

Chapitre II. Types de chromatographie

Dans des conditions chromatographiques données, le "temps de rétention" (temps au bout duquel un composé est élué de la colonne et détecté), caractérise qualitativement une substance.

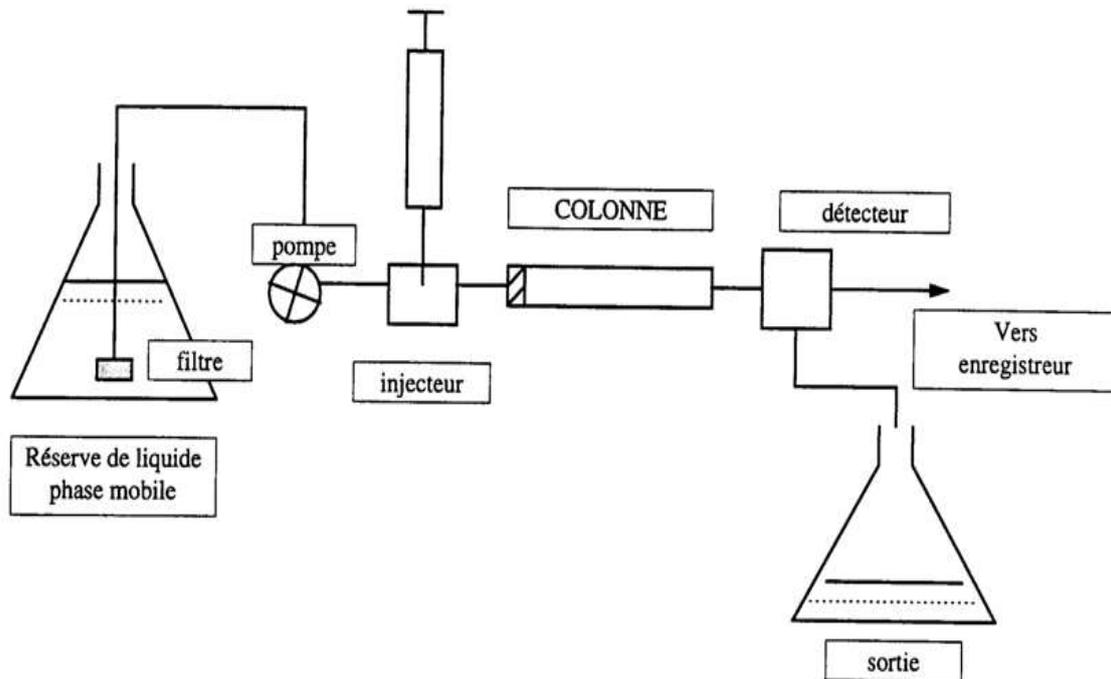


Figure 3 : principe de fonctionnement de l'HPLC

Fig.II.2.1 : Principe de fonctionnement de l'HPLC

II.2.3-Les organes

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'éluion (mélange de plusieurs solvants à des concentrations variables) à l'aide de la pompe doseuse.

b) La pompe : elle est muni d'un système de gradient permettant d'effectuer une programmation de la nature du solvant.

c) Vanne d'injection : c'est un injecteur à boucles d'échantillonnage. 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.

Chapitre II. Types de chromatographie

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. 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.

- La phase inverse :

La phase inverse est majoritairement composée de silice **greffées 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.

- 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. 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'éluion 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'éluion 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'éluion).

On peut, en mélangeant plusieurs solvants, ajuster le pouvoir d'éluion de la phase mobile.

Chapitre II. Types de chromatographie

f) Détecteurs

Deux types de détecteurs sont classiquement utilisés

* Détecteur UV-visible (celui que nous utilisons) : il mesure l'absorption de la lumière par le produit à la sortie de la colonne. E opère à longueur d'onde constante, celle-ci ayant été fixée par l'opérateur.

- 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.

* **Réfractomètre** : il mesure la variation de l'indice de réfraction du liquide à la sortie de la colonne.

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.

II.2.4-Application de la chromatographie à l'analyse

-Analyse des chromatogrammes

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



Fig.II.2.1 : Analyse des chromatogrammes

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 λ en nm.

- la quantité injectée, le début de l'injection sur le chromatogramme, la sensibilité du détecteur, etc...

Chapitre II. Types de chromatographie



Fig.II.2.2 : Schéma d'un appareil de L'HPLC