

Quelle évolution pour la CLHP dans l'industrie chimique ?

par Mme M. Courtier et M. J.-P. Thomas

(Rhône Poulenc Industries, Direction des recherches et du développement, Centre de Recherches Nicolas Grillet, 13, quai Jules-Guesde, 94400 Vitry-sur-Seine)

Les techniques de la CLHP se sont rapidement développées dans les divers domaines de la chimie fine et de la biochimie. On discerne

La CLHP aujourd'hui

A partir des années 50, la chromatographie en phase gazeuse s'est développée rapidement. Elle a radicalement transformé l'analyse des composés chimiques assez facilement volatilisables et l'industrie pétrochimique en a tiré un immense avantage.

De façon assez paradoxale, la chromatographie liquide sur colonne, qui était connue depuis longtemps et dont le champ d'application est théoriquement plus vaste que celui de la chromatographie gazeuse, restait peu développée à l'époque. C'était une méthode très artisanale, réservée à quelques chercheurs patients. Elle nécessitait des colonnes dont l'efficacité était limitée par la hauteur de plafond des laboratoires...

Il faut toutefois faire des exceptions en ce qui concerne la chromatographie d'échange d'ions dont l'évolution a été constante, la chromatographie d'exclusion qui a permis de déterminer la répartition des masses moléculaires des polymères et les applications industrielles de la chromatographie d'adsorption puisque la pénicilline, par exemple, a, dès le début de sa production, été purifiée par cette méthode.

Vers 1970, l'idée d'accroître la vitesse et l'efficacité des colonnes de chromatographie liquide se répandait. Grâce à l'apparition de supports constitués par des particules de diamètres inférieurs à 30 µm présentant une répartition granulométrique régulière, grâce également à l'existence de pompes permettant d'obtenir des pressions suffisantes pour assurer la percolation des liquides au travers de ces supports, la chromatographie liquide sous haute pression ou CLHP voyait le jour.

Par la suite, on améliorait les caractéristiques des phases stationnaires, d'une part en augmentant leur surface spécifique et d'autre part, en conférant aux particules une structure de microsphères régulières et de répartition granulométrique étroite. Il était alors possible tout à la fois de diminuer la longueur des colonnes (à efficacité égale) et de diminuer la perte de charge. Les pressions nécessaires pour assurer la percolation pouvaient être abaissées et la CLHP devenait la chromatographie liquide à haute performance.

Grâce aux travaux d'équipes universitaires et notamment celles des Professeurs Guiochon et Rosset à Paris, celle du Professeur Porthault à Lyon, grâce également à la contribution industrielle, les bases théoriques et la technologie de la CLHP évoluèrent rapidement. Ses méthodes sont devenues fiables et de plus en plus simples à mettre en œuvre.

Les appareils de CLHP arrivent maintenant très largement en tête à la rubrique des investissements de laboratoire et les constructeurs savent que cette situation ne se modifiera pas au cours des prochaines années. Il subsiste cependant un point noir : on ne dispose pas en CLHP de détecteurs aussi généraux qu'en chromatographie en phase gazeuse.

La chromatographie d'adsorption a été la première à bénéficier de l'ensemble de ces progrès. Une étude entreprise dans le cadre de la

maintenant les idées directrices qui permettent d'adapter la CLHP à de nouvelles applications notamment en analyse industrielle.

DGRST en collaboration avec l'équipe de M. Rosset (ESPCI) a permis à Rhône-Poulenc de développer des microbilles de silice de surface spécifique élevée et de diamètres voisins de 5 µm (Sphérosils Normatom Prolabo) permettant d'atteindre des caractéristiques de séparation remarquables et d'utiliser des colonnes courtes (10 cm ou moins).

Par ailleurs, nous avons contribué à rendre la chromatographie d'absorption facile à maîtriser dans son efficacité et sa reproductibilité en dégagant la notion de solvants isohydriques (1) ou isoactifs (tableau 1).

En assurant une parfaite maîtrise du processus chromatographique, cette notion permet d'obtenir des séparations stables et reproductibles.

Elle permet également de limiter le nombre des phases mobiles et de simplifier la mise au point d'une séparation envisagée (2).

Elle rend donc possible la normalisation des méthodes et leur répétabilité d'un laboratoire à un autre.

Enfin, elle abrège le temps nécessaire aux changements de phase mobile lorsqu'un même appareillage doit effectuer des analyses diverses.

Tableau 1. Teneur en eau de solvants purs isohydriques

Deux solvants sont isohydriques (ou isoactifs) lorsque mis en contact successivement avec la même phase stationnaire ils n'en modifient pas l'état d'activation.

Chacun de ces solvants a une teneur en eau bien définie qui correspond à l'équilibre entre ce solvant et la phase stationnaire.

Exemple de séries de solvants isohydriques :

	Sphérosil Normatom XOA 600 teneur en eau (% v/v)	Sphérosil Normatom XOA 800 teneur en eau (% v/v)
Méthanol	5,2	5,2
Diméthylformamide	4,7	
Isopropanol	0,7	0,3
Acétonitrile	0,22	0,18
Dioxanne	0,14	
Tétrahydrofurane	0,13	
Acétate d'éthyle *	0,060	0,060
Di-isopropyle oxyde	0,008	0,010
Dichloro-1,2 éthane	0,007	0,009
Chloroforme (0,5 % éthanol)	0,006	0,006
Cyclohexane	< 0,0005	
n-heptane	< 0,0005	< 0,0002
Iso-octane	< 0,0005	< 0,0002

* Solvant de référence.

La chromatographie de partage s'est développée très rapidement dès que l'on a pu réaliser des phases stationnaires appropriées en greffant des chaînes aliphatiques linéaires comportant 18 ou 8 atomes de carbone sur des microbilles de silices.

Actuellement, la chromatographie de partage semble largement supplanter la chromatographie d'adsorption lorsqu'il est possible de choisir entre les deux méthodes. Cela s'explique par l'évidente facilité de mise en œuvre de la chromatographie de partage qui ne requiert que des phases mobiles très simples, constituées dans la plupart des cas de mélanges d'eau et de méthanol, ou d'eau et d'acétonitrile. Il y a là l'illustration d'un phénomène général selon lequel on cherche toujours à simplifier les méthodologies en reportant la complexité sur la technologie (ici des phases stationnaires très élaborées).

Toutefois, la chromatographie d'adsorption ne sera jamais éliminée et on peut même prévoir qu'elle regagnera du terrain. En effet, les résultats de nos travaux sur les solvants isohydriques et les méthodes que nous avons préconisées pour définir rapidement et même automatiquement la composition optimale des phases mobiles simplifient considérablement les mises au point et l'utilisation de cette méthode.

D'autres types de greffages permettent d'accéder à des phases stationnaires offrant des affinités variées. Par exemple, des greffons porteurs de groupes $-NH_2$ sont utilisés pour la séparation des sucres. D'autres groupes, $-OH$, $-CN$, sont introduits pour modifier plus ou moins la polarité du support siliceux et l'adapter à d'autres cas de séparations.

La chromatographie d'échange d'ions, profitant également des progrès techniques, offre de nouvelles possibilités notamment pour le dosage des traces dans les contrôles de pollution et pour l'analyse des acides organiques dans les milieux complexes. La combinaison judicieuse de deux colonnes d'échangeurs d'ions permet d'utiliser une détection conductimétrique. Cette technique, appelée « chromatographie ionique » (3), est développée dans le système Dionex décrit dans un article de cette série.

Une nouvelle méthode, qui s'apparente à la fois à la chromatographie de partage et à l'échange d'ions, consiste à associer aux substances ionisées que l'on cherche à séparer un ion de charge opposée pour former des paires d'ions. Celles-ci sont alors séparées sur les supports, greffés ou non, mentionnés plus haut. On peut ainsi séparer un mélange d'acides carboxyliques sur une silice greffée octyle (C_8) en utilisant comme phase mobile un mélange d'eau et d'acétonitrile renfermant un « contre ion » cationique : le triméthylcétylammonium par exemple.

Conditions pour une évolution de la CLHP

Les méthodes de la CLHP sont aujourd'hui largement répandues dans les laboratoires de recherches analytiques. L'objectif est maintenant de tirer tous les avantages que l'on peut en attendre, en étendant leur domaine d'application au contrôle de la qualité des produits, à l'analyse industrielle en ligne et même au pilotage rétroactif des unités de production.

Pour faire progresser la CLHP selon ces divers axes d'applications, il y a des idées directrices que nous nous proposons d'exposer.

Le contrôle de qualité

Le contrôle de qualité des produits chimiques est une opération de routine qui suppose l'utilisation de méthodes fiables et reproductibles.

Cette exigence est encore plus impérative si, pour des raisons réglementaires ou même tout simplement commerciales, les méthodes en question doivent être normalisées.

Enfin, là comme ailleurs, il faut envisager une automatisation des tâches répétitives pour accroître la rigueur des résultats et pour augmenter la compétitivité des moyens de production.

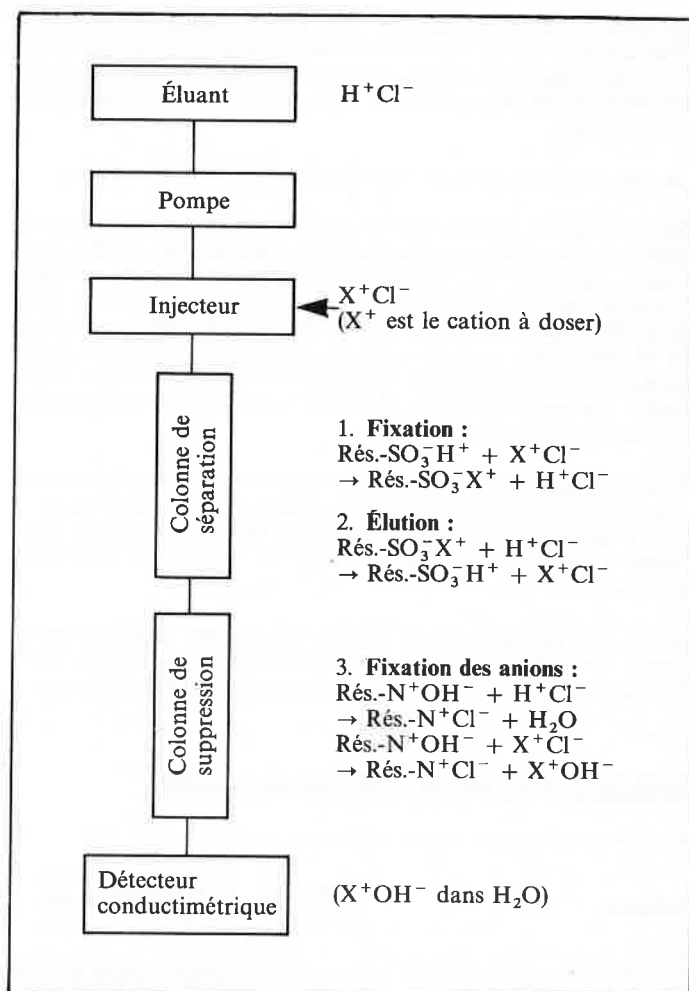
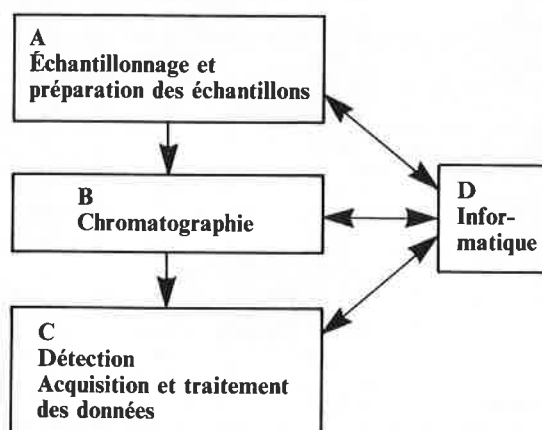


Figure 1. Chromatographie ionique : principe, exemple de séparation de cations.

Enfin, grâce à la réalisation de supports résistant à des pressions élevées, la chromatographie d'exclusion (gel permeation) bénéficie à son tour aujourd'hui des avantages apportés par la CLHP (efficacité et surtout rapidité).

La CLHP offre, sur le plan de l'adaptation aux contrôles de pureté des produits de chimie fine et de biochimie, une possibilité de remplacement de la chromatographie sur couche mince qui n'est pas



vraiment quantitative, qui est relativement longue et qui peut difficilement se passer d'une intervention humaine. Il convient donc d'envisager dès maintenant la conception d'appareils automatiques relativement complexes, basés sur un système chromatographique en phase liquide.

On peut imaginer pour ce type d'appareil le schéma ci-dessus.

Pour réaliser un tel ensemble, la première idée qui s'impose est de simplifier à l'extrême la partie analytique proprement dite B. On ne conçoit guère que l'on puisse adopter pour cet usage des systèmes d'éluion à gradient de concentration. Il faut opter résolument pour des systèmes isocratiques. Ils sont faciles à définir, simples et fiables. Ils ne requièrent pas de systèmes de pompage complexes, ils permettent une régénération et un équilibrage en des temps courts, toutes choses permettant d'obtenir une bonne stabilité des constantes chromatographiques.

S'il faut envisager des séparations complexes, la bonne solution sera toujours de réaliser éventuellement plusieurs séparations isocratiques à la place d'une chromatographie unique à gradient, cette dernière restant bien entendu toujours utilisée en recherche analytique.

La seconde nécessité est de réaliser un système méthodologique unique en rassemblant les modes opératoires considérés. C'est d'ailleurs une démarche préalable à tout projet d'automatisation. Ce

point mérite d'être développé : nous n'envisageons pas ici le cas déjà bien résolu d'une analyse qui se répète sur des échantillons de même nature comme dans l'industrie pharmaceutique, quand, par exemple, on contrôle à longueur de journée la teneur en principe actif d'un comprimé afin de s'assurer que les machines fonctionnent régulièrement. Notre propos concerne la réalisation d'un appareillage permettant d'analyser par CLHP des substances chimiques variées, comme il s'en fabrique chaque jour dans une usine de chimie fine par exemple. Étant donné que l'on imagine mal d'affecter un appareil à l'analyse de chaque produit et qu'il n'est pas pensable non plus de réduire tous les modes opératoires à un seul, la solution consiste à sélectionner quelques systèmes chromatographiques bien choisis en limitant le nombre des phases stationnaires et des solvants. On dispose alors d'une méthodologie automatisable qui, moyennant la possibilité de faire varier quelques paramètres, est adaptée à l'analyse d'une large gamme de produits différents.

Si l'on envisage de réaliser un appareil automatique basé sur le principe de la chromatographie d'adsorption permettant d'effectuer successivement des séparations diverses, il faut réduire au strict minimum le nombre des solvants que l'on doit combiner pour obtenir dans chaque cas la phase mobile optimale.

Nous avons montré qu'on pouvait limiter à 6 le nombre des solvants de base et nous avons décrit la manière de les combiner 2 à 2 pour obtenir des mélanges binaires qui recombinaient entre eux permettent de couvrir toute la gamme de polarité (tableaux 2 et Figure 2).

Tableau 2. Critères de sélection des solvants

Solvants	Viscosité (cP)	Ébullition (°C)	Point éclair (°C)	Transmission nulle (λ nm)	Anomalies de comportement	Impuretés stabilisants	Toxicité	Solvants retenus
<i>n</i> -Pentane	0,23	36,1	- 40	210				
<i>n</i> -Hexane	0,32	69	- 28	210				
Cyclohexane	1,00	80,7	2,5	210				
<i>n</i> -Heptane	0,41	98,4	- 0,5	210				
Triméthyl-2,2,4 pentane	0,50	99,2	16	210				*
Benzène	0,65	80,1	- 11	280				
Toluène	0,59	110,6	4	285				
Tétrachlorure de carbone	0,97	76,8	-	265				
Chloroforme	0,57	61,2	-	245				
Chlorure de méthylène	0,44	39,8	-	235				
Dichloro-1,2 éthane	0,79	83,5	-	230				*
Di-éthoxyde	0,23	34,6	- 47	220				
Di-isopropyloxyde	0,37	68,3	- 22	220				*
Tétrahydrofuranne	0,55	66,0	- 14,5	220				
Dioxanne	1,5	101,3	11	220				
Acétate d'éthyle	0,45	77,1	7	260				*
Acétonitrile	0,37	81,6	5,6	210				*
Acétone	0,56	56,5	- 9	330				
Isopropanol	2,3	82,3	21	210				
Éthanol	1,20	78,3	16	210				
Méthanol	0,60	64,7	15,6	210				*
Diméthylformamide	0,63	153	67	270				

Les applications de la CLHP en analyse industrielle

Les unités de production pétrochimiques sont équipées, depuis longtemps, de chromatographes en phase gazeuse. Jusqu'à maintenant, en revanche, la chimie fine est restée très démunie d'analyseurs industriels. Le développement de la CLHP arrive à point car la compétition économique actuelle impose en chimie fine un accroissement des rendements et, du fait de l'augmentation régulière de la taille des unités de production, une plus grande rigueur de fonctionnement.

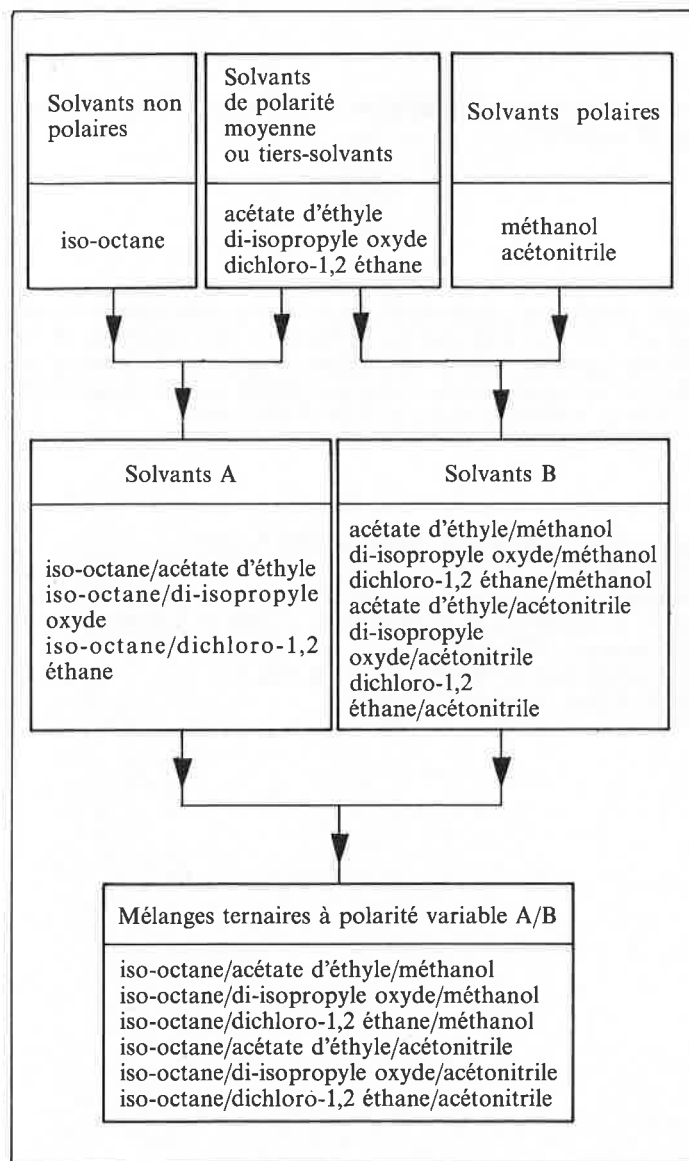


Figure 2. Classement et mélange des solvants pour l'élaboration de la phase mobile.

En général, un analyseur industriel doit d'abord donner une réponse rapide. Le délai d'analyse doit être petit par rapport à la dérive de marche d'une réaction de façon à permettre d'intervenir à temps pour compenser cette dérive.

Rosset et Caude (4) ont montré qu'on pouvait raccourcir la longueur des colonnes et diminuer corrélativement la durée des analyses, sans altérer l'efficacité de la séparation, en diminuant le diamètre des particules du support. Toutefois, il ne semble guère raisonnable actuellement de descendre au-dessous de diamètres de 5 µm.

Guillemin (5) apporte la preuve qu'avec des surfaces spécifiques élevées (Sphérosils Normatom de 600 et 800 m²/g) on peut réduire la longueur des colonnes jusqu'à 1 ou 2 cm en chromatographie d'adsorption. On obtient alors des durées de réponse qui sont de l'ordre de la minute ou même inférieures. Dans ce cas, pour conserver

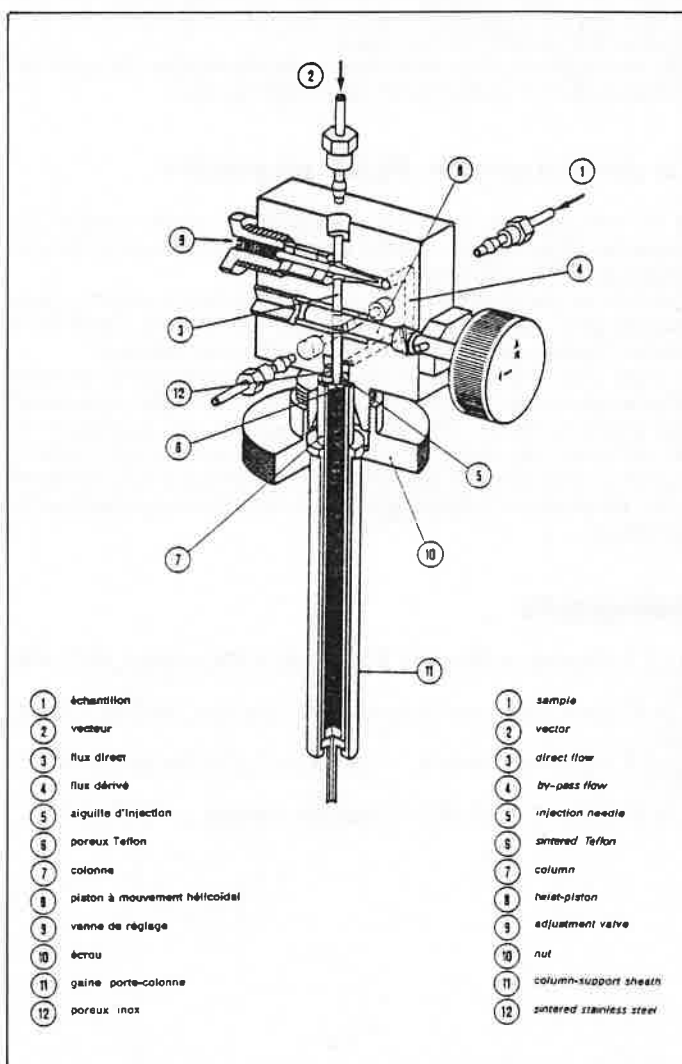


Figure 3. Vanne d'injection à flux dérivé réglable et système de colonnes sans volume mort et sans raccords sertis Chromaflux LC 50 (Prolabo) (Dispositif breveté).

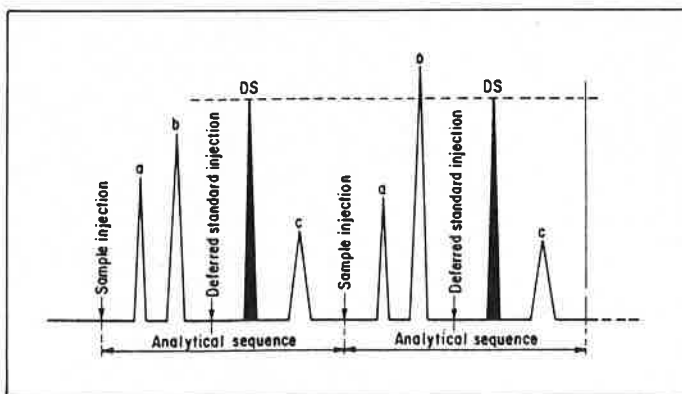


Figure 4. Technique du « standard différé ». (C. L. Guillemin, *Instrumentation Technology*, April 1975, p. 43).

une résolution suffisante, il faut disposer d'un circuit chromatographique présentant un très faible volume mort. Ces résultats permettent presque d'assimiler la CLHP à un capteur physique dont le temps de réponse est quasi instantané (figure 3).

L'autre qualité exigée d'un analyseur industriel est la fiabilité, surtout si l'appareil est utilisé en pilotage rétroactif.

Dans ce domaine, le rôle de l'informatique est très important. Elle permet tout d'abord l'autocontrôle de l'analyseur, c'est-à-dire la vérification permanente du fonctionnement satisfaisant de tous organes mécaniques ou électriques.

Elle assure ensuite l'introduction à intervalles réguliers de solutions d'étalonnage qui permettent de quantifier l'analyse.

La chromatographie liquide préparative

A la différence de la chromatographie en phase gazeuse, la chromatographie liquide se prête bien à la transposition de l'échelle analytique à l'échelle préparative.

Cela tient essentiellement au fait que, contrairement à ce qui se passe dans les gaz, la diffusion dans les liquides est faible en regard de la vitesse d'écoulement de la phase mobile dans les colonnes.

Il serait d'un coût prohibitif de remplir des colonnes de grandes dimensions avec les supports développés pour la CLHP. Cependant des supports mieux adaptés, constitués par des particules de diamètres moyens un peu plus élevés et par là même moins onéreux à fabriquer, sont actuellement développés. Ils permettent de bénéficier à l'échelle préparative des progrès acquis en chromatographie liquide analytique.

Bibliographie

- (1) J. P. Thomas, A. Brun et J. P. Bounine, *J. Chromatogr.*, 1977, **139**, 21 ;
J. P. Thomas, M. Caude, A. Brun et J. P. Bounine, *Analisis*, 1977, **5**, 205.
- (2) J. P. Thomas, A. Brun et J. P. Bounine, *J. Chromatogr.*, 1979, **172**, 107 ;
J. P. Thomas, A. Brun et J. P. Bounine, *Analisis*, 1979, **7**, 221.

Enfin, grâce à l'utilisation de la technique de « standard différé », il est possible de vérifier en permanence le bon fonctionnement de l'analyse elle-même : injection, séparation chromatographique, détection, acquisition et traitement de la mesure (Figure 4).

Bien entendu, s'il est essentiel de détecter les pannes d'un appareil, il est surtout important que celles-ci soient aussi rares que possible. C'est la raison pour laquelle il faut que la partie chromatographique elle-même, élément essentiel de l'analyseur, fonctionne avec une grande sécurité.

Il convient donc de concevoir un processus analytique très simple, de s'appuyer sur une technologie fiable et d'utiliser des réactifs (phase stationnaire, solvants, étalons) de qualité constante.

Les bases de la transposition d'une échelle à l'autre ont été établies par R. Rosset (6).

*
* *

Pour conclure, ce rapide exposé sur les orientations prises à l'heure actuelle en vue d'étendre les applications des méthodes de la chromatographie liquide en analyse industrielle, il convient de rappeler que cette extension passe par la mise au point de méthodes simples et réalisables avec une technologie fiable.

- (3) A. Jardy et R. Rosset, *Analisis*, 1979, **7**, 259.
- (4) R. Rosset, M. Caude et A. Jardy, *Manuel pratique de chromatographie en phase liquide*, Varian S.A., Orsay, 1975, p. 60.
- (5) C. L. Guillemin, J. P. Thomas, S. Thiault et J. P. Bounine, *J. Chromatogr.*, 1977, **142**, 321 ;
C. L. Guillemin, *J. Chromatogr.*, 1978, **158**, 21.
- (6) R. Rosset, *Analisis*, 1977, **5**, 253.