

Méthodes de séparation analytiques

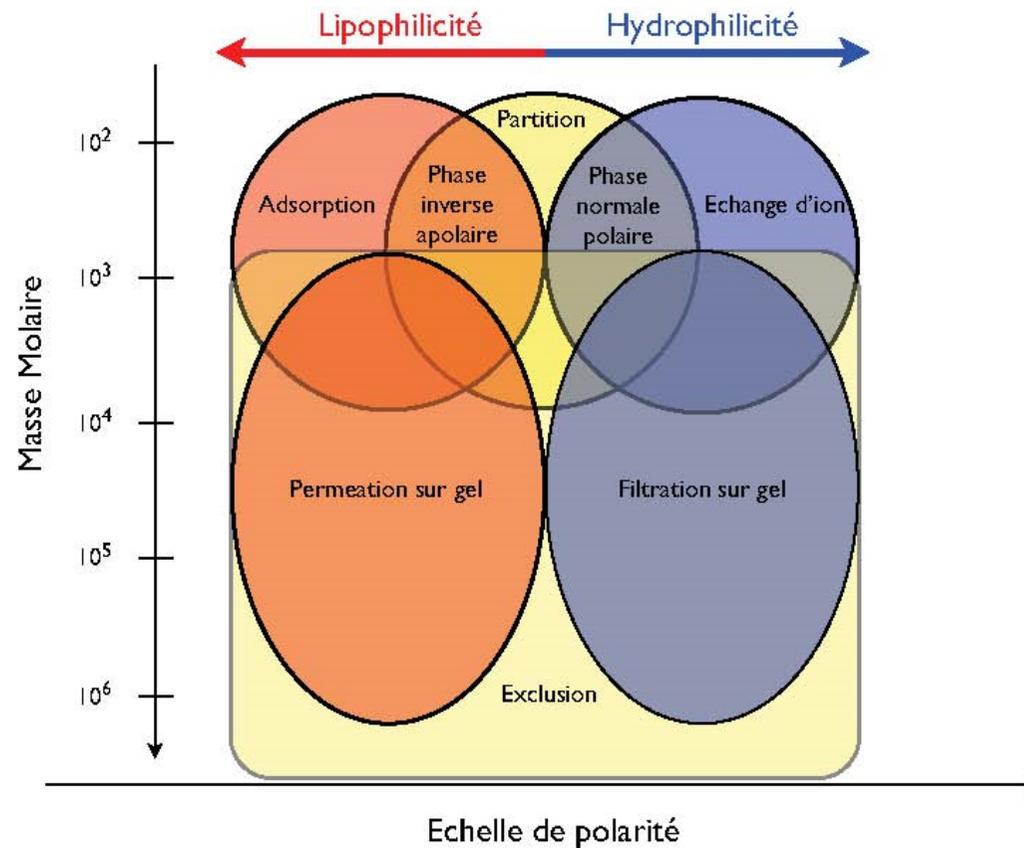
Chromatographie en phase liquide

Introduction

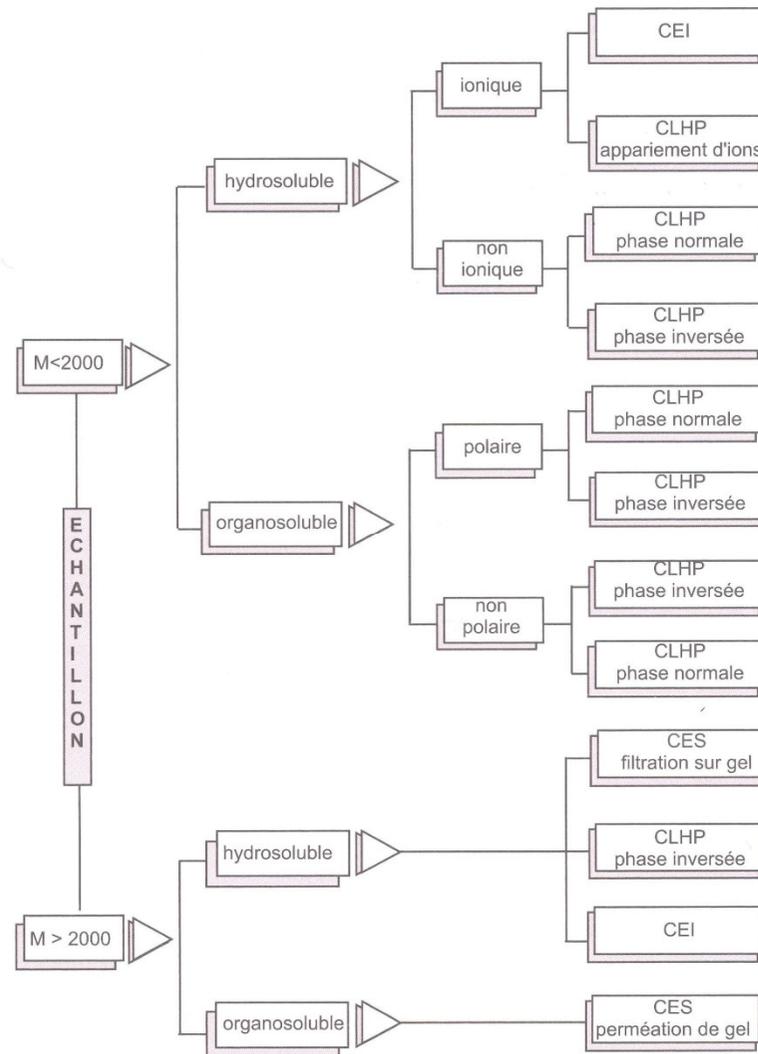
- ⇒ La chromatographie liquide d'éluion instrumentale est la version moderne de la chromatographie sur colonne. Le débit de phase mobile est délivrée de façon constante à l'aide de pompes à haute pression.
- ⇒ Par rapport à la chromatographie sur colonne, les performances en termes de sélectivité et de résolution de cette technique sont largement améliorées.
- ⇒ Il existe plusieurs types de chromatographie en phase liquide d'éluion, dépendant de la nature de la phase stationnaire et des solutés à séparer.
- ⇒ Si la phase stationnaire est apolaire ou polaire, on parle de chromatographie HPLC pour High Pressure Liquide Chromatography.
- ⇒ Si la phase stationnaire peut engendrer une reconnaissance spécifique d'une classe de solutés, on parle de chromatographie AC (Affinity Chromatography). Elle constitue une méthode particulière d' HPLC.
- ⇒ Lorsque la séparation des solutés nécessite la présence dans l'éluant d'un agent permettant la formation d'une paire d'ion, on parle de chromatographie PIC (Paired Ion Chromatography). Elle constitue aussi une méthode particulière d' HPLC.

Chromatographie en phase liquide

- ⇒ Lorsque la phase stationnaire est un gel poreux, on parle de chromatographie SEC (Size Exclusion Chromatography).
- ⇒ Quand la phase stationnaire est ionique, on parle de chromatographie IC (Ion Chromatography).



⇒ Diagramme de sélection d'une méthode chromatographique en phase liquide d'élution en fonction de la nature de l'échantillon à analyser:

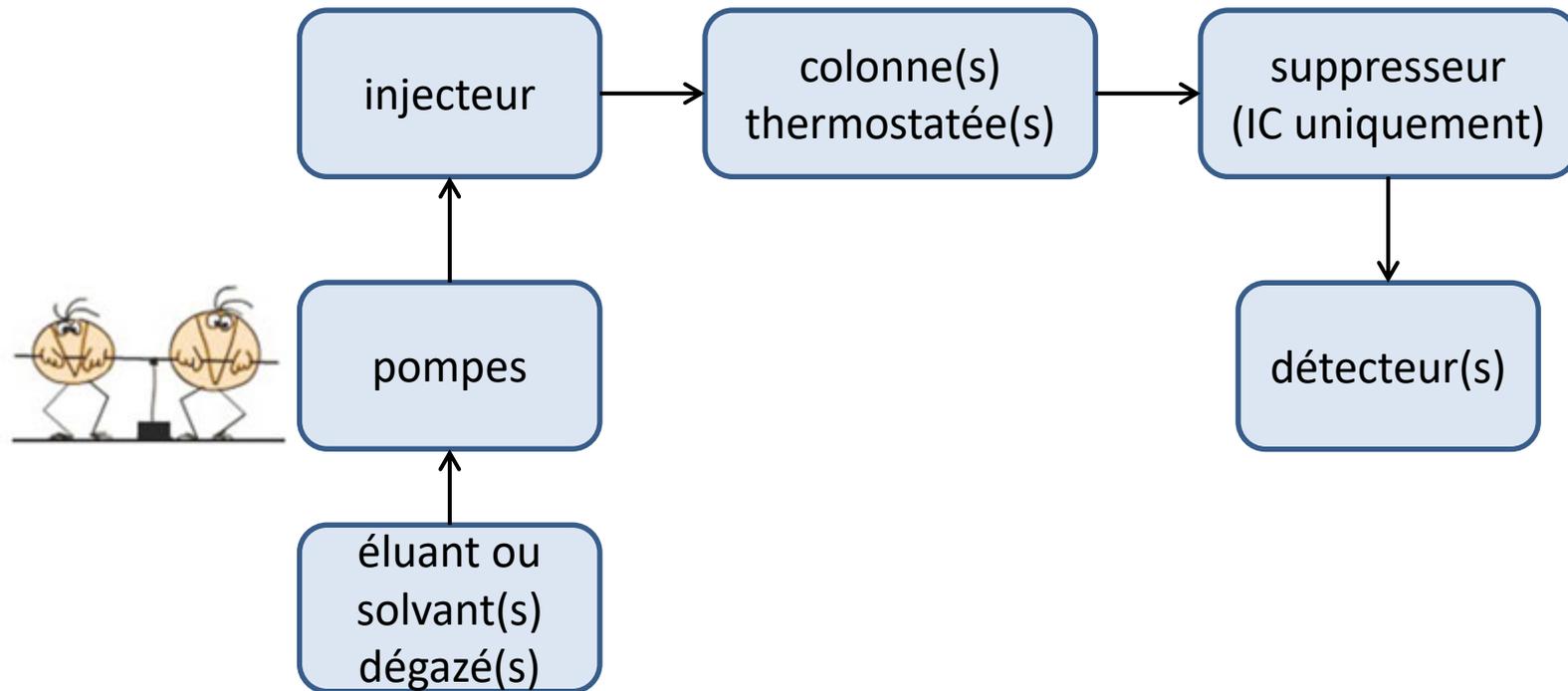


CEI = IC

CLHP = HPLC

CES = SEC

Éléments d'un chromatographe en phase liquide d'élution



⇒ L'éluant peut être un solvant ou un mélange de solvants. Dans le cas d'un mélange de solvants, ce mélange peut être généré avant ou après les pompes.

- ⇒ Le schéma précédent retrace les éléments que l'on trouve dans un chromatographe en phase liquide d'élution.
- ↪ Pour un chromatographe HPLC, on utilise une colonne sans suppresseur avec un seul détecteur.
- ↪ Pour un chromatographe SEC, on utilise plusieurs colonnes sans suppresseur avec un ou plusieurs détecteurs.
- ↪ Pour un chromatographe IC, on utilise une colonne avec parfois un suppresseur et avec un seul détecteur.
- ⇒ La chromatographie liquide d'élution peut être réalisée de façon analytique ou à des fins préparatives. Il s'agit d'une séparation réalisée en grande quantité qui permet un isolement des substances séparées.
- ↪ Dans le cas de la chromatographie préparative, les pompes et colonnes utilisées sont dimensionnées en conséquence.

Éluants et dégazage

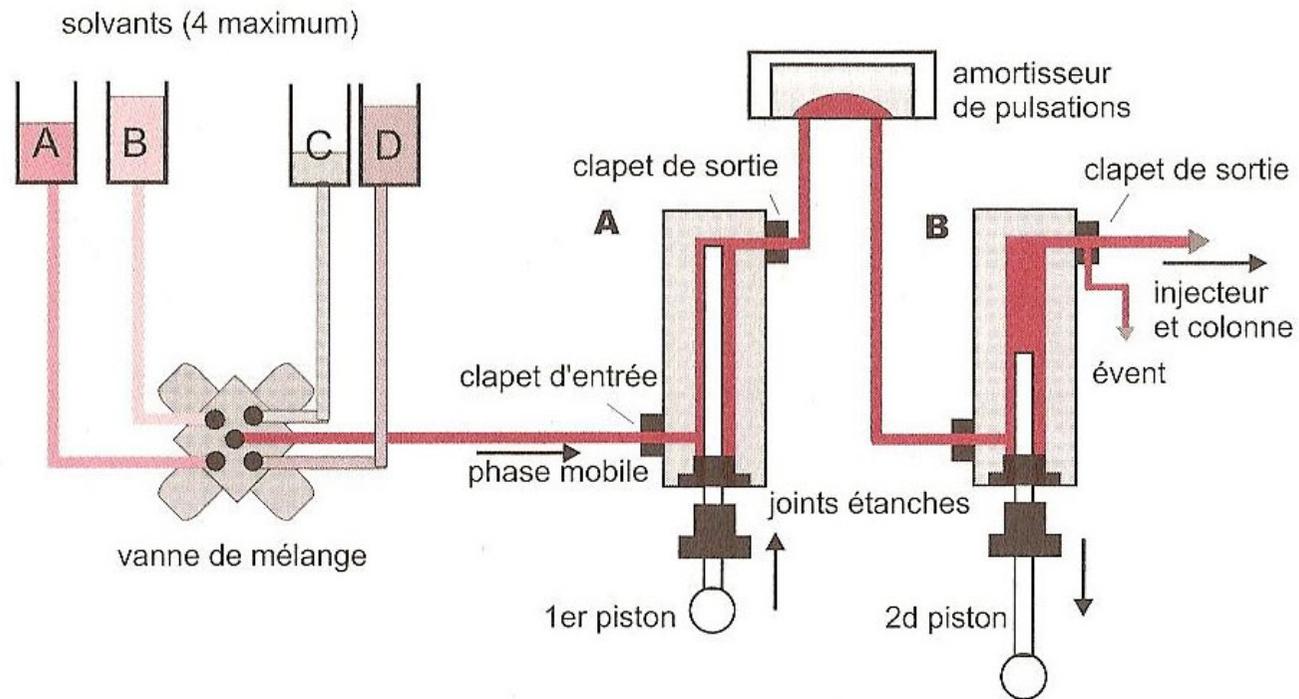
- ⇒ Les éluants sont des mélanges organiques (HPLC, SEC) ou hydro-organiques (HPLC, SEC) ou aqueux (SEC, IC).
- ⇒ Ces mélanges peuvent être préparés par l'opérateur ou générés par l'appareil lui-même. Dans ce cas l'appareil doit posséder une vanne de mélange ou un mélangeur. L'éluant est choisi en fonction la phase stationnaire utilisée et des solutés à séparer.
- ⇒ Les solvants constituant l'éluant doivent être filtrés pour exclure toute poussière pouvant bloquer ou endommager les systèmes de pompage, mélange, colonne...
- ⇒ Les solvants constituant l'éluant doivent être dégazés pour éviter la formation de bulles dans le système qui peuvent engendrer:
 - ↪ Une variation de la pression au cours de la séparation. Une pression stable engendre une bonne séparation.
 - ↪ Une apparition de pics fantômes par génération d'un signal dû au gaz (détecteur électrochimique et photométrique UV-Visible sensibles à O₂).
 - ↪ Une dégradation prématurée de la colonne, notamment à cause de O₂ dissout.

- ↪ La présence de gaz dans les solvants constituant l'éluant peut conduire au pire au désamorçage de la pompe.
- ⇒ Le dégazage des solvants constituant l'éluant peut se faire manuellement:
 - ↪ Un barbotage d'hélium dans les bouteilles de distribution des solvants. 85% de l'oxygène éliminé en 10 minutes environ. L'hélium est très peu soluble dans les solvants organiques, donc absent du fluide après barbotage.
 - ↪ Dégazage des bouteilles de distribution des solvants sous ultrasons. 50% de l'air contenu est éliminé.
 - ↪ Filtration sous vide des solvants avant stockage dans les bouteilles de distribution des solvants. Il faut faire attention à l'évaporation sous vide.
- ⇒ Le dégazage des solvants constituant l'éluant peut se faire automatiquement dans le chromatographe à l'aide d'un dégazeur à membrane.
- ↪ Les solvants passent à travers un tube poreux, une membrane, situé dans une enceinte sous vide (pompe à vide). Le tube poreux est conçu pour ne laisser passer que les gaz.

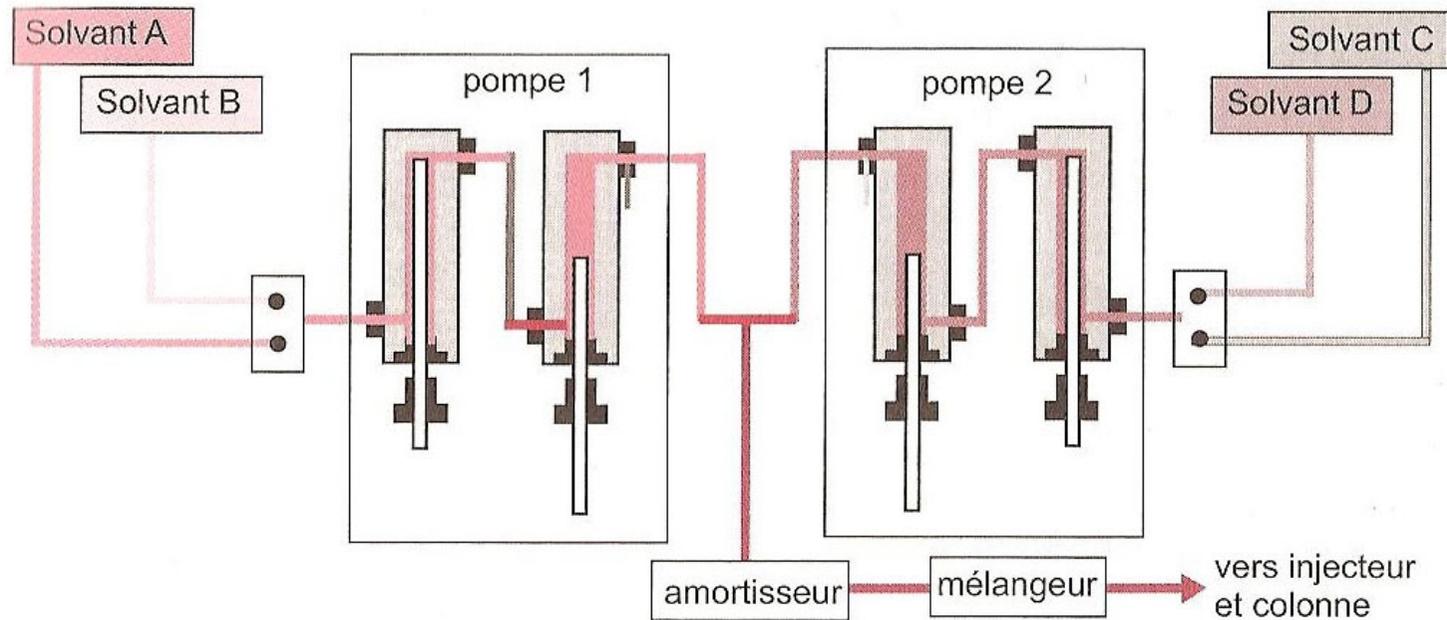
Pompes

- ⇒ Les pompes maintiennent une pression de quelque centaines de bars au niveau de l'injecteur. Cette pression dépend du débit imposé de l'éluant, de sa viscosité, des caractéristiques physiques de la colonne chromatographique et la nature de la phase stationnaire.
- ⇒ Dans une HPLC à ultra haute pression (UPLC) les pressions peuvent atteindre jusqu'à 1200 bars.
- ⇒ Les débits de pompes varient de $0,01 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ à $10 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. La morphologie des pompes est adaptée à la plage de débit à délivrer. Le débit est fonction des caractéristiques physiques de la colonne chromatographique que l'on utilise.
- ⇒ Les pompes assurent un débit avec une stabilité de 0,2%.
- ⇒ Les pompes permettent de travailler en mode isocratique ou en mode gradient.
- ⇒ Un mode isocratique est un mode où la composition de l'éluant reste constante au cours de la séparation.
- ⇒ Un mode gradient est un mode où la composition de l'éluant varie au cours de la séparation.

⇒ Dans ce type de pompe, un gradient de solvants est généré par une vanne de mélange:

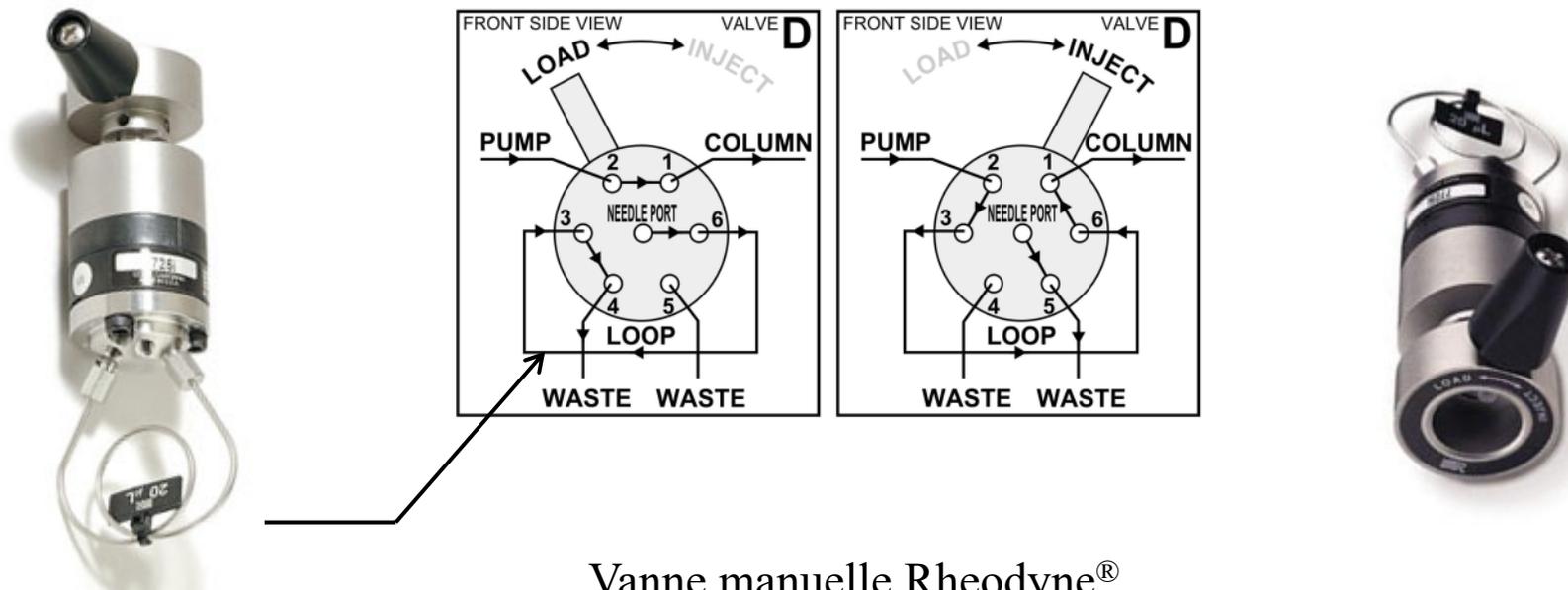


⇒ Dans ce type de configuration, un gradient de solvants est engendré par deux pompes. Il s'agit ici de pompes binaires:



Injecteurs

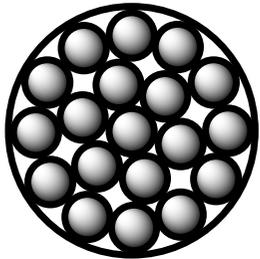
- ⇒ Les injecteurs sont des vannes haute pression manuelles munies d'une boucle d'injection de volume calibré. La précision du volume de la boucle d'injection conditionne la reproductibilité quantitative. Pour une chromatographie analytique, les volumes d'injection varient de 5 à 20 μL .
- ⇒ Il existe aussi des injecteurs automatiques (vannes motorisées) avec passeur d'échantillons. Dans ce cas aussi, le système est muni des mêmes boucles d'injection.



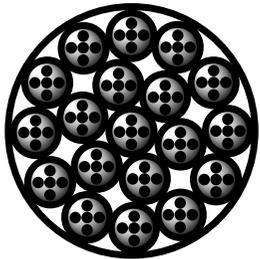
Vanne manuelle Rheodyne®

La colonne chromatographique:

⇒ Les colonnes chromatographiques sont des colonnes garnies:



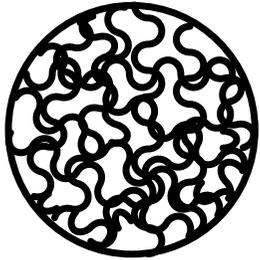
⇒ Colonne garnie à phase stationnaire sous forme de billes rigides peu poreuses ou colonne garnie à phase stationnaire sous forme de film de liquide visqueux déposé sur des billes rigides peu poreuses.



⇒ Colonne garnie à phase stationnaire sous forme de billes rigides poreuses.



⇒ Colonne garnie à phase stationnaire sous forme de billes de gel poreux.



⇒ Colonne garnie à phase stationnaire sous forme d'un solide monolithe poreux ou colonne garnie à phase stationnaire sous forme d'un gel réticulé.

⇒ Ces colonnes induisent une perte de charge obéissant à la loi de Darcy. La porosité ε est définie comme: $\varepsilon = \frac{V_{mo}}{V_c} = \frac{(V_i + V_p)}{V_c}$. Si $V_{mo} = V_M$ alors $\varepsilon = \frac{V_M}{V_c} = \frac{t_M F_V}{V_c}$ d'où $t_M = \frac{\varepsilon V_c}{F_V}$

Le supprimeur:

- ⇒ Le supprimeur est une unité utilisée uniquement en chromatographie ionique.
- ⇒ Il n'est utilisé que dans le cas où l'éluant est un acide fort ou une base forte diluée en présence d'un détecteur conductométrique.
- ⇒ Le rôle de ce supprimeur est d'éradiquer le signal conductométrique intense de l'éluant.

Les détecteurs:

⇒ Les détecteurs sont en général spécifiques à un type de chromatographie. Les principaux détecteurs utilisés en chromatographie liquide d'éluant sont présentés ci-après.

⇒ La détection des solutés séparés peut se faire de façon directe ou peut nécessiter une dérivatisation chimique pour les rendre observables par le détecteur à disposition. Dans ce cas, la réaction de dérivatisation doit être totale pour conserver l'aspect quantitatif de la méthode.

Nom	Limite approximative de détection (mg · mL ⁻¹)	Gradient	Applications
Absorbance UV/visible	10 ⁻⁴	Oui	Sélective, non spécifique
Fluorescence	10 ⁻⁵	Oui	Sélective, nombre limité de constituants
Chimiluminescence	2 × 10 ⁻⁷	Oui	Sélective, spécifique d'un nombre restreint de composés
Fluorescence laser	faible	Oui	Sélective, variété limitée de constituants
Diffusion laser à petits angles	10	Non	Espèces de masse moléculaire élevée
IRTF	1	Oui	Sélective, non spécifique
Conductivité	10 ⁻²	Oui/Non	Espèces ioniques ou ionisables
Ampérométrie	10 ⁻⁵	Non	Sélective, espèces oxydables ou réductibles
Réfractométrie	10 ⁻²	Non	Universelle
Spectrométrie de masse	10 ⁻⁵	Oui	Universelle
Polarimétrie	10 ⁻⁴	Non	Inverses optiques
ICP-MS	2,5 × 10 ⁻³	Oui	Espèces métalliques

Type	Response	Noise level	C _N g cm ⁻³	Linear range	Flow cell volume, μl
Uv-visible absorption	selective	10 ⁻⁴ au	10 ⁻⁸	10 ⁴ -10 ⁵	1-8
Fluorescence	selective	10 ⁻⁷ au	10 ⁻¹²	10 ³ -10 ⁴	8-25
Conductivity	selective	10 ⁻² μS cm ⁻¹	10 ⁻⁷	10 ³ -10 ⁴	1-5
Amperometric	selective	0.1 nA	10 ⁻¹⁰	10 ⁴ -10 ⁵	0.5-5
Refractive index	universal*	10 ⁻⁷ riu	10 ⁻⁶	10 ³ -10 ⁴	5-15