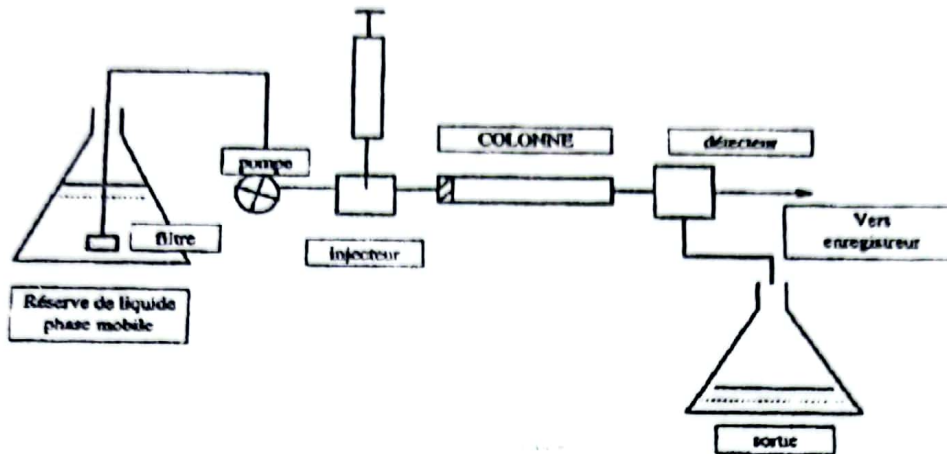


Chromatographie en phase liquide haute performance HPLC



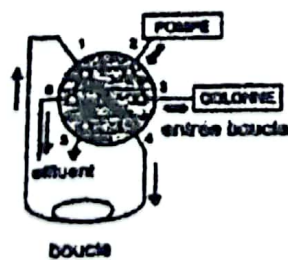
Principe de fonctionnement d'une HPLC

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

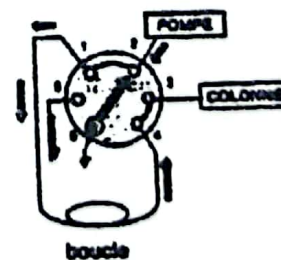
b) La pompe :

Les pompes actuelles ont un débit variable de quelques μl à plusieurs ml/min .

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



a) chargement



b) injection

d) La colonne

Une colonne est un tube construit dans un matériau le plus possible inerte aux produits chimiques, souvent en inox ou en verre. Sa section est constante, de diamètre compris entre 4 et 20 mm pour des longueurs généralement de 15 à 30 cm. Au delà, les importantes pertes de charges exigeraient des pressions de liquide beaucoup trop élevées.

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

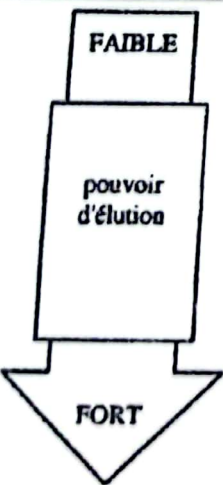

- La phase inverse :

La phase inverse est majoritairement composée de silice greffées par des chaînes linéaires de 8 ou 18 atomes de carbones (C_8 et C_{18}). Cette phase est apolaire et nécessite donc un éluant polaire (ACN, MeOH, H_2O). 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.

f- La phase mobile

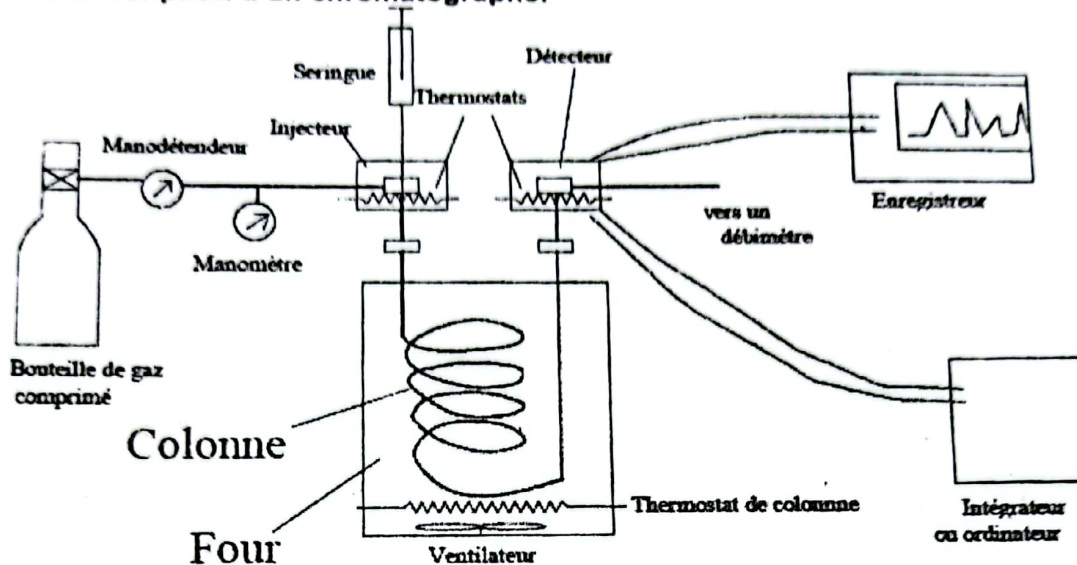
pouvoir d'éluion de la phase mobile en HPLC

phase polaire normale	solvants classes par polarité croissante	phase à polarité inversée
	hexane toluène trichlorométhane dichlorométhane éther acétate d'éthyle acétonitrile méthanol eau	

5. Chromatographie en phase gazeuse (CPG):

Le principe de la séparation par C.P.G. consiste à partager l'échantillon à analyser entre deux phases. L'une de ces phases est un liquide stationnaire uniformément réparti sous forme d'une pellicule mince sur un solide inerte de grande surface spécifique, tandis que l'autre phase est un gaz mobile qui s'écoule à travers l'ensemble stationnaire.

5.1. Description d'un chromatographe.



Un chromatographe est constitué en première approximation de trois organes essentiels :

- l'injecteur
- le détecteur
- la colonne

Injecteur:

Il permet d'introduire un liquide qui doit être vaporisé instantanément avant d'être transféré dans la colonne. Sa température doit être supérieure d'environ 20°C à la température du produit le moins volatil.

La figure suivante le représente: le gaz porteur, de préférence préchauffé, entre dans une chambre chauffée, obturée par une pastille d'élastomère, le *septum*, qui assure l'étanchéité. A l'aide d'une seringue hypodermique de petite capacité, on pique au travers du septum, afin que l'extrémité de l'aiguille arrive au-dessous du niveau de l'arrivée du gaz porteur, puis on pousse le piston pour réaliser l'injection.

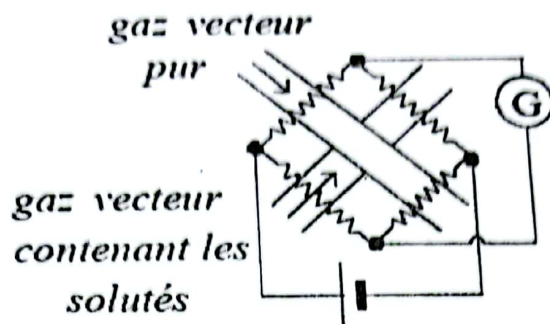
Détecteur:

Il permet de mettre en évidence le passage des différents gaz séparés par la colonne. La détection peut être basée sur des techniques de mesures différentes. Le détecteur le plus utilisé en CPG est celui à conductibilité thermique appelé catharomètre. (cas de notre chromatographe)

Sa température est généralement la même que celle de l'injecteur.

Catharomètre

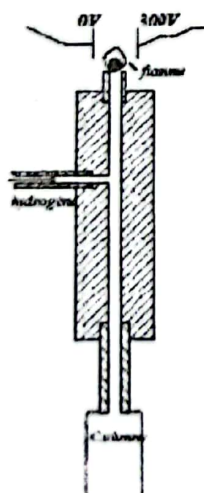
Le catharomètre est un appareil simple et robuste, à réponse universelle, mais relativement peu sensible. Il est fondé sur une comparaison continue entre le flux de chaleur emporté par le gaz vecteur pur et le flux de chaleur emporté par le gaz vecteur chargé des molécules de soluté. Ces flux de chaleurs sont produits par des thermistances, parcourues par un courant continu de tension fixe, dans une enceinte thermostatée avec précision.



En faisant passer le gaz vecteur contenant les constituants séparés sur la cellule du détecteur, nous obtiendrons un signal chaque fois que l'un des constituants se présentera dans la cellule car la conductibilité thermique du gaz vecteur (qui traverse le détecteur) varie quand le constituant X traverse le détecteur.

L'élément sensible est incorporé dans l'une des branches d'un pont de Wheatstone. Dans l'autre branche est placé un fil absolument identique, mais qui est toujours placé dans le gaz porteur pur et dont la résistance sera donc constante; on constitue ainsi deux cellules, l'une de mesure et l'autre de référence.

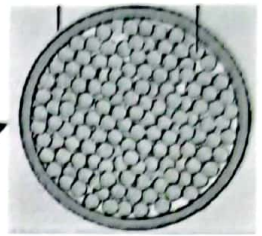
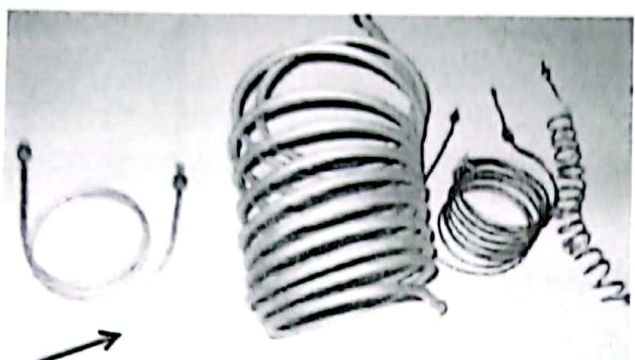
Détecteur à ionisation de flamme.



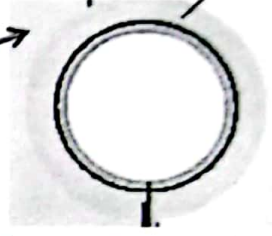
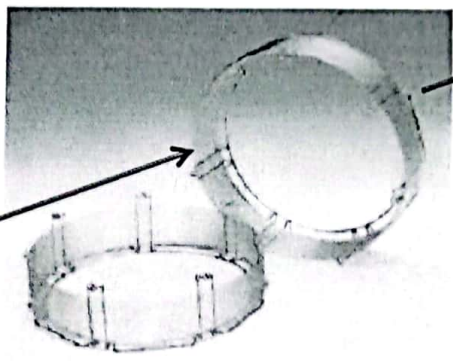
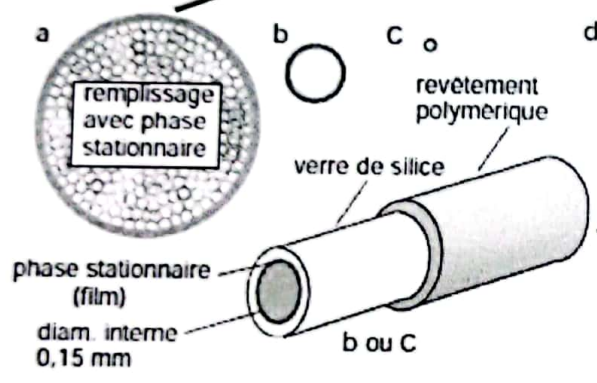
C'est un détecteur beaucoup plus sensible que le catharomètre, mais moins universel, car il ne donne de réponse qu'aux composés organiques.

Il a aussi l'inconvénient, contrairement au catharomètre, de détruire le soluté qui le traverse, car son principe est de brûler, dans une flamme d'hydrogène, l'effluent apporté par de l'azote (gaz vecteur). Sous l'effet d'un champ électrostatique, il se forme des ions carbone de charge positive qui sont précipités sur une électrode où ils créent un courant d'ionisation que l'on amplifie grâce à un électromètre amplificateur. Sur un enregistreur, on obtient par conséquent un signal proportionnel au débit-masse du soluté dans le détecteur. En fait, il n'est pas exactement proportionnel au nombre d'atomes de carbone du composé concerné, car il y a une influence défavorable des autres atomes que C et H. Par contre, il est inutile de placer ce détecteur dans une enceinte thermostatée.

Colonnes



diam. ext. = 1/8 inch = 3,18mm
 ou 1/4 inch = 6,35mm
 (1 inch = 2,54cm)
 longueur: ~1 à 6 m



phase stationnaire: ép. 0,05-5µm déposée ou greffée

diam. int. = ~0,1-0,75mm

long. = 25-100m

Représentation à la même échelle des sections des trois types de colonnes. a) Colonne remplie de 2 mm de diamètre; b) colonne capillaire « 530 » de 0,53 mm; c) colonne capillaire de 0,1 mm; détail d'une colonne capillaire. À cette échelle, l'épaisseur de phase stationnaire serait à peine visible; d) colonnes commerciales de 50 m de longueur (Document de la Société Alltech).