

# Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance (HPLC)

## 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 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 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).

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).

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).

## 2. Intérêt

Il est actuellement utilisé dans la recherche pharmaceutique et le développement :

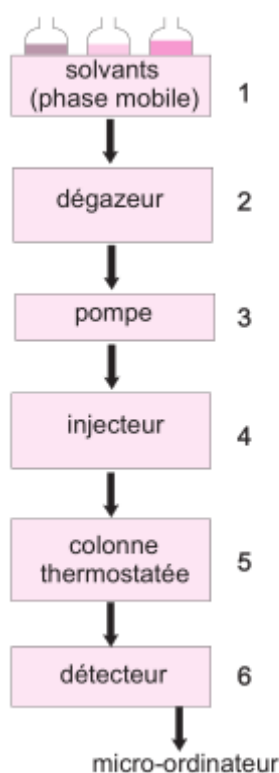
- Pour purifier les produits synthétiques ou naturels.
- Caractériser les métabolites.
- Pour doser les ingrédients actifs, les impuretés, les produits de dégradation et dans les essais de dissolution.
- Dans les études pharmacodynamiques et pharmacocinétiques.

### 3. Conception générale d'un appareil de HPLC (CLHP)

Une installation de CLHP (HPLC) comporte divers modules spécialisés, qui se présentent dans des boîtiers distincts ou intégrés dans un même châssis pour des raisons de moindre encombrement (fig.1).

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.

L'écoulement des faibles débits obéit à la loi de Poiseuille. La vitesse de la phase mobile est maximum au centre des canalisations et nulle au contact des parois. Une dispersion des composés se produit donc inévitablement. Pour améliorer les séparations on fait donc en sorte que le volume de phase mobile hors-colonne soit le plus réduit possible (10 % du volume mort de la colonne).



**Fig.1 : Schéma d'une installation de CLHP avec double détection. Un exemple de réalisation de type modulaire.**

La présentation en colonne des différents modules est commune à de très nombreux modèles concurrents. Ici le chromatographe comporte un injecteur automatique permettant un

fonctionnement en continu et une colonne thermostatée pour améliorer la reproductibilité des séparations. Les composés élués, après passage par le détecteur UV sont identifiés avec encore plus de certitude au moyen d'un spectromètre de masse, situé à droite de l'image.

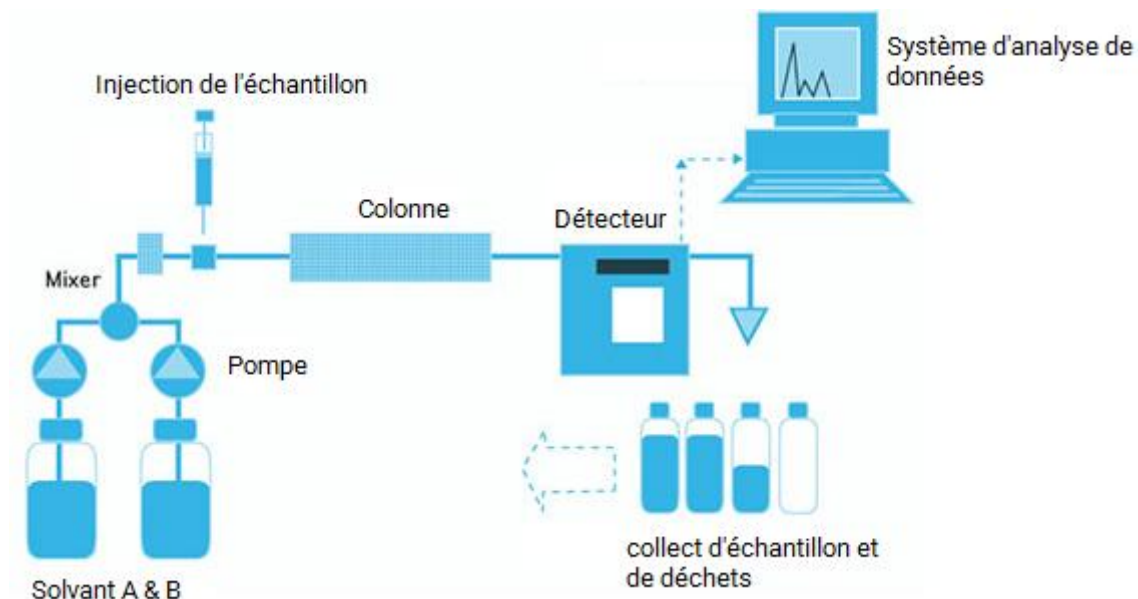


Fig.2 : Appareil d'HPLC (Conception générale)

## 4. Pompe et gradients d'éluion

### 4.1. Pompes pour éluant

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. On utilise des pompes conçues pour maintenir un débit non pulsé et stable, même si la composition de la phase mobile varie. Ces pompes débit-métriques comportent généralement deux pistons : en série (fig. 2).

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 fonctionnant en opposition pour éviter les interruptions de débit dues au remplissage du cylindre. Le déplacement des pistons est contrôlé par un moteur pas à pas associé à une came de forme particulière.
- Réservoirs de phase mobile

- Électrovannes
- Amortisseur de pulsations
- Système de purge et d'amorçage
- Capteur de pression

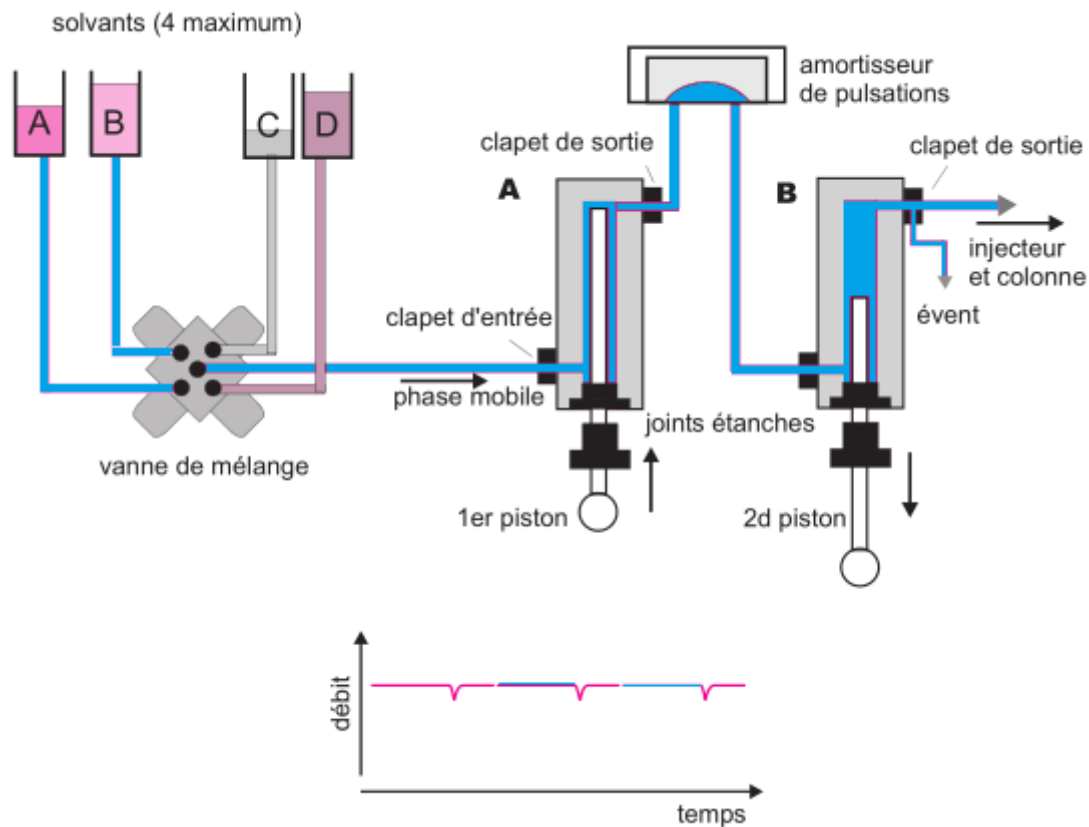


Figure 3. Principe de fonctionnement d'une pompe à deux têtes en série.

De manière simplifiée et en ignorant les corrections de compressibilité des solvants, on peut décrire ainsi le cycle de fonctionnement. Partant de l'instant où le clapet de sortie du cylindre A vient de se fermer et le clapet d'entrée vient de s'ouvrir, le piston de A recule pour remplir la chambre A. Pendant ce temps le cylindre B est ouvert et le piston de B avance pour chasser la phase mobile vers la colonne. Le volume déplacé par le piston de B est deux fois plus petit que le volume aspiré par le piston de A. Arrivé au fond de sa course, le clapet d'entrée de A se ferme et le clapet de sortie s'ouvre.

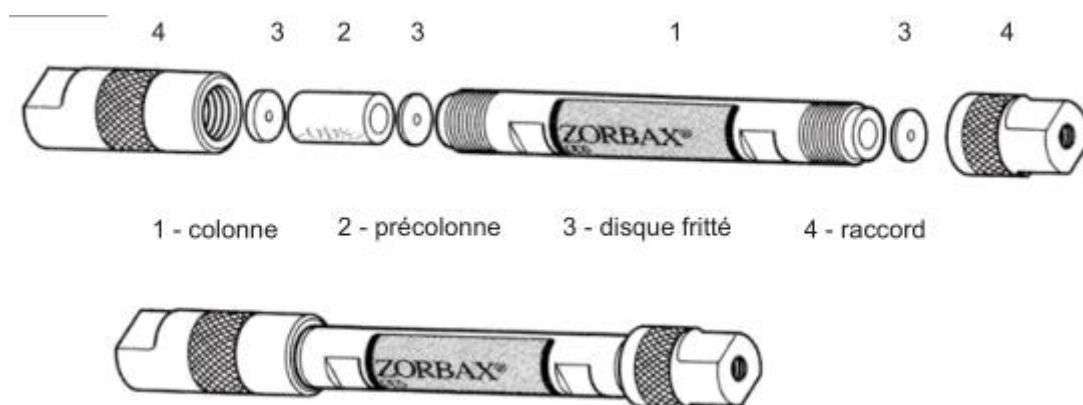
Le piston de A avance et chasse le contenu du cylindre A. Ce volume pour moitié est expulsé vers la colonne, l'autre moitié servant à remplir le cylindre B dans sa phase de recul. Entre les deux cylindres est placé un amortisseur de pulsations. (En bas), Variations de débit d'une pompe en fonction des cycles.

## 4.2. Injecteur

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. On utilise pour ce faire, une vanne haute pression à plusieurs voies, manuelle ou motorisée dans le cas des injecteurs automatiques, placée juste avant la colonne (fig. 3).

## 4.3. Colonnes

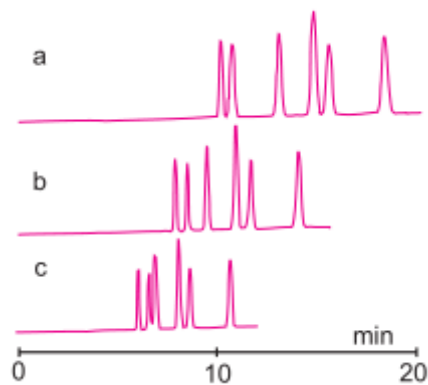
La colonne se présente comme un tube, le plus souvent en acier, dont la longueur et le diamètre présentent des différences selon les modèles. Les colonnes « standard » dont le diamètre interne (DI) est d'environ 4,5 mm et la longueur de 10 cm, sont de plus en plus supplantées par des colonnes de plus faibles diamètres. 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. 4).



**Figure 4.** Colonne standard et précolonne de CLHP.

## 4.4. Effet de Modification de la température

Les écarts de température modifiant les temps de rétention, les appareils actuels permettent de thermostatier 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. 4).



**Figure 5. 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**

## 4.5. Phases stationnaires

La recherche d'une bonne résolution chromatographique et par voie de conséquence d'une efficacité élevée, a conduit à la création de phases stationnaires de nature et de structures variées. Pour raccourcir les temps d'analyse, il faut tenter d'accélérer dans la colonne les transferts entre les phases mobile et fixe.

### 4.5.1. Le gel de silice

Parmi tous les matériaux qui ont été ou sont actuellement utilisés pour la confection des phases stationnaires, le gel de silice tient une place prépondérante. Ce matériau de base est un solide amorphe ayant pour formule de composition  $\text{SiO}_2 (\text{H}_2\text{O})_n$  (avec  $n$  très proche de 0). Il est tout à fait différent de la silice naturelle cristalline ( $\text{SiO}_2$ ) qui n'est qu'un précurseur très éloigné de sa préparation. C'est un polymère inorganique réticulé. Il comporte des groupements silanols,  $\text{Si-OH}$  en nombre variable, qui ont résisté à la phase finale de déshydratation thermique.

Ces groupements sont responsables des propriétés catalytiques acides de ce matériau très polaire car  $\text{Si-OH}$  a un  $\text{pK}$  de 10, comparable à celui du phénol. Leur concentration peut être établie par RMN du  $^{29}\text{Si}$  ou par analyse centésimale du carbone pour les phases greffées. (Fig.6)

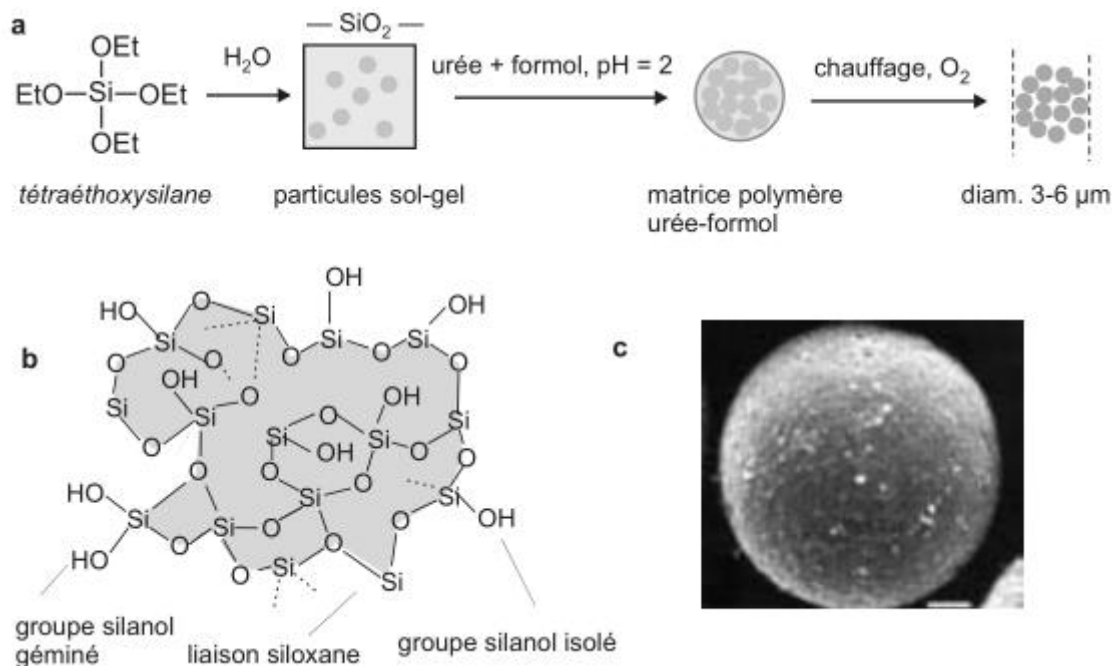


Figure 6. Le gel de silice pour chromatographie. a) préparation de grains sphériques de gel de silice via un sol-gel. La dispersion, appelée sol, constituée de particules sphériques de quelques nm de diamètre, s'agglutène en présence d'un liant organique urée/formol jusqu'à atteindre la taille voulue (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.

#### 4.5.2. Porosité

Le gel de silice comporte des pores de tailles différentes. Pour remplir la colonne d'une manière homogène, il est préparé sous forme, soit de microparticules sphériques, soit d'un monolithe poreux (fig.6 et 7). Il est nécessaire en effet d'éviter la formation de chemins préférentiels pour la phase mobile et par suite pour les composés qui y sont dissous.

- Les micro-sphères ont un diamètre constant dans une même colonne mais il en existe plusieurs types allant de 1 à 12 mm.
- Les monolithes, apparus plus récemment, sont ainsi nommés parce qu'il s'agit d'un gel de silice formé d'une seule pièce dans la colonne même. La reproductibilité des caractéristiques de ce second type de colonne est plus difficile à maîtriser.

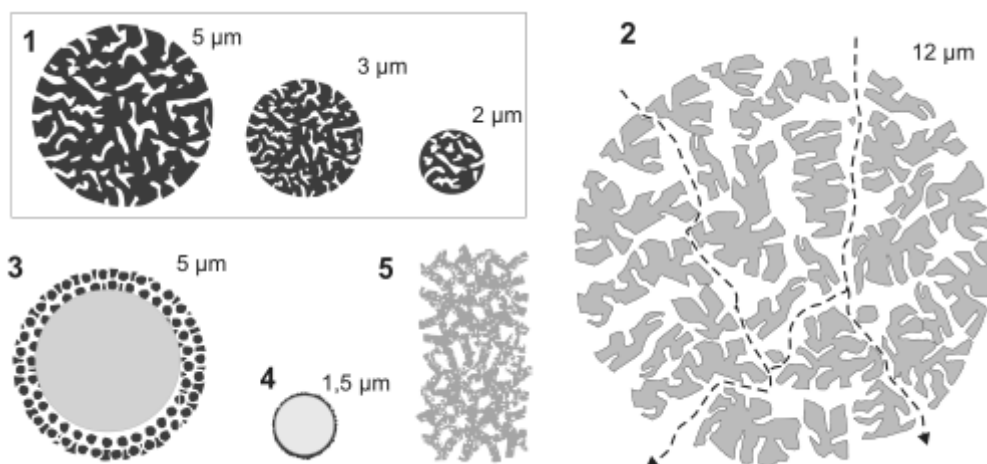


Figure 7. Représentations imagées de quelques types de gels de silice (porosité et dimensions). 1- structure comportant des pores de diffusion répartis dans la totalité de la particule. 2- structure comportant des fissures de perfusion pour accélérer le processus de transfert. 3 et 4- Particules poreuse en surface avec un noyau non poreux. 5- détail de structure d'un remplissage du type monolithique.

#### 4.6. Détecteur

Il existe plusieurs types de détecteurs :

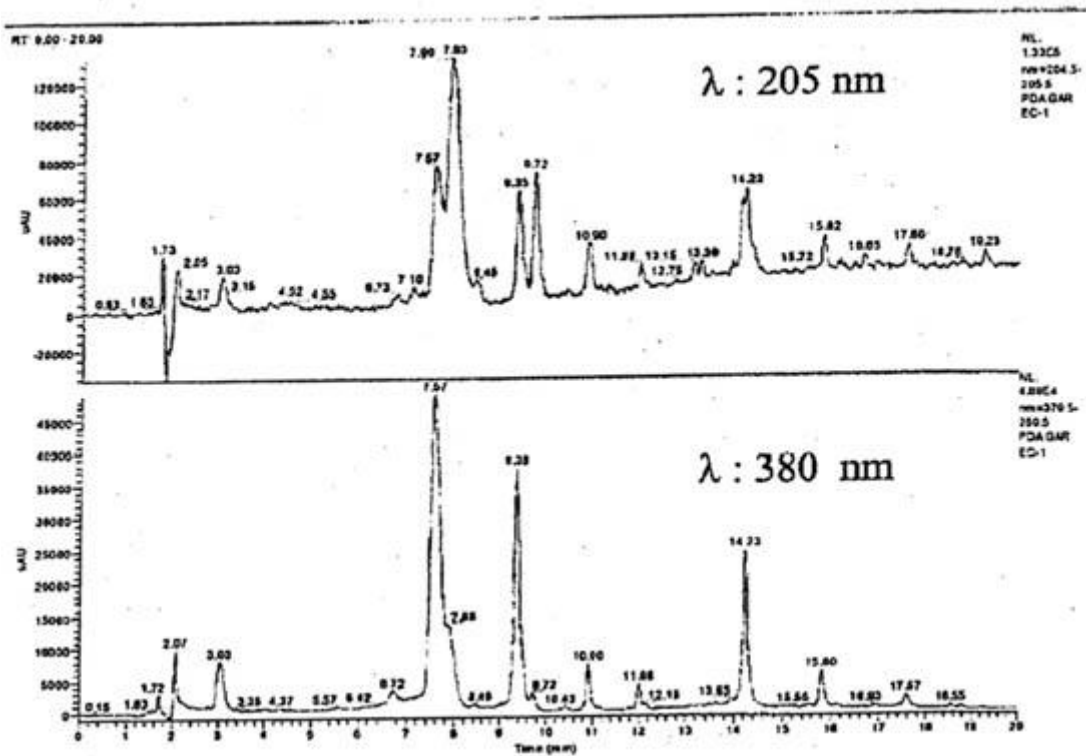
- détecteurs spectroscopiques :
  - par spectroscopie d'absorption : ultraviolet-visible ou infrarouge,
  - par spectroscopie de fluorescence ;
- réfractométrie ;
- détecteurs électrochimiques (DEC) :
  - ampérométriques,
  - coulométriques,
  - polarographiques,
  - potentiométriques ;
- conductimétrie ;
- UV à barrette de diodes (DAD) ;
- évaporatif à diffusion de la lumière (DEDL) ;
- détection spectrale avec couplage :
  - à la spectrométrie de masse (MS), exemples : chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse et chromatographie en phase liquide-spectrométrie de masse ;
  - à la spectroscopie atomique.





## Activité :

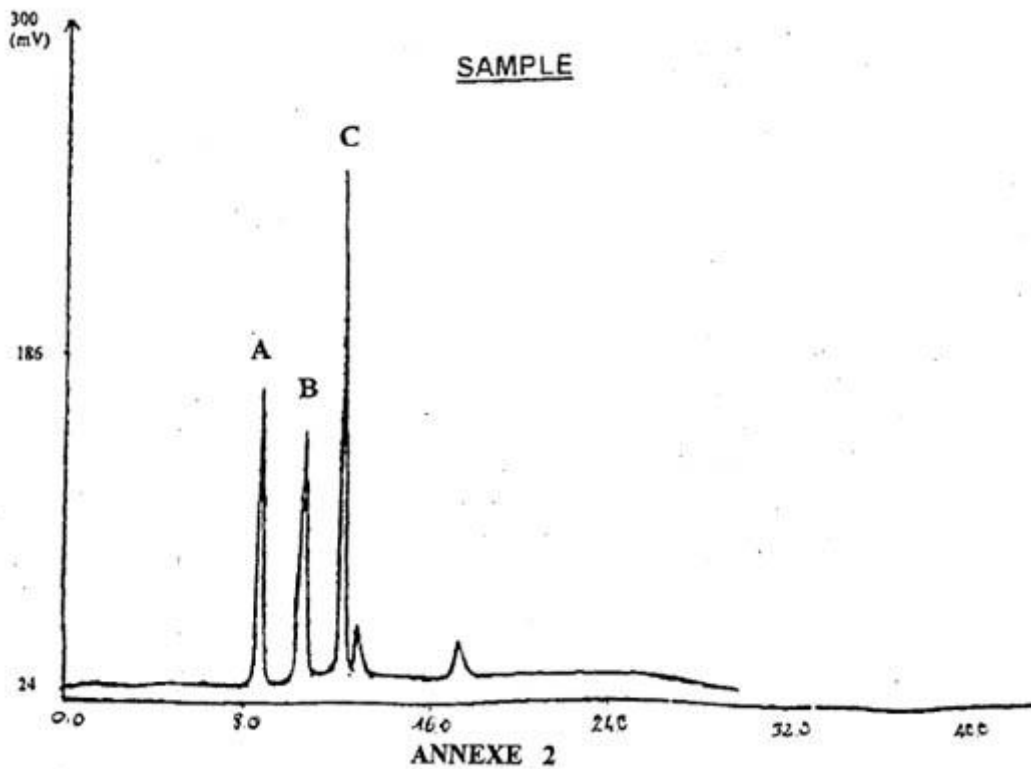
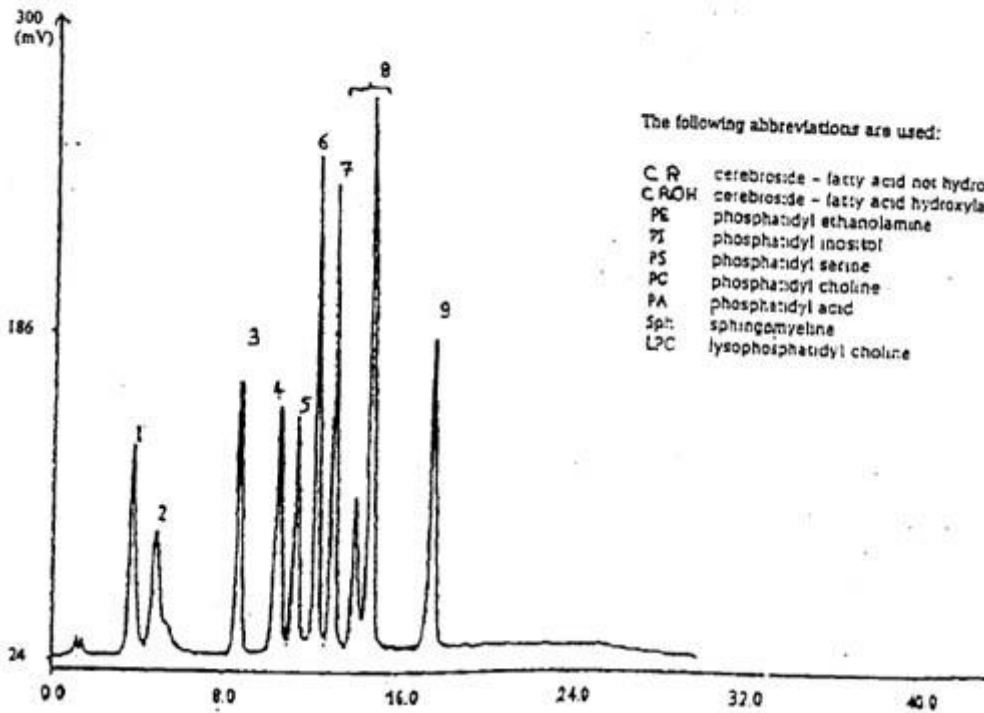
1) L'analyse d'un mélange de produits naturels a été réalisée par HPLC avec un détecteur UV. Les chromatogrammes enregistrés à 205 nm et 380 nm sont fournis ci-dessous.



Expliquer la différence de profil des 2 chromatogrammes (disparition de pic, différence d'intensité...)

2) Des phospholipides ont été extraits d'un milieu biologique. Ils ont été analysés et ont produit le chromatogramme

**Separation of a standard mixture of nine (phospho) lipids. 1, CR; 2, CROH; 3, PE; 4, PI; 5, PS; 6, PC; 7, PA; 8, Sph double peak; 9, LPC. Conditions in text.**



En vous servant des informations fournies dans le tableau ci dessous :

	AIREs (unités arbitraires)				
	Injection 1	Injection 2	Injection 3	Injection 4	Injection 5
PIC A	2,09.10 <sup>6</sup>	2,12.10 <sup>6</sup>	2,00.10 <sup>6</sup>	1,88.10 <sup>6</sup>	1,91.10 <sup>6</sup>
PIC B	0,47.10 <sup>6</sup>	0,50.10 <sup>6</sup>	0,53.10 <sup>6</sup>	0,49.10 <sup>6</sup>	0,51.10 <sup>6</sup>
PIC C	1,94.10 <sup>6</sup>	1,87.10 <sup>6</sup>	2,00.10 <sup>6</sup>	2,13.10 <sup>6</sup>	2,06.10 <sup>6</sup>

- a) Quelles précautions devez-vous prendre pour vous préserver du risque chimique lors de la manipulation des produits cités?
- b) Analyser le chromatogramme de l'échantillon obtenu en annexe 2. Vous pouvez utiliser le chromatogramme des témoins de cette même annexe.
- c) 5 répétitions ont été réalisées (tableau 1). Les résultats obtenus, pour chaque composé A,B,C analysé vous paraissent-ils fiables? Justifier votre opinion.
- d) En examinant les conditions opératoires, relatives à la phase mobile, comment évolue la polarité de celle-ci? Justifier votre réponse.