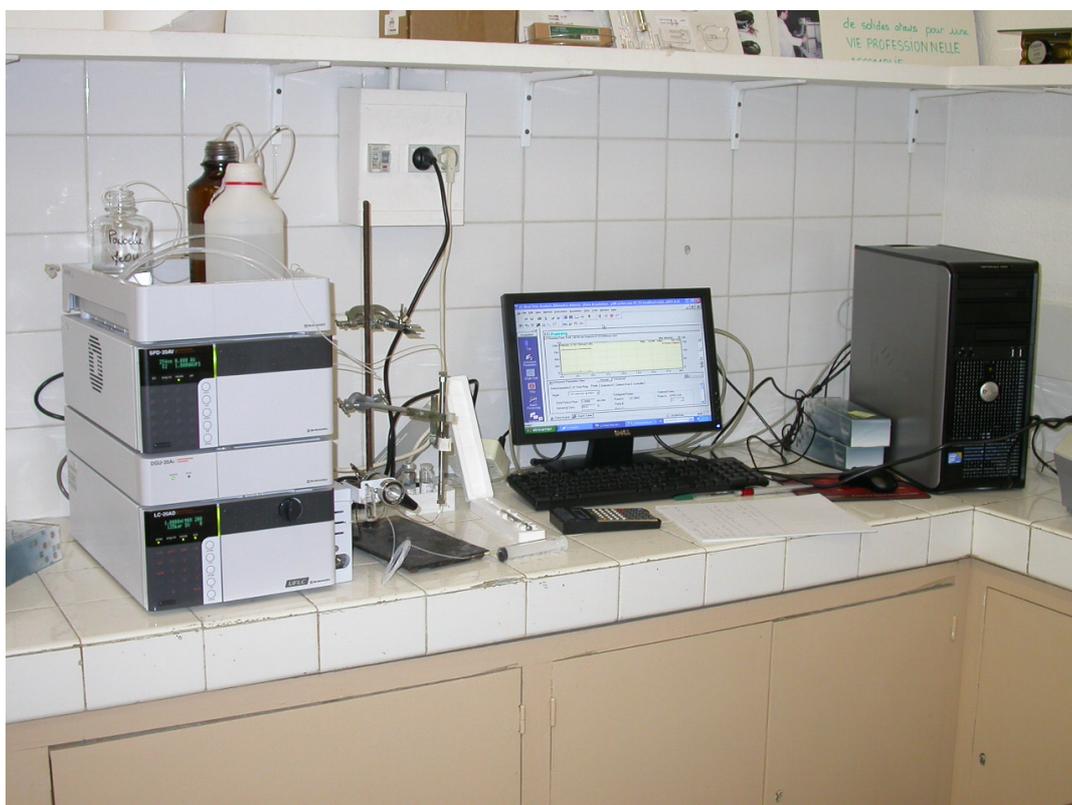


2^{ème} année BTS Bioanalyses
en Laboratoire de Contrôle

Théorie HPLC



L. GODIN
<http://ligodin.free.fr>

l.godin@etsl.fr

TP n°8 : QUALIFICATION DE LA CHAÎNE HPLC Shimadzu

1. GENERALITES SUR LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE	2
1.1. Les supports	3
1.2. Les phases stationnaires	3
1.3. Les phases mobiles	4
1.4. Les Modes de travail	6
Mode isocratique	7
Mode gradient	7
1.5. L'appareillage	8
Les pompes	10
Les injecteurs	12
Les colonnes	13
Les détecteurs	14
Détecteurs spectrophotométriques	14
2. GRANDEURS IMPORTANTES EN CHROMATOGRAPHIE	16
2.1. Loi de Darcy	16
2.2. Grandeurs chromatographiques et facteurs d'identification des solutés	16
2.2.1. Grandeurs de rétention	17
2.2.1.1. Temps de rétention et largeur du pic	17
2.2.1.2. Volumes de rétention	17
2.2.1.3. Facteur de rétention ou de capacité k'	18
2.2.1.4. Facteur de sélectivité ou de séparation α entre deux solutés	18
2.2.1.5. Facteur d'asymétrie des pics	19
2.2.2. Efficacité d'une colonne	19
2.2.2.1. Le nombre de plateaux théoriques N	20
2.2.2.2. La hauteur équivalente à un plateaux théorique H ou H.E.P.T.	20
2.3. Séparation des solutés et résolution	20
2.3.1. Facteur de résolution R_s entre deux pics	20
2.3.2. Optimisation de la résolution R_s	21
2.3.2.1. Augmentation du nombre de plateaux N	21
2.3.2.2. Modification des facteurs de rétention	22
2.3.2.3. Augmentation de la sélectivité α	22
3. GÉNÉRALITÉS SUR LA CAFEINE	23
3.1. Présentation	23
3.2. Pharmacologie	23
3.3. Principaux effets de la caféine	23
3.4. Intoxication	24
3.5. Propriétés physico-chimiques	24

1. Généralités sur la chromatographie liquide haute performance

La Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC en anglais et CLHP en français), initialement appelée Chromatographie Liquide à Haute Pression, est apparue en 1968. Il s'agit, en réalité, d'une amélioration des méthodes chromatographiques liquides sur colonne.

En effet, les inconvénients majeurs de ces méthodes étaient :

- ✓ la lenteur des séparations (environ 1 à 20 heures) ;
- ✓ l'absence de détection aisée et rapide ;
- ✓ la quantité considérable d'échantillon ;
- ✓ l'absence d'automatisation.

La CLHP comble donc ces lacunes. Son succès réside principalement dans la qualité granulométrique de la phase stationnaire. En effet, la mise au point de phase stationnaire de granulométrie plus fine et homogène a ainsi permis d'améliorer considérablement l'efficacité de la chromatographie.

De plus, la vitesse des analyses fut notablement accélérée par la fabrication de colonnes de taille plus petite (5 minutes à 1 heure au lieu de 1 à 20 heures)¹.

Enfin, la possibilité de coupler les résultats d'analyse avec des détecteurs de type spectromètre UV/visible ou spectromètre de masse a favorisé la qualité des études.

Son atout majeur d'agir de manière très précise sur la sélectivité entre les composés par le choix de la colonne (qui contient la phase stationnaire) et de la composition de l'éluant (phase mobile) en exploitant donc les interactions soluté/phase mobile/phase stationnaire, explique son utilisation massive. Ceci se schématise selon le triangle suivant :

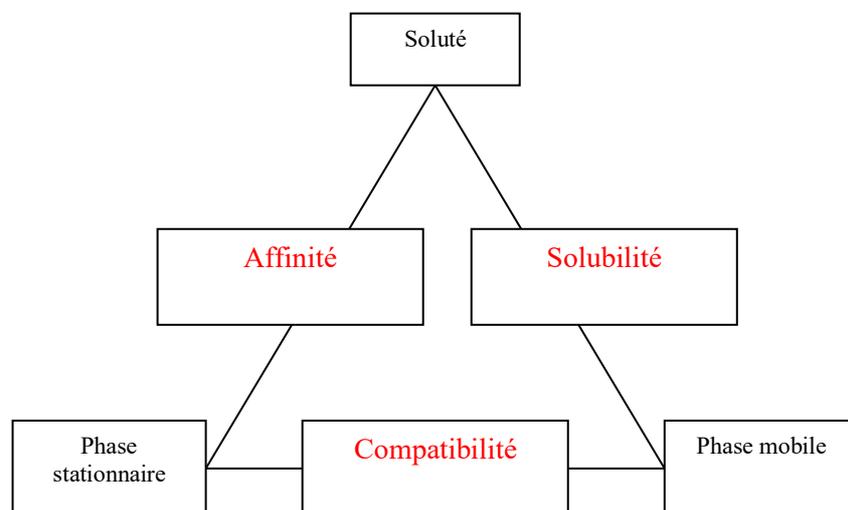


Figure 1 : représentation schématique des interactions soluté/phase mobile/phase stationnaire

¹ L'utilisation de colonnes de petite taille de granulométrie très fine entraînant ainsi une augmentation du nombre de plateaux théoriques due à l'augmentation de la surface d'échange. Notion qui vous sera détaillée dans la partie « Grandeurs importantes en chromatographie ».

Cette méthode permet de séparer des composés de masse molaire variables, de nature chimique différente et même des isomères.

La CLHP est devenue la première technique analytique présente dans les laboratoires de recherche et d'analyses. Elle couvre tous les domaines d'applications.

Voici quelques exemples :

- ✓ l'agroalimentaire : détermination de la teneur en acides carboxyliques dans le vin ;
- ✓ la pharmacie : recherche d'impuretés dans les matières premières, analyse quantitative et identification de principe actif, etc ;
- ✓ la cosmétique et la pharmacie : dosage des parabènes dans les crèmes, les médicaments, etc ;
- ✓ la biopharmacie ou biologie : analyse de masses molaires de polypeptides, protéines, etc.

1.1. Les supports

Les supports sont des solides très finement divisés dont la principale propriété est d'être inerte vis-à-vis des phases stationnaire et mobile.

Le support majoritairement utilisé est le gel de silice formé de grains de diamètre variant de 1,5 à quelques dizaines de micromètres. Ces grains présentent à leur surface des pores de diamètres différents (80 à 300 μm) au travers desquels la phase mobile circule.

Selon l'utilisation souhaitée, la granulométrie du support varie ; par exemple, en UPLC, les diamètres utilisés sont très petits (de l'ordre de 1,5 μm), en méthode analytique, on privilégie des diamètres de l'ordre de 5 μm ² alors qu'en méthode semi-préparative ou préparative, les diamètres des grains atteignent des dimensions pouvant aller jusqu'à 50 μm .

Il faut préciser que depuis quelques années, de nouveaux supports, différents du gel de silice sont apparus, comme des polymères synthétiques, la zircone ou l'oxyde de zirconium (Zr O_2) qui présentent alors une meilleure stabilité en milieu basique/acide.

1.2. Les phases stationnaires

Les phases stationnaires majoritaires sont des phases greffées c'est-à-dire des phases dans lesquelles de véritables liaisons chimiques existent entre la phase stationnaire et le support. Les plus utilisées sont constituées de chaînes aliphatiques greffées, de polarité ou de longueur variables.

En chromatographie de partage, méthode la plus rencontrée, on distingue deux types de phase stationnaire :

1. la phase stationnaire normale (phase minoritaire) : phase polaire qui nécessite alors l'utilisation d'une phase mobile peu polaire (hydrocarbures, par exemple) ;
2. la phase stationnaire inverse (la plus utilisée) : phase non polaire, qui nécessite l'utilisation d'une phase mobile plutôt polaire (mélanges eau/méthanol, eau/acétonitrile, eau/tétrahydrofurane, tampon/solvants organiques).

² Dans notre laboratoire, toutes nos colonnes ont une granulométrie de l'ordre de 5 μm .

Voici par ailleurs quelques exemples de phases stationnaires classées selon la polarité de leurs groupements :

- ✓ polaires (ou hydrophiles) tels que les amines, les nitro et nitriles, les dialcools ;
- ✓ apolaires (ou hydrophobes) tels que les chaînes alkyles de C₄ à C₃₀ (les plus connus sont les chaînes C₈ et C₁₈ de formule – Si - (CH₂)₁₇ – CH₃ pour cette dernière), les phényles.

Ces phases stationnaires à base de silice greffée présentent de nombreux désavantages tels que :

- ✓ une instabilité face aux pH acides et basiques ;
- ✓ un phénomène d'adhérence des chaînes alkyles sur le support dans les phases mobiles très hydrophiles.

Ces défauts ont conduit ainsi à la mise au point de nouvelles phases stationnaires. Citons quelques exemples :

- ✓ des phases alkyles incorporant des groupements polaires (amide, éther ou carbamate) ;
- ✓ de nouvelles polymérisations de la silice pour résister aux pH ;
- ✓ des zircons greffés résistants à pH 13,0 ;
- ✓ des silices fluorées plus hydrophiles que les phases alkyles.

1.3. Les phases mobiles

Elles doivent présenter les propriétés suivantes³ :

- ✓ posséder un pouvoir solvant et une inertie chimique vis-à-vis des composés à séparer ;
- ✓ posséder également une inertie chimique et une insolubilité vis-à-vis de la phase stationnaire.

Le plus souvent, ces phases mobiles sont constituées de plusieurs solvants : mélanges d'eau ou de solutions tamponnées avec un solvant organique dont les proportions peuvent varier ou non au cours de l'analyse. C'est pourquoi le choix de la phase mobile dépend surtout de :

- ✓ la nature des composés à analyser ;
- ✓ la polarité de la phase stationnaire utilisée.

On rappelle, en effet, que le couple phase stationnaire/phase mobile fonctionne en inversé :

phase stationnaire polaire ↔ phase mobile apolaire
phase stationnaire apolaire ↔ phase mobile polaire

Les solvants peuvent donc être classés selon leurs propriétés physiques. Il s'agit principalement de :

- leur polarité ou coefficient de polarité ; cette grandeur, sans dimension, comprise entre 0 et 1, est spécifique d'un solvant (par exemple, l'eau, solvant polaire présente un coefficient de 1, celui du tétrahydrofurane, solvant moins polaire, est de 0,45 et celui du dichlorométhane, composé apolaire est de 0,30) ;
- leur pouvoir d'élution.

³ Pour rappel, il faut se référer à la représentation schématique (figure 1) des interactions soluté/phase stationnaire/phase mobile.

Voici quelques exemples de solvants organiques usuels et de leurs forces éluantes selon ces deux propriétés physiques.

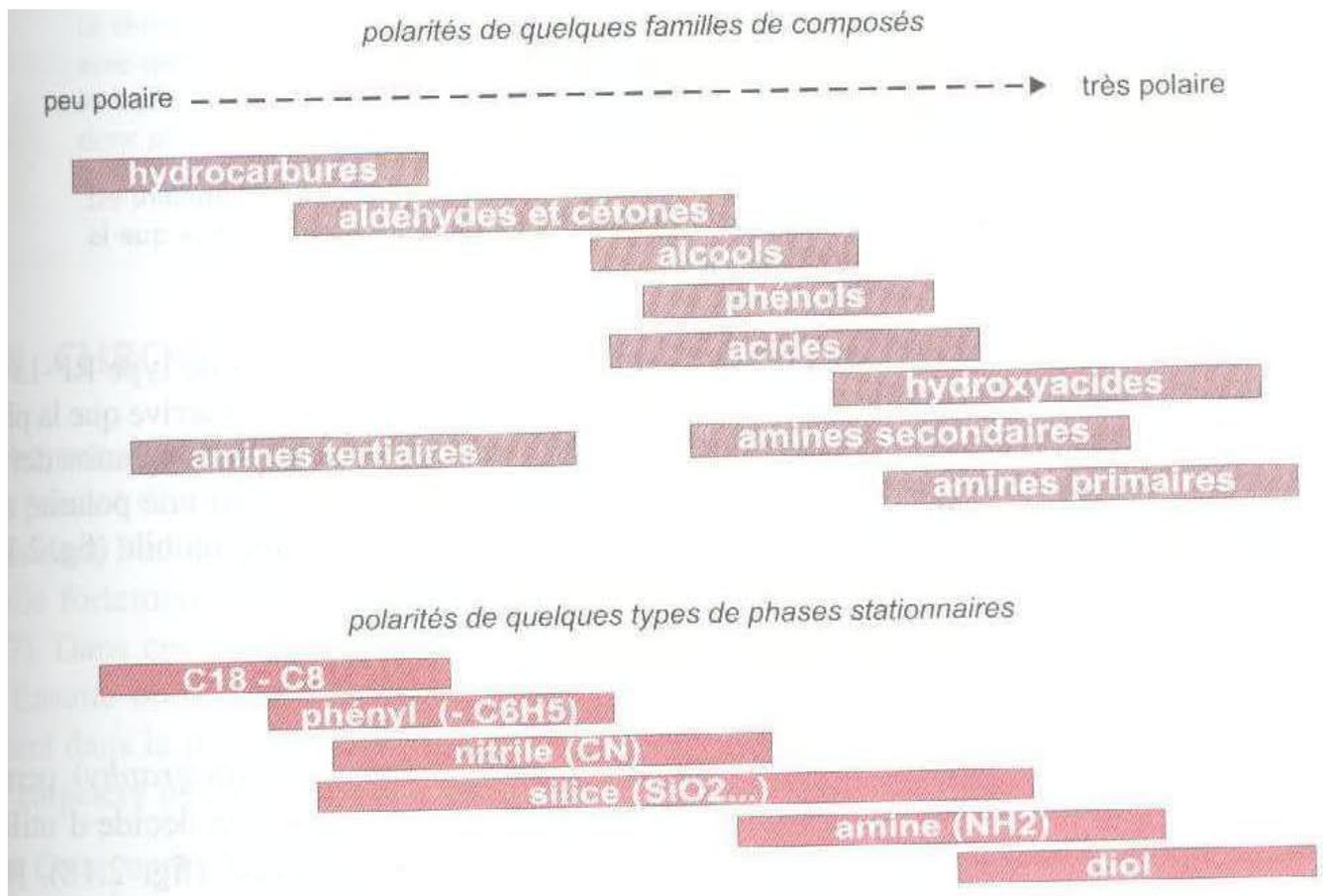


Figure 2 : polarités de quelques familles de composés organiques ainsi que des principaux greffons des phases stationnaires actuelles

Sur phase polaire normale

FAIBLE



FORT

Solvant

- Hexane
- Toluène
- Dichlorométhane
- Tétrahydrofurane
- Acétonitrile
- Méthanol
- Eau

sur phase à polarité inversée

FORT



FAIBLE

Figure 3 : force ou pouvoir d'éluion des solvants utilisés comme phases mobiles

Il est important de noter que selon les solvants utilisés et leur proportion dans le mélange, la viscosité et en conséquence la pression en tête de colonne pourra fortement varier (cf. figure 4 et la loi de Darcy⁴)

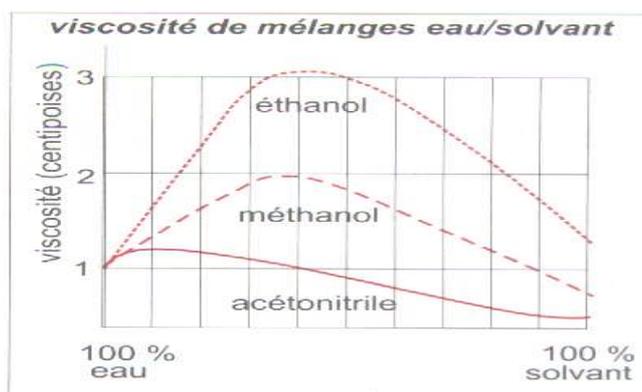


Figure 4 : viscosité de mélanges eau/solvant

Toute la difficulté de la méthode chromatographique est donc de faire le bon choix de phases en fonction des composés à séparer tout en évitant un excès de pression.

Enfin, l'utilisation de solvants en CLHP entraîne le respect de quelques règles élémentaires telles que :

- ✓ l'utilisation de solvants spécifiques CLHP ;
- ✓ l'utilisation d'eau ultrapure exempte de tout composé ionisé (l'eau ultrapure se contamine très vite ; elle doit être fraîche chaque matin : la résistivité doit être de $18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$)⁵ ;
- ✓ la filtration obligatoire des solvants sur des filtres spéciaux (type FHUP ou FHLC 47 mm 0,45/0,5 μm)⁶ ou le dégazage des solvants après filtration par ultrasons ou par la technique de « bullage » par l'hélium, ou le dégazage dit en ligne.

Si le solvant contient des tampons, il est fortement conseillé de ne pas laisser la chaîne sous tampon au repos et de filtrer de nouveau le tampon avant sa prochaine utilisation.

1.4. Modes de travail

On peut fonctionner en CLHP de deux façons :

1. si on utilise un solvant pur ou un mélange de solvants de composition constante dans le temps, on travaille en mode ISOCRATIQUE ;
2. si on utilise un mélange de solvants de composition variable dans le temps, on parle de mode GRADIENT.

⁴ Cette loi importante sera détaillée dans la partie « Grandeurs importantes en chromatographie ».

⁵ De nombreux appareils mesurent également le Carbone Organique Total (COT).

⁶ Il existe aussi des filtres 0,22 μm utilisés surtout en UPLC ou pour éviter les contaminations bactériennes.

Mode isocratique

Ce mode de travail, très fréquemment utilisé, demande un appareillage moins coûteux, ainsi qu'un entretien, une maintenance et une qualification d'appareil moins stricts que ceux requis par le mode gradient. Il est souvent suffisant pour séparer et analyser des mélanges de composés.

Mode gradient

Ce second mode de travail présente de nombreux avantages. Son utilisation permet surtout de diminuer le temps d'analyse tout en respectant à priori une séparation correcte de mélanges complexes de composés.

Exemple de son application : en phase inverse, nous savons que la colonne utilisée contient une phase stationnaire apolaire, entraînant l'utilisation soit d'un solvant (phase mobile) polaire à moyennement polaire (eau associée à du méthanol ou de l'acétonitrile).

Ainsi, d'après la nature des composés à séparer, il est alors possible et très intéressant de travailler selon différentes proportions des solvants de la phase mobile : on pourrait commencer, par exemple, la séparation avec un mélange 80/20 % eau/acétonitrile pour terminer à la composition de 40/60% ou bien selon le cas de figure appliqué lors de votre séance.

Dans la pratique, il existe deux types de gradients, les gradients linéaire et exponentiel. Les premiers utilisent 2 points de concentration de solvant.

Les seconds appliquent un facteur de courbure sur le gradient linéaire préalablement défini par les soins de l'utilisateur dont la valeur peut varier de -10 à +10. Exemple de trois gradients exponentiels de facteurs : -10, 0 et 10 qui sont définies comme suit :

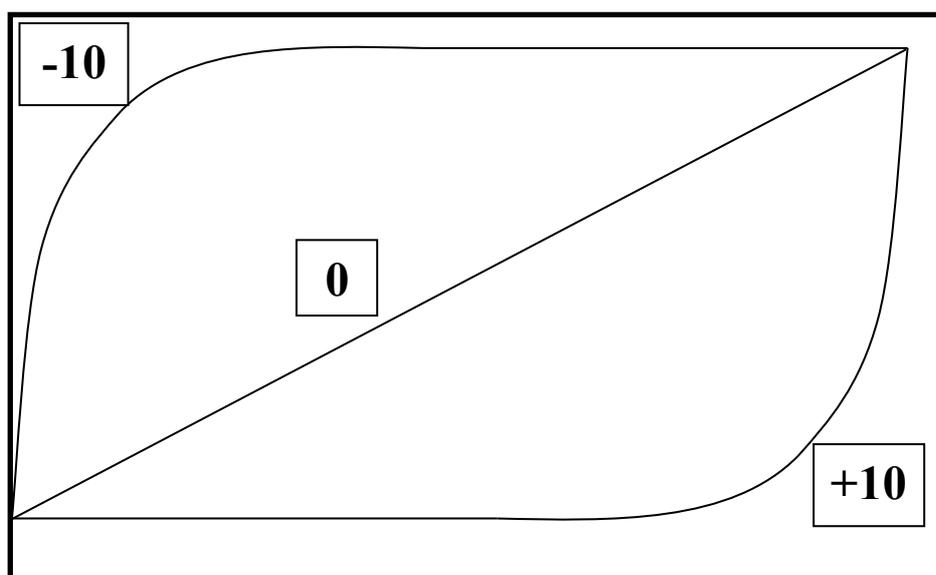


Figure 5 : représentation des différentes "courbes" d'un gradient exponentiel d'éluion

La courbe -10 permet de changer la composition du mélange très rapidement, précisément dès le début du lancement du gradient, à l'inverse du principe de fonctionnement du gradient avec une courbe +10, qui présente les mêmes conditions de travail initiales pendant un long temps et un changement de composition plus tardif. Quant à la courbe 0, elle permet le changement linéaire des conditions de mélange dans la durée de l'analyse. Ces changements de pourcentages de solvants permettront donc d'éluier plus facilement et par conséquent de diminuer favorablement le temps d'étude.

Cependant, ce mode de travail présente des inconvénients :

- en raison de la longueur de tubulures et de celle de la colonne à traverser, on constate qu'il existe un temps de latence entre l'instant programmé pour le changement de pente et le moment exact du changement de conditions de travail ; il faut donc obligatoirement songer à inclure ce délai dans la programmation de l'appareil ;
- on constate des dérives de la ligne de base à l'endroit où les conditions de travail varient, même dans le cas d'une programmation d'une pente douce (effet de bosse) ;
- on note une perte de temps car à la fin de l'analyse, un retour aux conditions initiales est obligatoire pour la colonne ;
- enfin, on constate qu'il est impossible de travailler en circuit fermé entraînant alors d'éventuelles surconsommations de solvants.

1.5. L'appareillage

En raison des pressions élevées qui doivent être appliquées pour assurer des débits raisonnables⁷ lorsqu'on utilise des supports dont le diamètre particulaire est de l'ordre de 2 à 10 μm , l'appareillage requis pour cette méthode d'analyse est ainsi nécessairement plus sophistiqué et plus coûteux que celui utilisé pour d'autres méthodes chromatographiques.

C'est pourquoi, on retrouvera dans tout appareil de CLHP les éléments de base suivants :

- ✓ un ou plusieurs réservoirs (bouteilles) de phases mobiles (200 à 1000 mL) contenant soit des solvants purs, soit des mélanges de concentrations connues ; on y adjoint souvent des dispositifs permettant d'en éliminer les poussières et les gaz dissous⁸ ;
- ✓ une ou plusieurs pompes pour les éluants ;
- ✓ un système d'injection comportant une boucle d'échantillonnage calibrée (de type vanne Rhéodyne) ou un injecteur automatique ;
- ✓ une colonne remplie en acier inox (ou verre) de quelques cm de long ;
- ✓ un détecteur permettant à la fois de mettre en évidence la sortie des solutés de la colonne et de donner un signal proportionnel à la quantité de chacun des composés du mélange analysé ;
- ✓ un flacon qui tient le rôle de poubelle de solvants à vider régulièrement.

⁷ Cf. le descriptif de la loi de Darcy dans « Grandeurs importantes en chromatographie ».

⁸ Il n'est pas nécessaire que le système de dégazage et les filtres fassent partie intégrante de l'appareil. Il est parfois plus facile de traiter le solvant avant son introduction dans le réservoir en le filtrant sous vide à l'aide d'un filtre approprié Millipore.

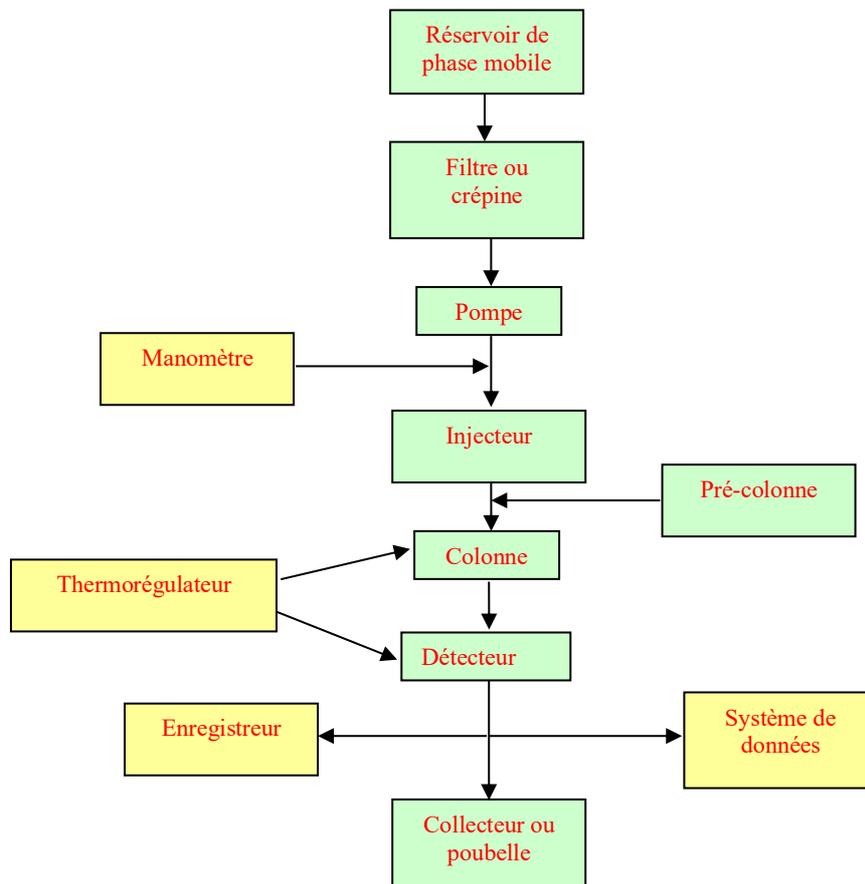


Figure 6 : schéma simplifié du principe de base d'un appareil HPLC

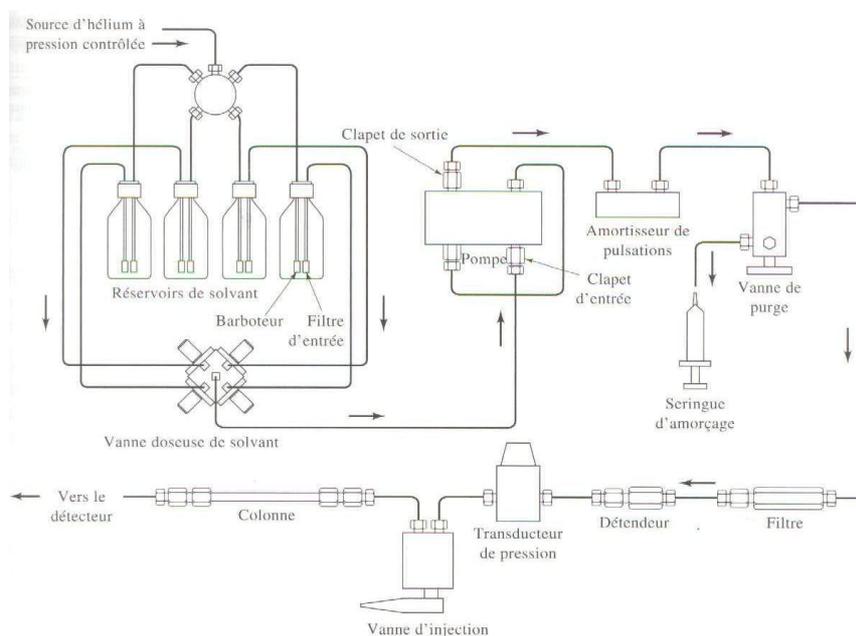


Figure 7 : schéma détaillé d'un appareil de chromatographie liquide à haute performance

Concrètement, chacun de ces éléments est stocké dans un module spécialisé qui se présente dans un boîtier distinct ou intégré dans un même ensemble.

Ces modules sont reliés entre eux par des canalisations de très faible diamètre interne, différent selon leur localisation, pour assurer la circulation de la phase mobile.

Elles peuvent être en acier inoxydable ou en PEEK (polyether-etherketone), polymère souple, aisé d'utilisation, coloré et résistant aux solvants usuels même sous de fortes pressions (maximum 350 bars).

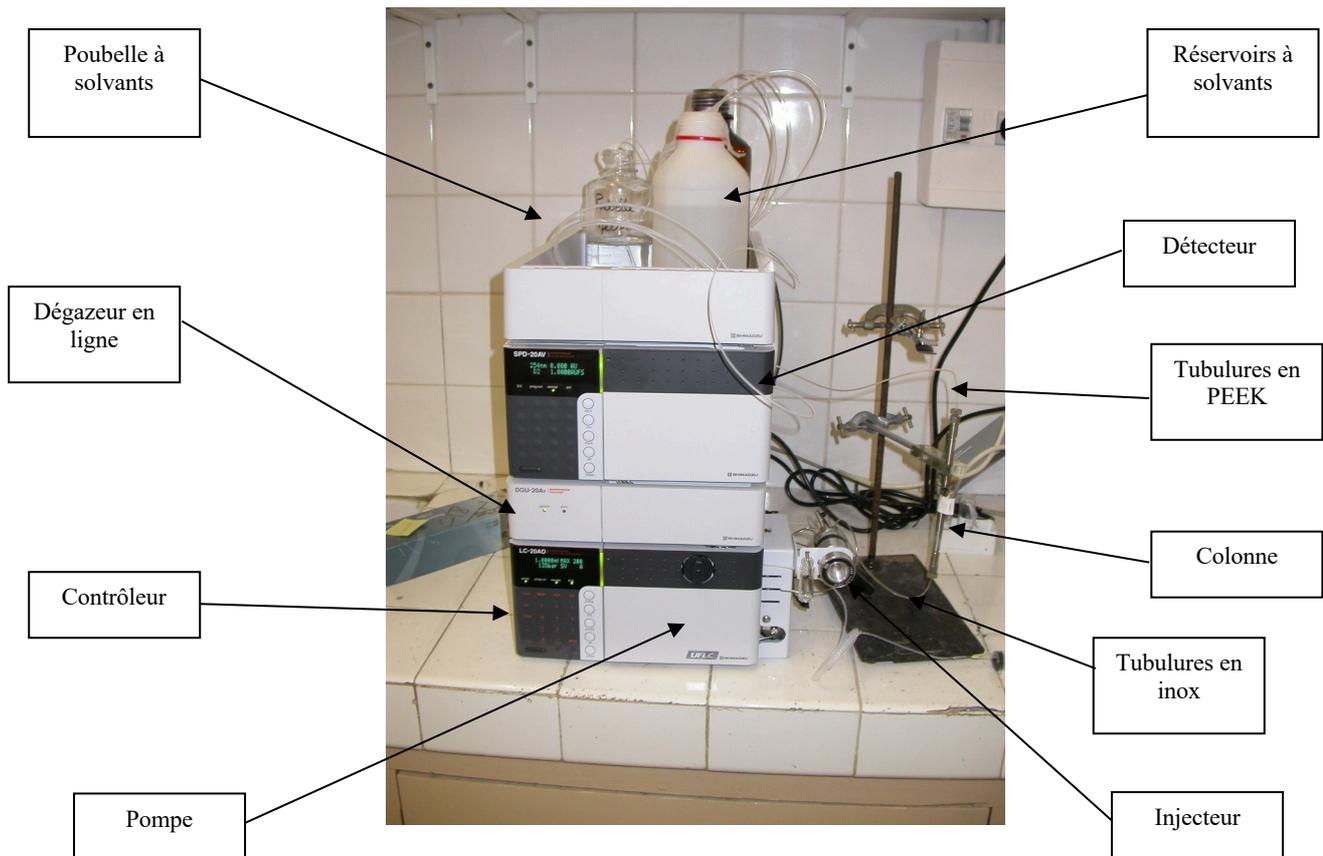


Figure 8 : photo de l'ensemble de la chaîne HPLC utilisée

Les pompes

Toute installation de chaîne HPLC comporte au moins 1 pompe, dont le but est de forcer le passage de la phase mobile à travers la colonne.

Son rôle est double :

1. permettre le maintien d'un débit constant quelles que soient la pression et la variation de composition de la phase mobile ;
2. obtenir un débit suffisant jusqu'à 10 mL/min sans perte d'exactitude et de reproductibilité.

Actuellement, on utilise presque exclusivement deux types de pompes :

- ✓ dite seringue : la phase mobile est alors poussée par une vis sans fin ;
- ✓ dite à piston à mouvement alternatif : deux pistons en série fonctionnent en opposition et entre les deux pistons, avant l'injecteur, se trouve un amortisseur de pulsations (enroulement de tubes aplatis se dilatant pour contrecarrer la variation de pression lors de la phase de pressurisation des pistons).

Suivant les modèles de chaînes CLHP, on peut distinguer deux cas de figure :

- présence d'une pompe unique pour mélanger à basse pression : dans ce cas-là, le dispositif comporte un système d'électrovanne ou vanne de mélange, dédiée à chaque solvant. L'inconvénient majeur de cet appareillage est un dégazage obligatoire, avec de l'hélium, des filtres, ou un dégazeur en ligne, pour chacun des solvants ;

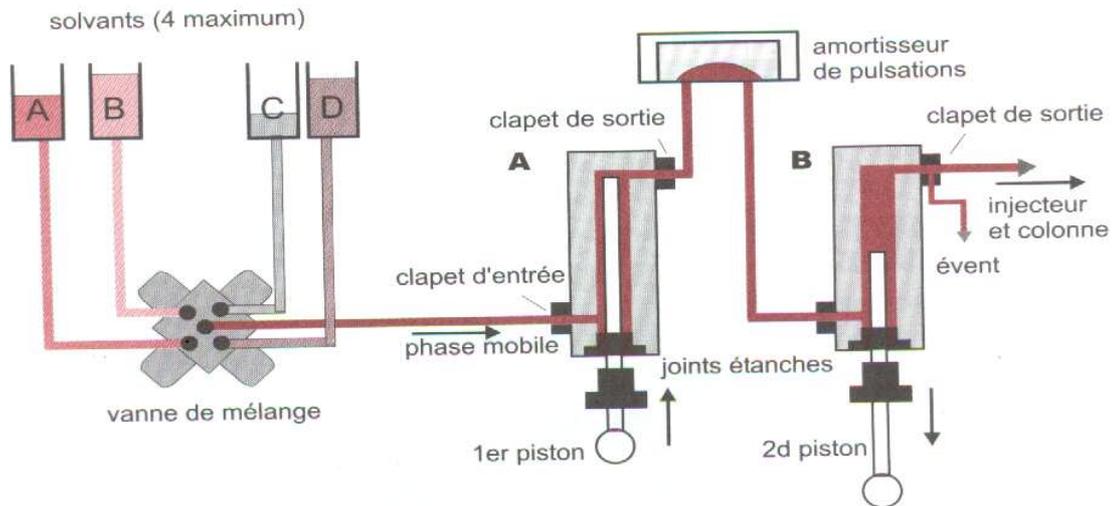


Figure 9 : principe de fonctionnement d'une pompe à basse pression

- présence de plusieurs pompes, chacune étant dédiée à un solvant, le mélange s'effectuant par le débit de chaque pompe sous haute pression. Les pompes sont alors appelées binaire, ternaire ou quaternaire suivant le nombre de solvants qu'elles peuvent mélanger.

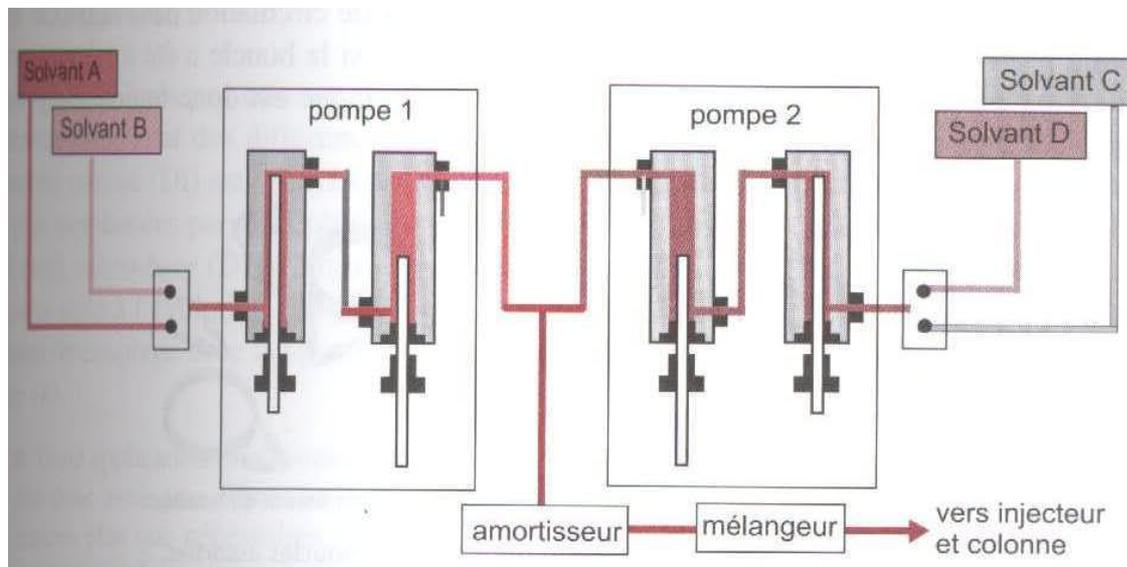


Figure 10 : exemple de configuration pour gradient haute pression

Remarque : pour résister aux pH acides et basiques des solvants, qui sont d'autant plus corrosifs que la pression augmente, toutes les pièces en contact avec la phase mobile doivent être inertes ; on utilise en général du téflon ou parfois des alliages spéciaux.

Dans le cas de la **pompe LC20AD de Shimadzu**, une faible pulsation de débit lente et une période de pulsation réduite permettent une distribution précise.

En réduisant le volume d'envoi par course du piston au niveau du microvolume (10 µL) et en appliquant un entraînement haute vitesse, la pulsation du débit et la période de pulsation ont été réduites à des niveaux significativement plus bas que ceux définis pour les autres appareils, il n'y a donc plus besoin d'amortisseurs de pulsations ! Cette fonction permet d'utiliser des détecteurs de haute sensibilité, y compris des détecteurs d'indice de réfraction et des détecteurs électrochimiques, sensibles à la pulsation de débit. Elle permet également la distribution du gradient avec un degré de précision qui, en général, n'est pas possible même avec des débits à micro-niveaux.

Les injecteurs

Ils sont de deux types. Mais, seul celui dit de « vanne à boucle externe » permet d'injecter une quantité calibrée (donc reproductible) ou un volume calibré (de 10 à 100 µL) de composés à analyser en un temps bref en tête de colonne. Il s'agit d'une vanne haute pression composée de plusieurs voies, manuelle ou motorisée.

La plus connue et la plus couramment utilisée est la vanne dite Rhéodyne.



Figure 11 : modèle de vanne Rhéodyne modèle 7725 en acier inoxydable

Son mode de fonctionnement est en deux étapes :

1. dans la position de chargement ou de remplissage (« load ») : seules la pompe et la colonne étant reliées, l'échantillon à analyser est introduit, à pression atmosphérique, dans une « boucle » avec un volume très supérieur (de l'ordre de 5 fois) au volume d'injection afin d'assurer une constance dans le paramètre de volume injecté ; par exemple, la boucle étant calibrée sur 20 µL, on va prélever et injecter 100 µL d'échantillon ;
2. dans la position injection : l'échantillon est introduit dans le flux de phase mobile par rotation de 60° d'un levier et ce, sans variation importante de la pression dans le circuit allant de la pompe vers l'entrée de la colonne ; la rotation de 60° permet d'inverser le sens de circulation dans la boucle.

Schéma d'une vanne rhéodyne

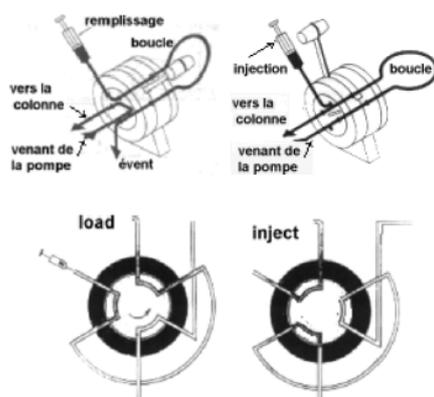


Figure 12 : schémas du fonctionnement d'une vanne Rhéodyne

Les colonnes

Le diamètre intérieur varie de quelques mm (3,9 à 10 mm) à quelques cm. Leur longueur moyenne est de l'ordre de 20 cm (variation de 5 à 30 cm).

Leur remplissage est délicat en raison de la très fine granulométrie⁹ qui les caractérise.

Citons quelques chiffres : dans les laboratoires, en général, la colonne utilisée possède une longueur de 15 cm, un diamètre intérieur de 4,6 mm et une granulométrie de 5 µm. Le nombre de plateaux théoriques¹⁰ (N) est compris entre 40 000 et 60 000 par mètre.

Cependant, depuis quelques années, on assiste à l'apparition de colonnes « nouvelle génération » de plus faible diamètre qui permettent avant tout de réaliser de fortes économies de solvants.¹¹

Enfin, la colonne est souvent précédée d'un élément nommé « pré-colonne » ou colonne de garde.

C'est un petit dispositif court (de 0,4 à 1 cm), rempli de la même phase stationnaire que la colonne avec lequel il est monté mais toutefois avec une granulométrie ordinairement moins fine.

Son rôle est surtout d'être un protecteur de la colonne afin d'améliorer sa durée de vie, qui est sujet, bien évidemment, à l'usure temporelle, tout en préservant ses qualités et performances :

- il protège contre d'éventuels coups de pression ;
- il limite les problèmes de colmatage ;
- en cas de pH limite, il préserve la colonne en saturant la phase mobile en silice.

Pour conclure, il sera temps de changer de pré-colonne :

- quand la pression augmentera de 30 % ;
- quand l'allure des pics sera en dehors des critères de conformité.

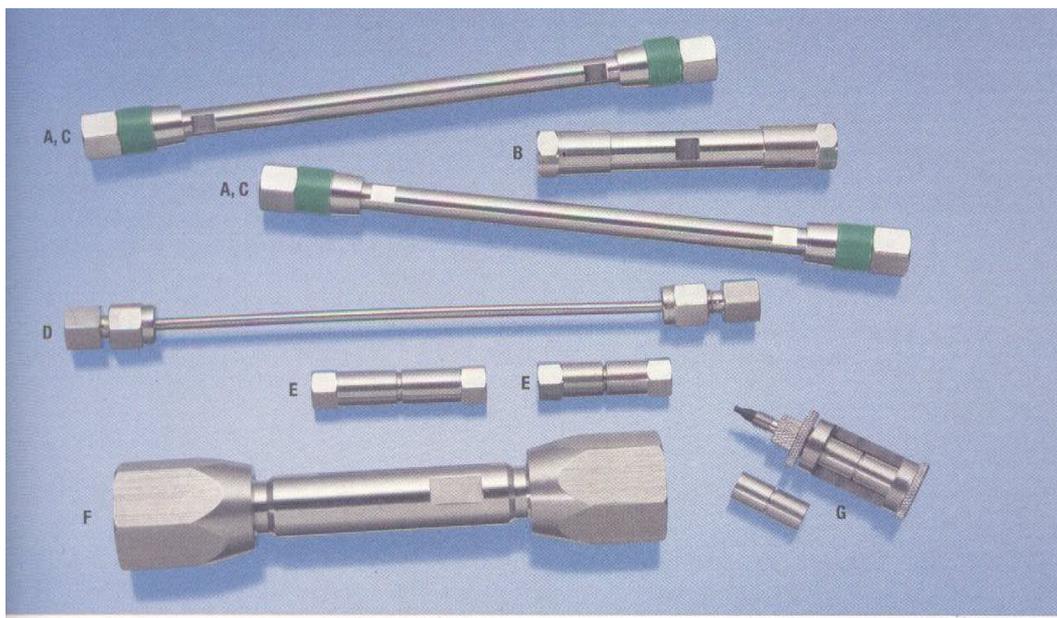


Figure 13 : exemples de colonnes de marque Alltech

⁹ Les phases stationnaires utilisées et les supports sont décrits dans le chapitre précédent.

¹⁰ La notion de nombre de plateaux théoriques est détaillée dans « Grandeurs importantes en chromatographie ».

¹¹ Ces nouvelles colonnes de plus faible diamètre sont baptisées « narrow-bore » et « micro-bore ».

Les détecteurs

Ces systèmes de détection sont des éléments indispensables au système chromatographique CLHP.

Ils permettent de suivre en continu la séparation et de mesurer la concentration instantanée des différents solutés d'un mélange à analyser.

Ils doivent donc présenter les caractéristiques suivantes :

- ✓ être fidèles, sensibles, stables et linéaires ;
- ✓ présenter un faible temps de réponse ;
- ✓ avoir un faible volume mort ;
- ✓ être exploitable en mode gradient, si l'analyse le nécessite.

Etant spécifique de chaque application, il est impératif de connaître exactement le type d'analyses à effectuer pour choisir le détecteur adapté.

Les modes de détection les plus courants dépendent des propriétés optiques des composés élués : absorption, fluorescence et indice de réfraction.

Cependant, depuis quelques années, de nouveaux modes de détection sont apparus. Le plus couramment utilisé est le couplage de la CLHP avec un spectromètre de masse constituant alors un détecteur universel et un puissant moyen d'identification.¹²

Voici résumé en quelques lignes un tableau comparatif de quelques détecteurs :

Tableau comparatif des principaux détecteurs

Type de détecteurs	Limite Optimale de Détection (LOD)	Sensible à la température T	Sensible au débit
Spectro UV/visible	1 pg	faible	Non
Spectrofluorimétrie	10 fg	faible	Non
Réfractométrie	10 ng	10 ⁻⁴ /°C	Oui
Electrochimiques	100 fg	1,5 %/°C	Oui
Conductimétrie	500 pg	2%/°C	Non
Spectromètre de masse	1 pg	-	-

Détecteurs spectrophotométriques

Ce sont les détecteurs majoritairement utilisés.

Leur domaine d'application est l'UV/visible.

Les limites de ces appareils sont les absorptions propres des solvants et des solutés.

Leur fonctionnement est régi par la loi de Lambert Beer¹³ :

- ✓ l'absorbance de la phase mobile est mesurée en sortie de colonne à la longueur d'onde λ ou plusieurs longueurs d'onde ;
- ✓ la phase mobile ne doit pas ou très peu absorbée ;
- ✓ l'intensité de l'absorption dépend du coefficient d'absorption molaire ϵ du soluté.

¹² On constate l'apparition de l'Evaporative Light Scattering Detector (ELSD) qui remplacerait le réfractomètre et le Corona.

¹³ La loi de Lambert Beer lie l'absorbance d'un soluté, sa concentration et le coefficient d'absorption molaire à une longueur d'onde donnée selon la relation $A = \epsilon \times b \times C$ (mol.L⁻¹).

Cette détection correspond donc à une détection sélective.

Ils peuvent être utilisés en mode gradient d'élution.

Dans les meilleurs cas, on peut détecter, au minimum, des quantités de l'ordre du nanogramme.

Il existe plusieurs types d'appareils :

- ✓ à longueur d'onde fixe : $\lambda = 254 \text{ nm}$ (raie la plus intense d'une lampe à vapeur de mercure) ;
- ✓ à longueurs d'onde variable de 200 à 700 nm ;
- ✓ à barrettes de diodes : ce dispositif donne la valeur simultanée des intensités lumineuses sur tout le spectre assurant ainsi la détermination de l'identité des composés séparés ; le spectrochromatogramme obtenu est spectaculaire et sa représentation est souvent en trois dimensions.

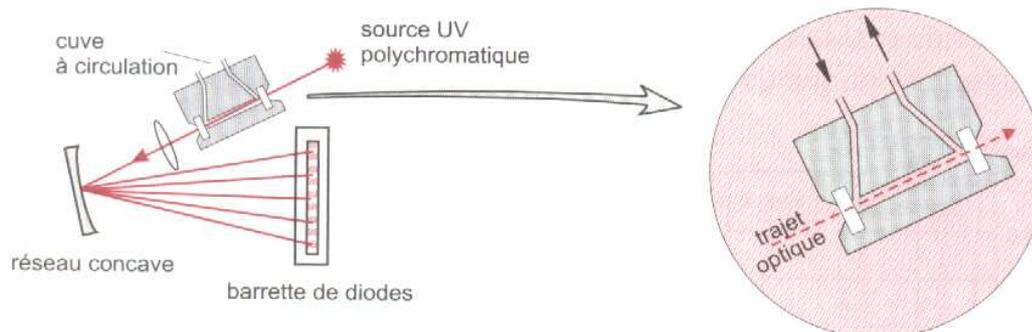


Figure 14 : principe du détecteur à barrette de diodes

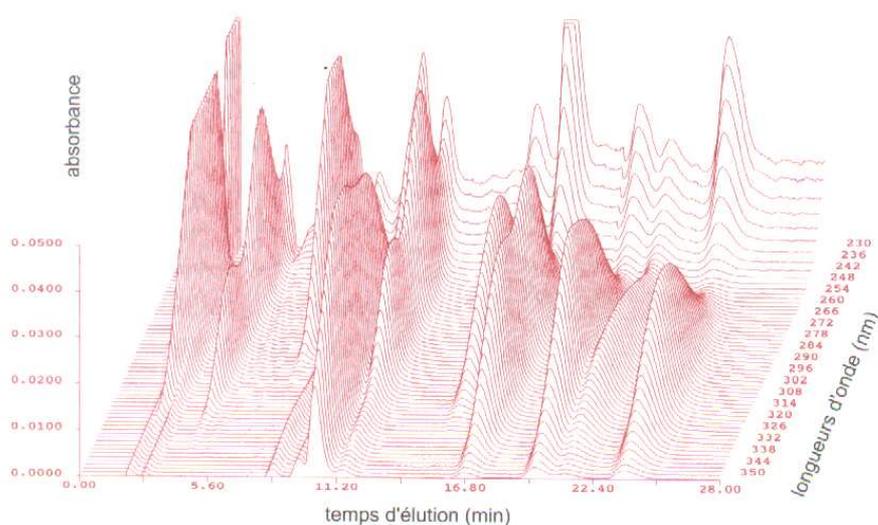


Figure 15 : représentation tridimensionnelle d'une séparation chromatographique

Le **détecteur Shimadzu SPD-20AV** comprend à la fois des lampes halogènes au deutérium et au tungstène. La lampe D est utilisée pour des applications dans l'UV, alors que la lampe W étend les capacités d'analyse à la zone visible. Il dispose de 3 modes de mesures - longueur d'onde unique, longueur d'onde double et balayage de longueur d'onde.

Le mode longueur d'onde double exécute simultanément la détection de deux longueurs d'onde, et peut fournir des chromatogrammes des deux longueurs d'onde, ou un chromatogramme d'une longueur d'onde et un chromatogramme de ratio. Dans le mode de balayage de longueur d'onde, c'est le spectre d'absorbance qui est mesuré. Le mode balayage de longueur d'onde est conçu pour être utilisé pendant que le flux est arrêté.

2. Grandeurs importantes en chromatographie

2.1. La loi de Darcy

La Chromatographie Liquide Haute Performance faisant appel à de nombreuses notions physico-chimiques, comme la pression, le diamètre des particules du support, il est important ici de rappeler la loi de Darcy qui relie tous ces éléments entre eux selon l'équation suivante :

$$P = \frac{32 \cdot \eta \cdot L \cdot V_{flux}}{D^2 \cdot d_p^2}$$

Avec P la différence de pression ou perte de charge dans la colonne,
 η la viscosité de la phase mobile, L la longueur de la colonne, V_{flux} le débit de la phase mobile, D le diamètre de la colonne et d_p le diamètre des particules.

2.2. Grandeurs chromatographiques et facteurs d'identification des solutés

La Chromatographie Liquide Haute Performance est une méthode d'analyse physico-chimique très utilisée qui fait intervenir des mécanismes d'échanges soluté / phase mobile / phase stationnaire basés sur les coefficients d'adsorption ou de partage K^{14} définis par la relation suivante :

$$K = \frac{c_S}{c_M}$$

avec c_S la concentration analytique du soluté dans la phase stationnaire, et c_M celle dans la phase mobile. Idéalement, c_S est toujours proportionnelle à c_M . On parle alors de chromatographie linéaire¹⁵. Le résultat obtenu après analyse se traduit alors par une courbe, type gaussien, appelé chromatogramme.

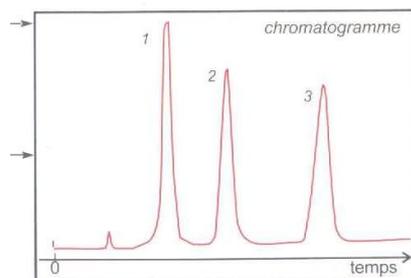


Figure 16 : représentation d'un chromatogramme type

Celui-ci correspond à la variation au cours du temps d'un paramètre relié à la concentration instantanée du soluté en sortie de colonne telle que :

$$\text{Intensité de signal} = f(\text{temps})$$

¹⁴ La notion de coefficient de partage K est reliée à la notion de facteur de rétention k' telle que $k' = K \times (V_S/V_M)$. Cette subtilité est rappelée dans le chapitre sur le facteur de rétention k' .

¹⁵ Cependant, ce principe n'est pas respecté dans tous les cas : par exemple, dans la chromatographie d'adsorption, ceci n'est pas vérifié.

2.2.1. Grandeurs de rétention

Comme nous l'avons décrit dans le paragraphe précédent, un pic idéal sur un chromatogramme a le même aspect que la représentation graphique de la loi Normale de distributions des erreurs aléatoires : il suit une courbe de Gauss (cf. figure 17).

Chaque pic de produit peut donc être étudié et caractérisé par des grandeurs chromatographiques. Nous nous proposons maintenant de les détailler.

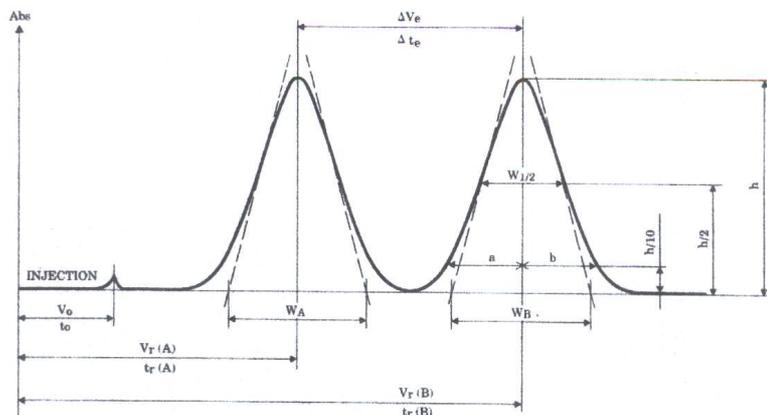


Figure 17 : différentes grandeurs chromatographiques

2.2.1.1. Temps de rétention et largeur du pic

Un constituant est caractérisé par son temps de rétention t_R , qui représente le temps écoulé entre l'instant d'injection et celui qui correspond sur le chromatogramme au maximum du pic qui lui est lié.

Idéalement, le temps de rétention t_R est indépendant de la quantité injectée.

Le temps t_0 ou t_M correspond au temps mort : temps de sortie d'un composé non retenu sur la colonne (comme l'acétone ou la thiourée en phase inverse).

La largeur du pic est symbolisée par w et on distingue notamment :

- ✓ la demi valeur du pic : largeur du pic à mi-hauteur ($w_{1/2}$) ;
- ✓ la largeur à la base du pic (w) entre les tangentes.

2.2.1.2. Volumes de rétention

Les volumes de rétentions bruts V_R sont les volumes de phase mobile utilisés pour éluer les solutés à leur concentration maximale depuis leur injection. Il est donné par la relation suivante :

$$V_R = D \times t_R \text{ avec } D \text{ le débit de la phase mobile}$$

Le volume mort V_0 ou V_M est le volume de phase mobile contenu dans la colonne. De même que précédemment, le volume mort est donné selon la relation suivante :

$$V_0 = D \times t_0 \text{ avec } D \text{ le débit de la phase mobile}$$

Remarque : on peut également calculer des temps de rétention réduits t_R' et des volumes de rétention réduits V_R' qui sont alors les grandeurs caractéristiques d'un soluté pour une colonne donnée (c'est-à-dire en fonction du volume mort de la colonne).

2.2.1.3. Facteur de rétention ou de capacité k'

Ce facteur, encore appelé facteur de capacité, est un paramètre important qui permet de décrire la vitesse de progression des solutés dans la colonne.

Il traduit le rapport des quantités de substances se trouvant entre les deux phases¹⁶.

Il est indépendant du débit de la phase mobile et de la longueur de la colonne.

Il se détermine tout simplement par la mesure des temps t_0 et t_R tel que :

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

L'analyse de ce facteur montre deux éléments importants :

- ✓ lorsque k' est nul, alors le composé n'est pas retenu par la phase stationnaire ;
- ✓ plus k' est grand, plus le composé est retenu.

En théorie, un bon facteur de rétention se situe entre 1 et 10. Cependant, dans les faits, on préférera une limite de 2 en cas de risques d'impuretés ou de salissures au temps mort.

On constate également que :

des valeurs trop élevées de k' (c'est-à-dire supérieures à 20 ou 30) entraînent un élargissement du pic, qui traduit une dégradation de la sensibilité et une augmentation du temps d'analyse, provoquant alors des coûts supplémentaires liés à l'augmentation du volume de solvants utilisés ;

des valeurs trop faibles, à l'inverse, entraînent une élution trop rapide et donc une mauvaise séparation.

2.2.1.4. Facteur de sélectivité ou de séparation α entre deux solutés

Il s'agit d'une grandeur qui concerne deux solutés A et B.

Elle est donnée par la relation suivante :

$$\alpha = \frac{t_{RB} - t_0}{t_{RA} - t_0}$$

ou encore :

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A}$$

avec B le composé le plus retenu.

Remarque : cette grandeur, sans dimensions, est toujours supérieure à 1.

¹⁶ Il faut préciser que le support en CLHP ne joue aucun rôle dans l'équilibre.

2.2.1.5. Facteur d'asymétrie des pics

En théorie, les pics d'élution chromatographiques ont l'allure d'un pic gaussien. En réalité, les chromatogrammes expérimentaux sont loin d'être idéaux.

La raison de cette différence est de deux ordres :

1. une irrégularité de concentration des constituants se produit en tête de colonne lors de l'injection ;
2. la vitesse de la phase mobile est différente selon sa localisation dans la colonne : elle est nulle au niveau des parois et maximale au centre du tube.

Toutes ces différences se traduisent par une asymétrie de pic caractérisée par deux paramètres selon les pharmacopées :

- ✓ le facteur d'asymétrie F_a qui doit être compris entre 0,8 et 1,2 est défini comme étant le rapport entre la largeur du pic au vingtième de sa hauteur et deux fois la distance entre la perpendiculaire abaissée du maximum du pic et le bord d'entrée au vingtième de sa hauteur (soit l'équivalent de 5 %);
- ✓ le facteur de traînées F_t mesuré à 10 % de la hauteur du pic.

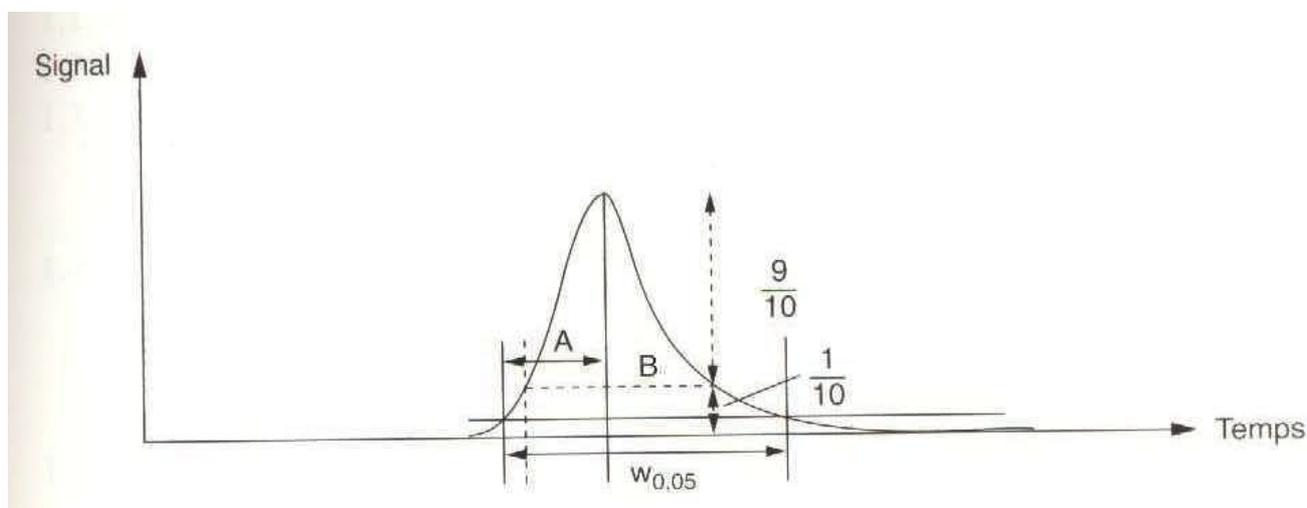


Figure 18 : représentation graphique explicative pour calculer le facteur d'asymétrie d'un pic

2.2.2. Efficacité d'une colonne

On distingue deux types de grandeurs principales définies à partir de la théorie des plateaux¹⁷.

¹⁷ Cette théorie trouve son origine dans les travaux de Martin et Syngé, les pionniers de la méthode. Cette théorie explique avec succès la forme gaussienne des bandes ainsi que leur vitesse de progression à travers la colonne. Cependant, elle a été remplacée par une autre théorie (cinétique) car elle ne permettait pas d'expliquer le phénomène d'élargissement des pics que l'on peut constater.

2.2.2.1. Le nombre de plateaux théoriques N

Il s'agit d'une grandeur qui définit l'efficacité théorique de la colonne.

Plus cette valeur est grande, plus la colonne est dite efficace. Cette valeur peut varier de quelques centaines à plusieurs centaines de milliers de plateaux.

Il dépend à la fois du soluté et des conditions opératoires utilisées.

Pour le calculer, il existe plusieurs formules de calculs. Nous choisirons dans notre cas la relation suivante :

$$N = 16 \times \left(\frac{t_R}{w} \right)^2$$

2.2.2.2. La hauteur équivalente à un plateau théorique H ou H.E.P.T.

Cette valeur fait appel à la notion de plateau théorique et dépend de la longueur de la colonne telle que la colonne serait divisée en un certain nombre de petits disques fictifs (N), encore appelés plateaux, de même hauteur H.

Pour chacun d'eux, la concentration du soluté dans la phase mobile est en équilibre avec la concentration dans la phase stationnaire de ce soluté.

Plus cette grandeur H est petite, mieux c'est (à longueur de colonne constante, bien entendu).

On la détermine donc par la relation suivante :

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

avec L la longueur de la colonne (exprimée le plus souvent en cm)

Les valeurs habituelles de H sont comprises entre quelques dixièmes de cm et moins d'un centième de millimètre.

Remarque : ces deux grandeurs (H et N) sont très souvent utilisées par les fabricants pour démontrer les performances des colonnes. Toutefois, pour que ces deux paramètres aient un sens lors de la comparaison entre colonnes, il est indispensable qu'ils soient déterminés avec le même composé.

2.3. Séparation des solutés et résolution

Pour qu'une séparation soit réussie, on doit obtenir autant de pics gaussiens qu'il y a de produits à séparer. De plus, il faut que les pics obtenus soient suffisamment séparés les uns des autres.

2.3.1. Facteur de résolution R_S entre deux pics

Cette valeur représente la mesure de la qualité effective de la séparation de deux pics voisins.

Elle est calculée à partir du chromatogramme à l'aide des largeurs de pics w obtenues par les tangentes et se définit, en règle générale, par la relation suivante¹⁸ :

¹⁸ Comme pour calculer le nombre de plateaux théoriques N, il existe plusieurs formules de calculs. Mais notre choix se portera sur celle-ci.

$$R_s = 2 \times \frac{t_{RB} - t_{RA}}{W_A + W_B}$$

avec B le composé le plus retenu

On considère, en analyse quantitative, que la séparation est acceptable à partir de $R_s > 1,5$ alors qu'en analyse qualitative, la valeur seuil suffisante est 1.

Cependant, dans la pratique, il vaut mieux avoir une meilleure résolution, surtout si les deux surfaces de pics sont identiques.¹⁹

Toutefois, des valeurs trop supérieures ne seraient pas nécessaires car elles prolongeraient inutilement l'analyse.

L'idéal est donc d'obtenir une résolution suffisante et non maximale.

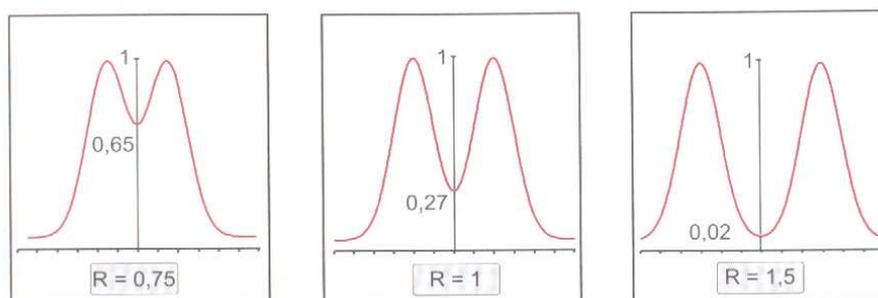


Figure 19 : exemples représentatifs de facteurs de résolution

2.3.2. Optimisation de la résolution R_s

Pour optimiser une séparation, il est possible d'agir sur les trois paramètres suivants :

- le nombre de plateaux théoriques N ;
- le facteur de rétention k' ;
- le facteur de sélectivité α (ce dernier facteur étant de loin le plus puissant).

2.3.2.1. Augmentation du nombre de plateaux N

Cette grandeur caractérisant l'efficacité de la colonne, l'augmenter correspondrait à diminuer la largeur du pic, c'est-à-dire à rétrécir la largeur du pic afin d'éviter qu'il chevauche le pic voisin.

Il existe donc deux façons d'augmenter l'efficacité théorique de la colonne :

- ✓ allonger la colonne tout en restant dans une limite raisonnable (si les produits restent plus longtemps dans la colonne, ils risquent d'être altérés et d'augmenter la durée d'analyse) ;
- ✓ diminuer la hauteur d'un plateau théorique en modifiant :
 - la taille des particules de phase stationnaire ;
 - la vitesse de la phase mobile (donc le débit).

La seconde solution étant d'ailleurs bien meilleure !

¹⁹ L'usure de la colonne influence également ces valeurs seuil. Il faut en tenir compte durant ses appréciations.

2.3.2.2. Modification des facteurs de rétention

Ce phénomène ne peut concerner que le composé le plus retenu (c'est-à-dire le composé B dans notre exemple). Dans la limite de $k'_B < 10$, l'augmentation de ce facteur k'_B entraînera l'amélioration de la séparation entre les deux pics.

De plus, selon la définition du facteur de rétention, si celui-ci s'accroît, alors les volumes de rétention suivent le même processus.

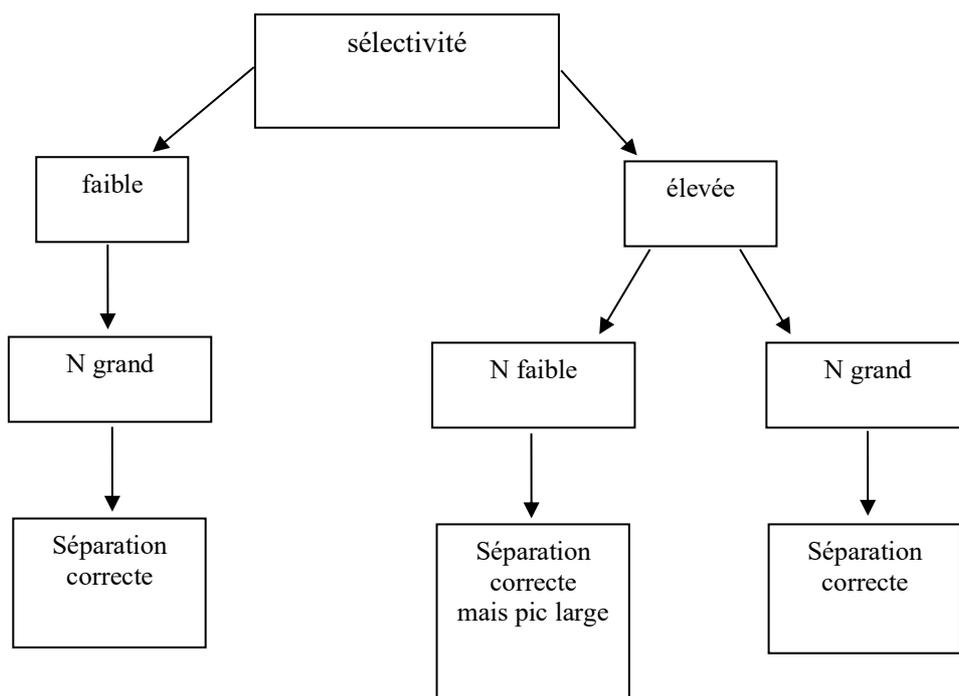
Ainsi, un composé apolaire voit son affinité pour la phase stationnaire apolaire augmenter si la polarité de la phase mobile augmente et inversement avec les composés polaires.

2.3.2.3. Augmentation de la sélectivité α

Ce facteur étant directement lié aux coefficients de partage des solutés²⁰, il s'agit de la meilleure solution pour optimiser une séparation. Différentes méthodes s'offrent à nous :

- Avant tout, dans le choix de la colonne ;
- Dans l'optimisation du solvant de la phase mobile ;
- Enfin, dans la dilution de l'échantillon.

Le schéma suivant résume parfaitement les différents cas de figure rencontrés :



²⁰ Cf. la partie détaillée sur le coefficient de partage K et le facteur de rétention k' .

3. Généralités sur la caféine

3.1. Présentation

La **caféine**, aussi désignée sous les noms de **théine**, **1,3,7-triméthylxanthine** ou **méthylthéobromine**, est un alcaloïde de la famille des méthylxanthines, présent dans de nombreux aliments, qui agit comme stimulant psychotrope chez les mammifères et comme léger diurétique. La caféine interagit avec d'autres molécules alcaloïdes proches, comme la nicotine par exemple. Les alcaloïdes ont la particularité de se fixer sur les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine, induisant une sensation de bien-être et d'augmentation de la vigilance et de l'attention.

La caféine a été isolée en 1819 par le chimiste allemand Friedlieb Ferdinand Runge.

La caféine est un métabolite secondaire présent dans les graines, les feuilles et les fruits de différentes plantes où elle agit comme insecticide naturel, paralysant ou tuant les insectes qui les consomment. En revanche, chez les mammifères, la caféine agit surtout comme stimulant du système nerveux central et du système cardiovasculaire, diminuant temporairement la somnolence et le temps de réaction et augmentant l'attention.

Des boissons très populaires contiennent de la caféine comme le café, le thé et le maté. On en trouve également dans certains sodas et boissons énergisantes à base de dérivés de la noix de kola, qui en contient de grandes quantités. Le cacao en contient aussi un peu.

La caféine est notamment présente dans les graines du caféier et du guarana ainsi que dans les feuilles de yerba maté et du théier. Du fait de sa présence dans des plantes autres que le caféier, elle est parfois appelée « théine », « **guaranine** » ou encore, « **matéine** ». Il s'agit pourtant de la même molécule, de formule brute $C_8H_{10}N_4O_2$, avec les mêmes effets même si elle n'est consommée ni seule, ni de la même manière et qu'elle n'est pas présente à la même concentration que dans le café.

De fait, la caféine est la substance psychoactive la plus consommée au monde ; elle est légale dans tous les pays, à la différence d'autres substances psychoactives. Le profil psychotrope analeptique stimulant de la caféine a été défini par électroencéphalographie quantitative après administration orale d'une dose élevée (400 mg) versus placebo chez des sujets volontaires sains. Elle entraîne de la tachycardie et une stimulation mentale pendant plusieurs heures suivie d'insomnie. En Amérique du Nord, 90 % des adultes consomment de la caféine quotidiennement. La Food and Drug Administration liste la caféine parmi les « substances alimentaires à buts multiples généralement reconnues comme sans danger » aux doses habituelles, mais toxiques au-delà d'une certaine dose.

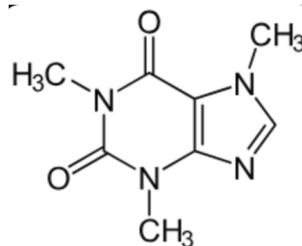


Figure 21 : Molécule de caféine

3.2. Pharmacologie

La caféine, qui est un stimulant du système nerveux central et du métabolisme, est utilisée dans un but à la fois récréatif et médical pour réduire la fatigue physique et restaurer la vigilance quand une faiblesse ou une somnolence inhabituelle se produit. La caféine stimule le système nerveux central au niveau du cerveau, il en résulte une vigilance accrue, un flot de pensées plus claires et rapides, une augmentation de la concentration et une coordination générale du corps améliorée. Une fois dans le corps, elle a une chimie complexe et agit au travers des différents mécanismes décrits ci-dessous, principalement par voie rénale et sous forme non métabolisée. Une faible proportion est éliminée par voie fécale.

3.3. Principaux Effets de la caféine

De façon générale, la caféine est un [stimulant](#) et un [psychostimulant](#). Sur le [système cardiovasculaire](#), ce [composé bioactif](#) entraîne une accélération du [rythme cardiaque](#) et une [vasodilatation](#). Elle présente également des effets au niveau du [système respiratoire](#) et [gastro-intestinal](#). De plus, elle agit au niveau des [muscles squelettiques](#), du [flux sanguin rénal](#), de la [glycogénolyse](#) et de la [lipolyse](#).

Il y a amélioration des performances physiques et augmentation de la [diurèse](#). La caféine peut provoquer une certaine amélioration de l'[humeur](#), du niveau d'éveil et des performances intellectuelles. En contrepartie, l'arrêt de la consommation habituelle ou un simple oubli de prise cause souvent des symptômes de [sevrage](#) : [fatigue](#), [maux de tête](#), voire [état dépressif](#). Du fait de ces symptômes de sevrage, il semble que les effets réels de psychostimulation de la caféine aient été parfois surévalués par la recherche. Ceci viendrait du fait que dans certaines études, l'état psychique dégradé lors de l'arrêt de la consommation de caféine (sevrage et manque) a été considéré comme l'état d'une personne ne consommant pas habituellement de café. L'amélioration par la disparition des effets de sevrage consécutive à un apport a alors pu être interprétée comme étant un effet bénéfique de la caféine.

3.4. Intoxication

La caféine est classée dans la catégorie des substances moyennement toxiques.

L'intoxication aiguë à la caféine intervient habituellement aux environs de 300 milligrammes, selon le poids corporel et le niveau de tolérance à la caféine. Elle peut entraîner un état de surstimulation du système nerveux central, avec des symptômes différents de ceux observés lors d'overdoses d'autres [stimulants](#). Ils peuvent inclure [anxiété](#), excitation, [insomnie](#), [flushing](#) cutané (rougeur de la face), [polyurie](#), troubles [gastro-intestinaux](#), [contraction involontaire](#), flot de pensées et de paroles incohérentes, irritabilité, [arythmie cardiaque](#), [tachycardie](#) et agitation psychomotrice. Dans le cas d'overdoses plus importantes, [manie](#), [dépression](#), erreurs de jugement, désorientation, [désinhibition](#), [délire](#), [hallucination](#), [psychose](#) et [rhabdomyolyse](#) (destruction de cellules musculaires) peuvent se produire. Il est recommandé de ne pas dépasser une consommation quotidienne de caféine (toutes sources) de 600 mg/j, ce qui équivaut à environ six tasses de café ou deux à trois litres de thé par jour.

La dose létale 50 ([DL₅₀](#)) chez le rat est de 192 mg/kg. La [DL₅₀](#) de la caféine chez l'humain, qui dépend du poids et de la sensibilité individuelle, est estimée à environ 150 à 200 mg/kg de masse corporelle, soit pour un adulte normal approximativement quatre-vingt à cent tasses de café, prises en un temps limité qui va dépendre de la [demi-vie](#). Atteindre une telle dose létale avec un café ordinaire est extrêmement difficile, cependant, des cas de mort par surdose de caféine en comprimé ont été rapportés, ainsi que des symptômes graves d'overdoses nécessitant une hospitalisation se produisant dès deux grammes de caféine.

3.5. Propriétés physico-chimiques

La caféine — $C_8H_{10}N_4O_2$, ou 1,3,7-tri[méthylxanthine](#) ou encore 1,3,7-triméthyl-1H-[purine](#)-2,6-dione — est une molécule de la famille des [méthylxanthines](#), qui comprend également la [théophylline](#) et la [théobromine](#). Sous sa forme pure, elle consiste en une poudre blanche d'un goût extrêmement amer. La caféine est modérément soluble dans l'eau et les [solvants organiques](#). À haute [température](#), la [solubilité](#) de la caféine dans l'eau augmente. La caféine, stable dans les milieux relativement acide et basique, est une [base faible](#) et peut réagir avec des [acides](#) pour donner des sels. Cependant, dans une [solution aqueuse](#) normale, elle n'est pas ionisée. Dissoute, elle peut être présente sous forme de [dimères](#) ainsi que de [polymères](#). La caféine est une substance absorbant dans l'[UV](#) avec un maximum à la longueur d'onde de 274 nm.