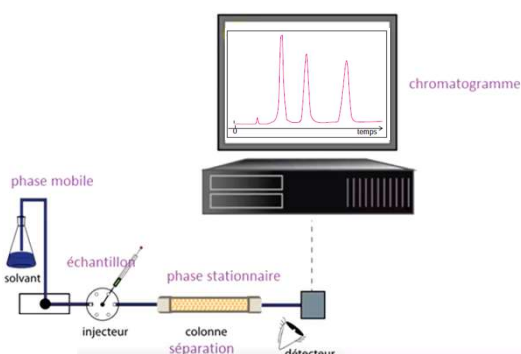


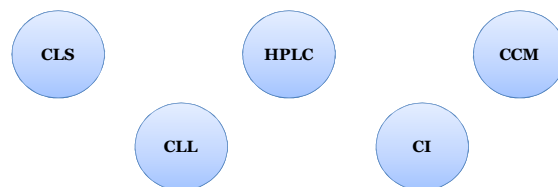
Chromatographie en phase Liquide (CPL)



Chromatographie en phase Liquide (CPL)

1- Généralités sur la CPL

Le terme « chromatographie liquide » englobe un lexique de techniques de séparation avec une seule caractéristique commune, celle d'une **phase mobile liquide**.



Chromatographie en phase Liquide (CPL)

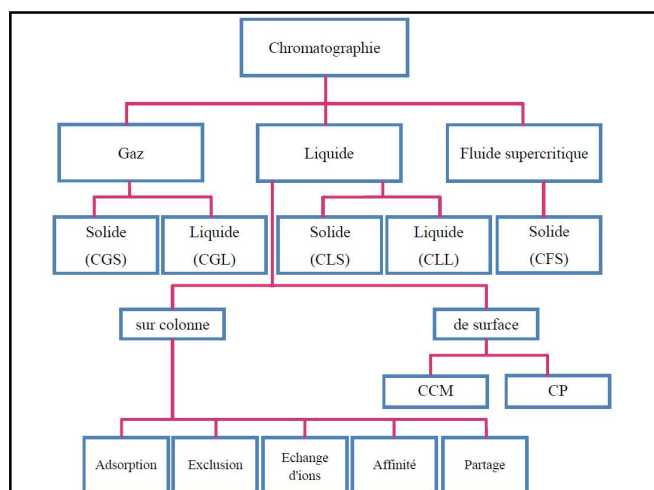
1- Généralités sur la CPL

Par rapport aux gaz, les liquides offrent une plus grande variété de capacités de solvation avec plus de possibilités d'optimisation de la sélectivité, tandis que les gaz ont des propriétés cinétiques plus favorables, ce qui donne des rendements plus élevés et des temps de séparation plus courts.

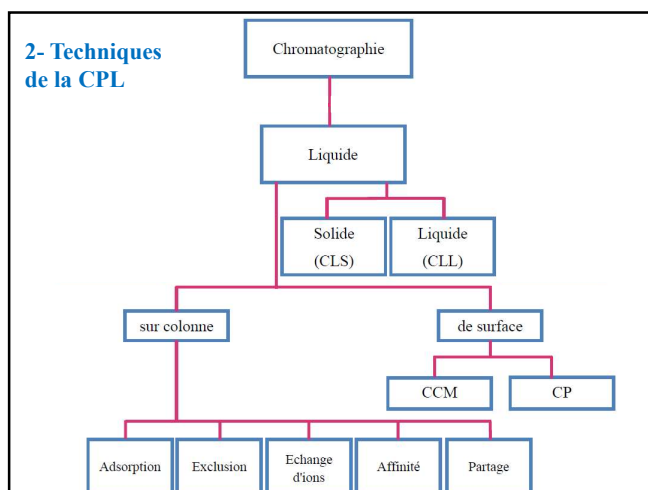
Chromatographie en phase Liquide (CPL)

1- Généralités sur la CPL

Par conséquent, les séparations en CPL sont généralement effectuées avec un nombre modeste de plateaux théoriques à une sélectivité optimisée obtenue par une sélection appropriée du **mode de séparation**, de la structure de la **phase stationnaire** et de la composition de la **phase mobile**. Comprendre la relation complexe entre les trois derniers termes est la clé pour comprendre comment les séparations se produisent en chromatographie liquide.



2- Techniques de la CPL



Chromatographie en phase Liquide (CPL)

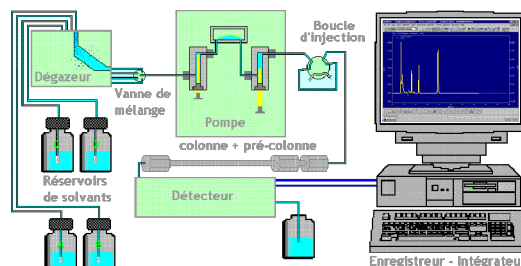
3-Domains d'applications

Identification

Quantification

Purification

Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC)



Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC)

1- Généralités sur la HPLC

La chromatographie liquide haute performance, souvent désignée par son abréviation **CLHP – HPLC** en anglais –, constitue une technique analytique très générale d'emploi. Elle dérive de la forme la plus ancienne de la chromatographie liquide sur colonne dont les performances, en termes de **sélectivité** et de **résolution**, se sont trouvées grandement améliorées par l'utilisation de phases stationnaires très élaborées.

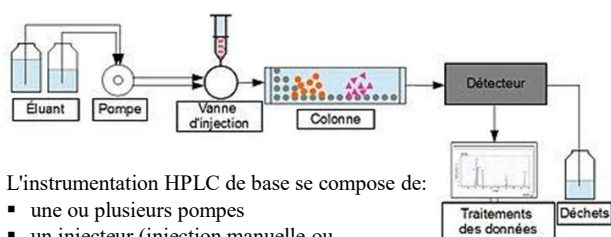
Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC)

1- Généralités sur la HPLC

Mise au point vers 1967 par Huker et Hulsman, la chromatographie liquide à haute pression a rapidement fait une concurrence presque déloyale à la CPG. En effet, alors que la CPG ne s'applique qu'aux **composés volatils**, la chromatographie liquide à haute pression n'est pas limitée par cette contrainte et peut séparer pratiquement **tous les mélanges**, peu importe la volatilité des composés. Si la chromatographie en phase gazeuse existe encore aujourd'hui, c'est à cause de son **seuil de détection** extrêmement bas que la HPLC n'arrive pas à rattraper.

Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC)

3- Appareillage



L'instrumentation HPLC de base se compose de:

- une ou plusieurs pompes
- un injecteur (injection manuelle ou automatique)
- une ou plusieurs colonnes
- un détecteur
- un dispositif de traitement des données

Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC)

3- Appareillage

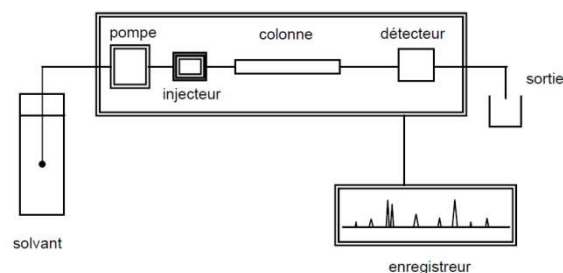


Schéma simplifié d'un chromatographe HPLC

Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC)

3- Appareillage

Phase mobile

La phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants qui doit être de pureté analytique et filtré pour éliminer les particules solides qui risqueraient d'endommager la pompe ou de bloquer la colonne. Le filtre, en acier inoxydable d'une porosité de 2 μm , est placé à l'extrémité dans le réservoir à solvant.

Principaux solvants en HPLC

phénomène	solvants
Adsorption	Hexane, méthanol, acétonitrile, dichlorométhane, chloroforme
Partition	Méthanol-eau, acétonitrile-eau
Échange d'ions	Solution tampon (pH contrôlé)
Exclusion	Tétrahydrofurane, toluène

Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC)

3- Appareillage

Pompe

Le rôle de la pompe en HPLC est de pousser l'éluant à travers la colonne à une pression élevée et à un débit constant. Elle doit être inerte à la corrosion des solvants utilisés, offrir un bon choix de débits et être conçue pour réduire les pulsations au minimum.



Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC)

3- Appareillage

Injecteur

Comme la pression dans le circuit pompe-colonne est très élevée, on utilise un moyen indirect pour introduire l'échantillon à l'entrée de la colonne. Celui-ci est d'abord introduit à l'aide d'une seringue dans un injecteur à **boucle** externe, en position **LOAD**. On injecte toujours un volume supérieur à celui de la boucle, en prenant soin de ne pas introduire de bulles d'air dans la boucle. En tournant la valve en position **INJECT**, seul le contenu de la boucle est dirigé en tête de colonne. Cette méthode d'injection a l'avantage de donner des résultats très reproductibles, d'une injection à l'autre.

Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC)

3- Appareillage

Injecteur



Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC)

3- Appareillage

Colonnes HPLC

- ** **Colonne analytique:** qui est responsable de la séparation
- ** **Colonne de garde:** qui est placée avant la colonne analytique pour la protéger de la contamination.

Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC)

3- Appareillage

Colonnes HPLC

Colonne analytique

Le type le plus courant de colonne HPLC est un tube en acier inoxydable d'un diamètre interne compris entre 2,1 mm et 4,6 mm et d'une longueur comprise entre 30 et 300 mm. La colonne est remplie de particules de silice poreuses de 3 à 10 nm de forme irrégulière ou sphérique. Les rendements typiques des colonnes sont de 40 000 à 60 000 plateaux théoriques/m.



Colonne garnie typique pour HPLC

Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC)

3- Appareillage

Colonnes HPLC

Colonne analytique

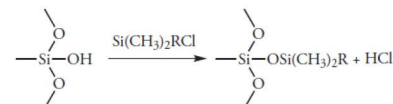
Les colonnes capillaires utilisent moins de solvant et, comme l'échantillon est moins dilué, produisent des signaux plus importants au niveau du détecteur. Ces colonnes sont fabriquées à partir de capillaires en silice fondue avec des diamètres internes de 44 à 200 μm et des longueurs de 50 à 250 mm. Des colonnes capillaires remplies de particules de 3 à 5 μm ont été préparées avec des efficacités de colonne allant jusqu'à 250 000 plateaux théoriques.

Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC)

3- Appareillage

Phase stationnaires

En chromatographie liquide, la phase stationnaire est un film liquide enduit sur un matériau de garnissage, généralement des particules de silice poreuses de 3 à 10 μm . Étant donné que la PS peut être partiellement soluble dans la PM, elle peut s'éluer ou s'écouler de la colonne au fil du temps. Pour éviter la perte de la PS, qui raccourcit la durée de vie de la colonne, celle-ci est liée de manière covalente aux particules de silice. Les PS liées sont créées en faisant réagir les particules de silice avec un organochlorosilane de la forme générale $\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{RCl}$, où R est un groupe alkyle ou alkyle substitué.



Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC)

3- Appareillage

Détecteurs

➤ Détecteurs spectroscopiques

Spectre d'absorption UV/Vis
Spectromètre de masse

➤ Détecteurs électrochimiques

Ampermétrie, voltamétrie, coulométrie et la conductivité.

➤ Autres détecteurs

La mesure d'un changement de l'indice de réfraction de la phase mobile

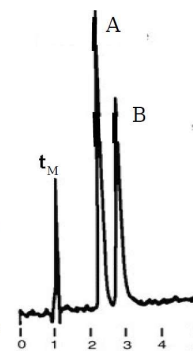
La surveillance de la conductivité thermique

Exercice d'application

Technique : HPLC
Colonne : Phase Stationnaire: C_{18} ,
15 cm x 4,6 mm, $d_p = 5 \mu\text{m}$
Phase Mobile : acétonitrile, CH_3CN
Température : 30 °C

$t_M = 1,07 \text{ min}$
 $t_R(A) = 2,40 \text{ min}$; $\delta_A = 5 \text{ s}$ (largeur du pic à mi-hauteur)
 $t_R(B) = 2,85 \text{ min}$; $\delta_B = 6 \text{ s}$

Rem: C_{18} : chaîne alkyle en C_{18} : $-(\text{CH}_2)_{17}-\text{CH}_3$ qui a été greffée sur du gel de silice: $\text{Si-O-Si}(\text{CH}_3)_2-(\text{CH}_2)_{17}-\text{CH}_3$
acétonitrile = cyanure de méthyle



• Calculer:

Facteur de sélectivité, facteur de résolution, nombre de plateaux théoriques

1. Calcul du facteur de sélectivité α

$$\alpha = K_B / K_A = \alpha = k'_B / k'_A = \alpha = t'_R(B) / t'_R(A)$$

$$\alpha = K(\text{soluté le + retenu: pic éloigné}) / K(\text{soluté le - retenu: 1er pic})$$

$$\alpha = (2,85 - 1,07) / (2,40 - 1,07) = 1,34$$

2. calcul du facteur de résolution

$$R = 2 [t'_R(B) - t'_R(A)] / [\omega(B) + \omega(A)]$$

$$\omega = 1,7\delta$$

$$R = 2 \cdot (2,85 - 2,40) \cdot 60 / (1,7 \cdot (6 + 5)) = 2,89$$

3. Calcul du nombre de plateaux théoriques de la colonne

régime isocratique: 1 seul solvant de composition constante

$$R = [(N^{1/2} / 4)] \cdot [(\alpha - 1) / \alpha] \cdot [k' / (1 + k')] \quad k' = (k'_A + k'_B) / 2$$

$$k'_A = t'_R / t_M = (2,40 - 1,07) / 1,07 = 1,24$$

$$k'_B = t'_R / t_M = (2,85 - 1,07) / 1,07 = 1,66 \quad (\alpha = k'_B / k'_A = 1,66 / 1,24 = 1,34)$$

$$N = [4 \cdot 2,89 \cdot 1,34 \cdot (1 + 1,45)]^2 / [(1,34 - 1) \cdot 1,45]^2 = 4646 \text{ plateaux théoriques}$$