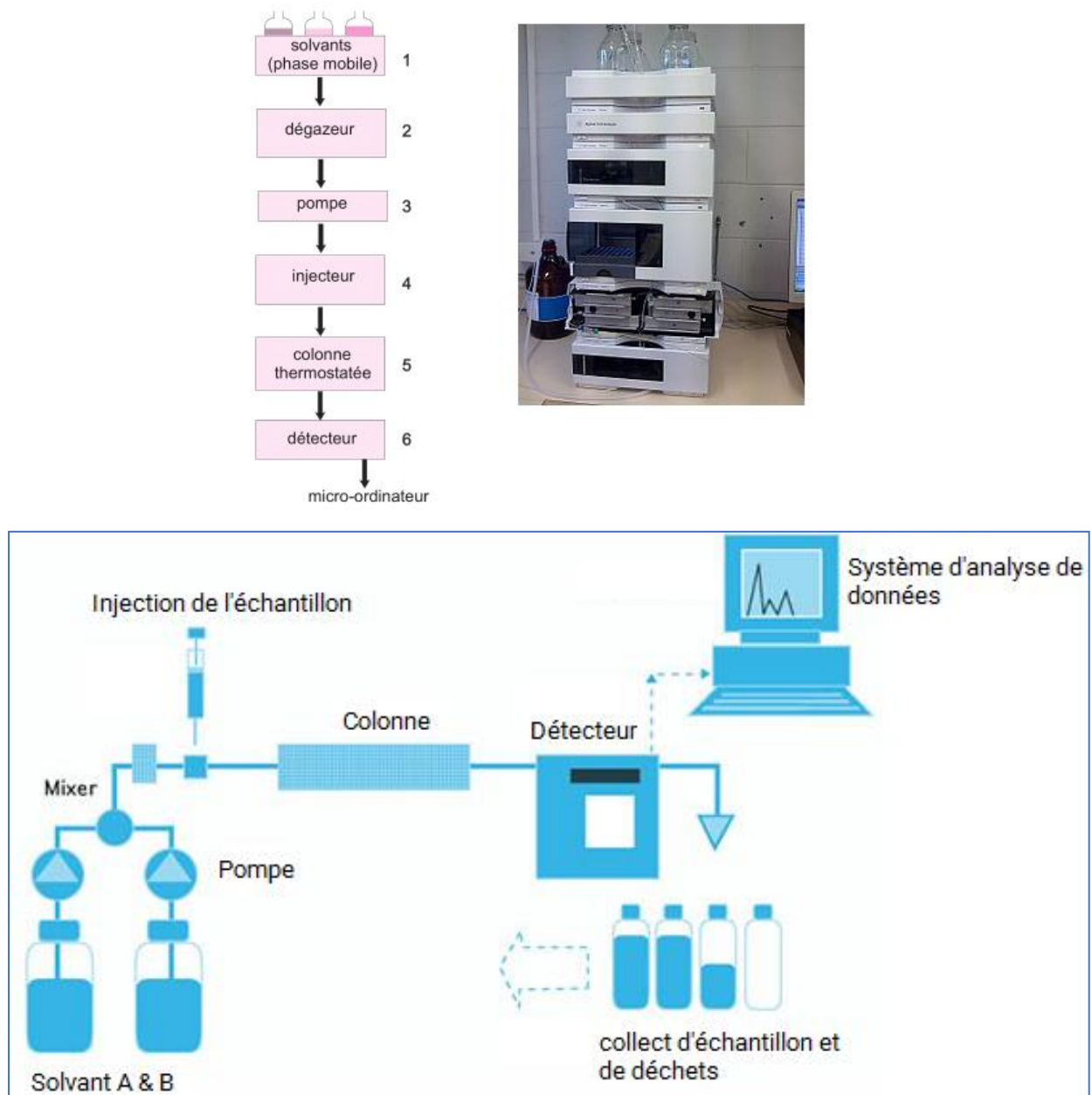


Fig.5. Les composants d'un chromatographe liquide à haute performance.

II.2.1 Réservoir de solvant (éluant) : Il 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.

II.2.2. Dispositif de dégazage : Durant le pompage, dans la chambre de mélange ou dans la colonne elle-même, si les solvants ne sont pas dégazés, l'air dissout dans le liquide soumis à de forte pression, forme des bulles à l'intérieur du système, c'est là un inconvénient majeur pour le fonctionnement de la plupart des détecteurs en particulier ceux qui utilisent des propriétés optiques.

En règle générale, plus le liquide est polaire, plus la tendance de l'air à se dissoudre est forte. Il convient donc d'éliminer au maximum l'azote et l'oxygène qui peuvent être présents.

Le dégazage de la phase mobile se fait par barbotage d'hélium, par ultrasons ou par un dégazeur.

II.2.3. 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. Les pompes actuelles ont des pressions maximales de refoulement voisines de 400 bar et un débit variable de quelques μl à plusieurs ml/min.

II.2.4. 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. Le système de la boucle d'injection permet d'avoir un volume injecté constant, ce qui est important pour l'analyse quantitative.

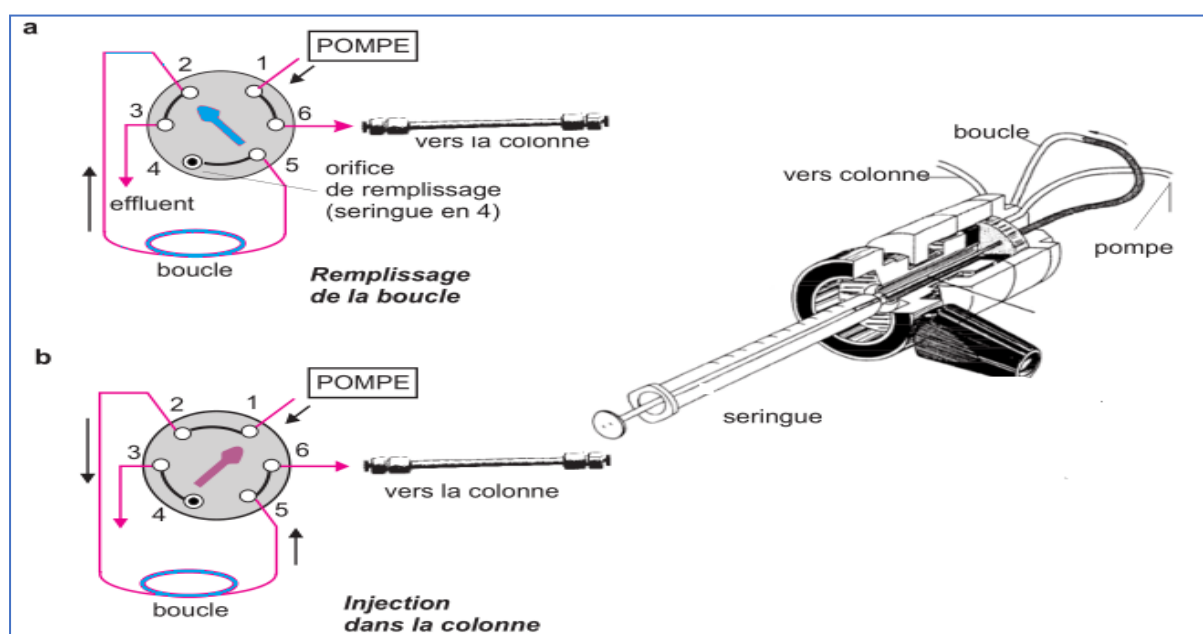


Fig.6. Injection avec une boucle. a) Remplissage de la boucle. Dans cette étape, la seringue est introduite à la position n° 4; b) injection dans la colonne (noter la nouvelle position de la manette). Vanne modèle 7125. Les vannes sont motorisables.

II.2.5. Colonne : Les colonnes CLHP sont généralement courtes et droites en acier inoxydable se caractérise par leur géométrie (diamètre intérieur de 4 mm et une longueur de 5 à 30 cm) et par la nature des phases qu'elles contiennent (Figure7). Elles doivent capables de résister aux fortes pressions. Le débit de la phase mobile ne peut dépasser quelques mL/min. Ces colonnes ont l'avantage de la rapidité de l'analyse, consomment moins de solvant et conduisent à une meilleure résolution de l'analyse. 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

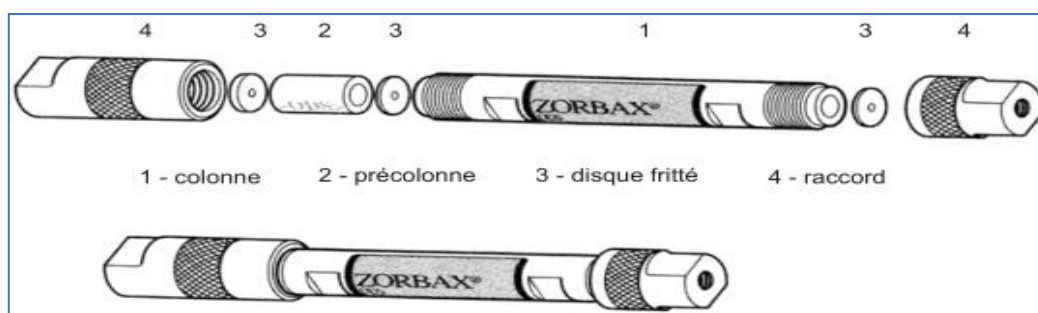


Fig.7. Colonne standard et précolonne de CLHP.

II.2.6. Les thermostats des colonnes : La plupart des appareils commerciaux récents sont équipés de dispositifs de régulations de la température ; qui la contrôle de la température ambiante jusqu'à 150°C. On obtient souvent de meilleurs chromatogrammes en maintenant la température constante à quelques dixièmes de degrés Celsius.

II.2.6.1. Effet de Modification de la température : Les écarts de température modifiant les temps de rétention, les appareils actuels permettent de thermostater la colonne et l'éluant, à la fois pour assurer la répétitivité des analyses et pour faire intervenir éventuellement la température comme paramètre de séparation (fig. 8).

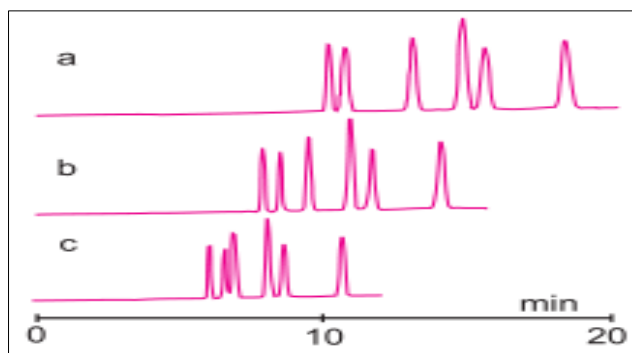


Fig. 8. Effet de la température de la colonne sur une séparation. Exemple relatif à trois essais effectués sur un même mélange et avec un même débit de phase mobile à des températures différentes (a) 25 °C, (b) 35 °C et (c) 45 °C

II.2.7. Détecteurs

a /Photomètre UV-Visible : Le détecteur UV-Visible mesure l'absorption de la lumière par le produit à la sortie de la colonne et opère à longueur d'onde constante, celle-ci ayant été fixée par l'opérateur. Pour que ce type de détecteur soit utilisable, il faut que:

- Le produit à détecter absorbe la lumière à une longueur d'onde accessible à l'appareil.
- La phase mobile n'absorbe pas la lumière à la longueur d'onde choisie par l'opérateur.

Ce détecteur détecte seulement les changements dans le soluté donc on peut l'utiliser dans l'analyse par gradient d'élution. Le détecteur est facile à opérer et ne détériore pas l'échantillon.

Ce type de détecteur permet de sélectionner la longueur d'onde optimale de détecteur pour chaque soluté. Il y'a plusieurs types de détecteurs :

- Détecteur à λ fixe : vapeur de Hg (254 nm)
- Détecteur à λ variable
- Détecteur à barrettes de diodes (DAD) : la cellule de mesure est éclairée par une source polychromatique ; gamme de 190 à 800 nm permettant l'enregistrement tridimensionnel absorbance-temps-longueurs d'onde. Ce type de détecteur permet de sélectionner la longueur d'onde optimale de détecteur pour chaque soluté.

b/Réfractomètre différentiel : Il mesure la variation de l'indice de réfraction entre la phase mobile contenant le soluté et la phase mobile pure correspondant à la référence. La sensibilité optimale correspond à un maximum d'écart entre les indices de réfraction des composants de l'échantillon et de la phase mobile.

Un composant dont l'indice est voisin de celui de la phase mobile est alors pratiquement indétectable. Son utilisation est moins répandue que celle du détecteur à UV à cause de sa plus faible sensibilité.

c/Détecteur fluorimétrique: Il mesure l'énergie de fluorescence d'un soluté excité par une radiation ultraviolette. L'émission de lumière est mesurée à angle droit du faisceau d'excitation. Ce procédé sert pour les composés fluorescents ou les dérivés fluorescents de certains composés.

Ce mode de détection est plus sélectif et plus sensible de tous les détecteurs optiques à condition que les composés présentent une fluorescence, qu'elle soit naturelle ou obtenue par formation de dérivés

d/ Détecteur électrochimique : Cette méthode de détection ne s'adresse qu'à la détection de molécule douée de propriétés oxydoréduction.

e/ Détecteur par spectroscopie de masse : La chromatographie liquide couplée à la spectroscopie de masse (LC-MS) est une technique d'analyse qui permet d'identifier clairement un composé grâce à son rapport masse molaire/charge (m/z).

II.3. Phase stationnaire

II.3.1. 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.

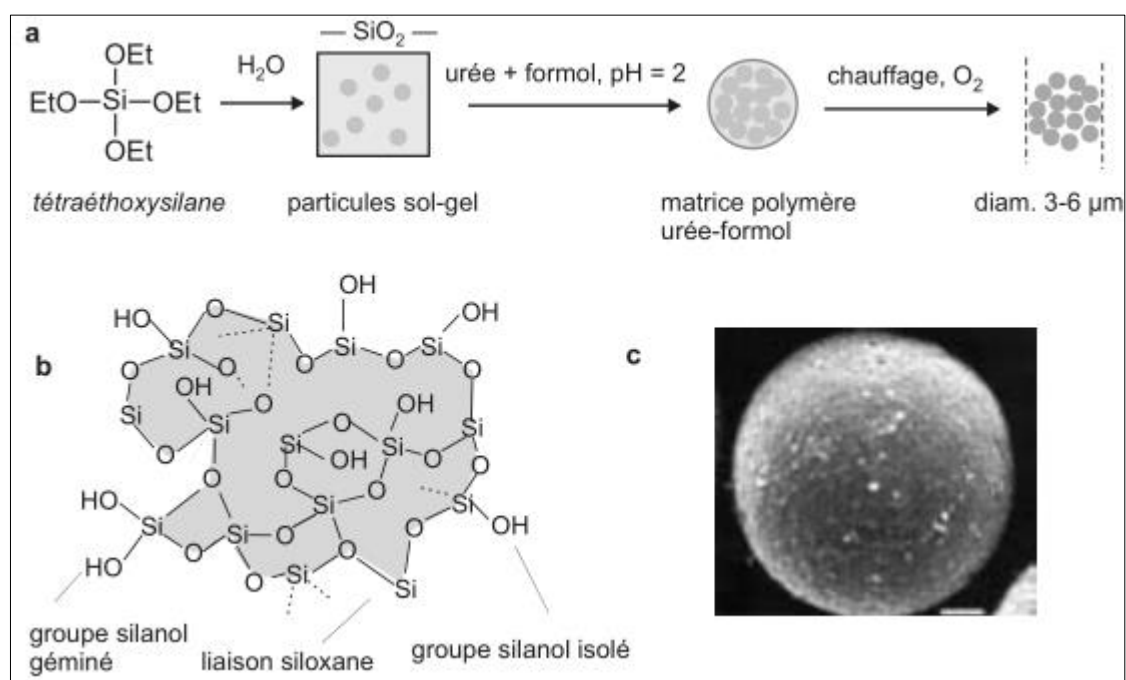


Fig.9. Le gel de silice pour chromatographie. a) préparation de grains sphériques de gel de silice via un sol-gel. La dispersion, appelée sol, constituée de particules sphériques de quelques nm de diamètre, s'agglutine en présence d'un liant organique urée/formol jusqu'à atteindre la taille voulue (3-7 mm). 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.

II. 3.2. 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.

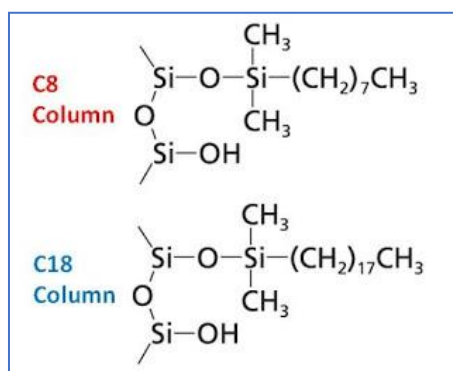


Fig.10. Gel de silice greffée

II.4. 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'élution 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'élution 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.

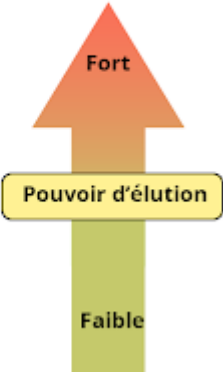
Phase stationnaire polaire	Solvants classés par polarité croissante	Phase stationnaire apolaire
	Hexane Toluène Trichloroéthane Dichlorométhane Éther Acétate d'éthyle Acétonitrile Méthanol Eau	

Fig.11. Force d'élution des solvants utilisés comme phases mobiles.

II.5. Domaines d'application de HPLC

Les domaines d'application de HPLC sont nombreux mais elle est particulièrement employée en :

- Biochimie pour l'analyse des constituants d'un composé.
- Séparation et identification des acides aminés, acides nucléiques, protéines, hydrocarbures, pesticides, glucides, antibiotiques, stéroïdes et d'innombrables autres substances organiques et inorganiques.
- Quantification des analytes présents
- Détermination de la pureté de l'échantillon
- Assurance qualité et contrôle.