

Chapitre V. Méthodes physico-chimiques d'analyse des médicaments

3. Méthodes chromatographiques : La Chromatographie Liquide Haute Performance

Dr. Fizir Meriem

2. La chromatographie liquide haute performance

1.1. Introduction

La chromatographie liquide haute performance appelé CLHP est une technique instrumentale qui permet de séparer les composants d'un mélange non volatile, thermosensible, de polarité élevée afin de les identifier et les quantifier. Elle met en œuvre, selon la nature de la phase stationnaire, des phénomènes de partage, d'adsorption, d'échange d'ions ou d'exclusion. Son développement très rapide, à partir de 1970, réside dans le fait qu'elle n'a pas les inconvénients de la chromatographie liquide classique ; cette dernière a toujours été peu utilisée, en raison de la lenteur de la séparation ; de l'absence de détecteur qui aurait permis de suivre facilement le développement de chromatogramme et la quantité considérable d'échantillon nécessaire.

1.2. Appareillage

Un appareil CLHP (Fig.1.1) comporte différents modules: un réservoir contenant la phase mobile, un système de pompage, un injecteur, une colonne, un détecteur à travers lesquels un liquide entraîne les substances d'un mélange à séparer et un système d'acquisition de données. Il nécessite également un dispositif de dégazage. Les différents modules sont reliés par des canalisations courtes et de très faible diamètre interne (0,1 mm).

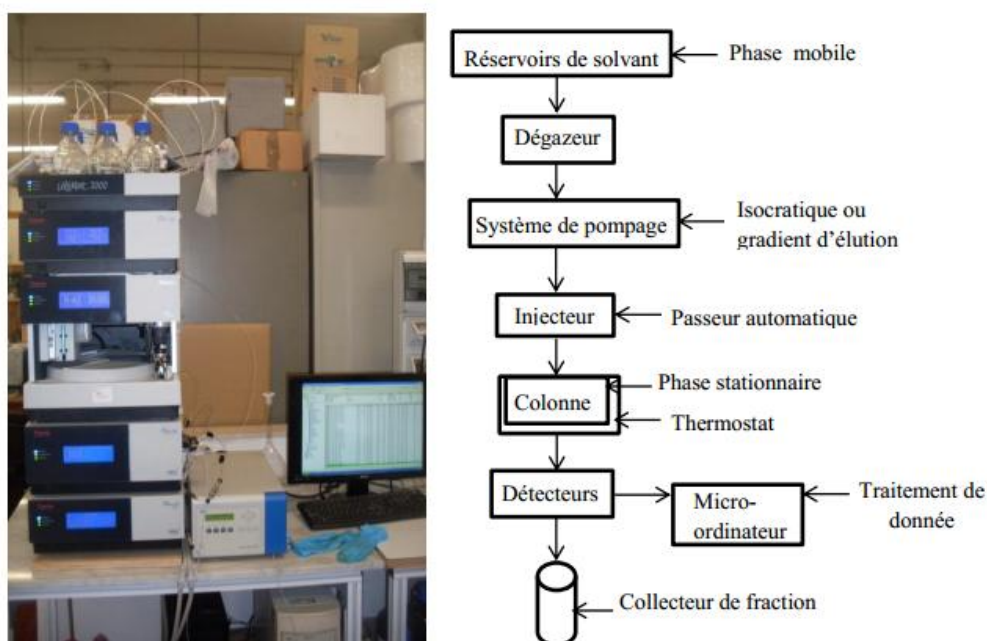


Fig.1.1 Les composants d'un chromatographe liquide à haute performance

1.3. Réservoir de solvants

Pour l'éluant on emploie un vase clos pour éviter l'évaporation. Le solvant utilisé doit nécessairement :

- a) Maintenir la stabilité de la colonne
- b) Être compatible avec le détecteur
- c) Solubiliser suffisamment l'échantillon et ne pas gêner sa récupération.

Il est recommandé de toujours employer des solvants traités spécifiquement pour CLHP. Ils doivent être dégazés et filtrés avant usage sur filtre spécial (0,45 μm). Le choix du solvant constitue habituellement la partie la plus difficile de ce type de chromatographie. Il est préférable de faire quelques essais en CCM.

1.4. Dispositif de dégazage

Durant le pompage, dans la chambre de mélange ou dans la colonne elle-même, si les solvants ne sont pas dégazés, l'air dissout dans le liquide soumis à forte pression, forme des bulles à l'intérieur du système, c'est là un inconvénient majeur pour le fonctionnement de la plupart des détecteurs en particulier ceux qui utilisent des propriétés optiques. En règle générale, plus le liquide est polaire, plus la tendance de l'air à se dissoudre est forte. Il convient donc d'éliminer au maximum l'azote et l'oxygène qui peuvent être présents. Le dégazage de la phase mobile se fait par barbotage d'hélium, par ultrasons ou par un dégazeur.

1.5. Pompe

La pompe d'un chromatographe a pour rôle d'assurer l'écoulement de la phase mobile dans la colonne. Tout appareil CLHP comporte au moins une pompe en mode isocratique (éluant de composition fixe tout au long de l'analyse donc la phase mobile peut être préalablement préparée et disposée dans un seul réservoir) ou en gradient d'élution (éluant de composition variable). L'élution graduée lors de la séparation de mélanges complexes permet, en modifiant la composition de l'éluant, d'optimiser les facteurs de capacité et de réduire les temps d'analyse. Les pompes les plus utilisées sont les pompes de type piston avec lesquelles les débits sont constants, la pression peut atteindre environ 500 bars.

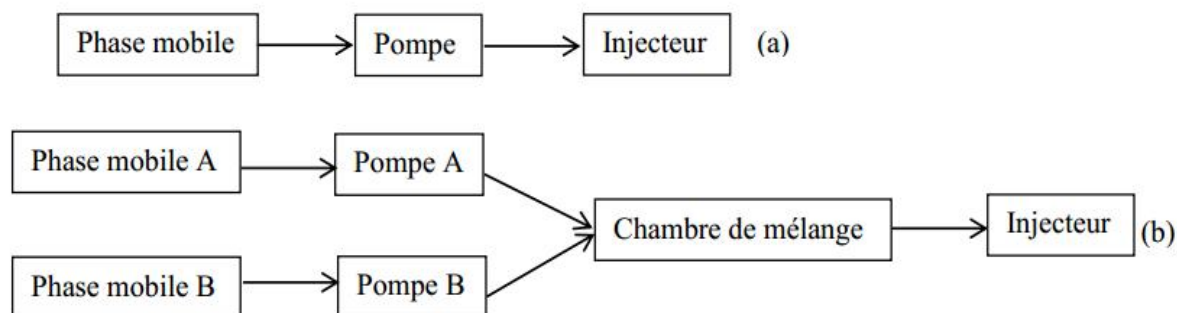


Fig.1.2 Représentation schématique d'un système de pompage

(a) mode isocratique (b) mode gradient d'élution

1.6. Injecteur

L'injection d'un volume précis de l'échantillon en tête de colonne doit se faire à l'aide d'une vanne (boucle d'échantillonnage) : on introduit d'abord l'échantillon dans une boucle de volume connu (position chargement ou Load) après rotation de la vanne de 60° d'un levier qui permet d'inverser le sens de circulation dans la boucle (position Inject), la phase mobile entraîne l'échantillon en tête de la colonne le volume injecté est constant, cela permet

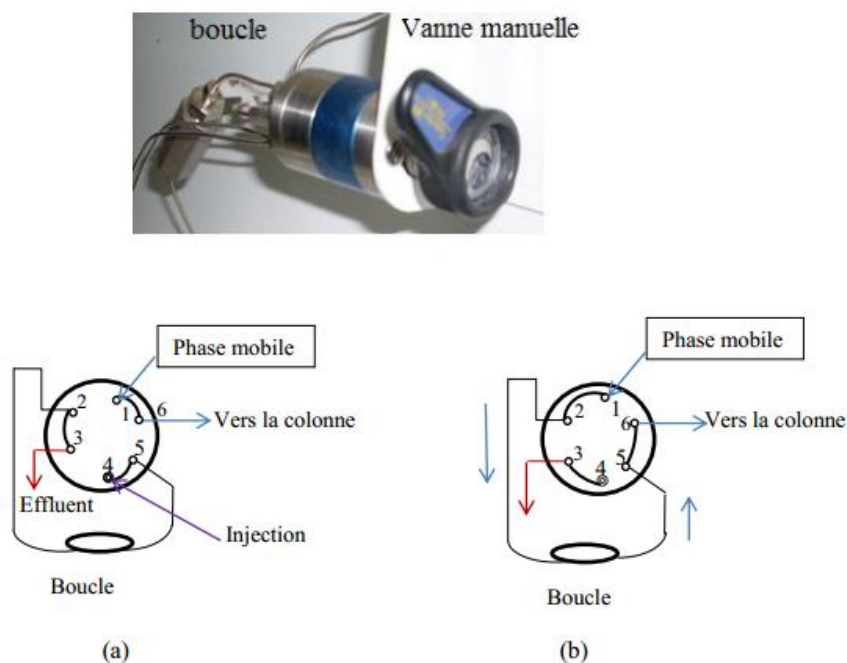


Fig. 1.3 Injecteur à boucle

(a) Remplissage de la boucle (b) Injection dans la boucle

donc de travailler en étalonnage externe pour une analyse quantitative. Le volume prélevé avec la seringue est donc toujours largement supérieur à celui de la boucle. Aujourd'hui on utilise des injecteurs automatiques.

1.7. Colonne

Les colonnes CLHP sont généralement courtes et droites en acier inoxydable se caractérise par leur géométrie (diamètre intérieur de 4 mm et une longueur de 5 à 30 cm) et par la nature des phases qu'elles contiennent (Figure 1.4). Elles doivent être capables de résister aux fortes pressions. Le débit de la phase mobile ne peut dépasser quelques mL/min. Ces colonnes ont l'avantage de la rapidité de l'analyse, consomment moins de solvant et conduisent à une meilleure résolution de l'analyse. Dans la plupart des analyses une précolonne ou colonne de garde qui ne diffère de la colonne analytique que par sa très faible longueur (1 à 2 cm pour une colonne de 25 cm) permet de protéger la colonne et d'en augmenter la durée de fonctionnement.



Fig. 1.4 Colonne CLHP

1.7.1 Les thermostats des colonnes

La plupart des appareils commerciaux récents sont équipés de dispositifs de régulations de la température ; qui contrôlent la température ambiante jusqu'à 150°C (Fig.1.5). On obtient souvent de meilleurs chromatogrammes en maintenant la température constante à quelques dixièmes de degrés Celsius.



Fig. 1.5 Colonne dans un thermostat

1.9. Interactions moléculaire entre phase mobile et soluté

Les interactions soluté-phase mobile correspondent essentiellement à l'établissement d'interactions diélectriques, de liaisons de type hydrogène ou de Van der Waals.

1.10. Force éluant et polarité

La polarité d'un échantillon et d'un solvant est la tendance de ces deux composés à interagir fortement par polarité. Les composés polaires interagissent très fortement les uns avec les autres. Pour les composés polaires :


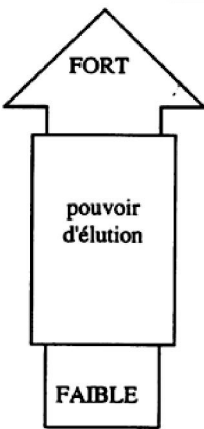
Plus la phase mobile sera polaire, plus elle va entraîner les solutés

Plus la phase mobile sera apolaire, moins elle va entraîner les solutés

Pour les composés moins polaires :

Plus la phase mobile sera polaire, moins elle va entraîner les solutés.

Tableau1. Pouvoir d'élution de la phase mobile en HPLC.

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

Applications

La CLHP est utilisée pour séparer et doser des espèces diverses d'analytes: inorganiques, organiques et biologiques.