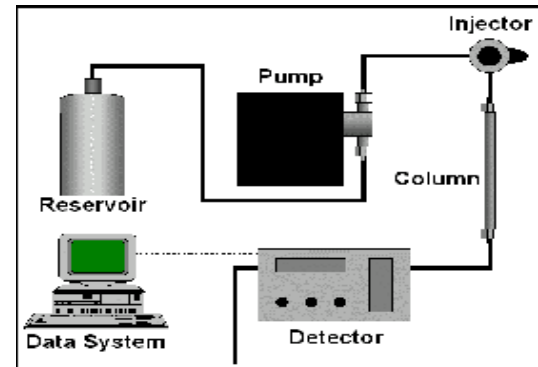


cours du 1 Décembre 2011
SVI S5 - STE S3
Professeur SAALAOUI Ennouamane

**Chromatographie liquide à haute
pression (HPLC)**

Chromatographie Liquide Haute Performance





HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

- *La gravité et la pression atmosphérique → hautes pressions (100 -450 bars)**
- *Analyses très fines en des temps remarquablement courts.**

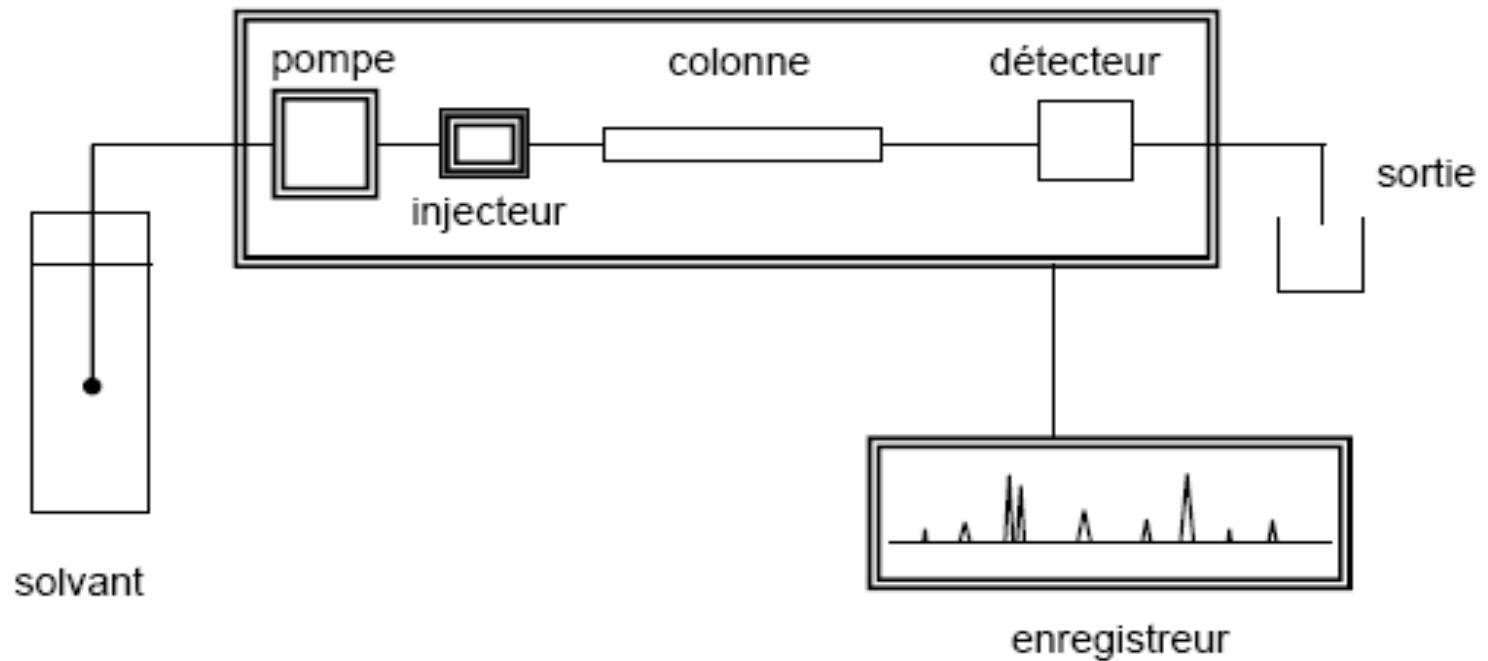
Chromatographie liquide à haute pression (HPLC)



- ❖ Mise au point vers 1967 par **Huker et Hulsman**
- ❖ Peut séparer pratiquement tous les mélanges
- ❖ Seuil de détection par rapport à celui de la CPG

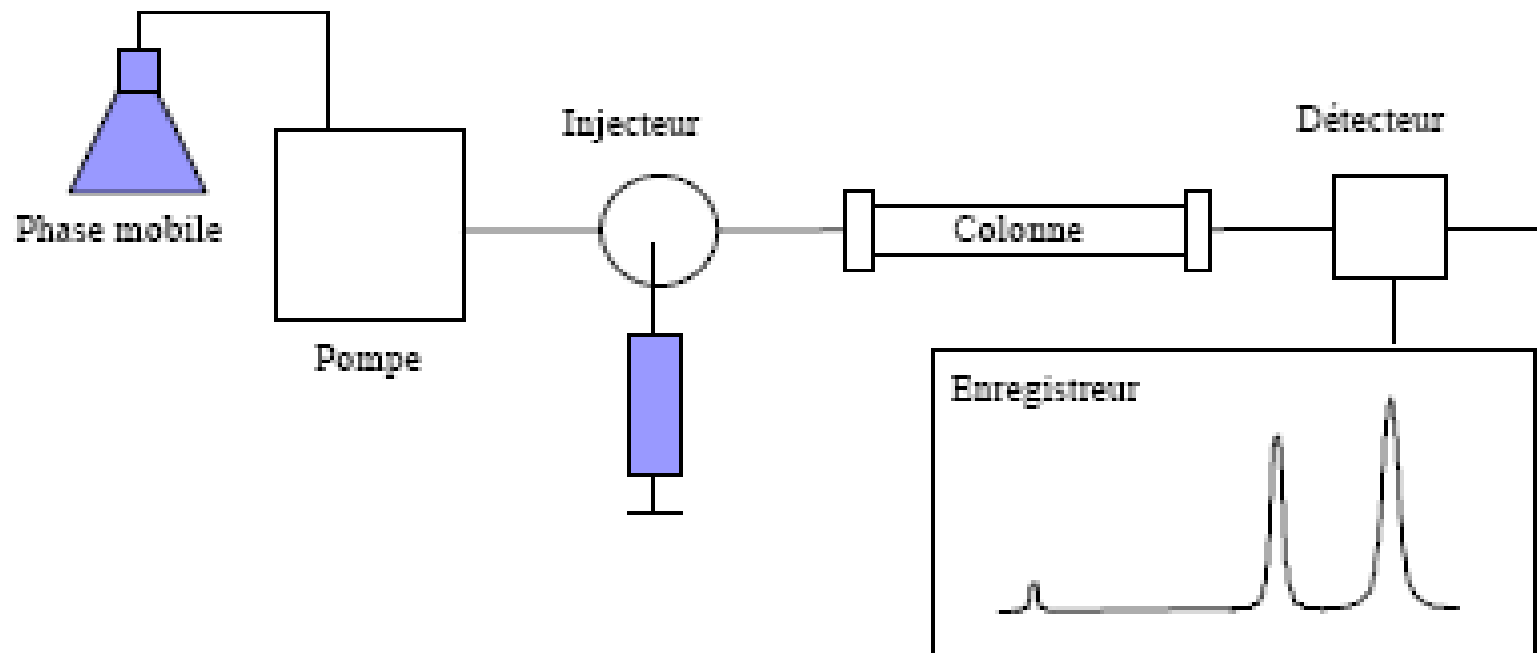
Appareillage et matériaux

- Appareil commercial



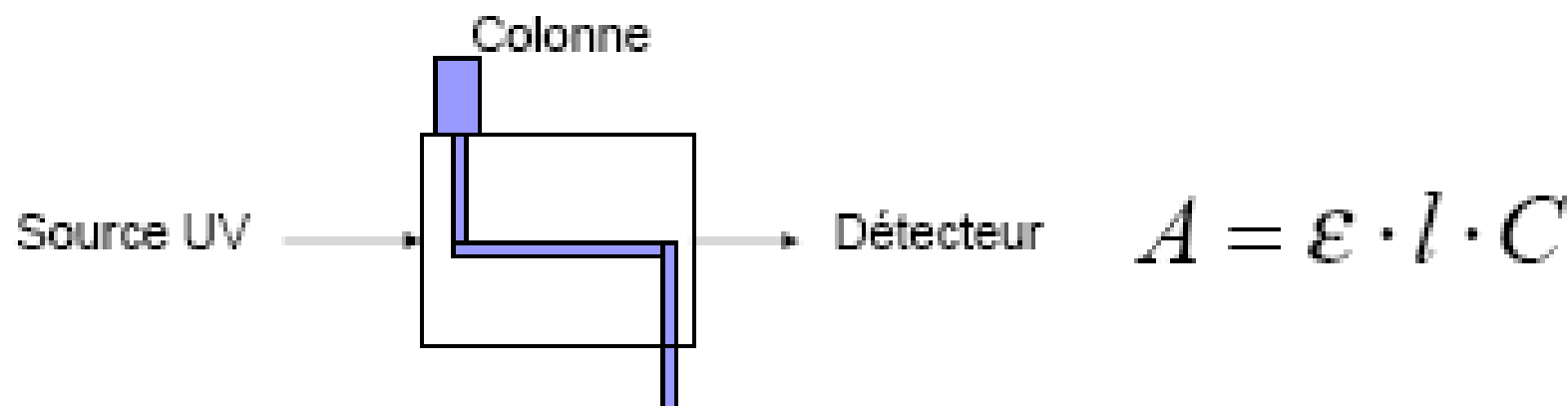
Chromatographe HPLC

Appareillage



Détecteurs

- Détecteur universel : réfractomètre
 - peu sensible : 100 ng-1µg
- Détecteur le plus courant : spectromètre UV-Vis
 - Très sensible : 100 pg – 1ng
 - Limité au composé absorbant (double liaison...)

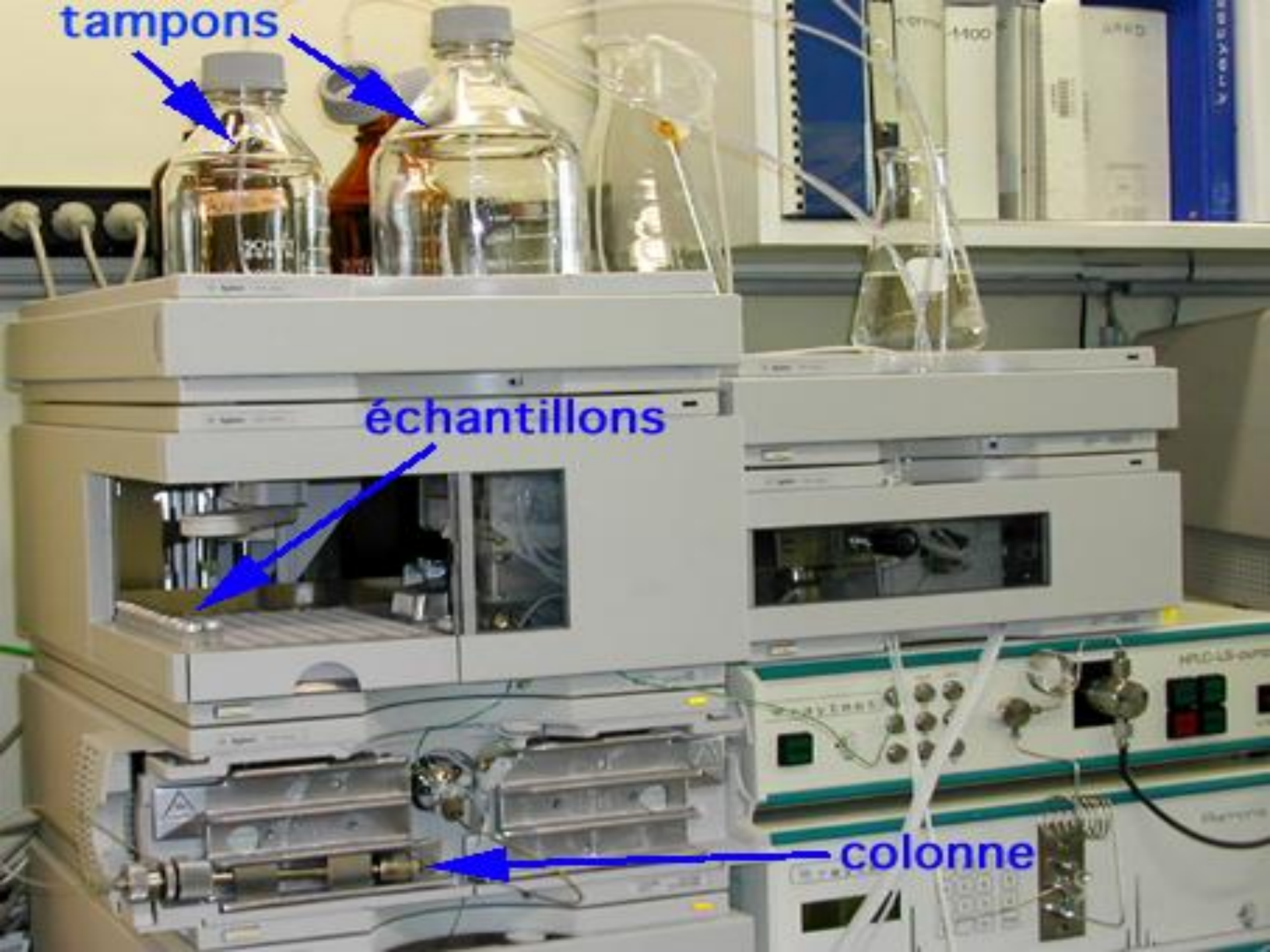




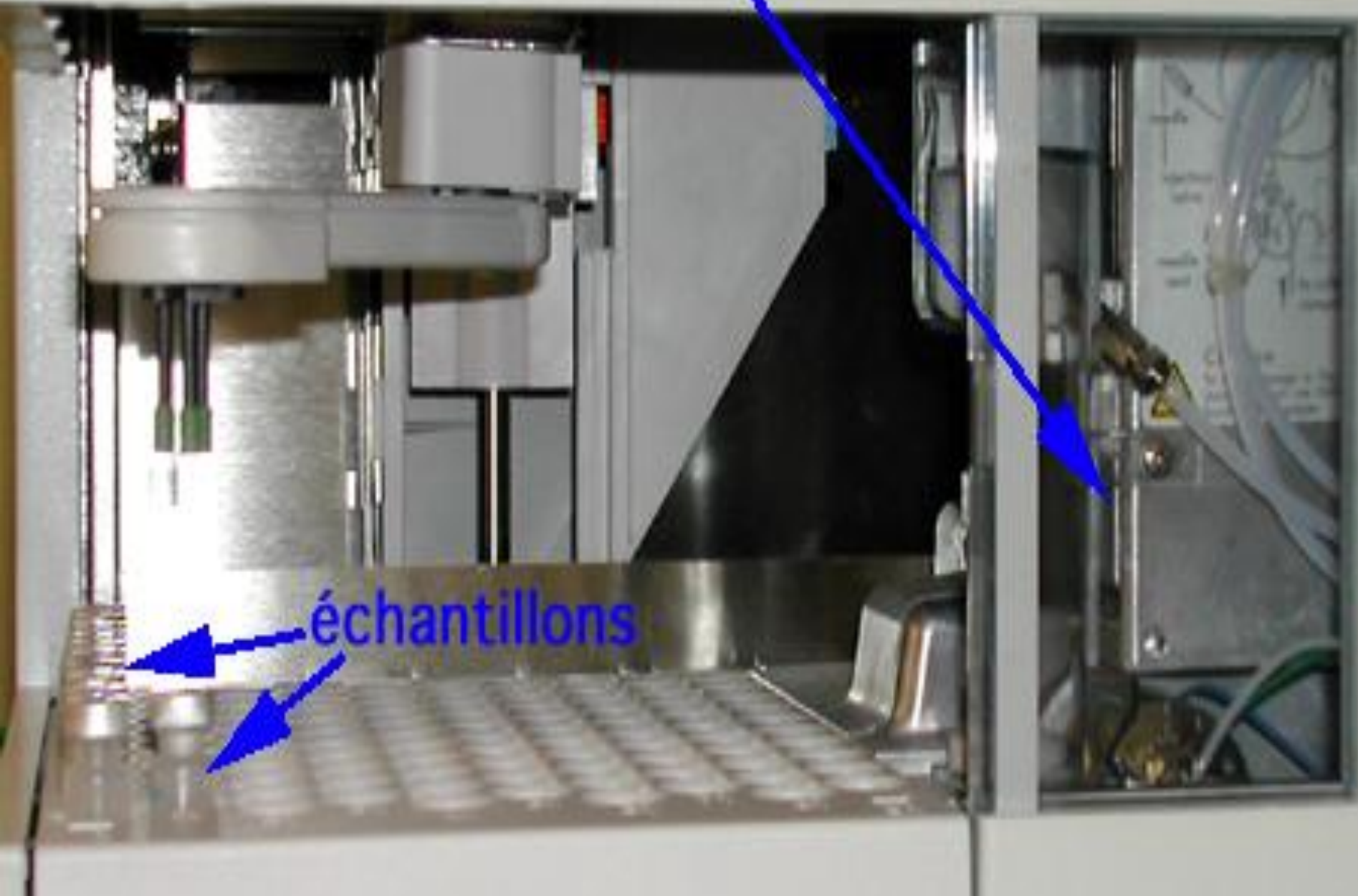
tampons

échantillons

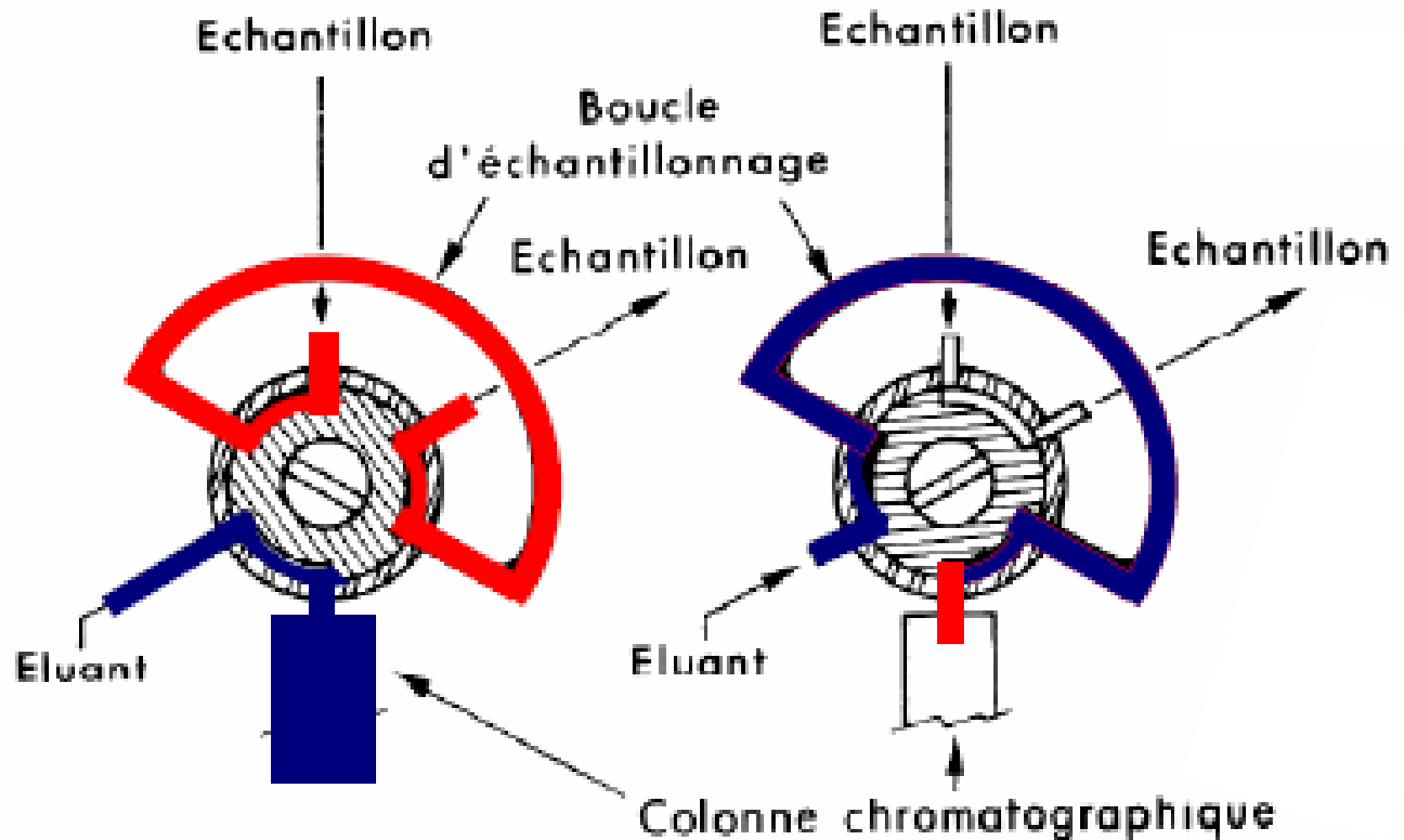
colonne

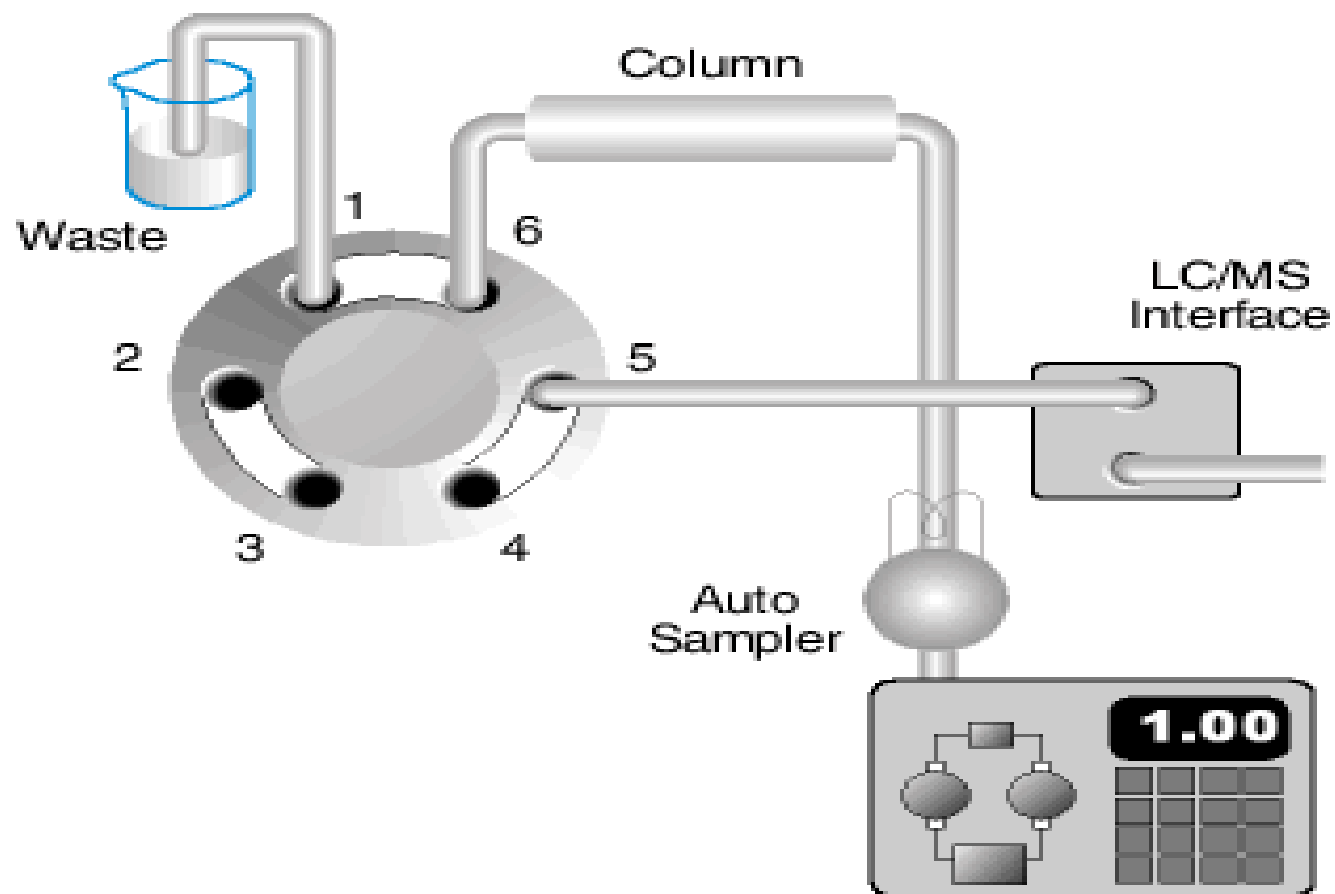


collecteur des échantillons



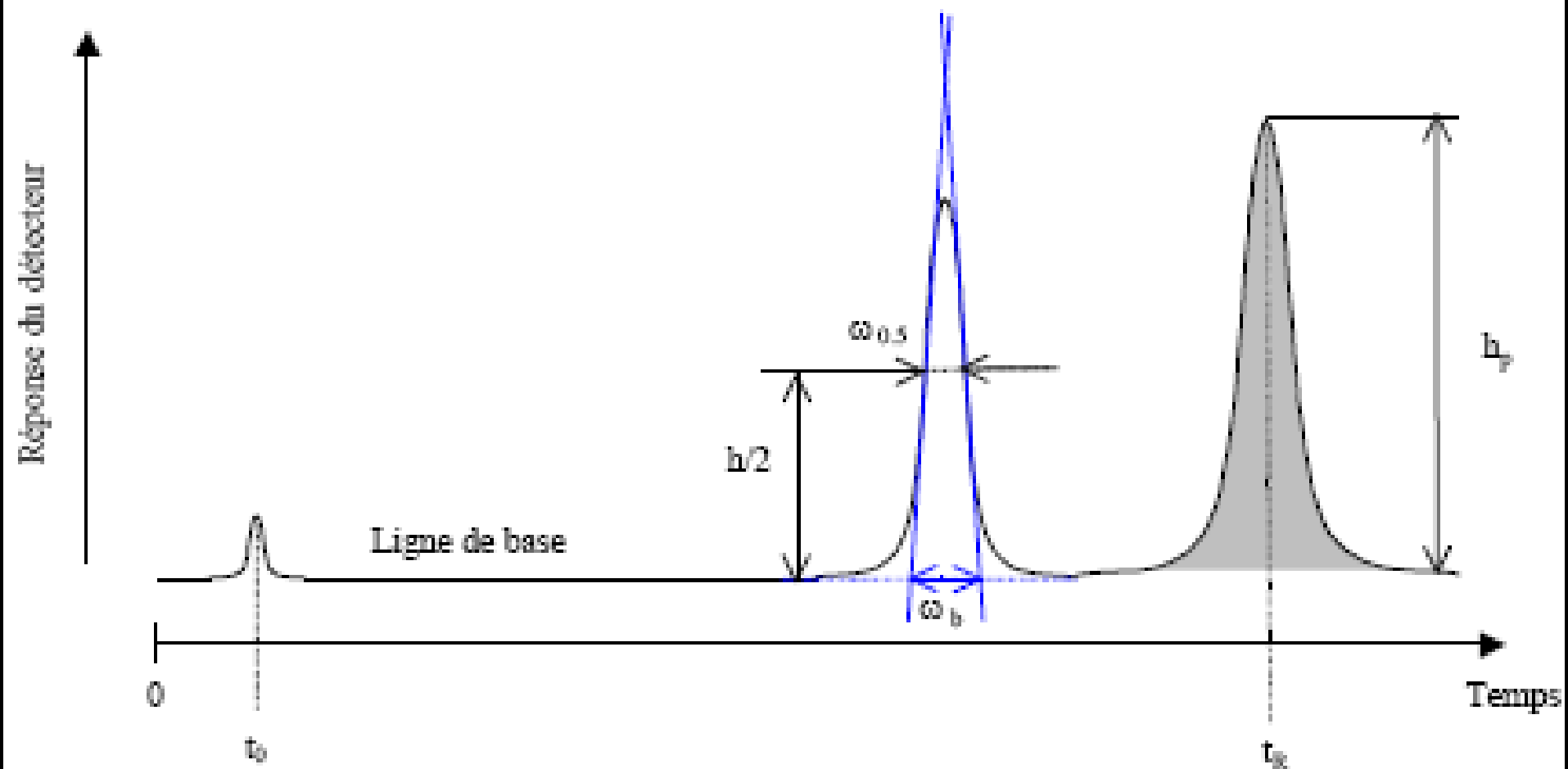
Injecteur

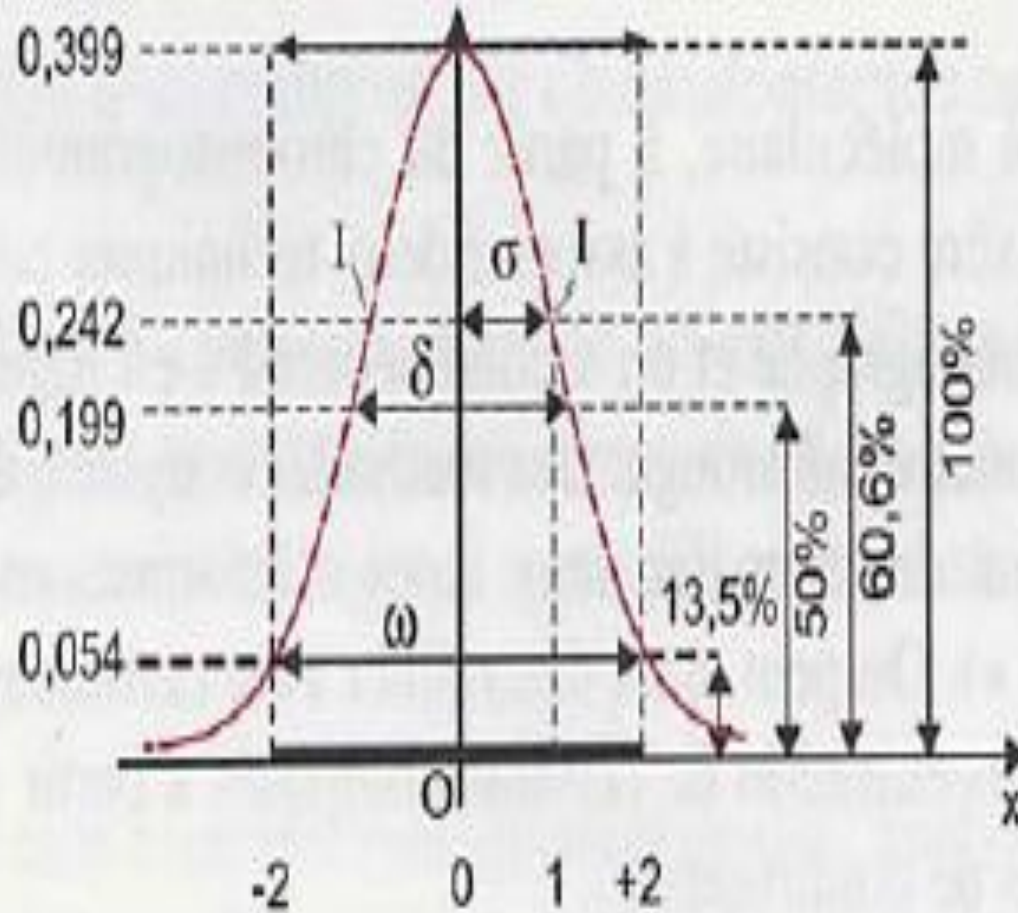




Switching to Interface

Chromatogramme





$$\delta = 2,35 \sigma$$

$$\omega = 4 \sigma$$

$$\omega = 1,7 \delta$$

l'aire comprise entre -2 et +2
vaut 95,4% de l'aire totale
comprise entre la courbe et
l'axe des x

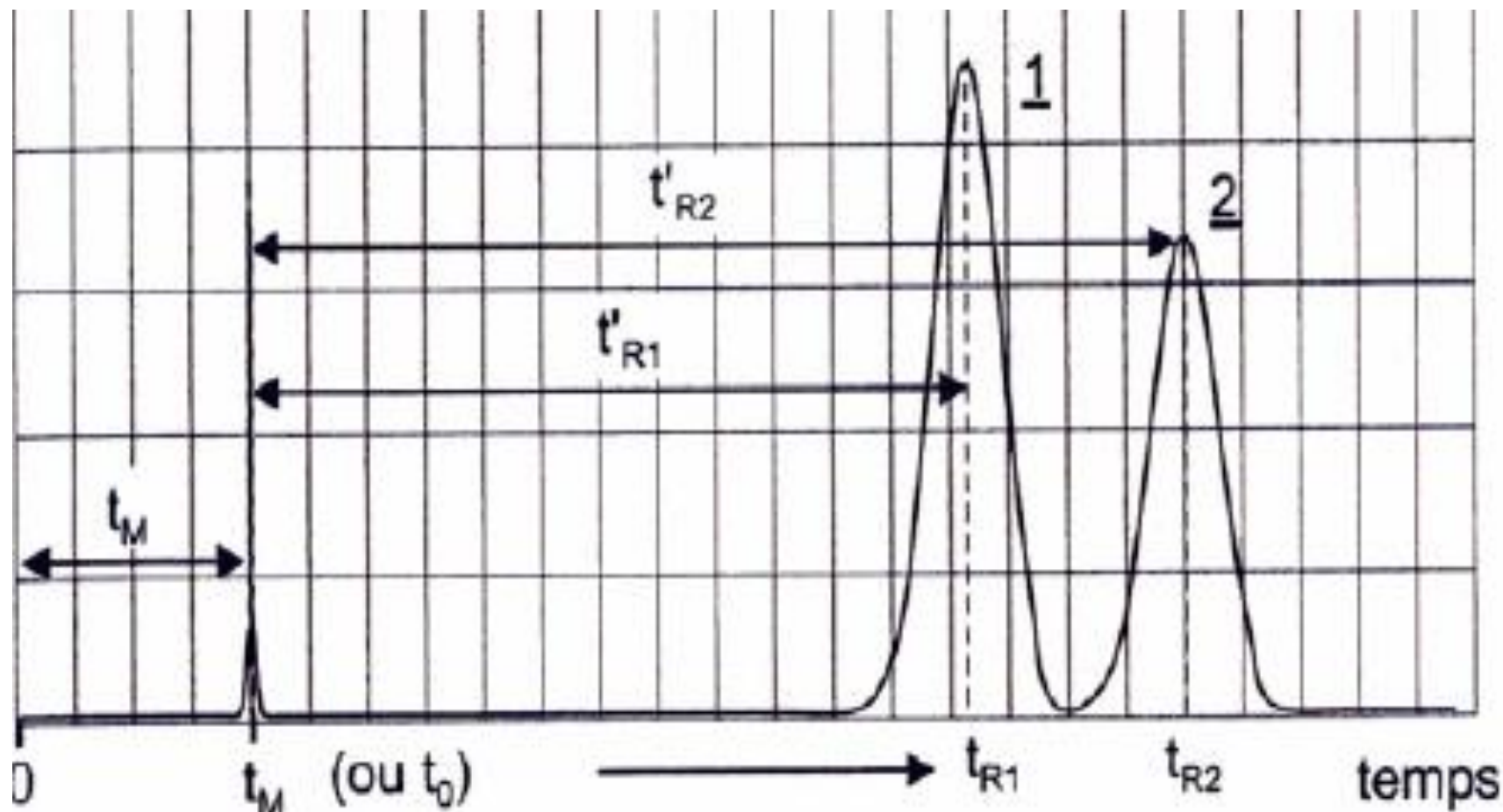
i = point d'inflexion du signal

σ = demi-largeur aux
points d'inflexion

δ = largeur à mi-hauteur

ω = largeur « à la base »

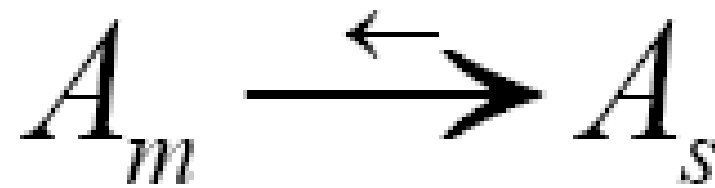
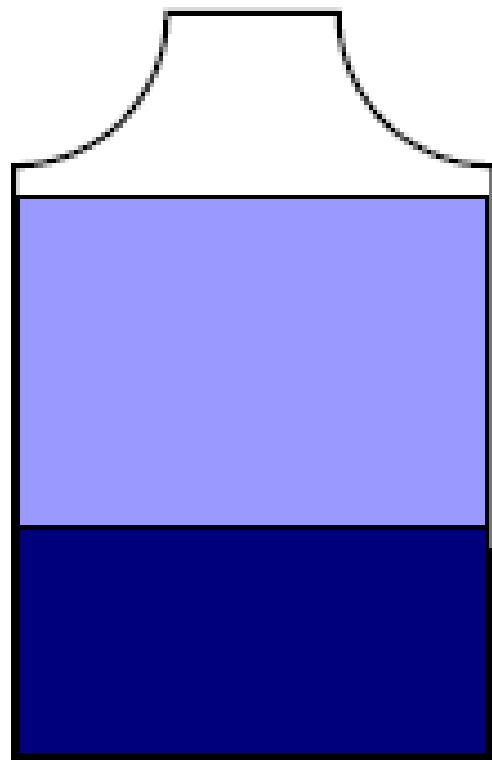
$$1 / \sqrt{2 \pi} = 0,399$$



Exemple d'un chromatogramme
avec les paramètres principaux
liés aux temps de rétention
(t_M , t_R et t'_R)

Déplacement des analytes

- *Coefficient de distribution*



$$K = \frac{c_s}{c_m}$$

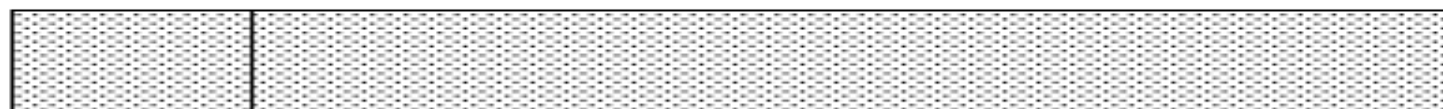
Déplacement des analytes

■ *Facteur de capacité*

$$\frac{\bar{t}_s}{\bar{t}_m} = \frac{Q_s}{Q_m}$$

$$k = \frac{Q_s}{Q_m} = \frac{c_s \cdot V_s}{c_m \cdot V_m} = K \cdot \frac{V_s}{V_m}$$

■ *Temps mort : t_0*



■ *Temps de rétention*



$$k = \frac{\bar{t}_s}{\bar{t}_m} = \frac{t_R - \bar{t}_m}{\bar{t}_m} = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

■ *Temps de rétention*



$$t_R = t_0(1 + k) = t_0 \left(1 + K \cdot \frac{V_s}{V_m} \right)$$

■ Efficacité chromatographique

- *L'efficacité (ou nombre de plateaux théoriques) est un nombre qui mesure la capacité d'un système chromatographique à conserver des pics étroits*

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{\omega_b} \right)^2 = 5,54 \cdot \left(\frac{t_R}{\omega_{0.5}} \right)^2$$

- Hauteur Equivalente à un Plateau Théorique (*HEPT*)

$$H = \frac{L}{N}$$

Grandeurs de séparation

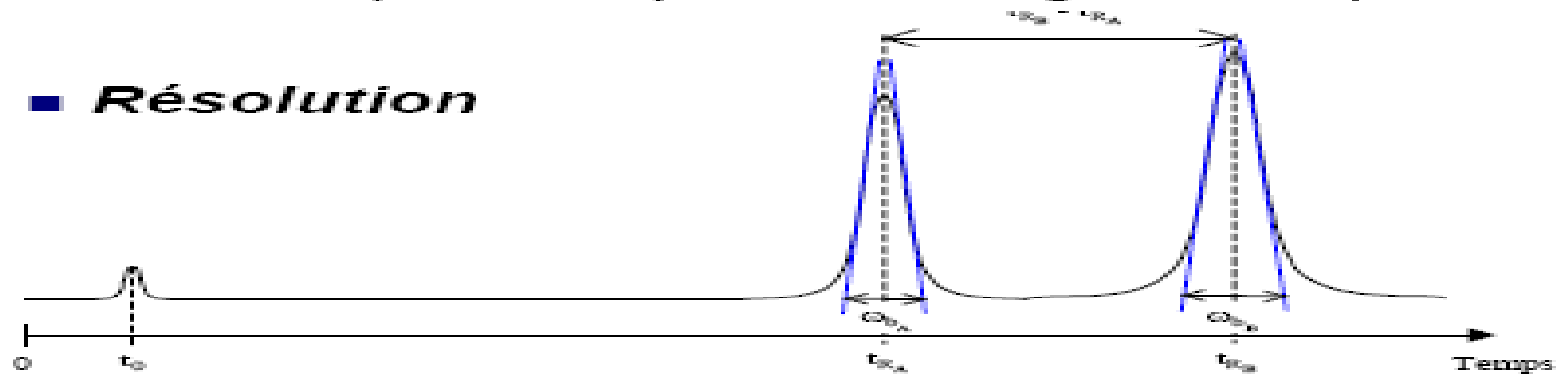
■ Sélectivité

$$\alpha = \frac{K_B}{K_A} = \frac{k_B}{k_A} = \frac{t_{R(B)} - t_o}{t_{R(A)} - t_o}$$

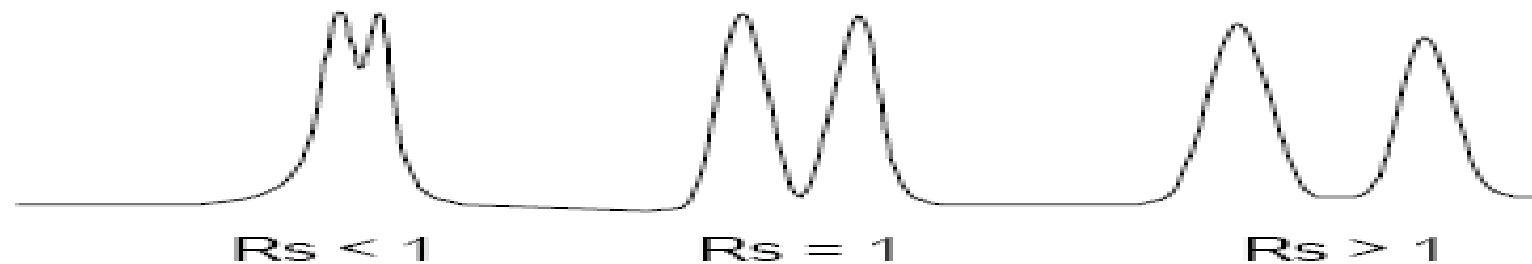
+ : facile à calculer

- : ne tient pas compte de la largeur des pics

■ Résolution



$$Rs = 2 \frac{(t_{R(B)} - t_{R(A)})}{\omega_{b,B} + \omega_{b,A}}$$



- **Efficacité N d'une colonne**

$$N = \frac{(t_R)^2}{(\sigma)^2} = 5.54 \frac{(t_R)^2}{(\delta)^2} = 16 \frac{(t_R)^2}{(\omega)^2}$$

-

t_R = temps de rétention du soluté

σ = Demi-largeur aux points d'inflexion

δ = largeur du pic à mi-hauteur

ω = largeur du pic à la base

t_R , σ , δ et ω sont mesurés dans la même unité
(temps, distance, volumes écoulés à débit constant)

- $V_M = t_M \times D$ si le débit D de la phase mobile est constant
- $V_R = t_R \times D$
- **Facteur de rétention k (facteur de capacité)**

$$k = \frac{t'_R}{t_M} = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{V_R - V_M}{V_M} = \frac{V'_R}{V_M}$$

- **Facteur de sélectivité (ou séparation) α entre deux solutés**

$$\alpha = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} = \frac{t_{R2} - t_M}{t_{R1} - t_M} = \frac{k_2}{k_1} = \frac{V'_{R2}}{V'_{R1}}$$

- **Facteur de résolution R entre deux solutés**

$$R = 2 \frac{t_{R2} - t_{R1}}{\omega_1 + \omega_2} = 2 \frac{t'_{R2} - t'_{R1}}{\omega_1 + \omega_2}$$

$$Rs = \frac{1}{4} \cdot \sqrt{N_B} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha} \cdot \frac{k_B}{1 + k_B}$$

Elargissement extra-colonne

- Cet élargissement a trois sources principales :
 - ✦ l'injection
 - ✦ le détecteur
 - ✦ les volumes morts du chromatographe
- Négligeable si possible

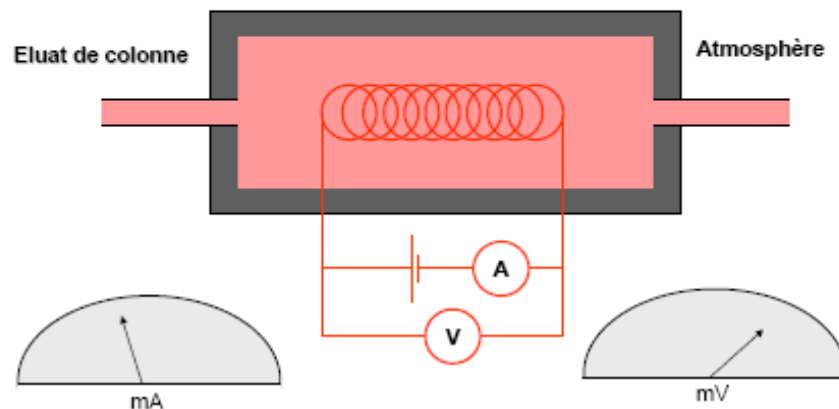
Détecteur



- ✦ Grande sensibilité
 - ✦ Bonne stabilité et reproductibilité
 - ✦ Réponse linéaire étendue
 - ✦ Large domaine de fonctionnement (T, P...)
 - ✦ Fiable et facile d'emploi
 - ✦ Très sélectif ou universel
 - ✦ Préserver l'échantillon
-

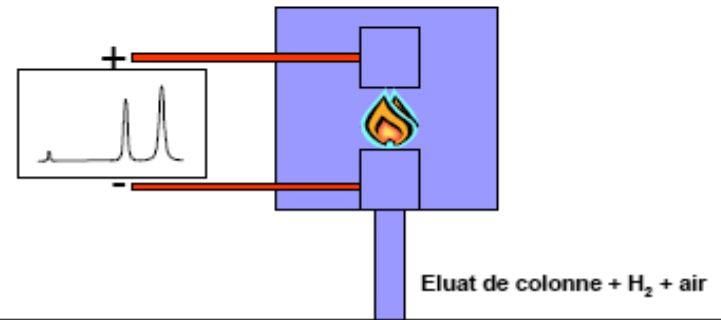
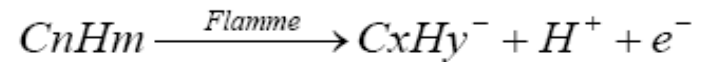
Conductivité thermique

■ Catharomètre



FID

■ Détecteur à ionisation de flamme



NPD

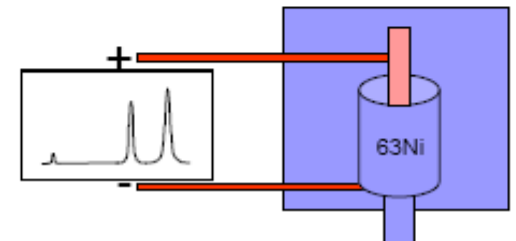
■ Détecteur à thermo-ionisation

- ✦ Principe identique au FID, mais présence d'une pastille en céramique de rubidium
- ✦ Sensibilité : P x 500 et N x 50
- ✦ Très utilisé pour la détection des médicaments azotés (barbituriques...), des pesticides...

ECD

■ Détecteur à capture d'électron

- ✦ Le gaz vecteur est ionisé par une forte ddp : H_2^+
- ✦ Un courant est enregistré
- ✦ Une source radioactive β^- (^{63}Ni) irradie les composés : $M + e^- \rightarrow M^-$
- ✦ $M^- + H_2^+ \rightarrow MH_2$
- ✦ Baisse du courant



Phases stationnaires

- Solide pulvérulent : silice, alumine...

Chromatographie d'adsorption

Phase mobile : solvants organiques

Application : séparation de composés peu polaires

Peu utilisée

Les phases stationnaires sont presque les mêmes que celles qu'on a vues dans les cours précédents où il avait l'échange ionique, l'exclusion, partage, adsorption... etc



Phase mobile:

- solvant ou un mélange de solvants qui doit être de pureté analytique
- filtré avec un filtre, en acier inoxydable d'une porosité de 2 μ m

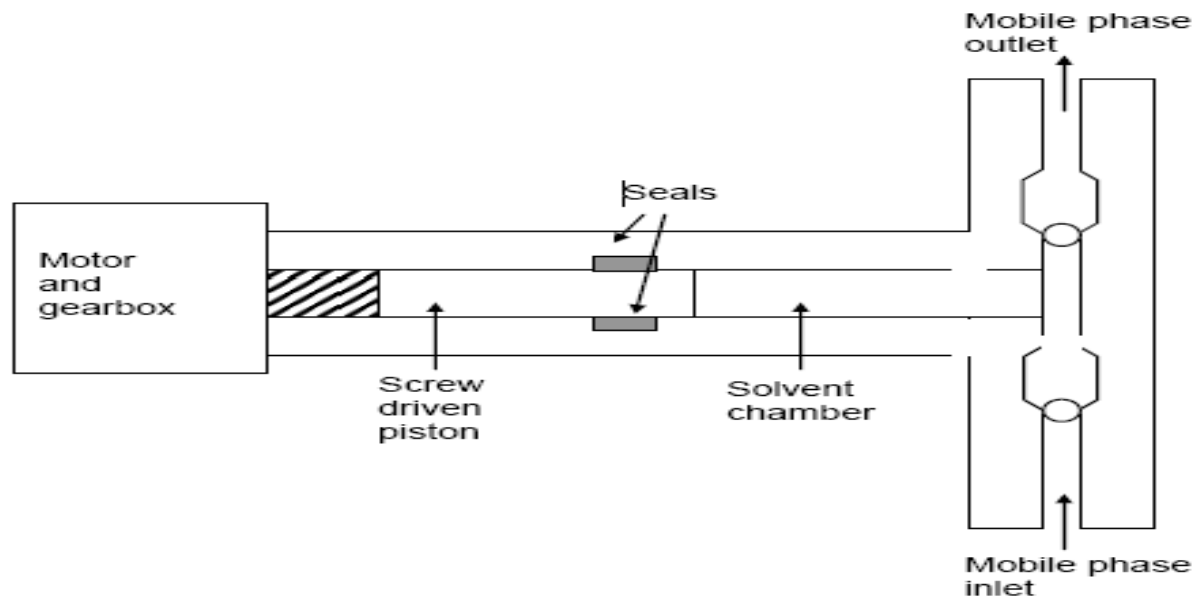
Principaux solvants:

phénomène	solvants
Adsorption	Hexane, méthanol, acétonitrile, dichlorométhane, chloroforme
Partition	Méthanol-eau, acétonitrile-eau
Échange d'ions	Solution tampon (pH contrôlé)
Exclusion	Tétrahydrofurane, toluène

Pompe:

- pression élevée
- débit constant
- inerte

Les pompes utilisées en HPLC sont des pompes à **piston**



Injecteur:

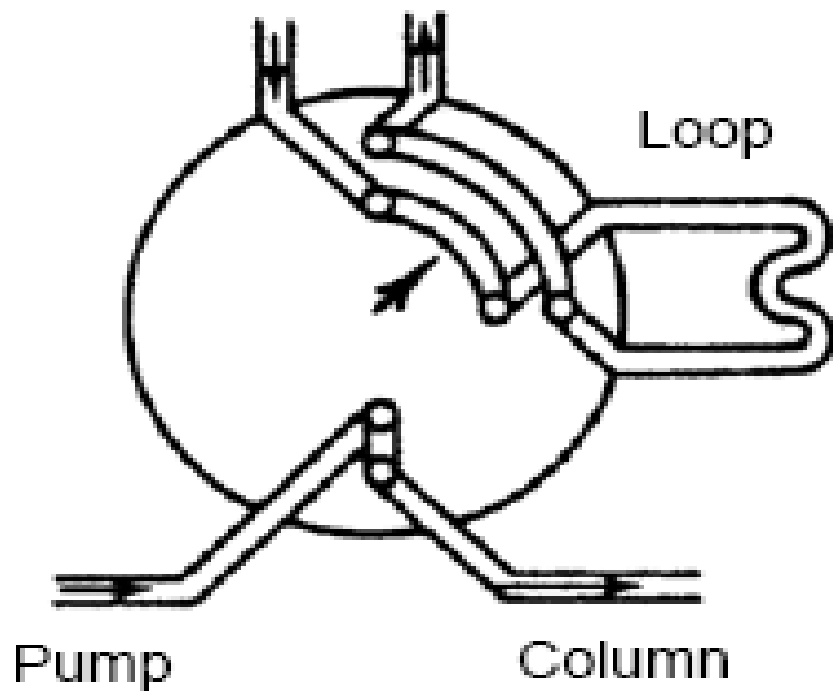


*la pression est très élevée

*Introduire l'échantillon à l'aide d'une seringue dans un injecteur :

- On injecte toujours un volume supérieur à celui de la boucle sans bulles d'air. LOAD
- En tournant la valve en position INJECT (seul le contenu de la boucle est dirigé en tête de colonne). résultats très reproductibles, d'une injection à l'autre.

LOAD
Sample



INJECT
Sample

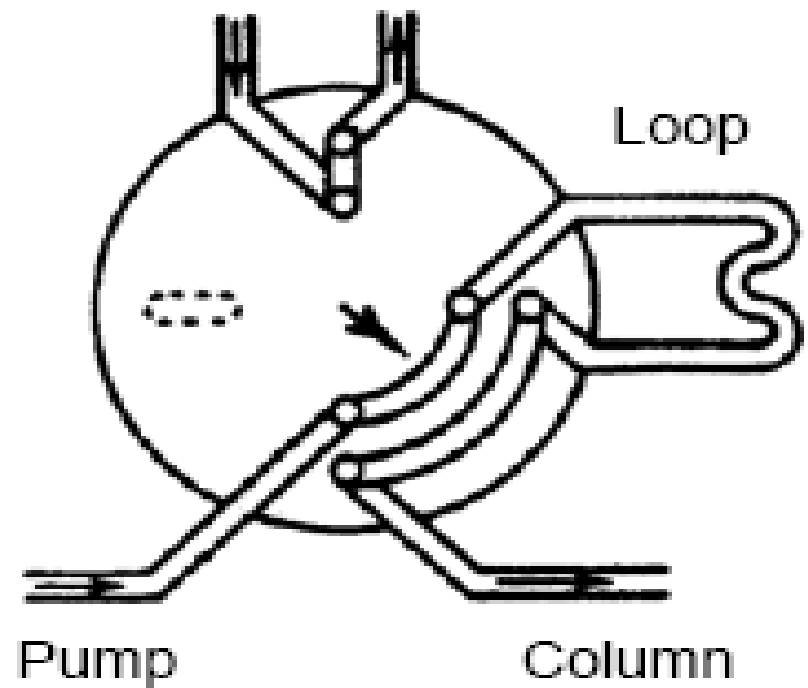
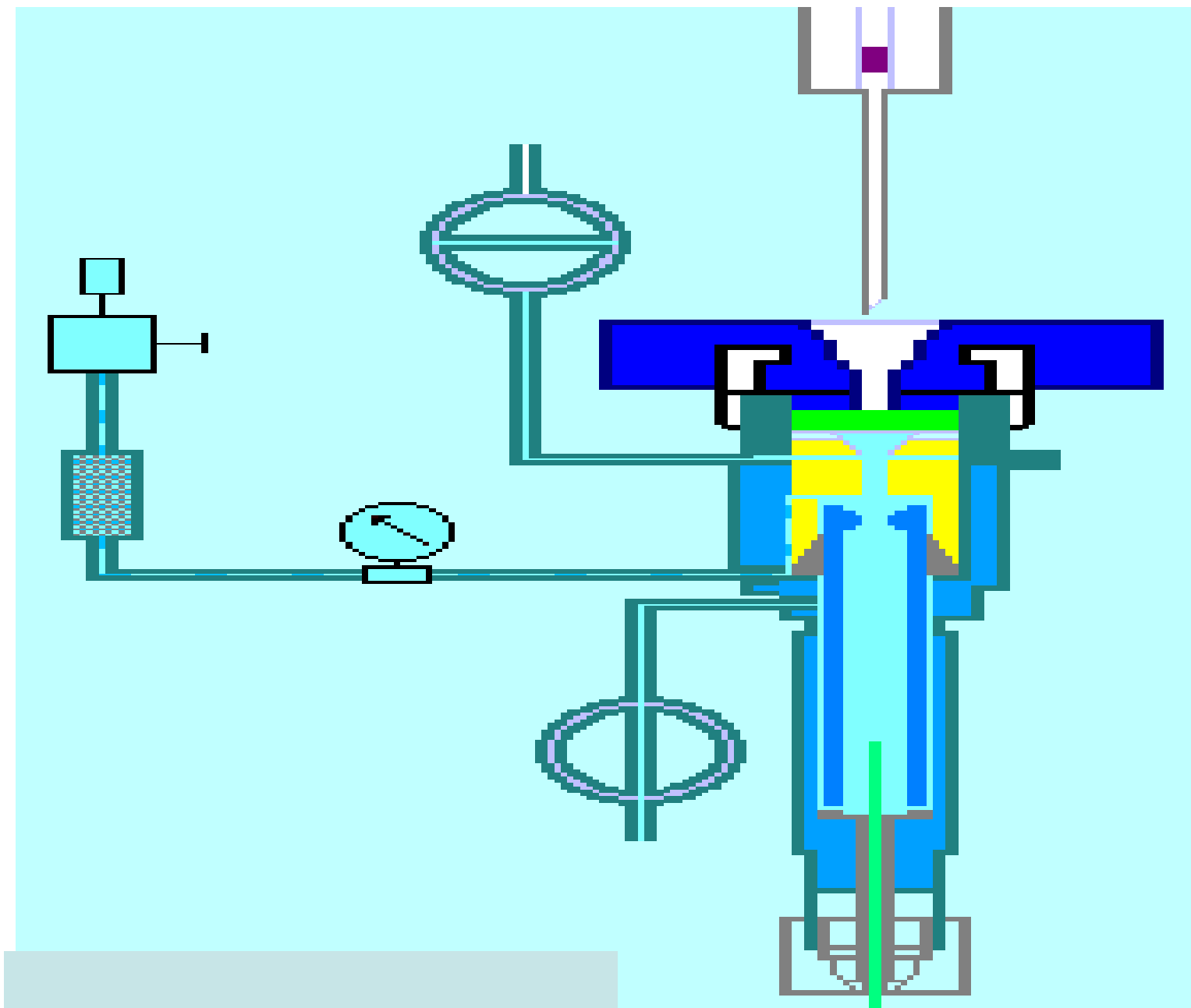


Schéma d'un injecteur à boucle externe



Colonnes:

- ❖-La plus importante du système.
- ❖-Les colonnes sont en acier inoxydable.
- ❖-longueur (5 à 25 cm).
- ❖-diamètre interne (4 à 4,6 mm).

❖Colonnes remplies:

le diamètre des particules (3 à 10 μm).

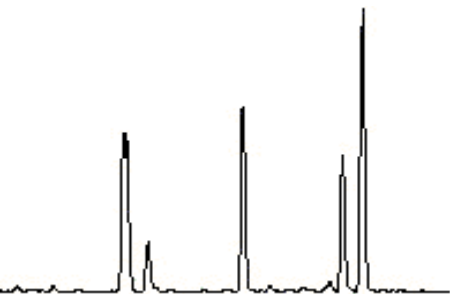
❖Une colonne de garde:

c'est une colonne qui doit être changée régulièrement.



Détecteurs

- Sortie de la colonne chromatographique
- Détecter les composés qui sortent de la colonne.
- Le signal est converti en impulsion électrique qui est transmise à l'enregistreur.**



les détecteurs utilisés en HPLC doivent posséder certaines qualités :

- une grande sensibilité.
- une réponse linéaire sur une gamme de concentration élevée.
- une capacité à détecter le plus de produits possible.

■ Détecteur électrochimique

✚ Conductimétrie

✚ Potentiométrie

✚ Ampérométrie

✚ Très sensible : 10 pg – 1 ng

✚ Limité aux composés ioniques

Les principaux détecteurs utilisés en HPLC sont :

a) Détecteur à absorbance dans l'U.V. et le visible

Son principal inconvénient est qu'il ne détecte que les composés qui ont une absorbance appréciable à la longueur utilisée.

b) Détecteur à indice de réfraction

C'est un détecteur universel

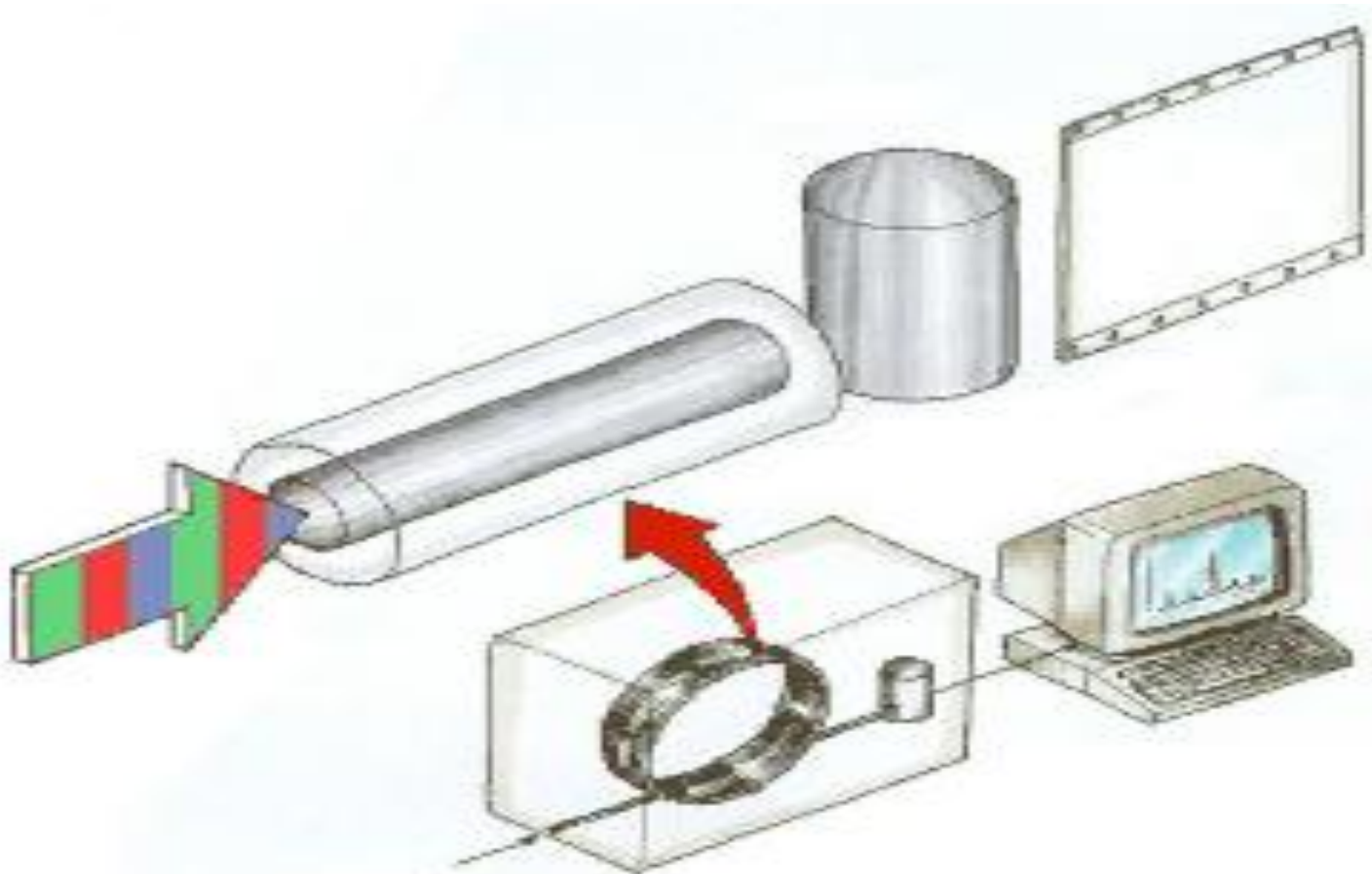
Son principal inconvénient est sa faible sensibilité.

c) le fluorimètre



Enregistreurs

Les enregistreurs sont les mêmes que ceux utilisés en chromatographie en phase gazeuse. Les logiciels d'application, comme le Millennium, sont également utilisés en HPLC.



Technique expérimentale:

a) Préparation des échantillons :

- purification préliminaire des produits pour éliminer du mélange les produits indésirables.
- Filtration des extraits sur une membrane jetable de type *Luer* avant d'être injectés.



b) Ajustement des paramètres:

débit d'éluant et pression
nature de l'éluant, etc....

c) Injection des échantillons inconnus et des standards.

d) Calculs pour l'analyse qualitative et quantitative.

e) Interprétation des résultats.

Résultats et interprétation:

Les résultats apparaissent sous forme de pics sur le chromatogramme

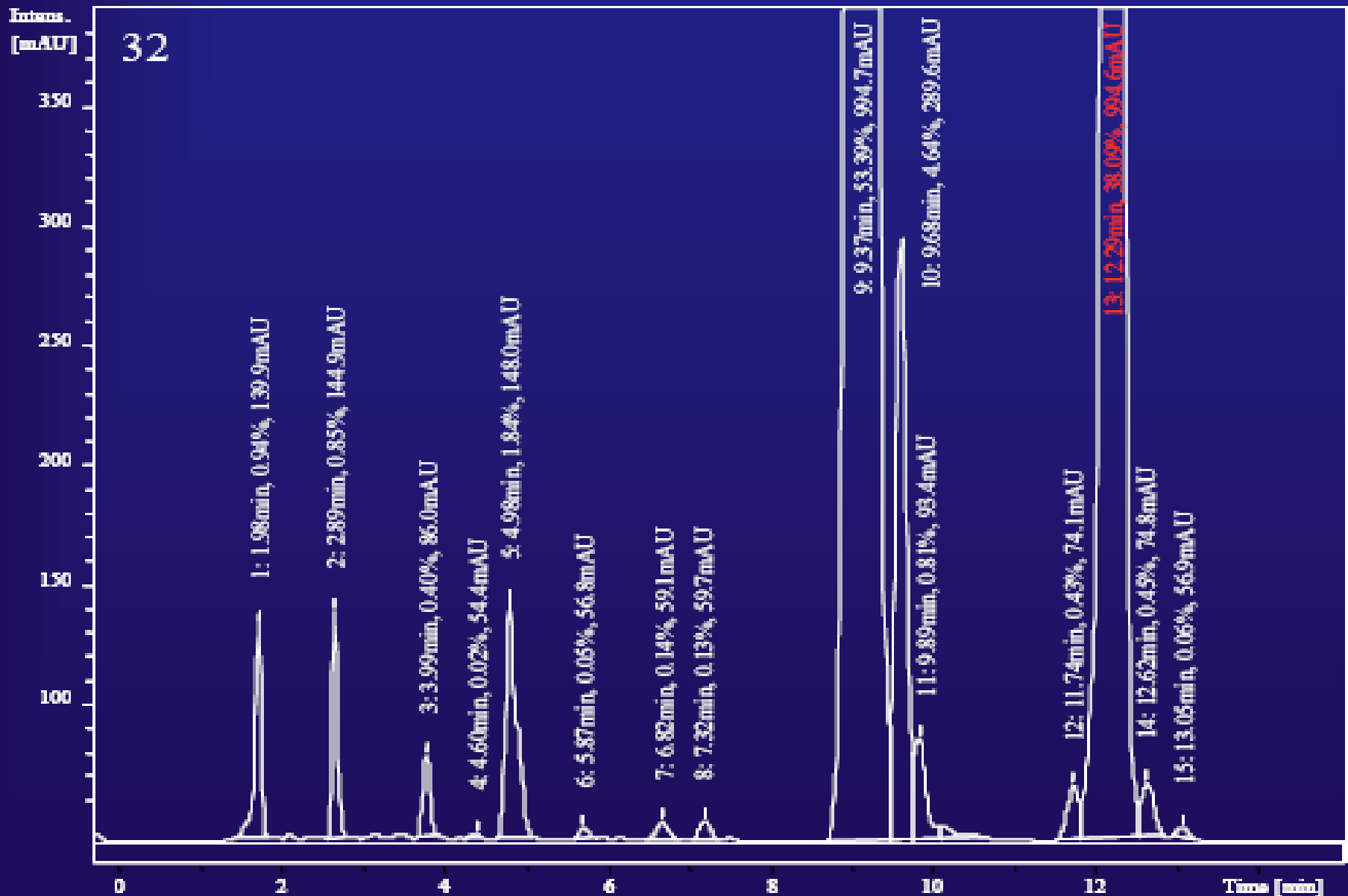
6-Port Injection Valve Animation

In this animation you will see:

- Introduction Of 6-Port Injection Valve
- Mobile Phase Flow Directly To Column
- Load Sample Loop
- Valve Actuation To Inject Position
- Mobile Phase Moves Sample Through The Column

[PLEASE CLICK HERE TO BEGIN ANIMATION](#)

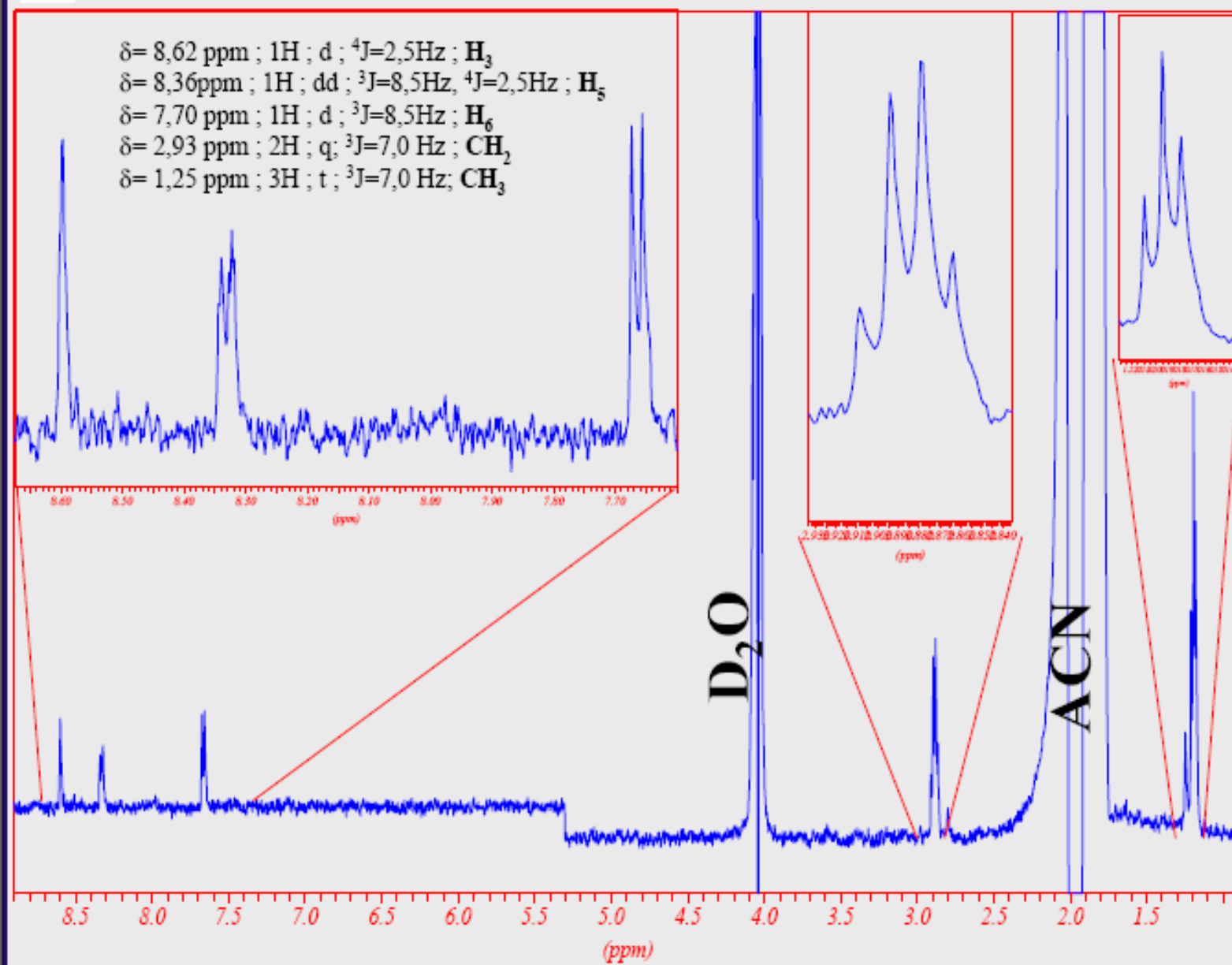
Exemple : Composé inconnu dans un échantillon de TNT



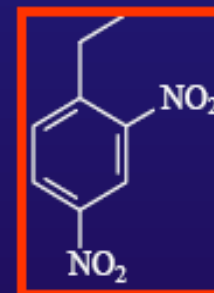
Couplage CLHP-RMN

RMN 500 MHz :

$\delta = 8,62$ ppm ; 1H ; d ; $^4J = 2,5$ Hz ; H_3
 $\delta = 8,36$ ppm ; 1H ; dd ; $^3J = 8,5$ Hz, $^4J = 2,5$ Hz ; H_5
 $\delta = 7,70$ ppm ; 1H ; d ; $^3J = 8,5$ Hz ; H_6
 $\delta = 2,93$ ppm ; 2H ; q ; $^3J = 7,0$ Hz ; CH_2
 $\delta = 1,25$ ppm ; 3H ; t ; $^3J = 7,0$ Hz ; CH_3



**2,4-dinitro
ethylbenzène :**

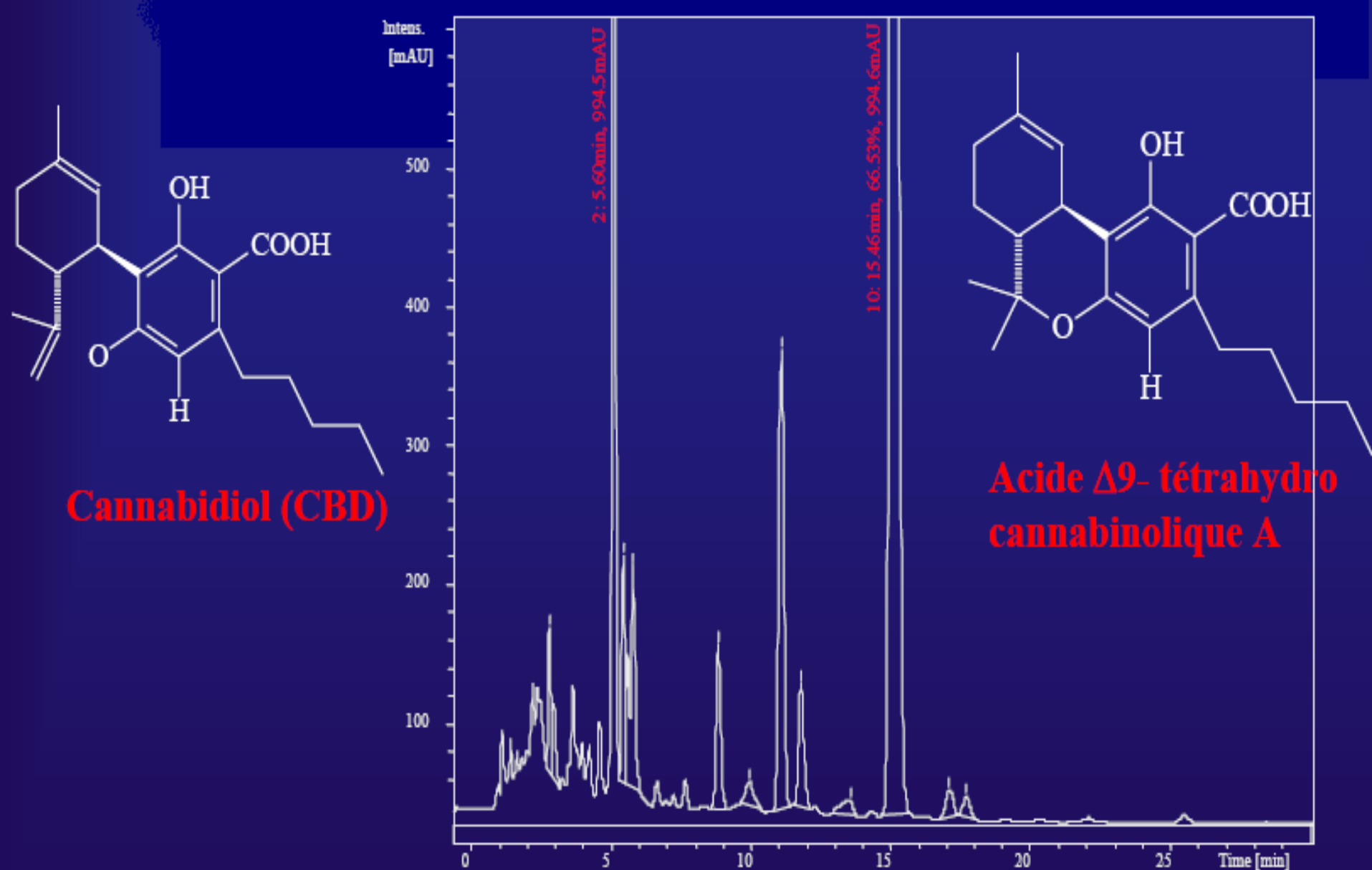


Domaine médical:

➤ stupéfiants: analyse des drogues (cannabis, héroïne....)



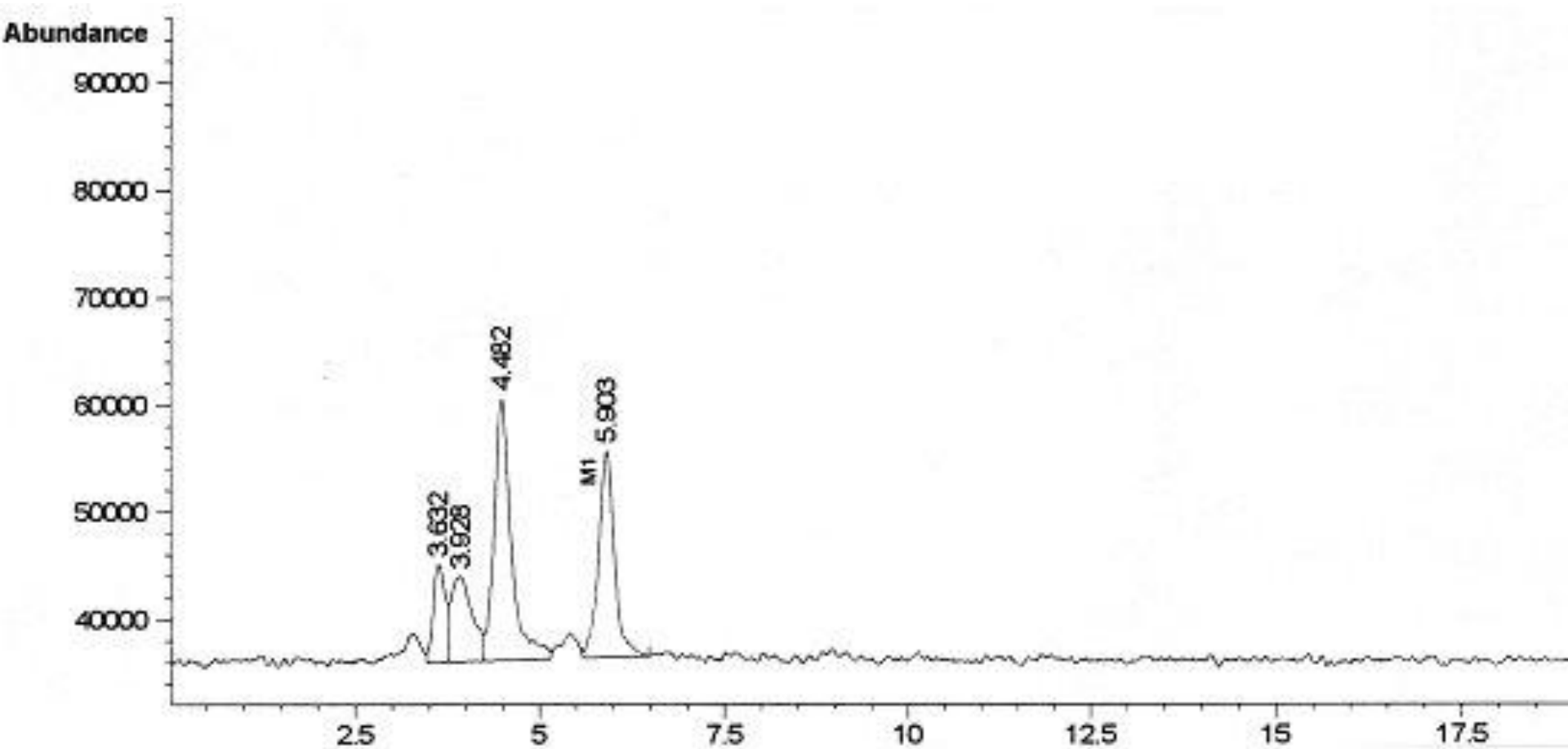
Exemple : Analyse d'un lot de Cannabis





- **toxicologie**: analyse de drug (anti-inflammatoire, analgésique, anti-convulsifs....)
- **Environnement**: analyse de pollutions(deversement...)
- **Agro-industrie**: analyse d'aliments et leurs compositions (molécules, additifs...)

Chromatogramme d'un échantillon de lait entier contaminé à la toxine M1 (50ppt) après séparation sur une colonne d'immun-oaffinité.



L'ANALYSE DES MYCOTOXINES

Comparatif des techniques analytiques

	Sensibilité	Spécificité	Avantage	Inconvénient
HPLC/FLUO	★ ★ ★ ★	★ ★	Sensibilité	Dérivation Purification
HPLC/UV	★ ★	★ ★	Pas de dérivation	Peu spécifique Purification
ELISA	★ ★ ★	★	Coût	Peu spécifique
CCM	★	★	Simple	Peu sensible Peu spécifique
GC/MS	★ ★	★ ★ ★	Sensibilité	Dérivation Purification
HPLC/MS/MS	★ ★ ★ ★	★ ★ ★ ★	Sensible Spécifique	Coût appareil

Pourquoi la spectrométrie de masse couplée la HPLC

- ➔ Solutionner des impasses techniques
- ➔ Simplifier les préparations
- ➔ Abandon de la détection dans l'UV ou Fluorimétrie
- ➔ Analyses multicomposés

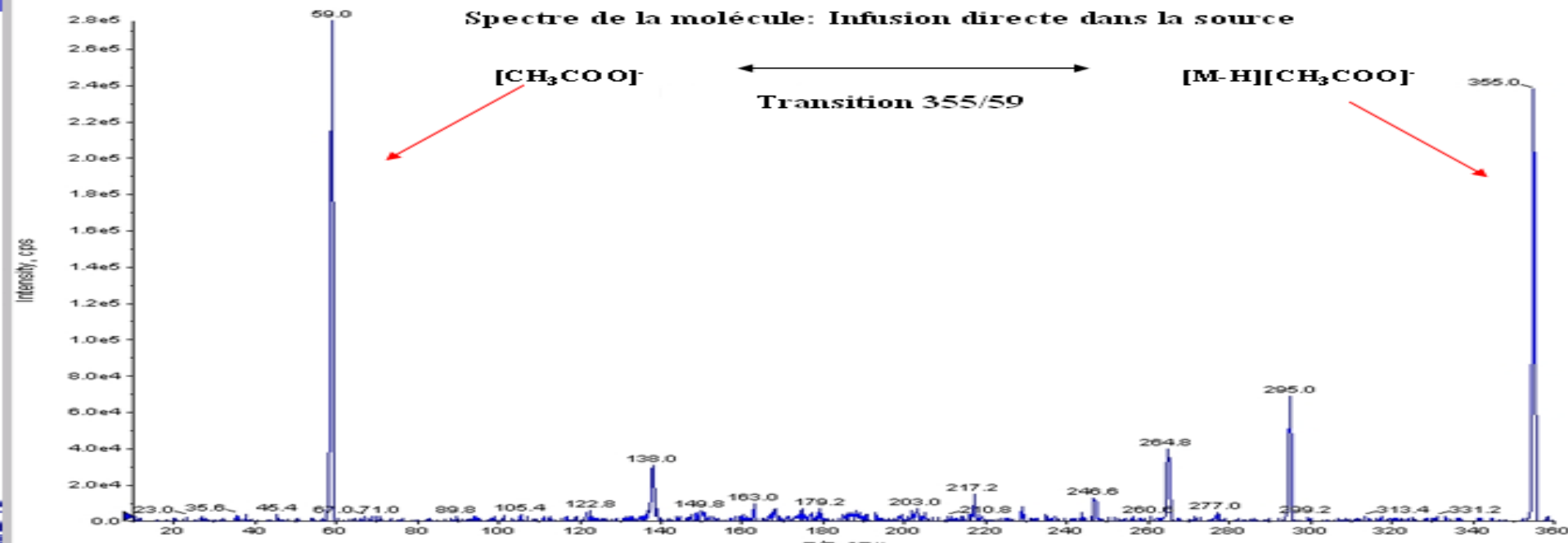


Réduire les coûts

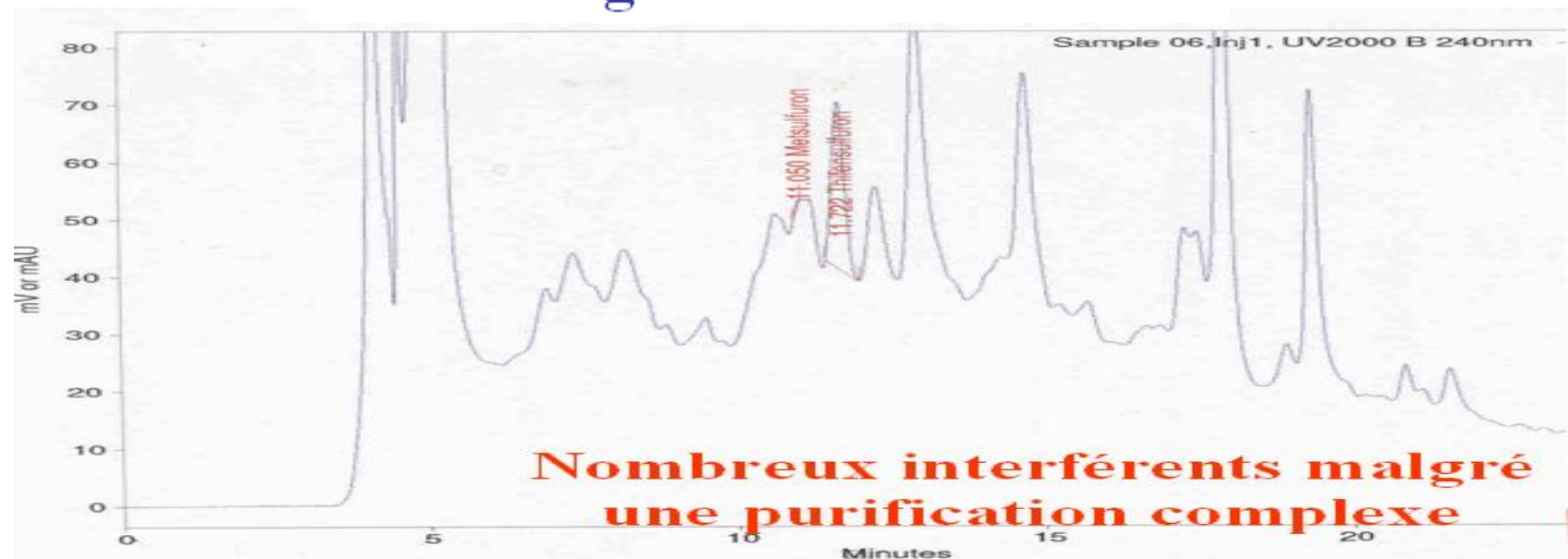
Spectre de la molécule

-Product (355.1): 26 MCA scans from DON-ACETATE_InitProduct_Neg.wiff

Max. 2.8e5 cps

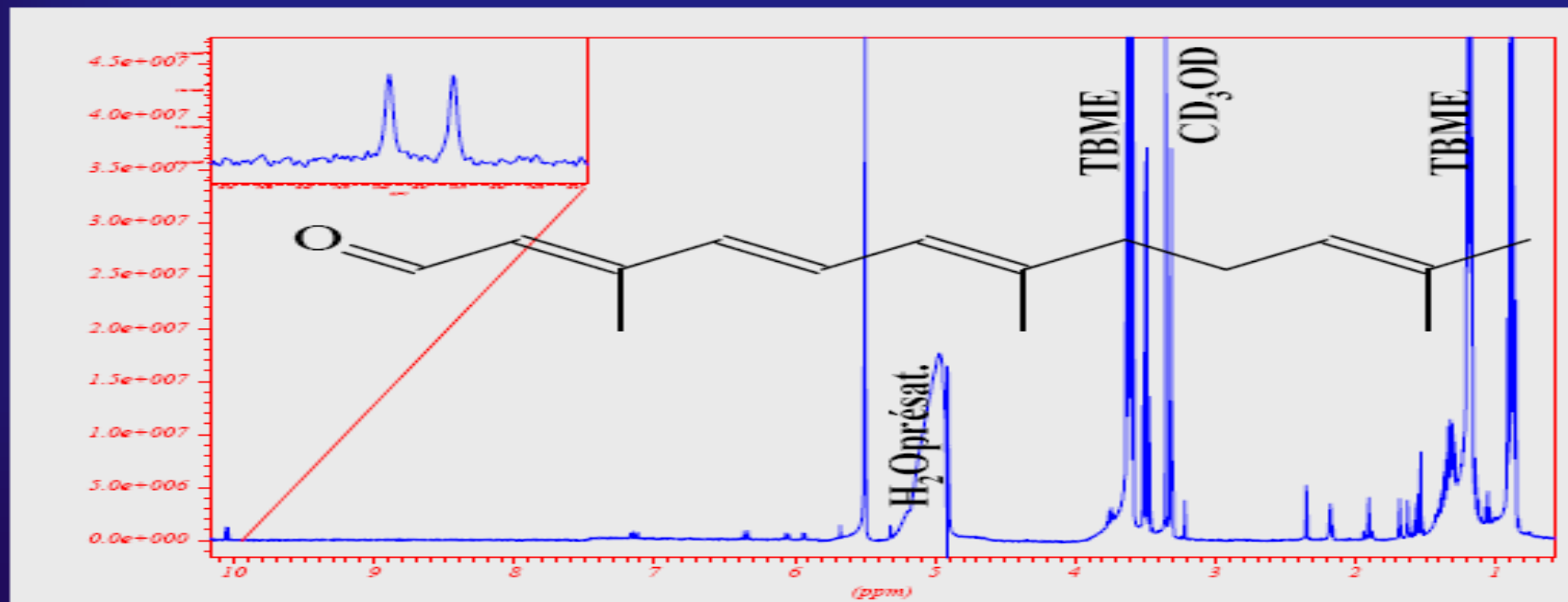


Chromatogramme en HPLC/UV



Exemple

Séparation des produits d'oxydation du lycopène



Dosage des colorants artificiels et naturels:

La technique de HPLC en phase inversée permet l'identification et le dosage des colorants hydrosolubles artificiels acides et des colorants liposolubles artificiels et naturels.