

Chapitre V

La chromatographie liquide à haute performance (CLHP).

V-1-Introduction.

V-2-Conception générale d'un appareil CLHP.

V-3-Pompes.

V-4- Injecteurs.

V-5-Colonnes.

V-6-Phases stationnaires.

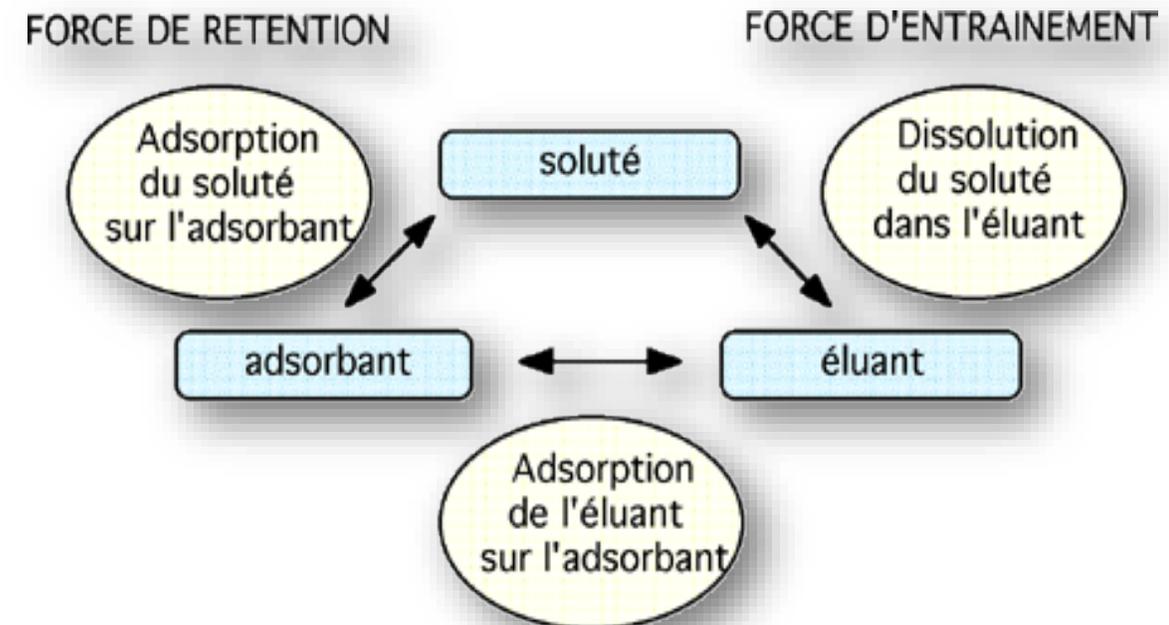
V-7-Chromatographie chirale.

V-8-Phases mobiles.

V-9-Principaux détecteurs.

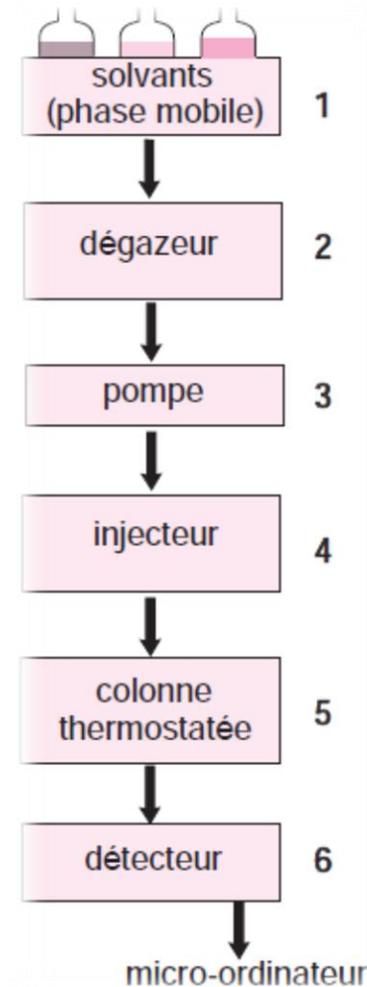
V-1-Introduction:

- ❖ La chromatographie liquide haute performance appelé CLHP est une technique instrumentale qui permet de séparer les composants d'un mélange non volatile, thermosensible, de polarité et de masse moléculaire élevée afin de les identifier et les quantifier.
- ❖ *Son succès est dû à la possibilité d'agir de manière très précise sur la sélectivité entre les composés par le choix de la colonne et de la composition de l'éluant, c'est-à-dire en exploitant les interactions soluté/phase mobile/phase stationnaire.*
- ❖ La particularité de la CLHP est de faire intervenir des mécanismes d'échange soluté/phase mobile/phase stationnaire basés sur les coefficients d'adsorption ou de partage.



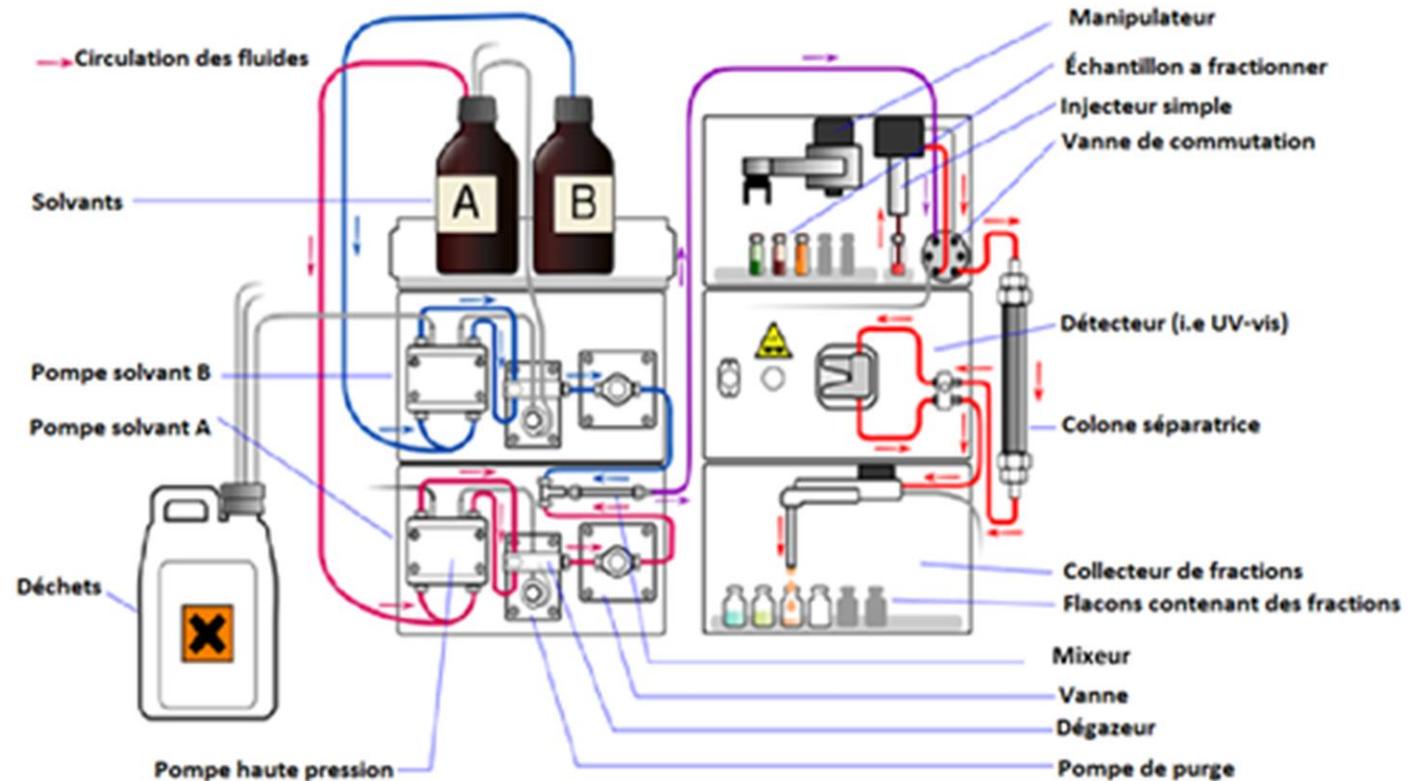
V-2-Conception générale d'un appareil CLHP:

- ❖ Une installation de CLHP comporte divers modules spécialisés, qui se présentent dans des boîtiers distincts ou intégrés dans un même châssis
- ❖ Un appareil CLHP comporte les modules suivants: **un réservoir contenant la phase mobile**, un **dégazeur**, un **système de pompage**, un **injecteur**, une **colonne**, un **détecteur** et un système d'acquisition de données.
- ❖ 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 ou en polymère qui résiste aux solvants usuels, même sous des pressions élevées.



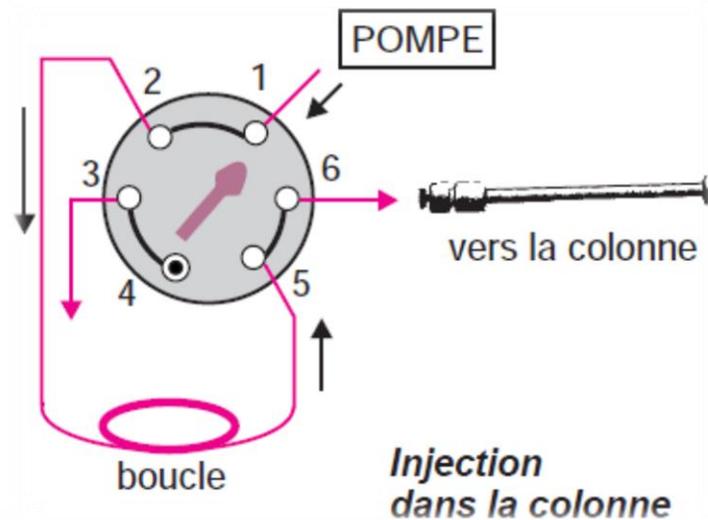
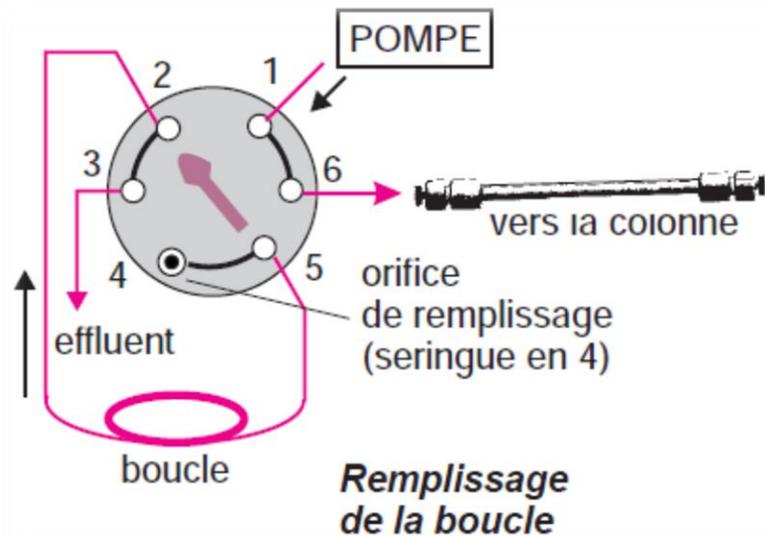
V-3-Pompes:

❖ 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.



V-4- Injecteurs:

- ❖ 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.
- ❖ L'injection de l'échantillon se fait à l'aide d'une vanne:
 1. On introduit d'abord l'échantillon dans une boucle de volume connu (position chargement).
 2. Après rotation de la vanne de 60° d'un levier qui permet d'inverser le sens de circulation dans la boucle (position Injection), la phase mobile entraîne l'échantillon en tête de la colonne.



V-5-Colonnes:

- ❖ La colonne se présente comme un tube en acier inoxydable, dont la longueur et le diamètre présentent des différences selon les modèles.
- ❖ La colonne est souvent précédée d'une pré colonne, dite *colonne de garde*, courte (0,4 à 1 cm), remplie de la même phase stationnaire, ce qui sert à retenir certaines impuretés.

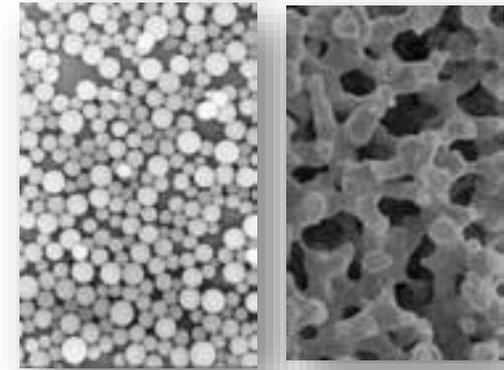


- ❖ Ces colonnes ont l'avantage de la **rapidité de l'analyse**, **consomment moins de solvant** et conduisent à une **meilleure résolution de l'analyse**.

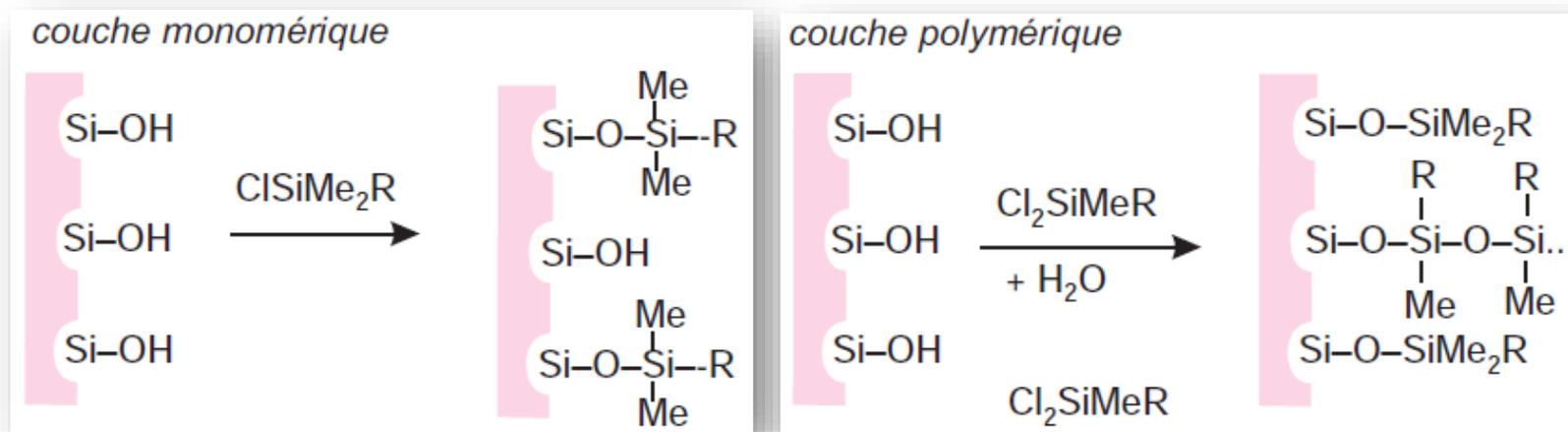
V-6-Phases stationnaires:

❖ La recherche d'une bonne résolution chromatographique a conduit à la création de phases stationnaires de nature et de structures variées. On distingue plusieurs phases stationnaires:

□ Phase stationnaire à base de gels de silice: Les propriétés des gels de silice dépendent de nombreux paramètres : *structure interne*, *porosité* (dimension et répartition des pores), *surface spécifique*, *résistance à l'écrasement* et *polarité*.

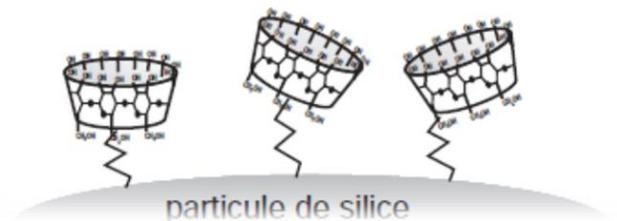
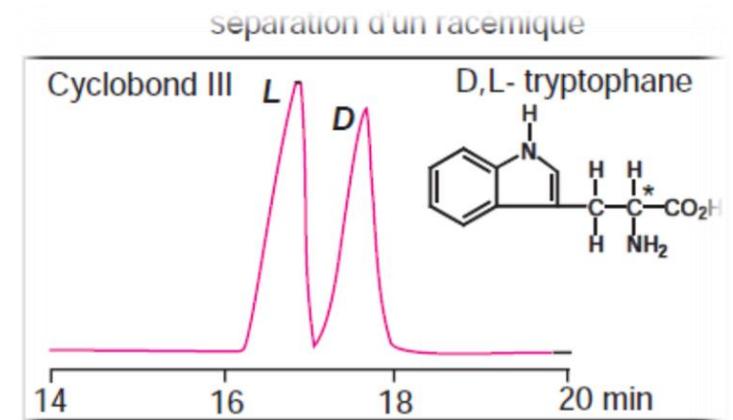


□ Phase stationnaire à base de gels de silice greffé: Ces phases greffées, sont à l'origine de la chromatographie de partage à polarité de *phase inversée*, utilisée dans quasiment toutes les séparations. Ces modifications de la surface du gel conduisent à deux types de phases: **Phases monomériques** (10-15 mm d'épaisseur), **Phases polymériques** (25 mm ou plus en épaisseur).



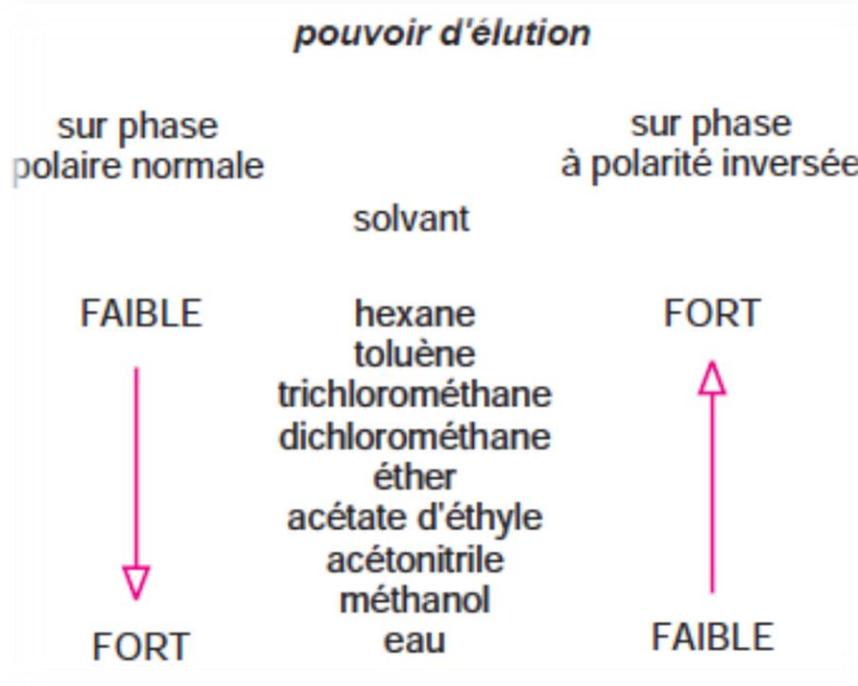
V-7-Chromatographie chirale:

- ❖ Un composé organique dont la formule développée révèle l'existence d'un centre asymétrique, conduit généralement à un mélange des deux énantiomères possibles *R* et *S*.
- ❖ Si on chromatographie ce composé sur une colonne dont la **phase stationnaire est chirale**, c'est-à-dire possédant des centres asymétriques identiques et correspondant à un seul énantiomère (*R* ou *S*), on observe sur le chromatogramme deux pics. Ces pics résultent des interactions réversibles entre les énantiomères du composé et l'énantiomère de la phase stationnaire.
- ❖ Les phases stationnaires sont des résines optiquement actives ou des gels de silice greffés avec des cyclodextrines (enchaînements cycliques de 5 à 7 molécules de glucose) par l'intermédiaire d'un « bras » ayant plusieurs atomes de carbone.



V-8-Phases mobiles:

- ❖ Suivant un principe général, à une phase stationnaire polaire on oppose une phase mobile peu ou pas polaire dans ce cas la chromatographie est dite en **phase normale**, dans le cas contraire elle est dite en **phase inverse**.
- ❖ Avec une phase stationnaire apolaire (une couche paraffinique C8 et C18), l'ordre d'éluion est opposé à celui des phases normales (phase stationnaire polaire). Ainsi avec un éluant polaire, un composé polaire migre plus vite qu'un composé apolaire. Dans ces conditions les hydrocarbures sont fortement retenus.



V-8-Phases mobiles:

Polarités de quelques familles de composés

Peu polaire  très polaire

hydrocarbures

aldéhydes et cétones

alcools

phénols

acides

hydroxyacides

amines tertiaires

amines secondaires

amines primaires

Polarités de quelques types de phases stationnaires

Peu polaire  très polaire

C8-C18

Phényl (-C₆H₅)

Nitrile (CN)

Silice (SiO₂)

Amine (NH₂)

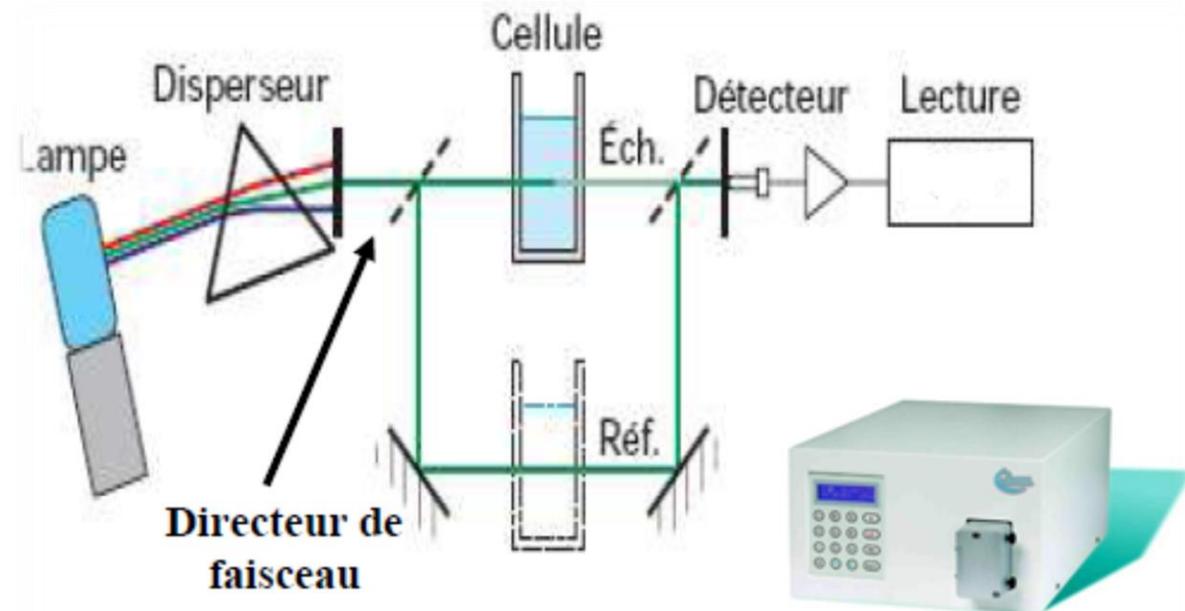
Diol

V-9-Principaux détecteurs:

- ❖ En chromatographie, un détecteur doit réunir un certain nombre de qualités : donner pour chaque composé détecté une réponse proportionnelle à sa concentration instantanée, être sensible et avoir peu de bruit de fond et être stable dans le temps. Les modes de détection les plus courants reposent sur les propriétés optiques des composés : **absorption**, **fluorescence** et **indice de réfraction**.

1. Détecteurs spectrophotométriques

- ❖ La détection est basée sur la loi de Lambert-Beer ($A = \epsilon.l.c$) : l'absorbance A de la phase mobile est mesurée en sortie de colonne, à la longueur d'onde λ ou plusieurs longueurs d'onde dans l'UV ou le visible.
- ❖ La détection UV est une détection sélective utilisée pour les composés contenant des groupements chromophores.



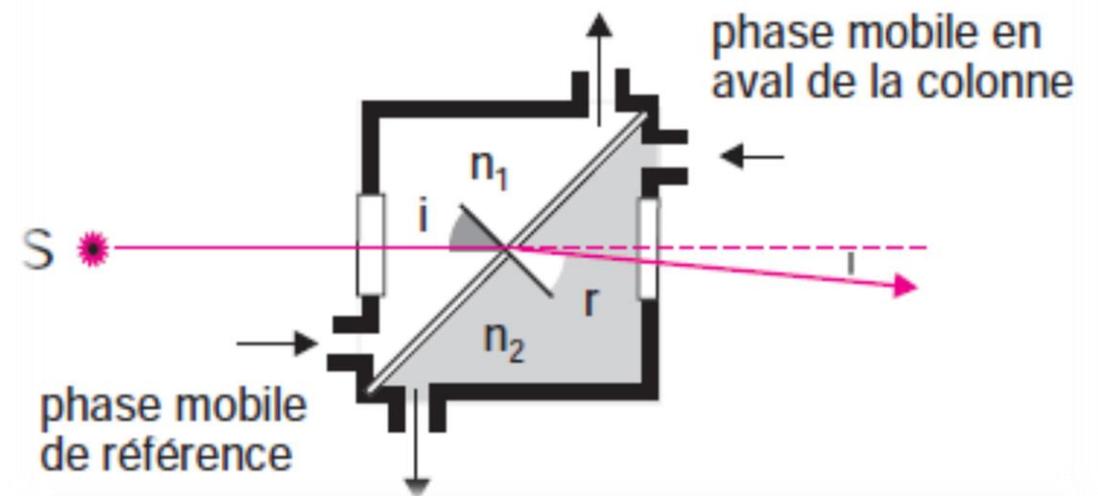
V-9-Principaux détecteurs:

2. Détecteur spectrofluorimétrique:

- ❖ Les composés fluorescents réémettent sous forme de radiations lumineuses une fraction plus ou moins grande du rayonnement de la source auquel ils sont soumis.
- ❖ L'intensité de fluorescence est proportionnelle à la concentration de la substance. Les détecteurs de fluorescence sont utilisables pour les composés naturellement fluorescents.

3. Détecteur réfractométrique:

- ❖ Ce type de détecteur comporte un réfractomètre différentiel qui a pour objet de mesurer en continu la différence d'indice de réfraction entre la phase mobile et l'effluent de la colonne. La sensibilité optimale correspond à un maximum d'écart entre les indices de réfraction des effluents et de la phase mobile.



Références

