

Méthodes de séparation analytiques

Chromatographie HPLC

Introduction

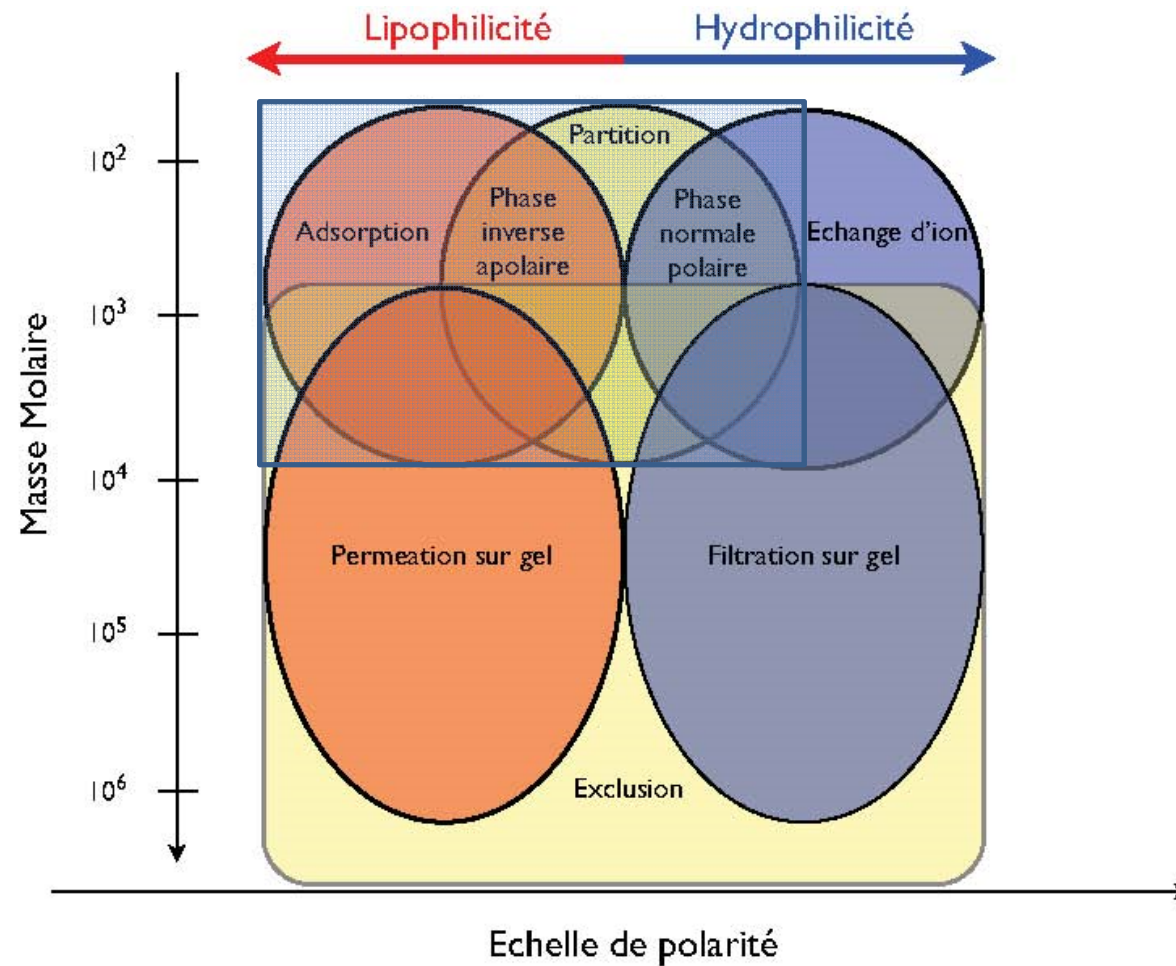
- ⇒ La chromatographie liquide à haute pression HPLC est la version moderne de la chromatographie sur colonne où le débit de phase mobile est délivrée de façon constante à l'aide de pompes à haute pression.
- ⇒ L'acronyme HPLC est aussi utilisé pour chromatographie à haute performance, terme de moins en moins utilisé. Par rapport à la chromatographie sur colonne, les performances en termes de sélectivité et de résolution de cette technique sont largement améliorées.
- ⇒ L' HPLC est utilisée pour séparer des molécules dont la masse molaire est inférieure à $2000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.
- ⇒ Si ces molécules sont thermiquement instables et/ou peu volatiles, l'HPLC est la méthode de choix car la séparation a lieu à basse température en conservant le mélange à séparer dans son état physique d'origine, mélange liquide ou en solution.
- ⇒ L' HPLC peut être réalisée de façon analytique ou à des fins préparatives.

Chromatographie HPLC

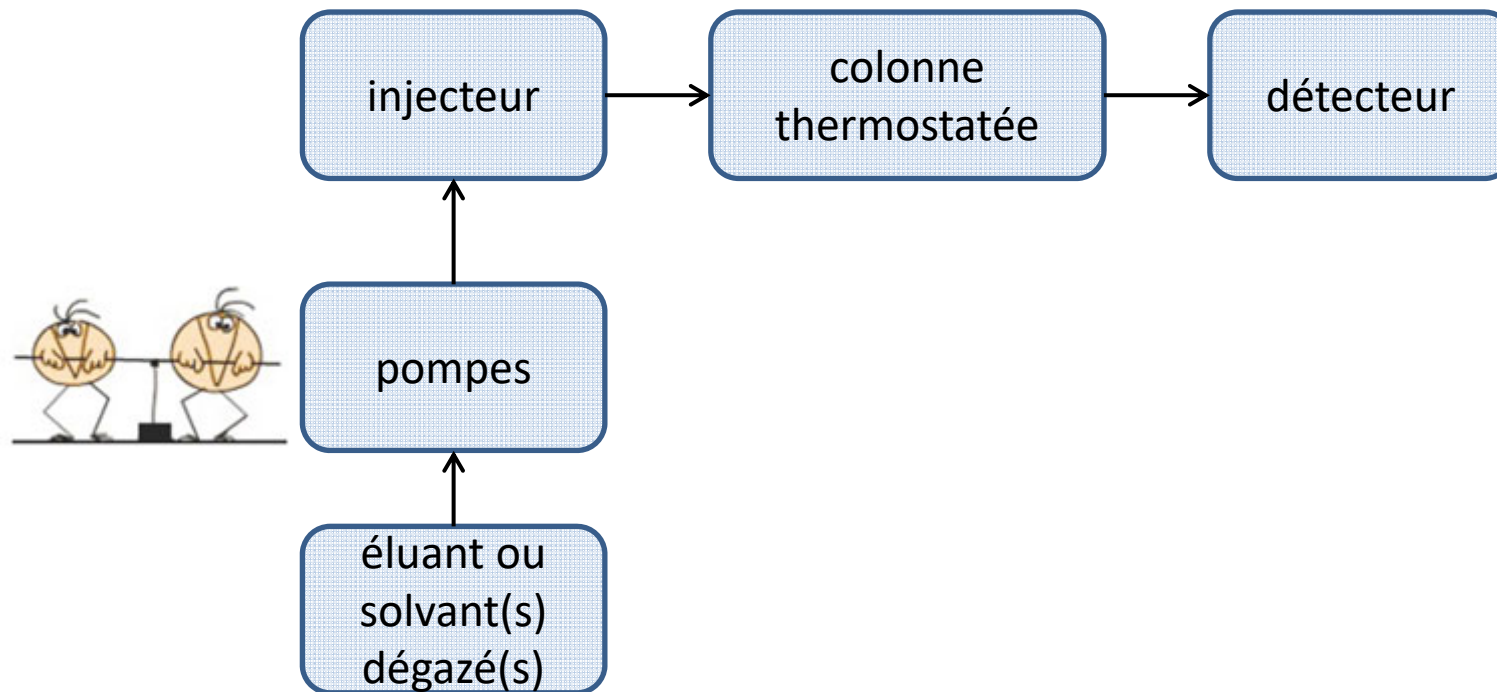


Chromatographie HPLC Waters

Domaine de la chromatographie HPLC

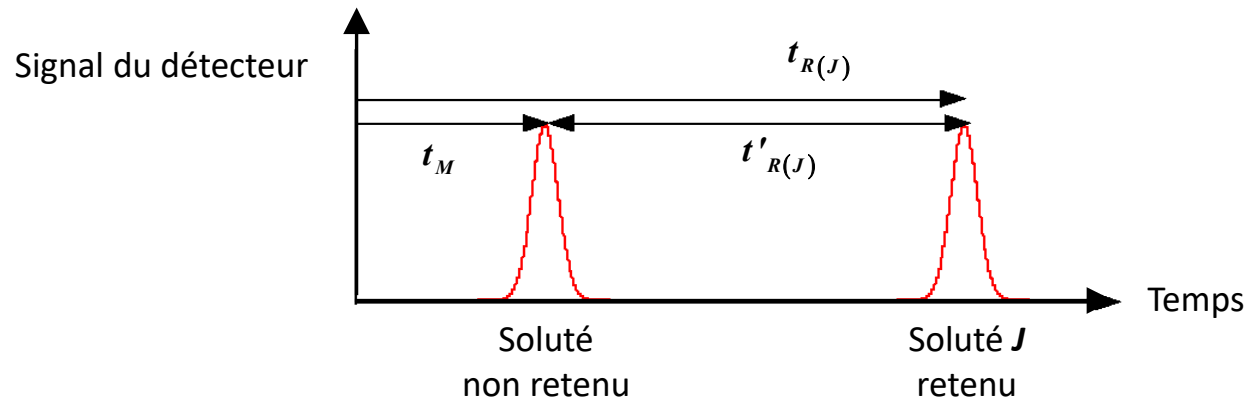


Principe de la chromatographie HPLC



⇒ L'éluant peut être un solvant ou un mélange de solvants. Dans le cas d'un mélange de solvants, ce mélange peut être généré avant ou après les pompes.

⇒ Une chromatographe HPLC génère un chromatogramme en temps:



Éluant

⇒ Les éluants sont des mélanges organiques ou hydro-organiques. L'éluant est choisi en fonction de la phase stationnaire utilisée et des solutés à séparer.

Pompes

⇒ Les pompes HPLC maintiennent une pression de 200 à 600 bars au niveau de l'injecteur. Cette pression dépend du débit imposé de l'éluant, de sa viscosité, de la nature de la phase stationnaire et du gabarit de la colonne.

⇒ Les débits des pompes sont adaptés aux colonnes HPLC utilisées:

⇒ HPLC rapide: $3 - 10 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$

⇒ HPLC classique: $0,5 - 2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$

⇒ HPLC semi-micro: $10 - 50 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$

⇒ HPLC micro: $5 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$

⇒ HPLC capillaire: $0,01 - 2 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$

Injecteurs

⇒ Les injecteurs sont des vannes haute pression manuelles munies d'une boucle d'injection de volume calibré.

⇒ Les injecteurs peuvent être automatiques, à vannes motorisées, avec passeur d'échantillons.

⇒ Dans le cas d'injecteurs automatiques, le système est munit des mêmes boucles d'injection.



La colonne chromatographique: caractéristiques physiques

⇒ Les colonnes chromatographiques se présentent sous la forme d'un tube d'acier. Les colonnes standards font entre 3 et 30 cm de longueur et environ 4 à 5 mm de diamètre interne.

⇒ Ces colonnes standards peuvent être remplacées par des colonnes de plus petit diamètre interne:

⇒ *narrow-bore* (2 à 4 mm)

⇒ *micro-bore* (1 à 2 mm)

⇒ *capillaires remplies* (0,1 à 1 mm)

⇒ Ces colonnes font aussi entre 3 à 30 cm de longueur. Pour les colonnes capillaires, on se situe autour de 10 cm de longueur.

⇒ Les débits de phase mobile sont de l'ordre de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ pour une colonne standard et descendent à quelques $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ pour une colonne micro-bore.

Table 1: Nomenclature for HPLC Columns in Cylindrical Formats.

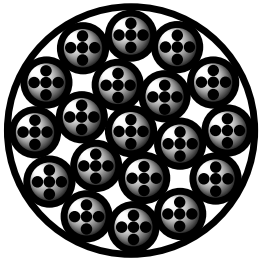
Description	Dimension	Approx. typical flow-rate (velocity 1–10 mm/s)
Open tubular liquid chromatography	$< 25 \mu\text{m i.d.}$	$< 25 \text{ nL/min}$
Nanobore column HPLC	$25 \mu\text{m} \leq \text{i.d.} \leq 100 \mu\text{m}$	$25\text{--}4000 \text{ nL/min}$
Capillary column HPLC	$100 \mu\text{m} < \text{i.d.} < 1 \text{ mm}$	$0.4\text{--}200 \mu\text{L/min}$
Microbore column HPLC	$1 \text{ mm} \leq \text{i.d.} \leq 2.1 \text{ mm}$	$50\text{--}1000 \mu\text{L/min}$
Narrow(small)-bore column HPLC	$2.1 \text{ mm} < \text{i.d.} < 4 \text{ mm}$	$0.3\text{--}3.0 \text{ mL/min}$
Normal-bore column HPLC	$4 \text{ mm} \leq \text{i.d.} \leq 5 \text{ mm}$	$1.0\text{--}10.0 \text{ mL/min}$
Semipreparative column HPLC	$5 \text{ mm} < \text{i.d.} \leq 10 \text{ mm}$	$5.0\text{--}40 \text{ mL/min}$
Preparative column HPLC	$\text{i.d.} > 10 \text{ mm}$	$> 20 \text{ mL/min}$

⇒ On adapte en général une précolonne en amont de la colonne pour préserver cette dernière.

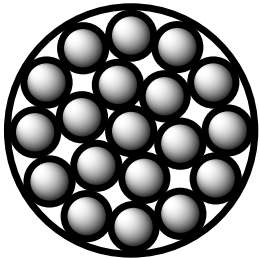
⇒ Il s'agit d'une courte colonne de 0,4 à 1 cm de longueur, remplie de la même phase stationnaire que celle de la colonne utilisée.

⇒ La précolonne permet de retenir des molécules qui auraient trop d'affinité pour la phase stationnaire de la colonne et qui de ce fait resteraient piégées dans cette dernière, causant sa dégradation.

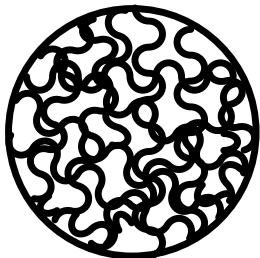
⇒ Les colonnes sont garnies de particules sphériques de quelques micromètres de diamètre et d'une porosité de quelques centaines d'Angström ou d'un solide monolithe poreux constituant la phase stationnaire:



⇒ Colonne à phase stationnaire sous forme de billes rigides de porosité variable.



⇒ Colonne à phase stationnaire sous forme de film de liquide visqueux déposé sur des billes rigides peu poreuses.



⇒ Colonne garnie à phase stationnaire sous forme d'un solide monolithe poreux.

⇒ Les particules constituant la phase stationnaire engendrent un empêchement à l'écoulement de la phase mobile, induisant une perte de charge ΔP dans la colonne obéissant à la loi de Darcy.

⇒ Pour des colonnes remplies de façon quasi optimale, la perte de charge peut être appréhendée par la loi de Vérillon:

$$\Delta P = 400 \frac{\eta L F_V}{d_p^2 d_c^2}$$

ΔP : perte de charge (MPa)

η : viscosité cinématique (cP)

L : longueur de la colonne (cm)

F_V : débit de la phase mobile (mL·min⁻¹)

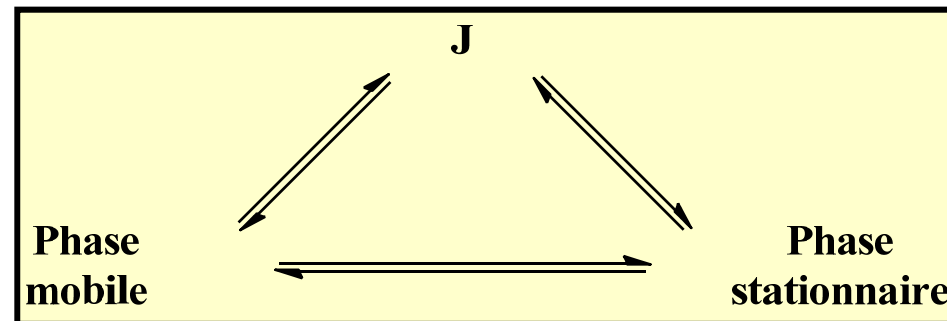
d_p : diamètre des particules de la phase stationnaire (μm)

d_c : diamètre de la colonne (mm)

⇒ La nature chimique des particules conditionne le mécanisme de rétention des solutés. Elle détermine aussi le choix de l'éluant utilisé pour la séparation chromatographique.

La colonne chromatographique: principes de rétention

⇒ Les principes de rétention thermodynamiques sont décrits ci-après:



⇒ Le paramètre le plus important en chromatographie c'est le facteur de rétention k' . Ainsi, pour un soluté J on peut écrire:

$$k'_{(J)} = K_{D(J)} \Phi_{SM} = K_{D(J)} \frac{V_S}{V_M}$$

$$k'_{(J)} = \frac{t'_{R(J)}}{t_M} = \frac{t_{R(J)} - t_M}{t_M} = \frac{V'_{R(J)}}{V_M} = \frac{V_{R(J)} - V_M}{V_M}$$

$$V_{R(J)} = V_M + K_{D(J)} V_S$$

⇒ En chromatographie HPLC, les volumes effectifs et physiques des phases stationnaire et mobile sont égaux:

$$V_{R(J)} = V_M + K_{D(J)} V_S = V_{mo} + K_{D(J)} V_{st}$$

⇒ En exprimant $V_{R(J)}$ en fonction de V_{mo} , $K_{D(J)}$ et du rapport de phase β , on obtient:

$$V_{R(J)} = V_{mo} + K_{D(J)} V_{mo} \beta^{-1} = V_{mo} \left(1 + K_{D(J)} \beta^{-1} \right) \text{ avec } \beta = \left(\frac{V_{mo}}{V_{st}} \right)$$

⇒ Comme $V_{mo} = V_M$, la constante de distribution $K_{D(J)}$ peut être calculée comme suit:

$$V_{R(J)} = V_M \left(1 + K_{D(J)} \beta^{-1} \right)$$

$$K_{D(J)} = \left(\frac{V_{R(J)} - V_M}{V_M} \right) \beta = \left(\frac{t_{R(J)} - t_M}{t_M} \right) \beta$$

⇒ En chromatographie HPLC, la température de la colonne influence les temps de rétention bruts des solutés séparés à travers k' :

$$\ln k'_{(J)} = -\frac{\Delta_D G^0_{(J)}}{RT} + \ln \Phi_{SM} = -\frac{\Delta_D H^0_{(J)}}{RT} + \frac{\Delta_D S^0_{(J)}}{R} + \ln \Phi_{SM} = \frac{a}{T} + b$$

⇒ La constante a est positive, la réaction de partage est exothermique, sous contrôle enthalpique.

$$K_{D(J)} = \exp\left(-\frac{\Delta_D G^0_{(J)}}{RT}\right) \approx \exp\left(-\frac{\Delta_D H^0_{(J)}}{RT}\right)$$

⇒ Les temps de rétentions sont plus courts lorsque la température de la colonne augmente.

⇒ Comme la plage de température à disposition est restreinte, l'éluant ne doit pas générer de phase gazeuse, la température n'est pas l'acteur principal de la séparation comme c'est le cas en GC.

⇒ La température est un facteur d'optimisation de la séparation.

⇒ D'un point de vue cinétique, l'équation de Van Deemter observée est la suivante:

$$H_{(J)} = 2\lambda d_p + \frac{2\gamma D_{M(J)}}{\bar{u}} + \left(\frac{k'_{(J)}{}^2}{96(1+k'_{(J)})^2} \times \frac{d_p^2}{D_{M(J)}} + \frac{(qk'_{(J)})}{(1+k'_{(J)})^2} \times \frac{d_f^2}{D_{S(J)}} \right) \bar{u}$$

⇒ Dans cette équation de Van Deemter, le paramètre le plus important c'est le facteur A . C'est lui qui conditionne le nombre de plateaux théoriques maximal atteignable.

⇒ En considérant une colonne correctement remplie, $\lambda = 1$, on obtiendra:

$$H_{min} = A + 2\sqrt{BC} \approx A \approx 2\lambda d_p \approx 2d_p$$

⇒ Le nombre de plateaux théoriques maximal atteignable sera alors:

$$N_{max} = \frac{L}{H_{min}} \approx \frac{L}{2d_p}$$

- ⇒ En se plaçant dans des conditions de débit de phase mobile standard $F_V \approx 1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, correspondant à \overline{u}_{opt} , on peut estimer rapidement le nombre de plateaux théoriques d'une colonne HPLC à partir du diamètre des particules qui constituent la phase stationnaire.
- ⇒ Dans cette approximation, le nombre de plateaux théoriques ne dépend pas du soluté chromatographié.
- ⇒ En chromatographie en phase liquide d'élution, il est commun d'avoir recours à l'équation de Knox. Cette dernière exprime la HEPT réduite h en fonction de la vitesse d'écoulement moyenne réduite \overline{v} :

$$h = A\overline{v}^{1/3} + \frac{B}{\overline{v}} + C\overline{v}$$

La colonne chromatographique: l'éluant

⇒ *La polarité de l'éluant*

⇒ L'ordre d'élution des solutés est gouvernée par leur polarité.

⇒ En chromatographie en phase normale, c'est-à-dire pour une phase stationnaire polaire, les solutés de faible polarité sont élués en premier.

⇒ Pour ajuster les temps de rétention il faut ajuster les propriétés de l'éluant qui constitue la phase mobile. En phase normale, si la résolution entre deux solutés est pauvre, il faudra diminuer la polarité de l'éluant.

⇒ En chromatographie en phase inverse, c'est-à-dire pour une phase stationnaire apolaire, les solutés de forte polarité sont élués en premier.

⇒ Pour ajuster les temps de rétention il faut ajuster les propriétés de l'éluant qui constitue la phase mobile. En phase inverse, si la résolution des deux solutés est pauvre, il faudra augmenter la polarité de l'éluant.

- ↪ Un éluant peut être issu d'un mélange de solvants organiques ou être issu d'un mélange hydro-organique ou l'un des partenaires est une phase aqueuse.
- ↪ L'éluant doit être réalisé à partir d'une combinaison de solvants miscibles entre eux.
- ↪ On peut faire appel à un éluant binaire, ternaire voire quaternaire.
- ↪ On peut dans un premier temps choisir un éluant grâce à son indice de polarité.
- ↪ L'indice de polarité P'_E d'un mélange de solvants miscibles est:

$$P'_E = \sum_{i=1}^N \Phi_i P'_i$$

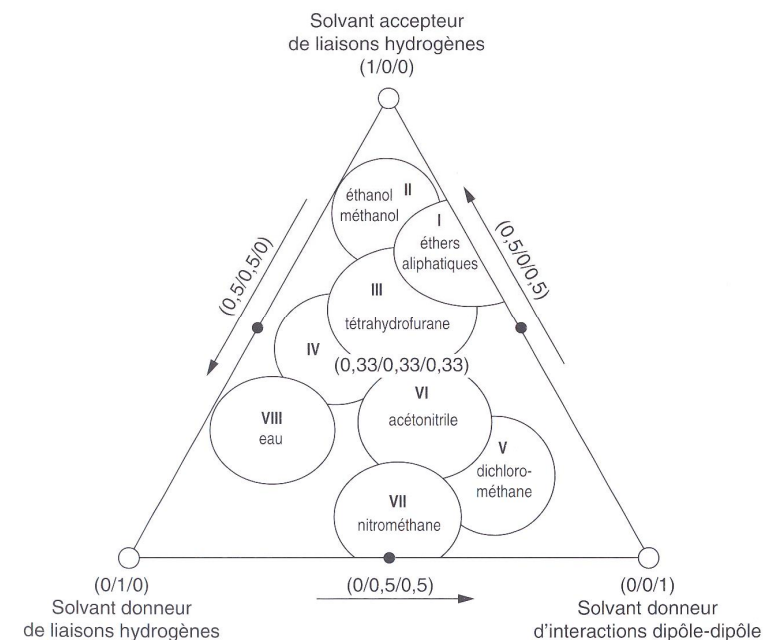
- ↪ Dans cette équation, Φ_i et P'_i représentent la fraction volumique et la polarité du solvant i composant l'éluant E .
- ↪ Le fichier solvants HPLC retrace les caractéristiques physiques, dont la polarité, des solvants usuels utilisés en HPLC.
- ↪ L'indice de polarité de l'éluant P'_E influence le facteur de rétention k' .

⇒ *Les propriétés chimiques de l'éluant*

⇒ Les propriétés chimiques de l'éluant peuvent influencer la rétention des solutés séparés en fonction de leur nature chimique.

⇒ Les propriétés chimiques de l'éluant dépendent majoritairement de:

- le caractère accepteur de liaisons hydrogènes des solvants qui constituent l'éluant.
- le caractère donneur de liaisons hydrogènes des solvants qui constituent l'éluant.
- le caractère donneur d'interactions dipôle-dipôle des solvants qui constituent l'éluant.



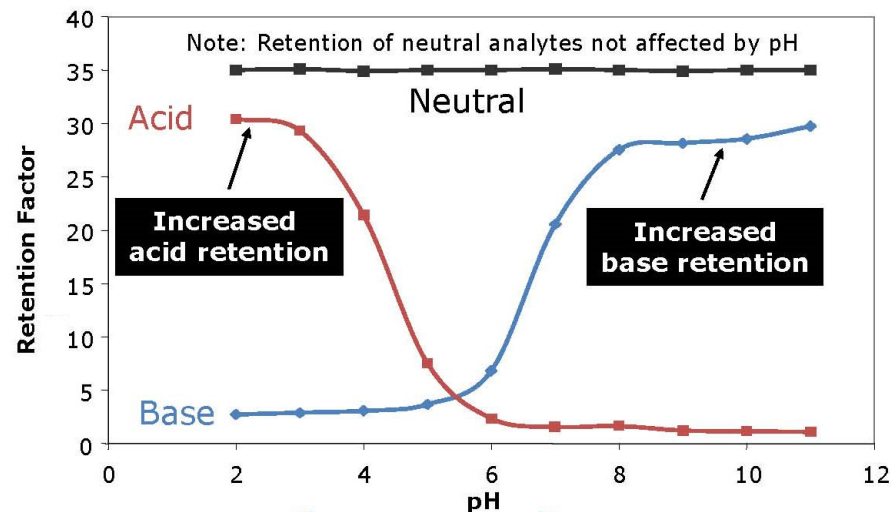
⇒ Ces propriétés sont résumées sur le triangle de Snyder ci-dessus.

⇒ *Le pH de l'éluant*

⇒ Pour des solutés qui possèdent des propriétés acido-basiques en phase aqueuse, le pH d'un éluant hydro-organique peut influencer leurs temps de rétention.

⇒ Cela dépend de la nature du soluté (acide, basique ou neutre) ainsi que de la nature de la colonne chromatographique (phase normale ou phase inverse).

⇒ Ci-dessous, on peut voir l'influence du pH d'un éluant sur la rétention de solutés acides, basiques et neutre en chromatographie en phase inverse:



⇒ *Le choix de l'éluant*

⇒ Lorsque $k' > 10$, on change la polarité de l'éluant pour obtenir $k' < 10$.

⇒ En général, une variation de polarité de 2 unités entraîne une diminution de k' par 10:

- En phase normale, on aura tendance à augmenter la polarité de l'éluant.
- En phase inverse, on devra diminuer la polarité de l'éluant.

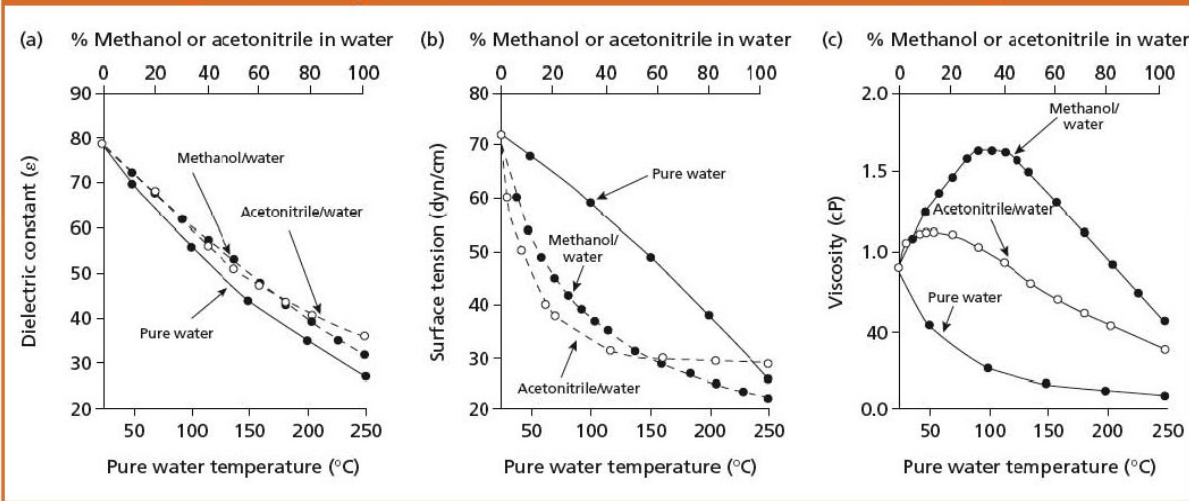
⇒ On peut jouer sur k' en jouant sur les propriétés chimiques de l'éluant en conservant ou non la polarité de l'éluant.

⇒ On peut jouer sur k' en jouant sur le pH de l'éluant (hydro-organique) lorsque l'on sépare des solutés ayant des propriétés acido-basiques en solution aqueuse.

⇒ D'autres propriétés physiques sont influencées par la composition de l'éluant:

- La viscosité cinématique est un facteur important car elle conditionne la perte de charge de la colonne.

Figure 3: Control of (a) solvent dielectric constant, (b) surface tension and (c) viscosity by changing temperature with pure liquid water at 50 bar compared with mixing water with methanol or acetonitrile at 25 °C. From reference 42 with permission.



⇒ *Elution en mode isocratique*

↪ Une élution en mode isocratique est une élution qui se réalise avec un éluant dont la composition ne varie pas au cours de la séparation.

↪ Cet éluant peut être un solvant unique (rare), binaire, ternaire voire quaternaire. Il peut être organique ou hydro-organique. Dans ce dernier cas, la phase aqueuse peut être de l'eau pure, de l'eau légèrement acidifiée (acide formique, trifluoroacétique...) ou basifiée (ammoniaque) voir une solution tampon ($\text{KH}_2\text{PO}_4 / \text{K}_2\text{HPO}_4$...).

➡ En exemple, on peut montrer la séparation de différents acides organiques (D. T. Harvey et al., *Journal of Chemical Education*, 1991, **68**, 162-168).

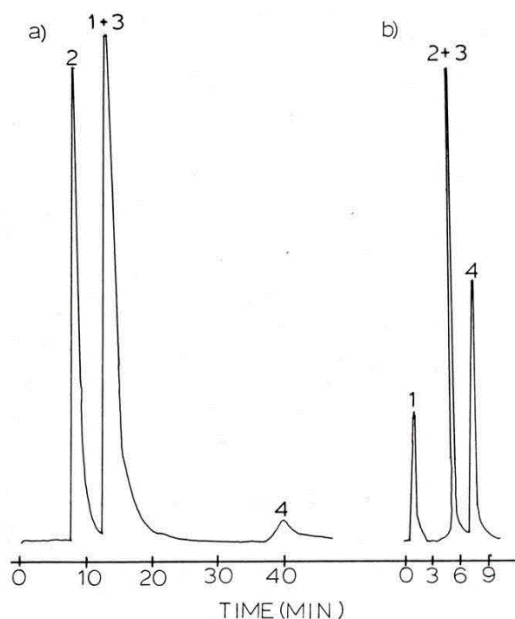


Figure 1. HPLC chromatogram of the sample mixture at (a) pH 3.65 and (b) pH 5.01. Components for the mixture are (1) terephthalic acid, (2) *p*-aminobenzoic acid, (3) *p*-hydroxybenzoic acid, and (4) benzoic acid.

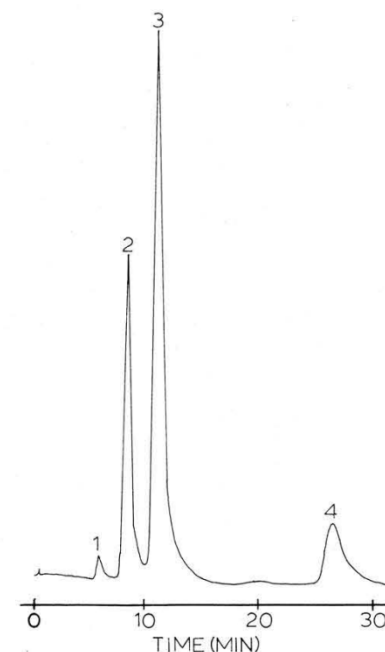
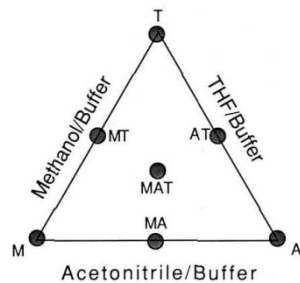


Figure 4. Optimum HPLC chromatogram of the sample mixture at pH 4.11. Peak identification as in Figure 1.

➡ Les chromatogrammes ont été obtenus à $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ sur une colonne apolaire (C18) en mode isocratique à l'aide de tampons acide acétique/acétate de sodium à 1 M de différents pHs.

Les chromatogrammes suivants ont été obtenus à $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ sur une colonne apolaire (C18) en mode isocratique avec différents éluants dont la partie aqueuse est un tampon acide acétique/ acétate de sodium à 1 M à pH = 4,11.



	%M	%A	%T
M	100	0	0
A	0	100	0
T	0	0	100
MA	50	50	0
MT	50	0	50
AT	0	50	50
MAT	33.3	33.3	33.3

Figure 5. Simplex lattice design for determining optimum ternary mobile phase composition. Experimental mobile phase compositions (volume percents) are listed in table. M = methanol, A = acetonitrile, and T = tetrahydrofuran.

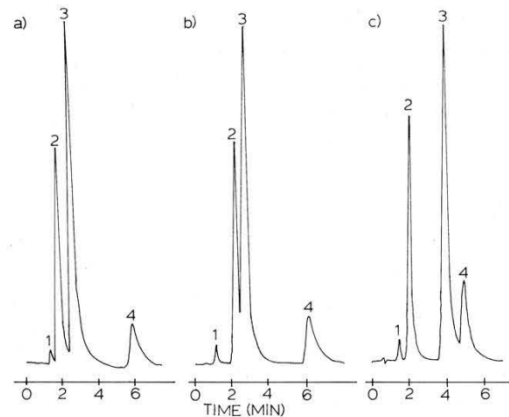


Figure 6. HPLC chromatogram for single organic modifier/buffer mobile phases: (a) 20% methanol/buffer, (b) 16% acetonitrile/buffer, and (c) 10% tetrahydrofuran/buffer. Peak identification as in Figure 1.

$$S = \frac{t_{R(J)} - t_{R(I)}}{t_{R(I)} + t_{R(J)}} \quad (S > 0)$$

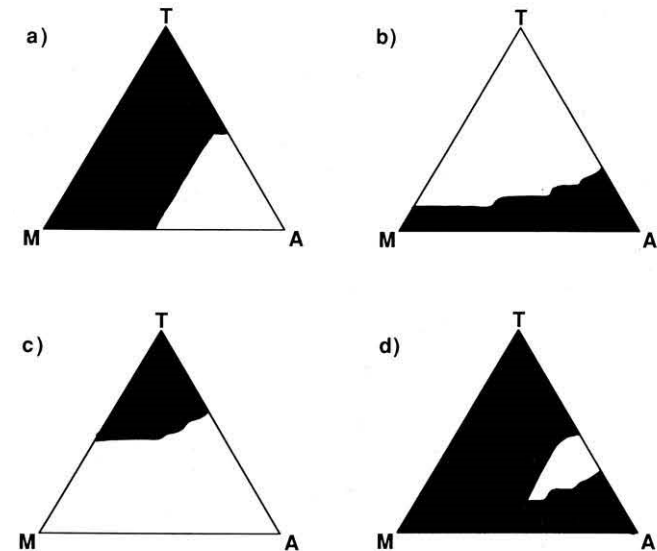


Figure 7. Resolution maps for (a) terephthalic acid and *p*-aminobenzoic acid, (b) *p*-aminobenzoic acid and *p*-hydroxybenzoic acid, and (c) *p*-hydroxybenzoic acid and benzoic acid. The final overlapping resolution map is shown in (d). Key: (■) unacceptable separation ($S < 0.2$); (□) acceptable separation ($S \geq 0.2$).

Les différents éluants de la figure 6 ont la même polarité

⇒ *Elution en mode gradient*

↪ L'élution en mode gradient permet souvent de séparer des solutés qui ne pourraient pas l'être en mode isocratique. Cette méthode est particulièrement efficace pour des solutés de polarités très différentes. La composition de l'éluant varie au cours de la séparation.

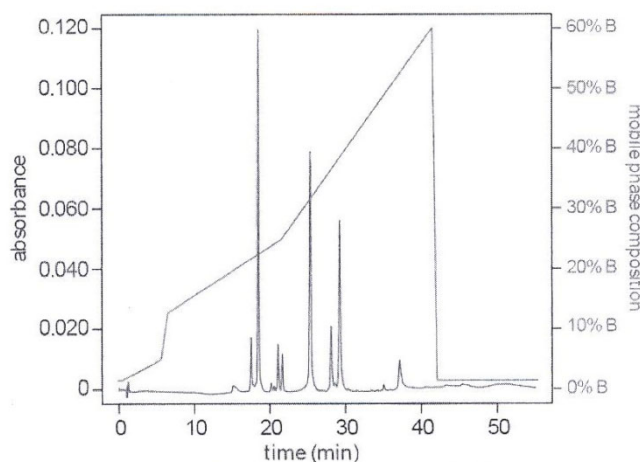


Figure 12.43 Gradient elution separation of a mixture of flavonoids. Mobile phase A is an aqueous solution of 0.1% formic acid and mobile phase B is 0.1% formic acid in acetonitrile. The initial mobile phase is 98% A and 2% B. The percentage of mobile phase B increases in four steps: from 2% to 5% over 5 min, beginning at 0.5 min; from 5% to 12% over 1 min, beginning at 5.5 min; from 12% to 25% over 15 min, beginning at 6.5 min; and from 25% to 60% over 20 min, beginning at 21.5 min. Data provided by Christopher Schardon, Kyle Meinhardt, and Michelle Bushey, Department of Chemistry, Trinity University.

↪ Le mode gradient peut s'effectuer à l'aide de 2, 3 voire 4 solvants similaires à ceux mentionnés en mode isocratique.

↪ Ce mode permet d'améliorer la résolution, la sensibilité, tout en diminuant le temps d'analyse ($k' < 10$).

↪ Ce mode permet aussi de diminuer l'effet de tailing des pics dont les temps de rétention sont important car on choisit le gradient pour que ces pics aient $k' < 10$.

La colonne chromatographique: phases stationnaires d'adsorption

Généralités

- ⇒ Il s'agit des premières phases stationnaires développées pour HPLC, elle dérivent directement de la chromatographie sur colonne.
- ⇒ Ces phases stationnaires peuvent être normales (polaires) ou inverses (apolaires).
- ⇒ Les phases normales sont à base de silice SiO_2 ou d'alumine Al_2O_3 .
- ⇒ Les phases inverses sont à base de carbone poreux ou de graphite.
- ⇒ Le rôle de l'éluant est primordial dans ce type de chromatographie puisque les molécules des solvants constituant l'éluant sont en compétition avec les solutés vis-à-vis de la phase stationnaire.
- ⇒ Les mécanismes de rétention par adsorption sont décrits en annexe (fichier HPLC_adsorption).
- ⇒ La pureté des solvants constituant l'éluant conditionne grandement l'efficacité et la reproductibilité de la séparation.

⇒ Plus les interactions entre l'éluant et la phase stationnaire sont fortes, moins les interactions entre les solutés et la phase stationnaire le seront.

Phases stationnaires normales

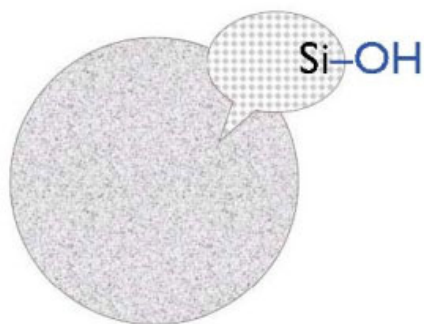
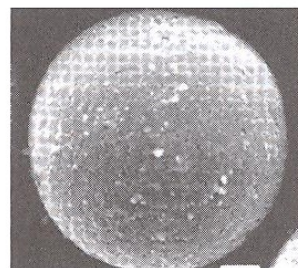
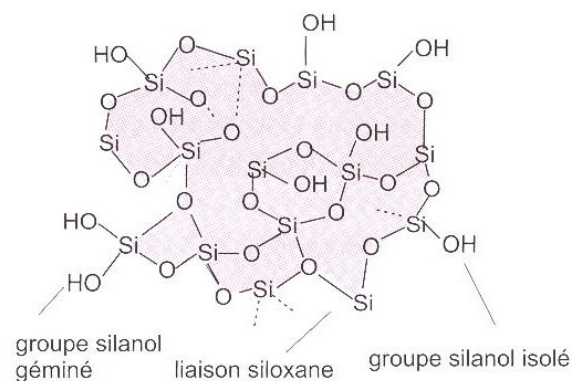
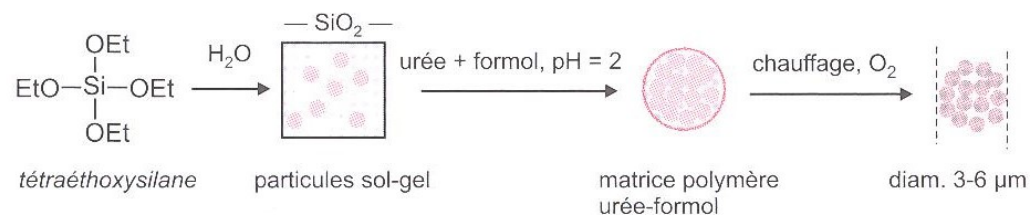
⇒ Ce type de phases stationnaires requière un éluant peu polaire. Pour un éluant binaire, le solvant de base est un alcane (*n*-hexane, *n*-heptane, isooctane...) et le solvant sélectif est un solvant plus polaire.

⇒ La rétention des solutés augmente selon la série:

hydrocarbures fluorés → hydrocarbures saturés → hydrocarbures insaturés et aromatiques → dérivés halogénés → éthers → esters → cétones et aldéhydes → alcools et amines → acides et bases

⇒ Les phases stationnaires à base de silice SiO_2 sont obtenues par hydrolyse-condensation du silicate de sodium $[(\text{Na}_2\text{SiO}_3)_x(\text{NaOH})_y(\text{H}_2\text{O})_z]$ en milieu acide. Le gel obtenu a pour structure: $[\text{SiO}_{(2-x/2)}(\text{OH})_x]_n(\text{H}_2\text{O})_p$.

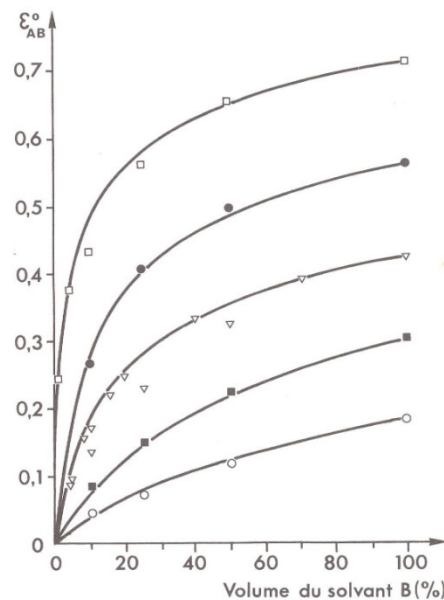
⇒ Les plus récents procédés Sol-Gel permettent d'obtenir des particules de silice homogènes dont la distribution en taille est relativement fine:



- Particules sphériques: 3, 5, 7, 10 μm
- Densité: 2,2 $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$
- Densité de remplissage: 0,4 - 0,7 $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$
- Diamètre des pores: 6, 10, 30, 50, 100 nm
- Surface spécifique: 20, 50, 120, 250, 450 $\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$
- Silanol: 5 / nm^2 , soit 8 $\mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}$ (au maximum)

- ⇒ La silice convient à la séparation de solutés présentant des groupes fonctionnels polaires différents. Elle permet aussi la séparation d'isomères de position. La silice étant un oxyde acide, elle convient bien pour la séparation des bases et/ou des solutés instables en milieu basique.
- ⇒ Ces phases stationnaires acceptent un pH de phase mobile compris entre 2 et 8.
- ⇒ Les interactions solutés/phase stationnaire font intervenir les forces de dispersion de London, forces électrostatiques, liaisons hydrogènes...
- ⇒ Les phases stationnaires à bases d'alumine sont obtenues à l'aide de procédés similaires. Il s'agit aussi d'un gel d'alumine dont la structure chimique est tout aussi compliquée.
- ⇒ L'alumine convient à la séparation de solutés présentant des groupes fonctionnels polaires différents. Elle permet aussi la séparation d'isomères de position. L'alumine étant un oxyde basique, elle convient bien pour la séparation des acides et/ou des solutés qui sont instables en milieu acide.
- ⇒ Le pouvoir de séparation des gels d'alumine est toutefois moins bon que celui de la silice. Ces phases stationnaires acceptent un pH de phase mobile compris entre 6 et 12.
- ⇒ Les interactions solutés/phase stationnaire font aussi intervenir les forces de dispersion de London, forces électrostatiques, liaisons hydrogènes...

⇒ Les phases stationnaires d'adsorption normales peuvent être utilisées en mode isocratique ou en mode gradient (voir fichier HPLC_adsorption).



Variation de la force éluante (déterminée sur alumine) d'un mélange binaire en fonction du pourcentage en volume du solvant le plus polaire.
 ○ : pentane/tétrachlorure de carbone (B)
 ■ : pentane/chlorure de *n*-propyle (B)
 ▽ : pentane/dichlorométhane (B)
 ● : pentane/acétone (B)
 □ : pentane/pyridine (B).

⇒ Dans la plupart des cas, la séparation se déroule avec un éluant composé de plusieurs solvants. La force éluante ϵ_0 (voir fichier solvants HPLC) de ce dernier est difficile à estimer.

⇒ Les phases stationnaires d'adsorption normales, de part leur sensibilité à la pureté des éluants et à leur chimie de surface compliquée sont progressivement remplacée par des phases stationnaires de partage normales.

Phases stationnaires inverses

- ⇒ Ce type de phase stationnaire requière un éluant polaire. Pour un éluant binaire, le solvant de base est une phase aqueuse (eau pure, eau légèrement acidifiée ou basifiée, tampon) et le solvant sélectif est un solvant moins polaire.
- ⇒ Ces phases stationnaires acceptent un pH de phase mobile compris entre 1 et 13.
- ⇒ La rétention des solutés diminue selon la série:

hydrocarbures fluorés → hydrocarbures saturés → hydrocarbures insaturés et aromatiques → dérivés halogénés → éthers → esters → cétones et aldéhydes → alcools et amines → acides et bases

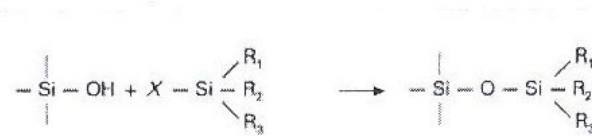
- ⇒ Les phases stationnaires d'adsorption inverses peuvent être utilisées en mode isocratique ou en mode gradient (voir fichier HPLC_adsorption).
- ⇒ Parce qu'elles sont difficiles à mettre en œuvre, ces phases stationnaires sont peu répandues. Elles sont douées de propriétés absorbantes intenses qui les rendent très sensibles aux impuretés des éluants. Dans ce domaine, le carbone poreux et le graphite sont les phases les plus connues. Ces phases ont laissé leur place aux phases stationnaires de partage inverses.

La colonne chromatographique: phases stationnaires de partage

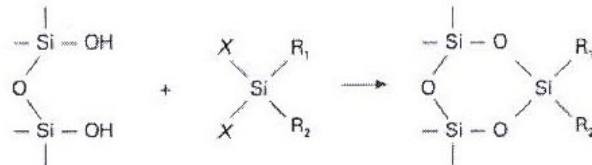
Généralités

- ⇒ Il s'agit de phases stationnaires issues de la modification de surface de la silice obtenue par procédés Sol-Gel.
- ⇒ Les modifications de surface par différents groupes fonctionnels permettent d'engendrer une grande variété de polarité.
- ⇒ Il existe des silices modifiées constituant des phases normales.
- ⇒ Ces dernières sont plus stables que la silice pure car la réactivité des groupes silanols (Si-OH) est réduite par substitution par des groupes organiques polaires moins réactifs.
- ⇒ Il existe des silices modifiées constituant des phases inverses.
- ⇒ Elles sont aussi bien moins réactives que les phases stationnaires minérales à base de carbone.
- ⇒ Pour obtenir ces phases stationnaires, il faut substituer les groupes silanols par des chaînes alkyles (C_2 - C_{18}).

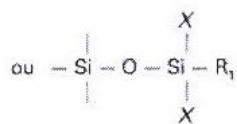
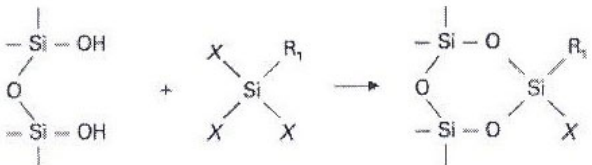
⇒ Modification chimique de la silice SiO_2 *via* les groupes silanols Si-OH :



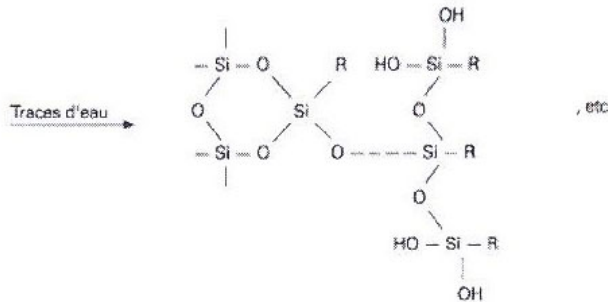
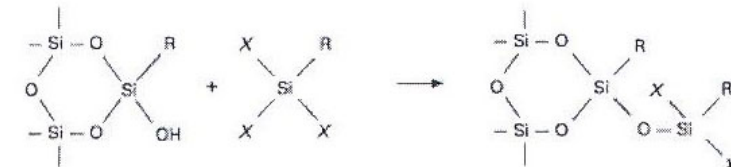
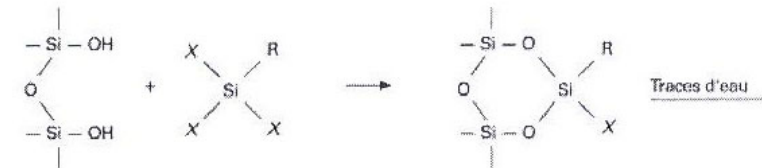
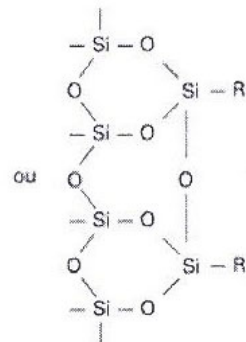
a silane monofonctionnel



b silane difonctionnel

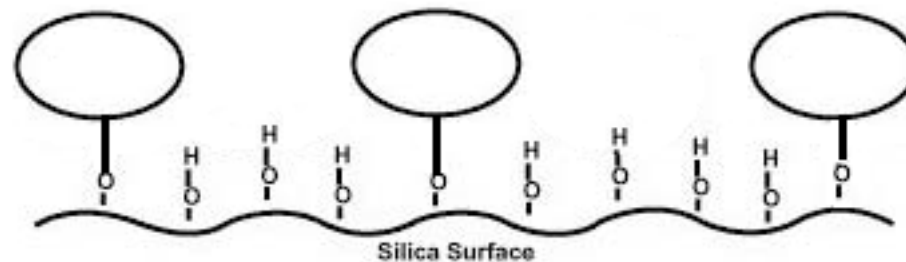


c silane trifonctionnel



La réaction de modification est une substitution nucléophile ou x est un groupe nucléofuge: $\text{x} = \text{Cl}$, $\text{CH}_3\text{O}-$, $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}-$,...

⇒ La modification chimique de la silice SiO_2 n'est pas totale, il reste toujours des groupes silanols non modifiés (4 à 4,5 sur 8 $\mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}$ pour les phases inverses). Ceci provient d'une gêne stérique des substituant alkyles entre eux lorsqu'ils se greffent sur les silanols.

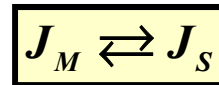


⇒ Dans certains types de phase stationnaire, les groupes silanols résiduels devront être modifiés ultérieurement ou écrantés pour affiner les propriétés chromatographiques escomptées. Les différentes techniques utilisées seront détaillées plus loin.

⇒ Ces phases stationnaires, de par la nature chimique de leur surface, se comportent plus comme des matériaux organiques que comme des matériaux minéraux. Ils sont assimilables à un liquide très visqueux.

⇒ La nature liquide de ces phases stationnaires implique un phénomène chromatographique de partage.

⇒ La séparation des solutés est basée sur leur partage entre deux liquides: la phase mobile et la phase stationnaire. Pour un soluté J , on a donc l'équilibre suivant:



⇒ Le facteur de rétention $k'_{(J)}$ s'exprime alors:

$$k'_{(J)} = K_{D(J)} \frac{V_S}{V_M}$$

⇒ La constante de distribution $K_{D(J)}$ s'exprime en fonction de la variation d'enthalpie libre standard de distribution du soluté J entre la phase mobile et la phase stationnaire:

$$K_{D(J)} = e^{-\left(\frac{\Delta_D G_{(J)}^0}{RT}\right)} \Rightarrow K_{D(J)} > 1$$

$$\Delta_D G_{(J)}^0 = \mu_{S(J)}^0 - \mu_{M(J)}^0$$

- ⇒ Pour une phase stationnaire donnée, le facteur de rétention $k'_{(J)}$ est directement corrélé au potentiel chimique du soluté J en phase mobile.
- ⇒ La nature de l'éluant conditionne donc le facteur de rétention $k'_{(J)}$.
- ⇒ Une élution en mode gradient permettra de séparer des solutés dont les facteurs de rétention k' sont proches lors d'une élution en mode isocratique.

$$\log k'_{(J)} = \frac{(\mu_{M(J)}^0 - \mu_{S(J)}^0)}{2,3RT} + \log \Phi_{SM}$$

Phases stationnaires normales

- ⇒ Ce type de phases stationnaires requière un éluant peu polaire. Pour un éluant binaire, le solvant de base est un alcane (n -hexane, n -heptane, isooctane...) et le solvant sélectif est un solvant plus polaire.

- ⇒ Dans certains cas, lorsque l'on sépare des acides, on a intérêt à utiliser un éluant qui permet un recul de ionisation des ces solutés. On pourra alors utiliser un mélange du type: *n*-hexane/dichlorométhane/acide acétique.
- ⇒ Si l'on doit séparer des amines, on ajoutera à l'éluant une base organique.
- ⇒ La rétention des solutés suit la même série que celle des phases stationnaires d'adsorption normales (SiO_2 et Al_2O_3).
- ⇒ Les phases stationnaires normales sont obtenues à partir de silice en substituant les groupes silanols par des groupes fonctionnels suivants:

$R = -(\text{CH}_2)_3\text{-NH}_2, -(\text{CH}_2)_3\text{-NHR}_1, -(\text{CH}_2)_3\text{-NR}_1\text{R}_2, -(\text{CH}_2)_n\text{-CN}, -\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-NO}_2, -(\text{CH}_2)_3\text{-O-CH}_2\text{-CH(OH)-CH}_2\text{OH}.$

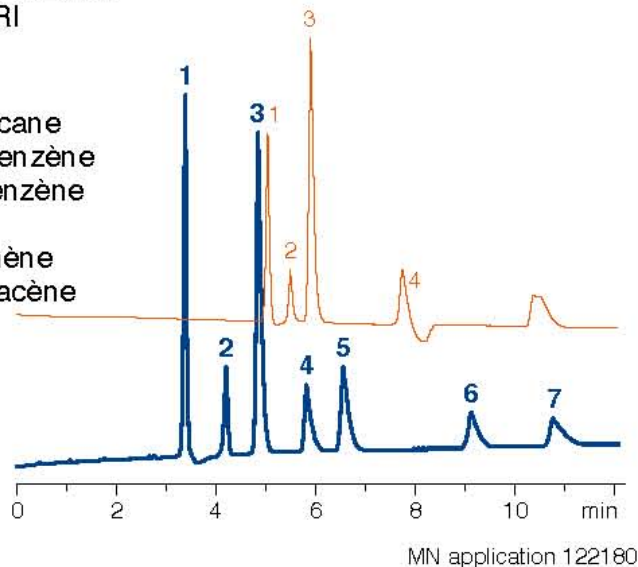
- ⇒ Dans cette famille de phases stationnaires, les plus répandues sont les phases aminopropyle et alkylnitrile mais les autres sont aussi commercialisées.
- ⇒ Pour ce type de phases stationnaires, même si la substitution n'est pas complète, la présence de groupes silanols résiduels ne posent pas de problème particulier, il ne sont généralement ni modifiés ni écrantés, sauf pour des applications spécifiques.

Séparation en phase normale de distillats moyens selon la norme DIN EN 12916

Colonnes : **A) 250 x 4 mm NUCLEODUR® 100-5 NH₂**
B) phase aminopropyle conventionnelle
 Eluant : heptane
 Débit : 1 mL/min
 Détection : RI

Pics :

1. Cyclohexane
2. 1-Phényldodécane
3. 1,2-Diméthylbenzène
4. Hexaméthylbenzène
5. Naphtalène
6. Dibenzothiophène
7. 9-Méthylantracène

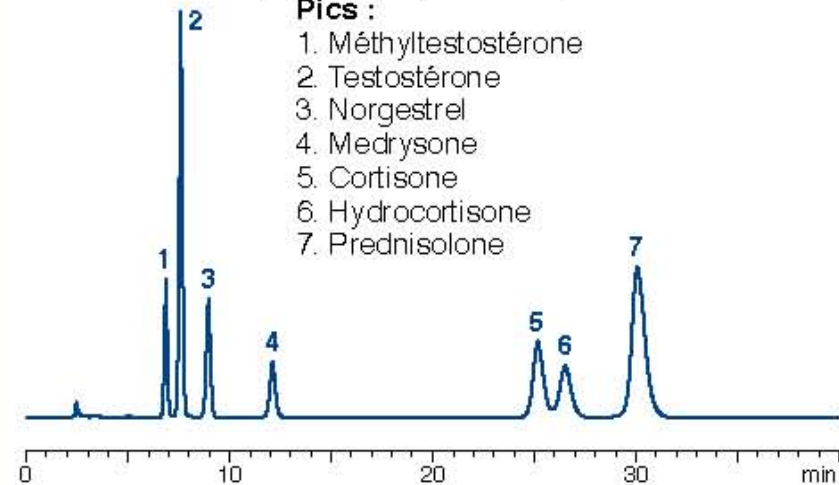


Phase normale

Colonne : 250 x 4 mm NUCLEODUR® 100-5 CN
 Eluant : *n*-heptane – 2-propanol (90:10, v/v)
 Débit : 1,0 mL/min, température 25 °C
 Détection : UV, 254 nm, injection 10 µL

Pics :

1. Méthyltestostérone
2. Testostérone
3. Norgestrel
4. Medrysone
5. Cortisone
6. Hydrocortisone
7. Prednisolone

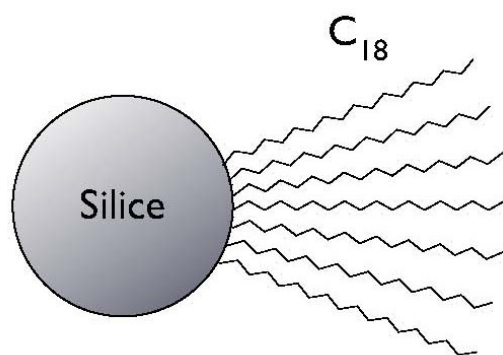


⇒ En modes isocratique et gradient, les relations qui relient k' à la composition de l'éluant sont empiriques et dépendent de la nature de l'éluant, de la phase stationnaire considérée et des solutés à séparer.

⇒ Ce point sera abordé dans la partie qui concerne les facteurs influençant la séparation.

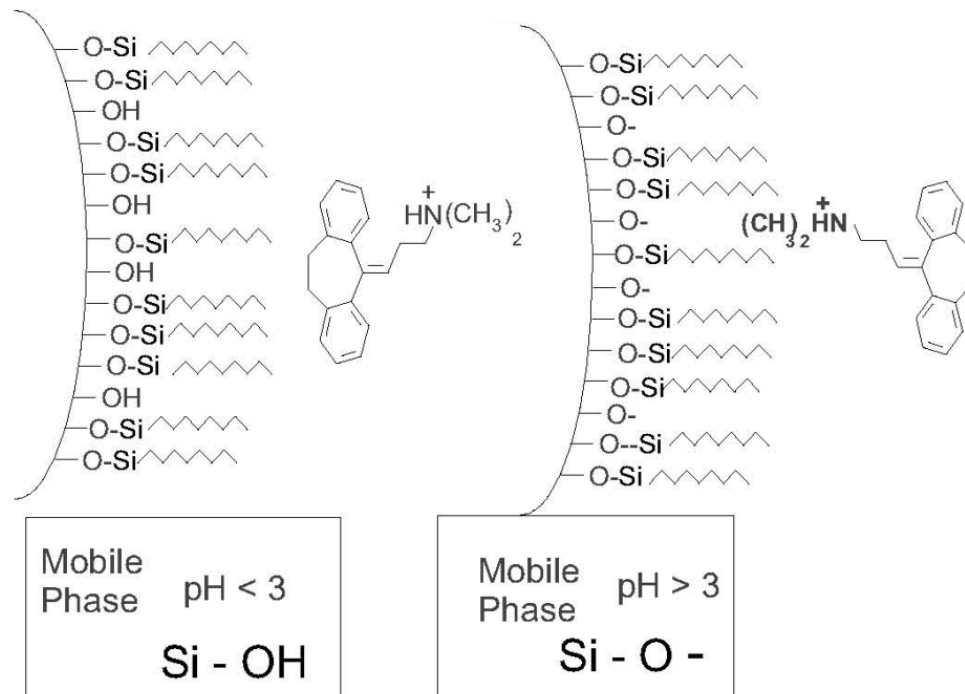
Phases stationnaires inverses

- ⇒ Ce type de phase stationnaire requière un éluant polaire. Pour un éluant binaire, le solvant de base est une phase aqueuse (eau pure, eau légèrement acidifiée ou basifiée, tampon) et le solvant sélectif est un solvant moins polaire.
- ⇒ La rétention des solutés suit la même série que celle des phases stationnaires d'adsorption inverses.
- ⇒ Les phases stationnaires inverses sont obtenues à partir de silice en substituant les groupes silanols par des groupes fonctionnels alkyles (C_4 , C_8 , C_{18}). Le substituant est en général un diméthylchlorosilane portant une chaîne C_x .



- ⇒ Il existe des colonnes C_2 où l'agent de dérivatisation de la silice est $(CH_3)_2-SiX_2$.
- ⇒ D'autres phases stationnaires de type phényle $-(CH_2)_3-C_6H_5$ sont aussi courantes.
- ⇒ Ces phases inverses à base de silice ne peuvent être utilisées que pour un pH de phase mobile compris entre 2 et 8 car le squelette de silice se dissout pour des pHs hors de ce domaine.

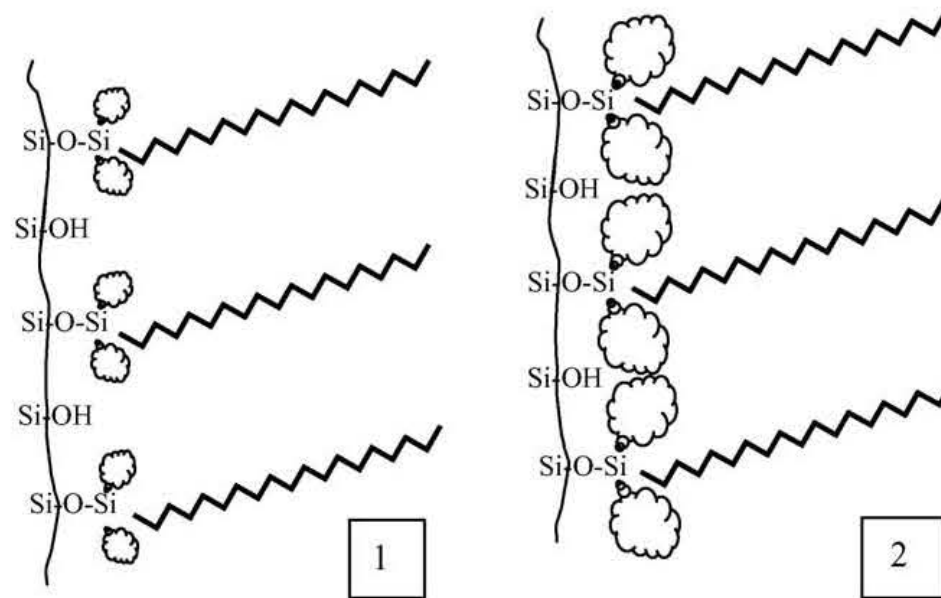
- ⇒ Pour pallier à la stabilité du squelette de silice, de nouvelles phases stationnaires dont le squelette est remplacé par de la zircone (ZrO_2) ou des co-polymères styrène-divinylbenzène (PS-DVB) sont proposées. L'utilisation de polymères organiques offre une relativement bonne stabilité sur toute la gamme de pH (0 à 14 en théorie) des phases mobiles employées.
- ⇒ Pour les phases stationnaires inverses, la présence de groupes silanols non modifiés réduisent l'hydrophobicité de cette dernière et peuvent poser un problème pour les solutés hydrophiles, ionisables et surtout pour les solutés basiques.



⇒ On observe des modes de rétention mixtes, asymétrie de pics, tailing...pour ce type de solutés.

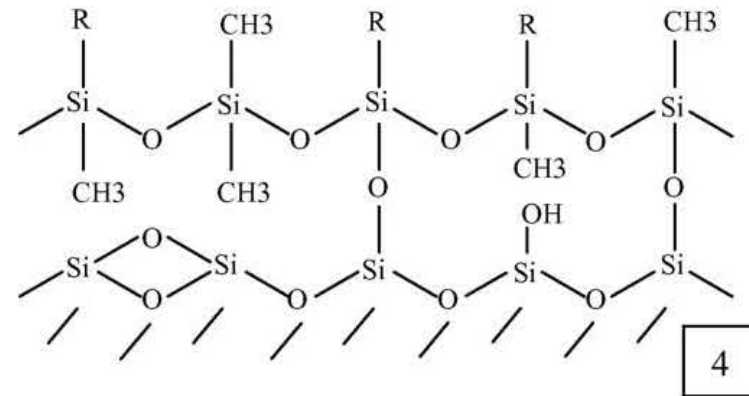
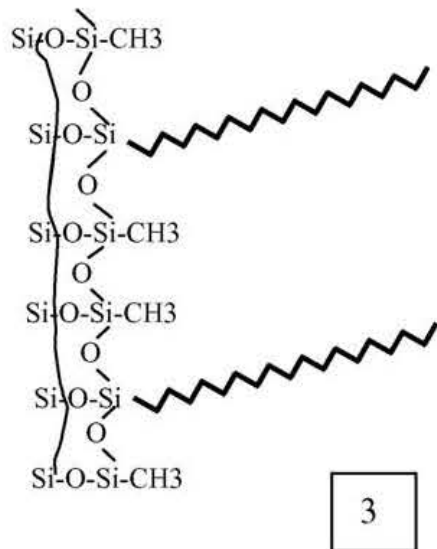
⇒ On peut alors proposer des modifications de ces phases stationnaires mais n'est pas forcément nécessaire, cela dépend de l'application visée.

- ⇒ Pour réduire l'activité des silanols résiduels, on peut procéder à une substitution par une chaîne alkyle portée par un di-*iso*-propylchlorosilane ou un di-*iso*-butylchlorosilane.
- ⇒ Les groupes *iso*-propyles ou *iso*-butyles (2) écrantent mieux les silanols résiduels que les groupes méthyles classiquement utilisés (1):



- ⇒ Les groupes silanols ne sont pas totalement masqués. Cependant, ces phases stationnaires peuvent être utilisées avec un éluant riche en phase aqueuse.

⇒ On peut aussi procéder par polymérisation *in-situ* de la phase stationnaire (3) ou dépôt d'un polymère servant de phase stationnaire (4):

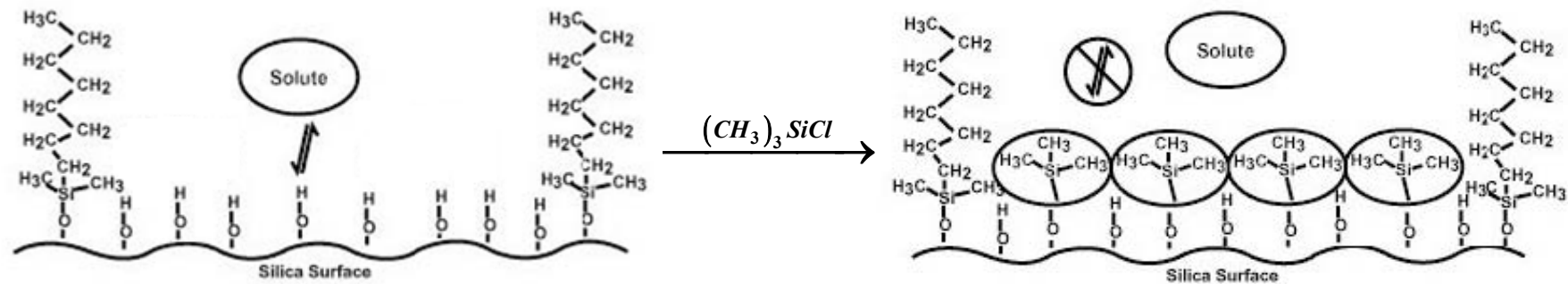


⇒ Ces modifications ont l'avantage de protéger le squelette de silice. Ces phases stationnaires peuvent être utilisées dans une plus grande gamme de pH de phase mobile.

⇒ On observe aussi une amélioration de la symétrie des pics chromatographiques.

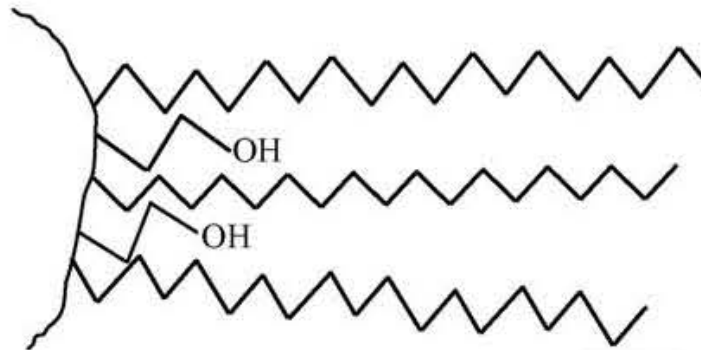
⇒ Ce type de phases stationnaires est plus dense que les phases stationnaires classiques, les silanols résiduels sont largement moins accessibles que dans le cas classique.

⇒ On peut procéder à un *endcapping* hydrophobe avec du triméthyl- ou de l'hexaméthylchlorosilane:



- ⇒ Le *endcapping* hydrophobe améliore la symétrie des pics (surtout pour les solutés basiques). Il réduit néanmoins la sélectivité.
- ⇒ La phase stationnaire devient très hydrophobe et les chaînes alkyles ont tendance à se rétracter lorsque le pourcentage de phase aqueuse dans l'éluant devient important.
- ⇒ On observe parfois un effondrement de la phase stationnaire lorsque le pourcentage de phase aqueuse dans l'éluant est au-delà de 90%.

⇒ On peut procéder à un *endcapping* hydrophile avec un dérivé chlorosilane substitué par une courte chaîne alkyle terminée par un groupe amine ou hydroxy.

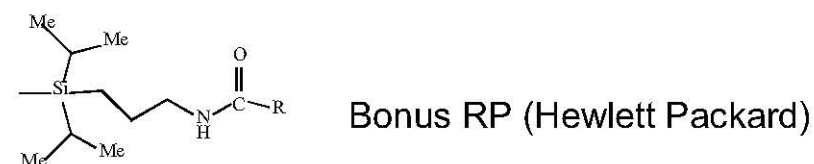
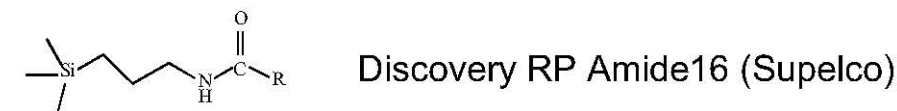
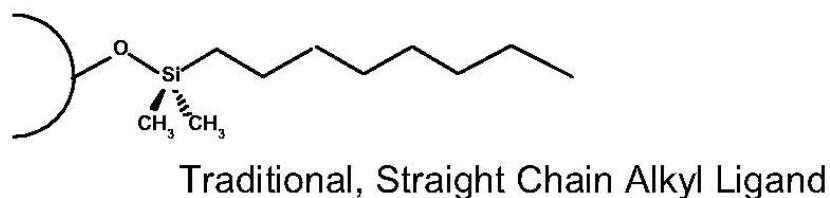
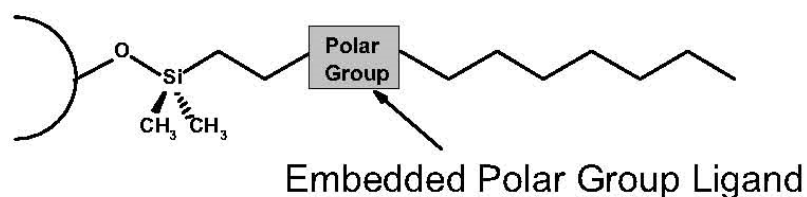


⇒ Ces phases stationnaires possèdent une hydrophobicité similaires aux phases stationnaires non-*endcappées*. Elles peuvent être utilisées avec un éluant riche en phase aqueuse.

⇒ La phase aqueuse de l'éluant établit un film à la surface des billes de silice permettant alors une interaction maximale entre le solvant organique de l'éluant et les chaînes alkyles. Ces dernières restent déployées même à forte concentration de phase aqueuse dans la phase mobile. Il n'y a plus de silanols actifs mais une phase aqueuse continue en surface.

⇒ Elles présentent une meilleur sélectivité pour les solutés acides. A très bas pH de phase mobile, elles présentent une bonne sélectivité pour les solutés basiques.

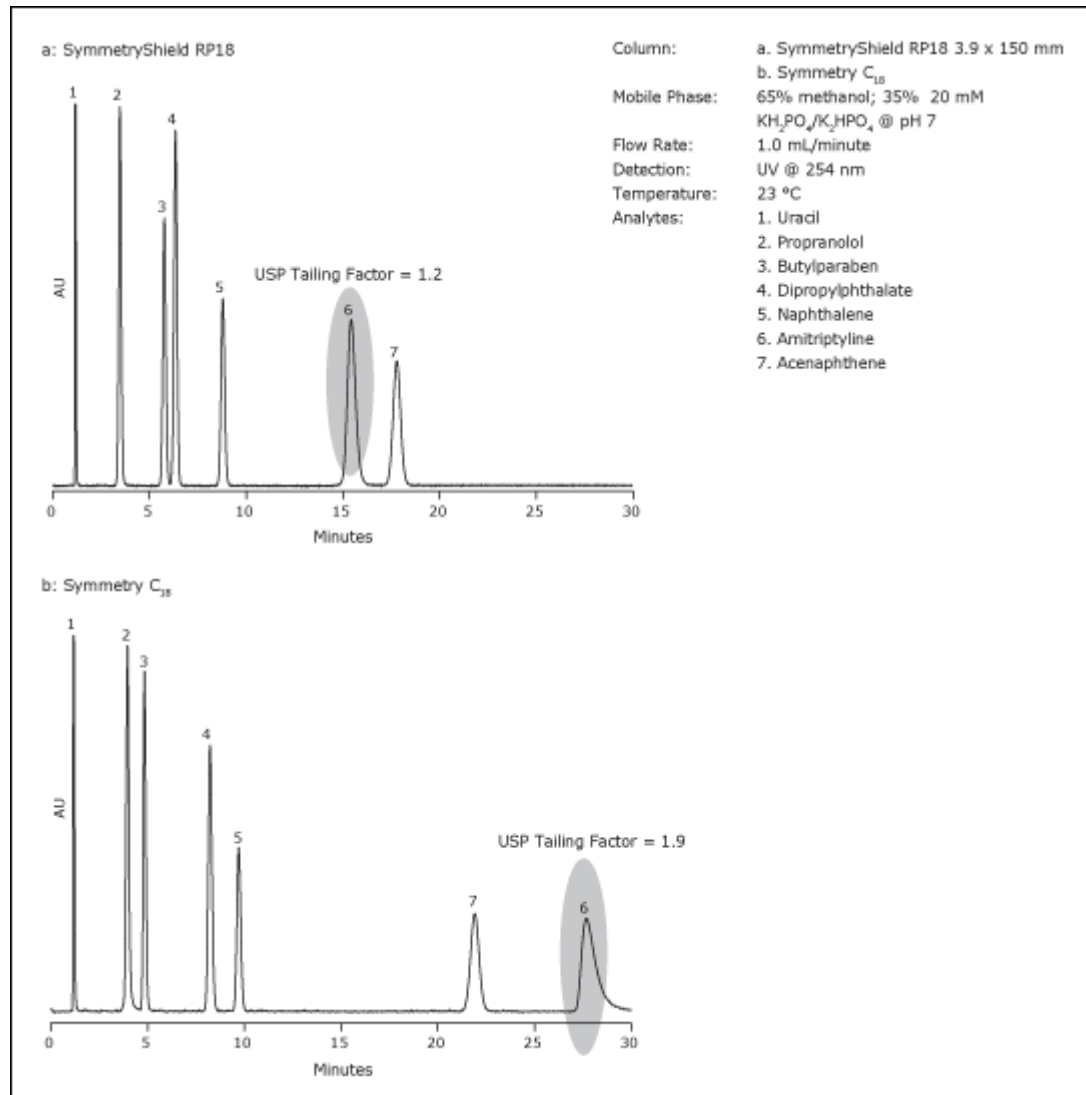
⇒ On peut modifier la chaîne alkyle en introduisant un groupe organique polaire: étheroxyde, amide, urée, carbamate, sulfonyle ou thiocarbamate.



⇒ La phase aqueuse de l'éluant établit un film à la surface des billes de silice.

⇒ La couche de phase aqueuse immobilisée agit comme un bouclier de forte constante diélectrique, empêchant les interactions ioniques entre les solutés ionisés et les silanols résiduels ionisés. Les liaisons hydrogène entre les silanols résiduels neutres et les solutés sont aussi amoindries.

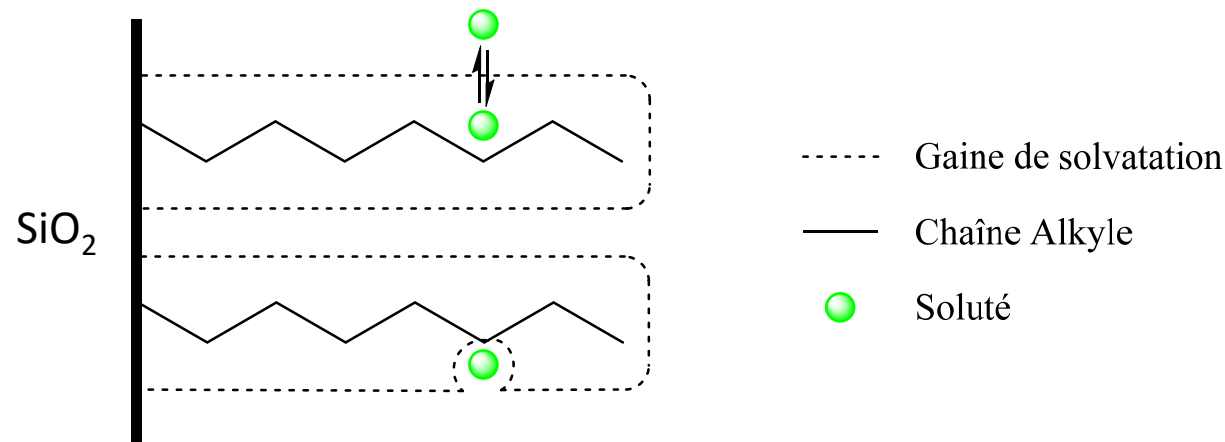
- ↪ Les liaisons hydrogènes qui s'établissent entre deux groupes polaires vicinaux organisent les chaînes alkyles.
- ↪ L'organisation des chaînes alkyles améliore considérablement la stabilité de ces phases stationnaires, notamment par rapport à leur effondrement éventuel.
- ↪ Ces phases stationnaires permettent l'emploi de phases mobiles à faibles pourcentage de solvant organique (voire 100% en phase aqueuse) sans perte de stabilité (hydrolyse du support SiO_2).
- ↪ L'activité des silanols est grandement diminuée.
- ↪ Par rapport aux phases stationnaires traditionnelles, k' augmente pour les solutés polaires et solutés pouvant engendrer des liaisons hydrogènes. Ceci n'est valable que lorsque tous ces solutés sont non ionisés.
- ↪ Par rapport aux phases stationnaires traditionnelles, k' diminue pour les solutés acides et basiques ionisés avec une diminution du tailing de leurs pics chromatographiques.
- ↪ La symétrie des pics chromatographiques des solutés acides est améliorée lorsque le solvant sélectif est de l'acétonitrile. Le contraire est souvent observé lorsque le solvant sélectif est du méthanol.



↪ La symétrie des pics chromatographiques des solutés basiques est améliorée lorsque le solvant sélectif est du méthanol. Le contraire est souvent observé lorsque le solvant sélectif est de l'acétonitrile.

↪ Par rapport aux phases stationnaires traditionnelles, la rétention diminue pour les solutés saturés et augmente pour les insaturés en général.

- ⇒ La rétention sur phases stationnaires inverses alkyles est expliquée par deux mécanismes.
- ⇒ Pour décrire ces deux mécanismes, on doit considérer que le solvant organique de la phase mobile forme une gaine de solvation autour des greffons apolaires:



- ⇒ Les solutés peuvent se partager entre la phase mobile et le solvant organique immobilisé autour de ces greffons.
- ⇒ Les solutés peuvent interagir directement avec la chaîne alkyle, ils se substituent à la gaine de solvation.

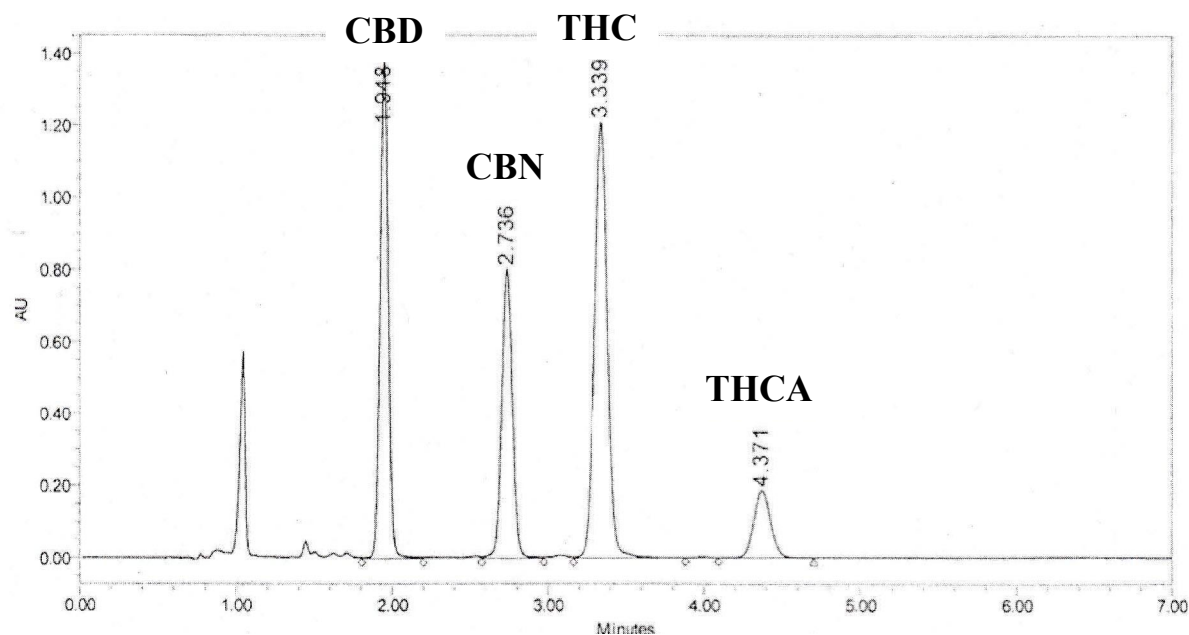
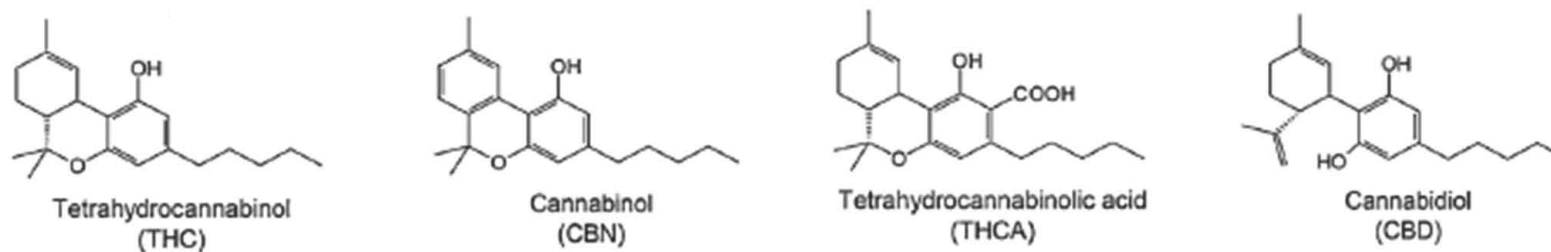
⇒ Les deux mécanismes interviennent en même temps, l'importance relative de chacun dépend de la nature des solutés et en particulier de leur caractère hydrophobe:

- pour de petites molécules organique, le mécanisme sera du partage pur.
- pour des molécules organiques moyenne telles que des peptides (une dizaine d'acides aminés), le mécanisme sera basé sur l'interaction hydrophobe et du partage.
- pour de grosses molécules organiques telles que des protéines (une centaine d'acides aminés), le mécanisme sera basé sur des interactions hydrophobes uniquement: HIC (Hydrophobic-Interaction Chromatography).

⇒ En modes isocratique et gradient, les relations qui relient k' à la composition de l'éluant sont empiriques et dépendent de la nature de l'éluant, de la phase stationnaire considérée et des solutés à séparer.

⇒ Ce point sera abordé dans la partie qui concerne les facteurs influençant la séparation.

⇒ L'exemple ci-dessous concerne la séparation de divers cannabinoïdes en chromatographie sur phase stationnaire inverse:



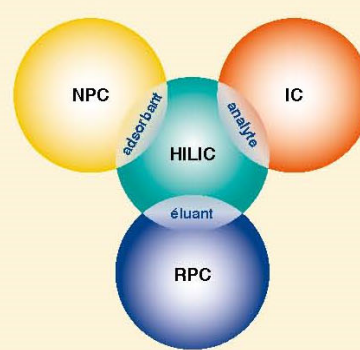
Colonne Nucléodur C₁₈ gravity 4,6 mm × 250 mm × 5 μm, mode isocratique à 3 mL·min⁻¹: 20% de A et 80% de B (A: acide formique à 0,1% (v/v) ; B: acétonitrile)

Phases stationnaires HILIC (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography)

- ⇒ Ce type de phase stationnaire est hydrophile et la phase mobile est un éluant binaire relativement hydrophobe.
- ⇒ Le mode HILIC peut être considéré comme une variante du mode en phase normale. Il s'agit d'une chromatographie en phase normale de composés polaires ou ioniques sous des conditions de phase inverse.
- ⇒ Les phases stationnaires HILIC les plus récentes sont à base de silice modifiée par une sulfoalkylebétaine:

NUCLEODUR® HILIC

phase zwitterionique



Caractéristiques principales :

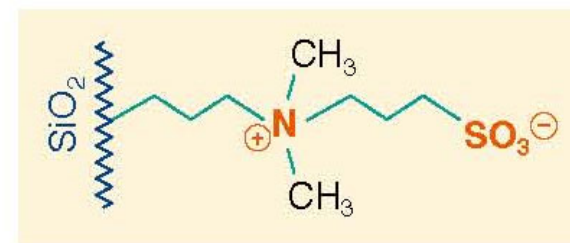
- Idéale pour une analyse chromatographique stable et reproductible des composés polaires
- Utilisable pour des applications analytiques et préparatives et particulièrement en LC/MS, particules de 1,8 µm compatibles UHPLC
- Rapide à conditionner

Caractéristiques techniques :

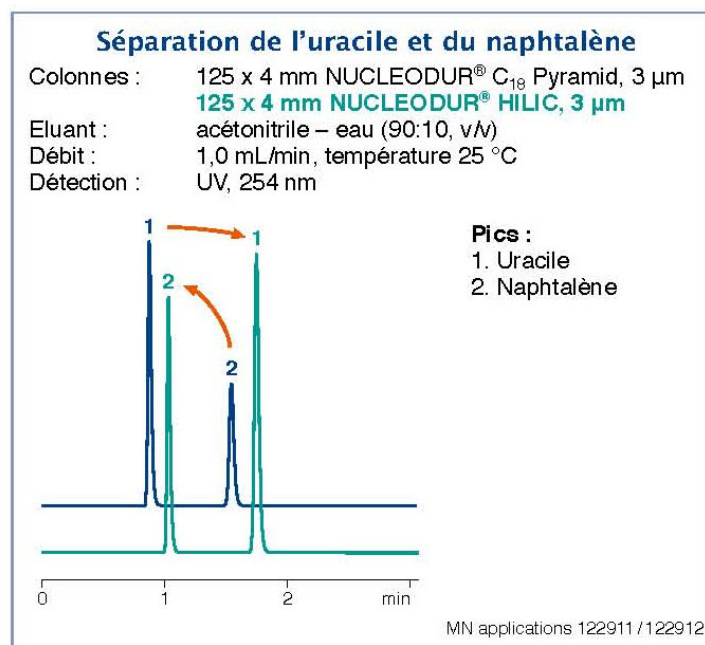
Silice modifiée ammonium – acide sulfonique ; taille des pores 110 Å ; tailles des particules 1,8, 3 et 5 µm ; teneur en carbone 7 % ; stabilité aux pH 2-8.5

Domaines d'applications :

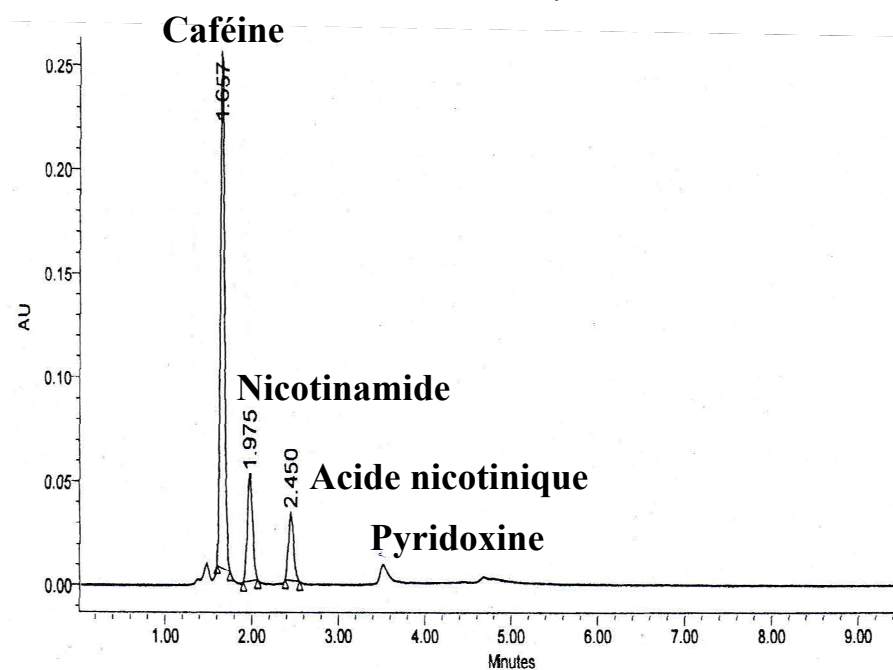
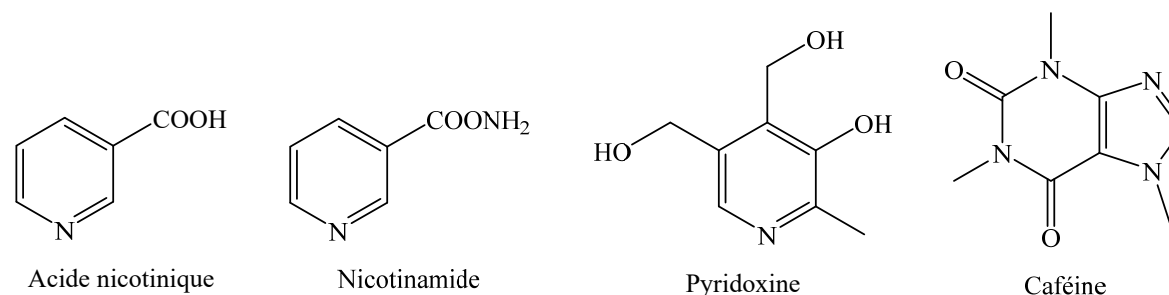
Composés hydrophiles comme les bases et les acides organiques polaires, composés naturels polaires, nucléosides, oligonucléotides, acides aminés, les peptides, les vitamines hydrosolubles



- ⇒ Le principe de ces phases stationnaires zwitterioniques réside en la formation d'une pellicule d'eau à la surface de celle-ci. La rétention des solutés augmente avec la polarité des ces derniers.
- ⇒ La rétention est largement exempte d'interactions silanophiliques et ioniques comme c'est la cas des phase normales SiO_2 et SiO_2 greffées amino.
- ⇒ La rétention est moins affectée par les variations du pH de l'éluant que ne le sont les phase stationnaires SiO_2 , SiO_2 greffées amino et amide. Les mécanismes de rétention ne sont pas clairement établis.



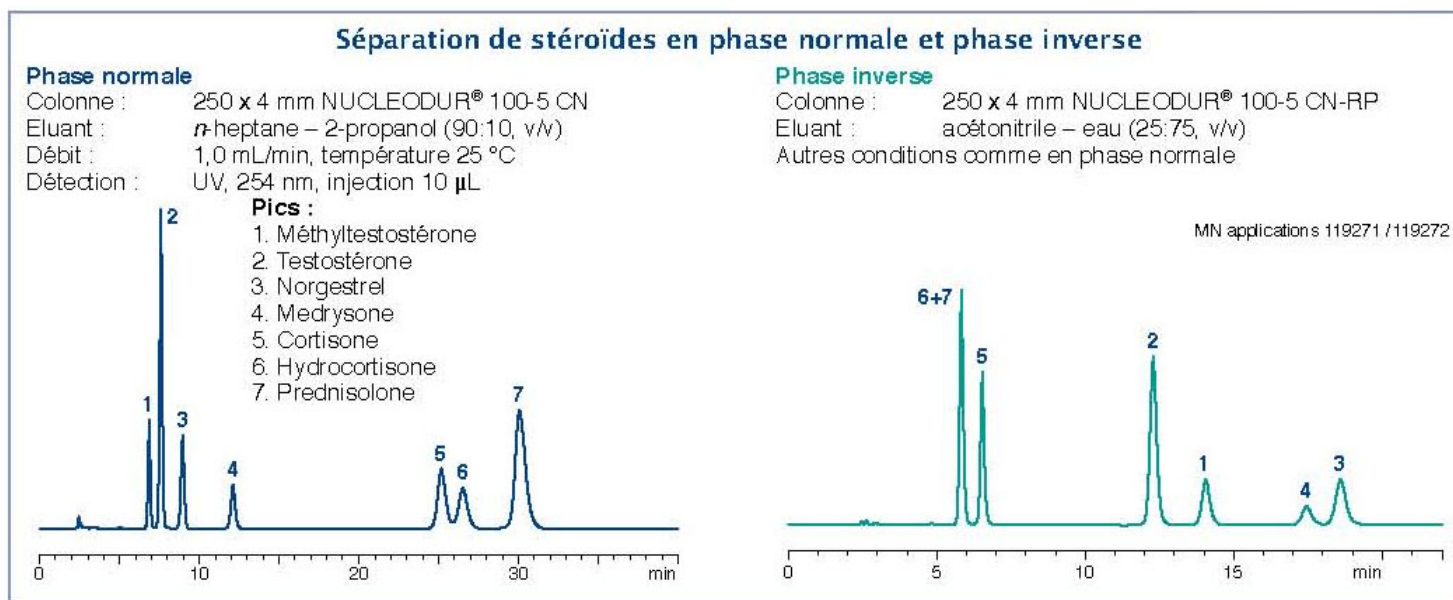
⇒ L'exemple ci-dessous concerne la séparation des composants du Red Bull en chromatographie sur phase stationnaire HILIC:



Colonne Nucleoshell HILIC 4,6 mm × 150 mm × 2,7 μm, mode gradient à 1 mL·min⁻¹: 20% de A et 80% de B pendant 1 min puis 3 min pour atteindre 50% de A et 50% de B (A: acide formique / formiate d'ammonium à 25 mM, pH = 3; B: acétonitrile)

Phases stationnaires mixtes

⇒ Les phases stationnaires de type propylcyano et propylamino, en fonction de la nature de l'éluant, peuvent se comporter comme des phases normales (éluant peu polaire) ou des phases inverses (éluant polaire).



Phases stationnaires monolithiques

⇒ Ce type de phase stationnaire est constitué d'une pièce unique de matériau poreux formé de macropores et mésopores. Le matériau peut être inorganique: SiO_2 , ZrO_2 , carbone ou organique: polyméthacrylate, polystyrène-divinylbenzène.

Chromolith (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)

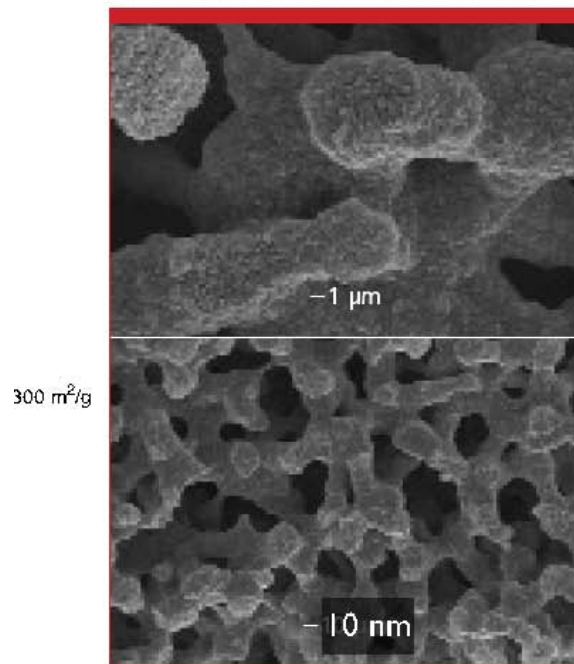


Figure 1: Electron micrographs of the (a) macroporous and (b) mesoporous structures in a monolithic silica rod.

⇒ Des phases stationnaires SiO_2 et SiO_2 greffée C_8 et C_{18} sont proposées. Le greffage C_8 et C_{18} est disponible sur ZrO_2 ou sur squelette organique.

⇒ Ces phases stationnaires, intéressantes au niveau de la réduction des pertes de charge dans la colonne, souffrent d'un manque de modifications chimiques disponibles (C_8 ou C_{18}).

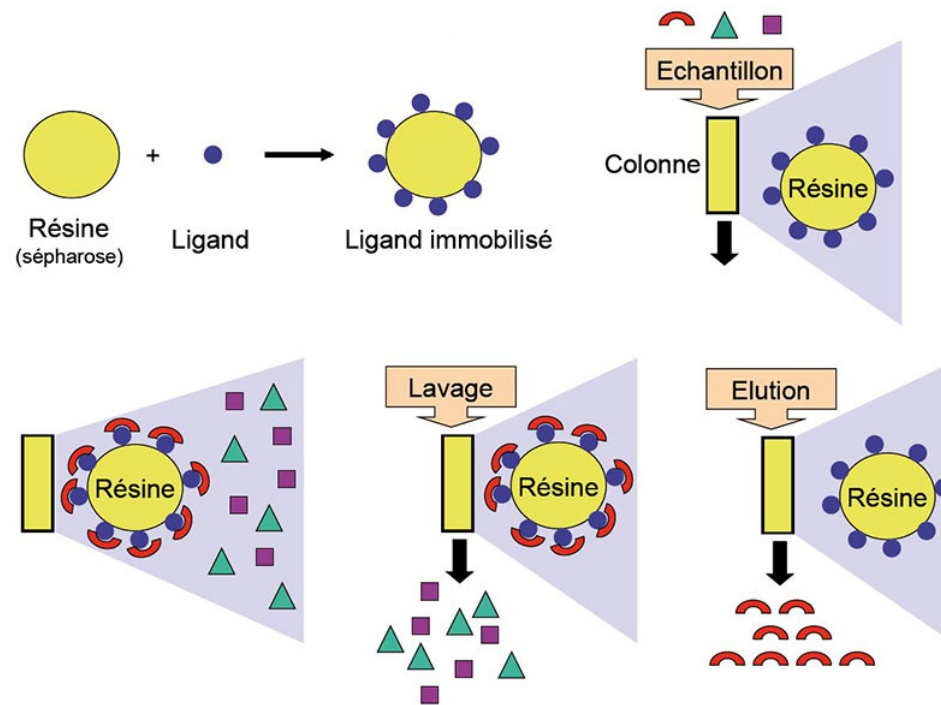
La colonne chromatographique: phases stationnaires d'affinité

Généralités

- ⇒ La phase stationnaire possède des groupements spécifiques qui permettent de sélectionner un soluté particulier par affinité.
- ⇒ Il peut s'agir d'une phase stationnaire à base d'anticorps qui permettent l'isolement spécifique de protéines appelées antigènes.
- ⇒ Il peut s'agir de métaux, Immobilised Metal Affinity Chromatography IMAC, qui interagissent spécifiquement avec certains acides aminés qui constituent les protéines, enzymes...
- ⇒ Il peut s'agir de phases stationnaires présentant des groupes chiraux qui permettent une reconnaissance spécifique d'un des énantiomères d'un mélange racémique.

Phases stationnaires d'affinité greffées

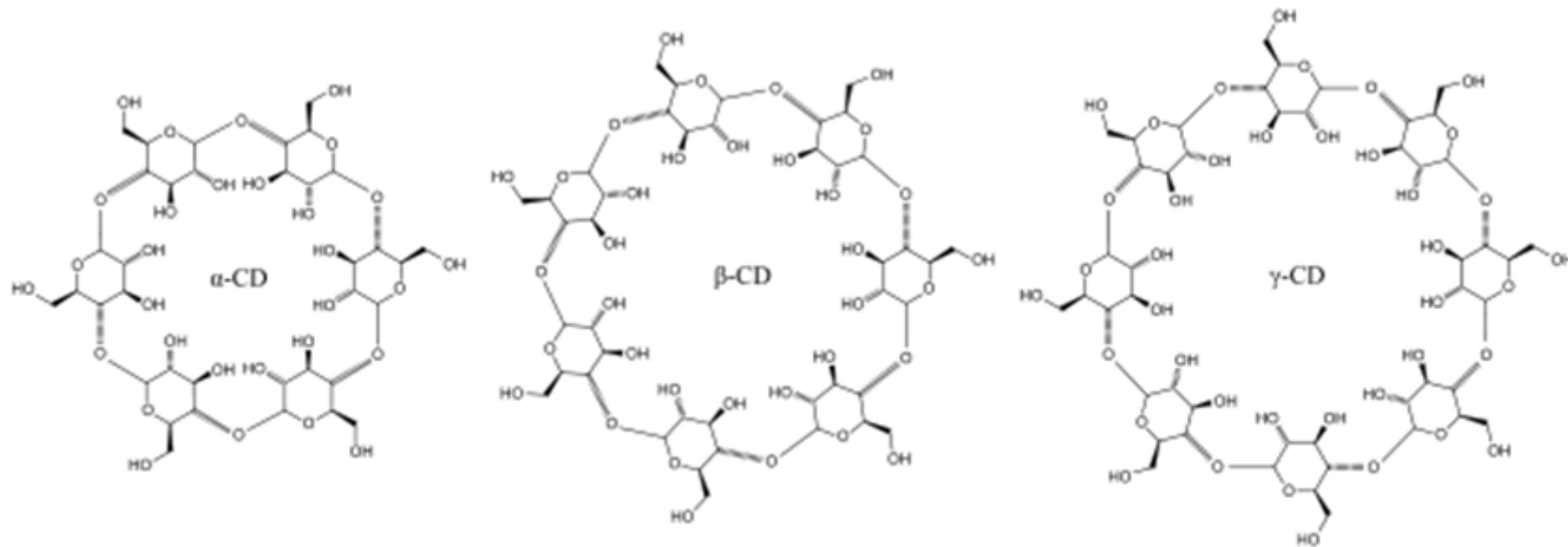
- ⇒ La phase stationnaire possède des groupements spécifiques: anticorps, métaux... qui permettent de sélectionner un soluté particulier.



Phases stationnaires d'affinité chirales

- ⇒ On utilise une phase stationnaire chirale pour séparer des énantiomères. Un des deux énantiomères interagit plus intensément avec la phase stationnaire que l'autre, il est plus retenu.
- ⇒ Le principe de rétention est basé sur la génération réversible de diastéréoisomères.

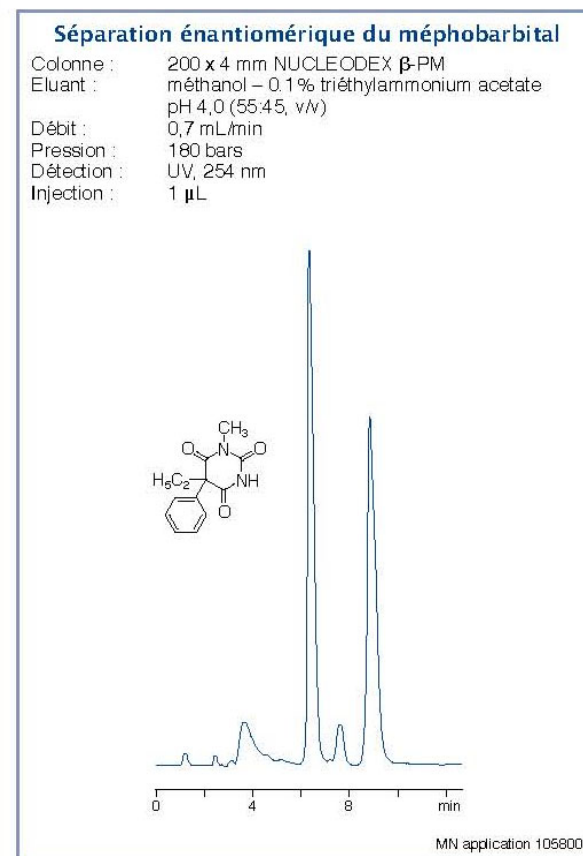
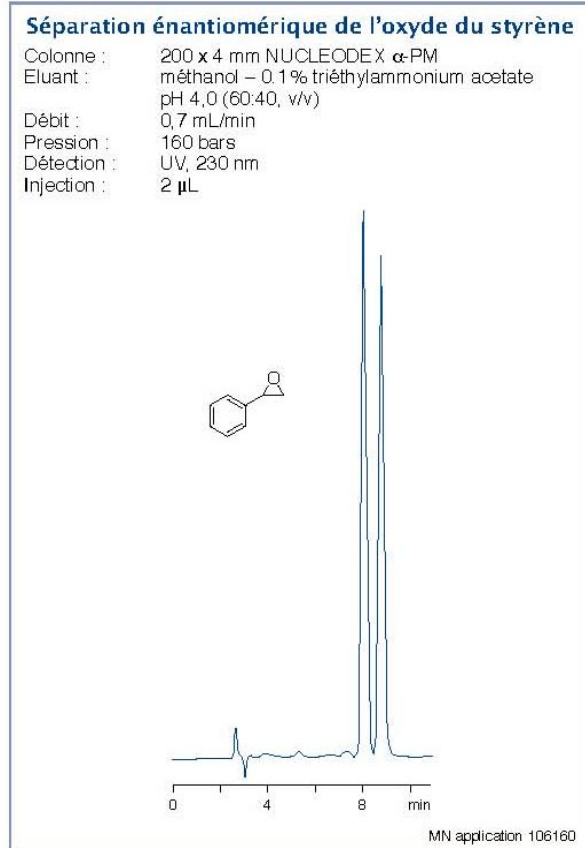
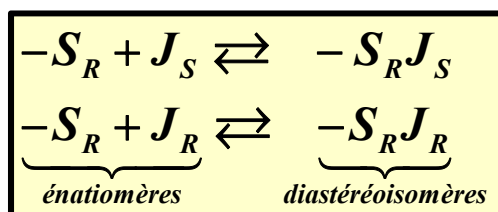
⇒ Les phases stationnaires chirales les plus courantes sont à base de cyclodextrine.



⇒ La phase stationnaire S de configuration absolue (R) interagit avec les énantiomères (S) et (R) du soluté J .

⇒ Le soluté J , initialement sous forme racémique, donne lieu à la formation de diastéréoisomères (RS) et (RR) avec la phase stationnaire.

⇒ Les propriétés physiques des énantiomères sont identiques. Les propriétés physiques des diastéréoisomères sont différentes.



Détecteurs

⇒ Les principaux détecteurs sont les suivants:

Type	Response	Noise level	C_N g cm^{-3}	Linear range	Flow cell volume, μl
Uv-visible absorption	selective	10^{-4} au	10^{-8}	10^4 – 10^5	1–8
Fluorescence	selective	10^{-7} au	10^{-12}	10^3 – 10^4	8–25
Conductivity	selective	10^{-2} $\mu\text{S cm}^{-1}$	10^{-7}	10^3 – 10^4	1–5
Amperometric	selective	0.1 nA	10^{-10}	10^4 – 10^5	0.5–5
Refractive index	universal*	10^{-7} riu	10^{-6}	10^3 – 10^4	5–15

⇒ Les détecteurs réfractométriques (RID) et ampérométriques ne sont pas compatibles avec un mode gradient.

⇒ La détection peut être directe ou nécessiter la dérivation chimique des solutés.

⇒ On peut réaliser des couplages avec un spectromètre de masse (LC/MS), un spectrophotomètre infrarouge (LC/FTIR), une spectromètre RMN (LC/RMN), un analyseur minéral (ICP-MS, ICP-OES, FAAS...), un polarimètre.

Facteurs influençant la séparation

⇒ Les facteurs que nous allons décrire ci-après vont influencer directement la séparation par le biais de la résolution R_s entre les différents pics chromatographiques. La résolution doit être optimum tout en gardant un temps d'analyse raisonnable ($k' < 10$).

⇒ La capacité de pics n_c , c'est-à-dire le nombre maximal de pics pouvant être séparés pour une résolution R_s donnée dans des conditions opératoires fixées, peut être utilisée comme critère d'optimisation.

⇒ Les facteurs influençant la séparation seront:

⇒ Les aspects physiques de la colonne

⇒ Les aspects chimiques de la colonne

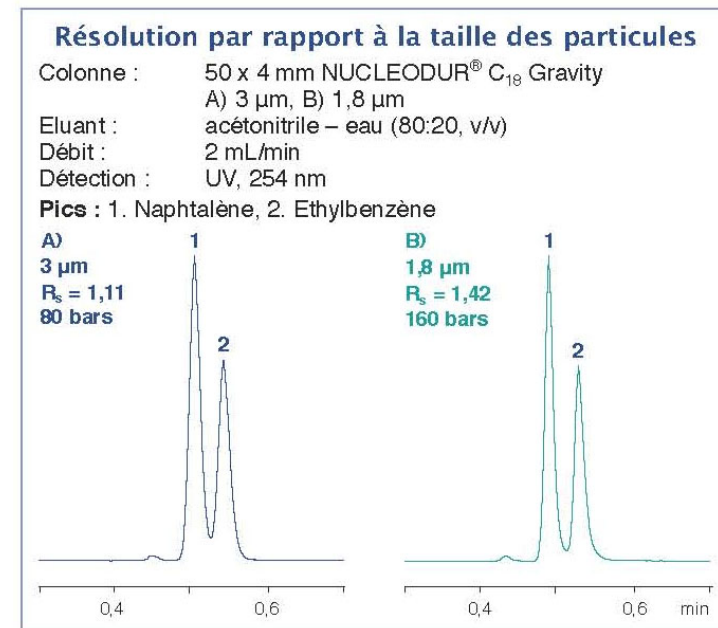
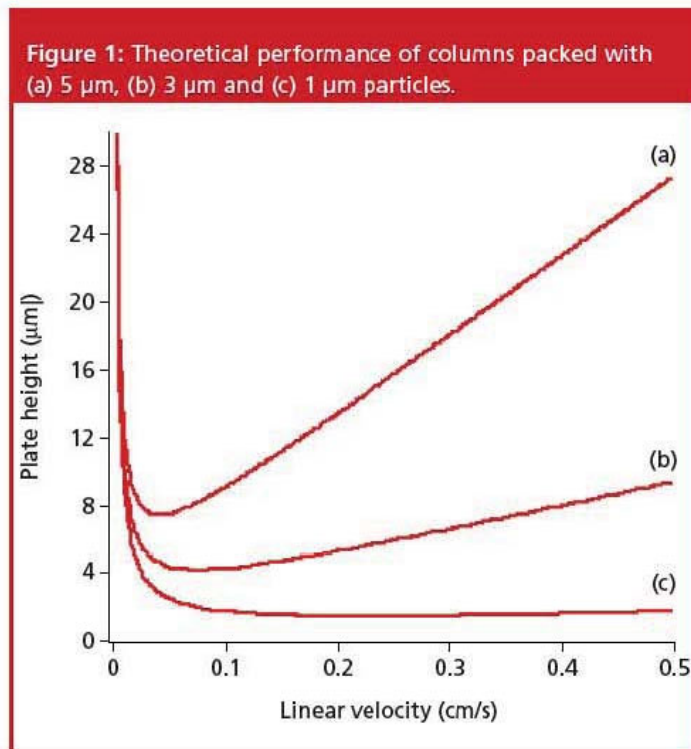
⇒ Les propriétés de l'éluant

⇒ La nature des solutés à séparer

⇒ On ne discutera que des phases stationnaires de partage. On abordera aussi les conséquences cinétiques issues de la variation de tous les paramètres cités ci-dessus, notamment à travers la vitesse linéaire d'écoulement moyenne optimale de l'éluant.

Les aspects physiques de la colonne

- ⇒ L'augmentation de la longueur de la colonne fournit un nombre de plateaux théoriques plus important ($N \times 2$ si $L \times 2$) mais accroît le temps d'analyse et la perte de charge.
- ⇒ Le diamètre des particules de la phase stationnaire influence la séparation à travers le nombre de plateaux théoriques et par conséquent joue un rôle sur la résolution ($R_s \propto N^{1/2}$).



➡ La diminution du diamètre des particules entraîne une amélioration de la séparation à travers le nombre de plateaux théoriques ($N \uparrow$) tout en générant une augmentation de la contre pression de la colonne (loi de Darcy).

Table 1: Pressure requirements and performance expected for differing stationary-phase particle diameters in a 25 cm long column. Values calculated for an analyte with $k' = 2$, $D_m = 6.0 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ and a mobile-phase viscosity (η) = 1.0 cP.

d_p (μm)	ΔP (psi)	Theoretical plates	Ret. time (min)
5.0	210	25 000	35
3.0	1000	42 000	21
1.5	8000	83 000	10.5
1.0	26 000	125 000	7
0.75	62 000	166 000	5

➡ On doit fournir une pression plus forte à la colonne pour garantir le débit de l'éluant fixé par l'opérateur, on passe alors de l'HPLC à l'UPLC (Ultra High Pressure Liquid Chromatography), technique abordée en fin de chapitre.

➡ La distribution de la taille des particules de la phase stationnaire influence la qualité de remplissage et par conséquent le nombre de plateaux théoriques.

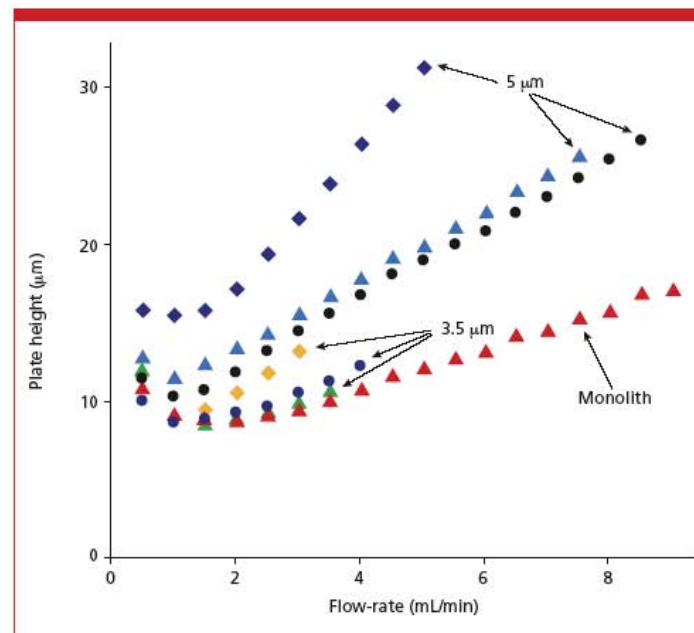


Figure 2: H versus u curves for monolithic silica (Chromolith) and particulate HPLC columns.

➡ Les phases monolithiques donnent une meilleure reproductibilité et un meilleur packing. Ceci est dû au fait que la phase stationnaire est directement générée dans la colonne chromatographique. Ces performances physiques sont néanmoins entachées par une faible flexibilité chimique.

⇒ L'augmentation de la température de la colonne augmente le nombre de plateaux théoriques tout en diminuant le facteur de rétention k' . La résolution et la symétrie des pics s'améliorent avec l'effet de température.

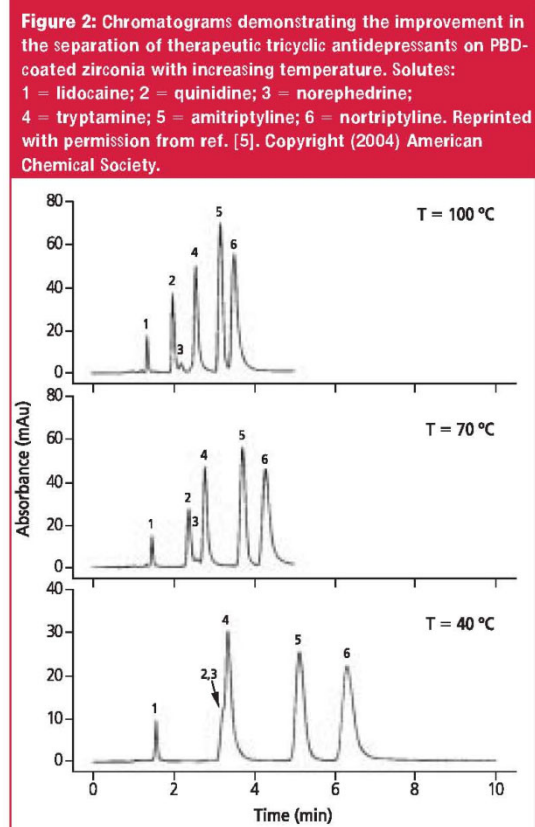
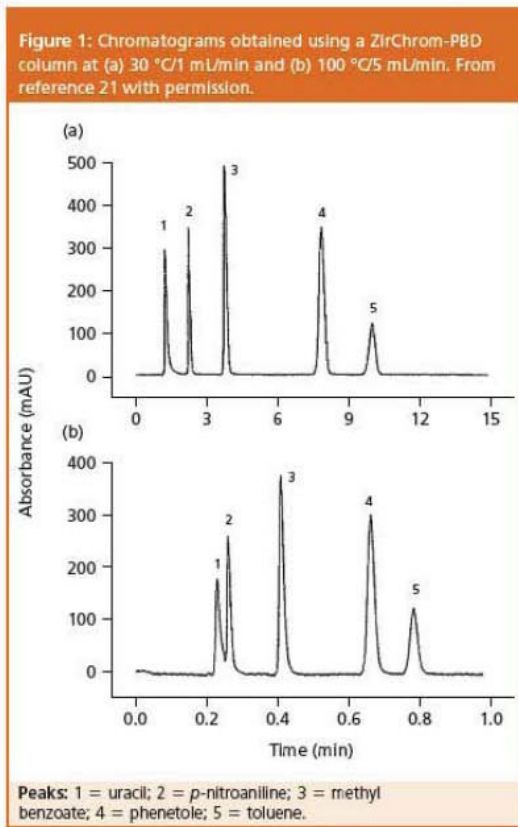
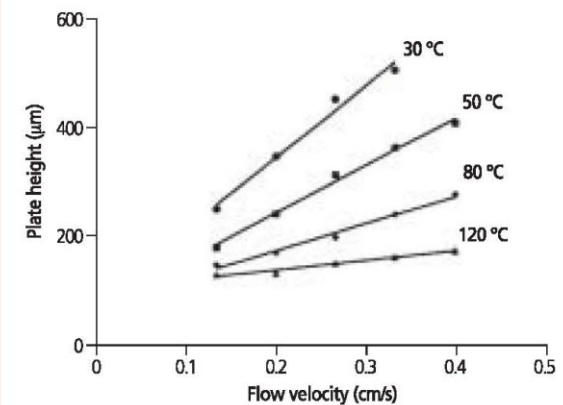


Figure 8: Plots of plate height versus linear flow velocity measured with ribonuclease A at elevated temperatures in the domain of high reduced flow velocities. Column: 30 × 4.6 mm, packed with 5 μm macroreticular cross-linked polystyrene. Concentration (v/v) of acetonitrile in water containing 0.1% (v/v) TFA: ● = 25%; ■ = 23.5%; ◆ = 22%; ▲ = 18%. Reprinted with permission from ref. [3]. Copyright (2004) John Wiley & Sons Limited.



↪ L'expression de k' pour un soluté J en chromatographie de partage est :

$$k'_{(J)} = K_{D(J)} \Phi_{SM} = e^{-\left(\frac{\Delta_D G^0_{(J)}}{RT}\right)} \Phi_{SM}$$

$$\ln k'_{(J)} = -\frac{\Delta_D H^0_{(J)}}{RT} + \frac{\Delta_D S^0_{(J)}}{R} + \ln \Phi_{SM}$$

↪ Pour tous types de phase stationnaire, la réaction est exothermique (transfert du soluté de la phase mobile vers la phase stationnaire favorisé), on a :

$$\ln k'_{(J)} = \frac{a}{T} + b \quad \rightarrow a > 0$$

↪ On observe alors une diminution du temps de rétention lorsque la température de la colonne augmente. Il faut faire attention à la viscosité de l'éluant en fonction de la température (perte de charge).

Les aspects chimiques de la colonne

⇒ En chromatographie de partage en phase normale aminopropyle, k' ↓ lorsque la concentration du solvant le plus polaire $[P]$ dans l'éluant ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) ↑.

⇒ En mode isocratique, on observe la relation suivante où a et b sont des constantes qui dépendent du système chromatographique (nature et composition de l'éluant) et du soluté considérés:

$$\log k'_{(J)} = -a[P] + b$$

⇒ En chromatographie de partage en phase normale cyanopropyle, k' ↓ lorsque la fraction molaire du solvant le plus polaire x_p dans l'éluant ↑.

⇒ En mode isocratique, on observe la relation suivante où a et b sont des constantes qui dépendent du système chromatographique (nature et composition de l'éluant) et du soluté considérés:

$$\log k'_{(J)} = -a \log x_p + b$$

⇒ En chromatographie de partage en phase inverse, $k' \downarrow$ lorsque la fraction volumique de solvant organique $\Phi_o \uparrow$.

⇒ En général, en mode isocratique, on observe la relation quadratique suivante où a et b sont des constantes qui dépendent du système chromatographique (nature et composition de l'éluant) et du soluté considérés et où $k'_{(J)w}$ est obtenu en phase aqueuse pure:

$$\log k'_{(J)} = \log k'_{(J)w} + a(\Phi_o)^2 - b\Phi_o$$

⇒ En mode isocratique, pour un domaine de composition plus étroit de l'éluant, la relation quadratique précédente peut être approximée par:

$$\log k'_{(J)} = \log k'_{(J)w} - b\Phi_o$$

⇒ En chromatographie de partage en phase inverse, on peut également observer une bonne corrélation entre le coefficient de partage eau-octanol d'un soluté (**$\log P$**) et le facteur de rétention **k'** .

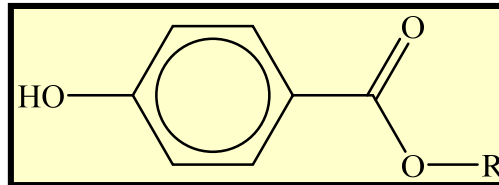
⇒ En mode isocratique, on observe la relation suivante où **a** et **b** sont des constantes qui dépendent du système chromatographique (nature et composition de l'éluant) et du soluté considérés:

$$\log k'_{(J)} = a \log P_{(J)} + b$$

Les propriétés de l'éluant

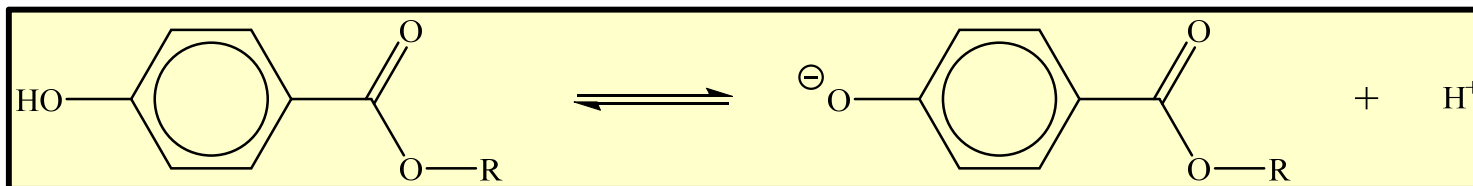
⇒ Pour trouver les conditions expérimentales appropriées, on effectue des essais sur un échantillon en effectuant une élution en mode gradient avec un mélange binaire de solvants.

⇒ Le mélange analysé est un mélange de parabènes homologues supérieurs dont la formule générique est la suivante:

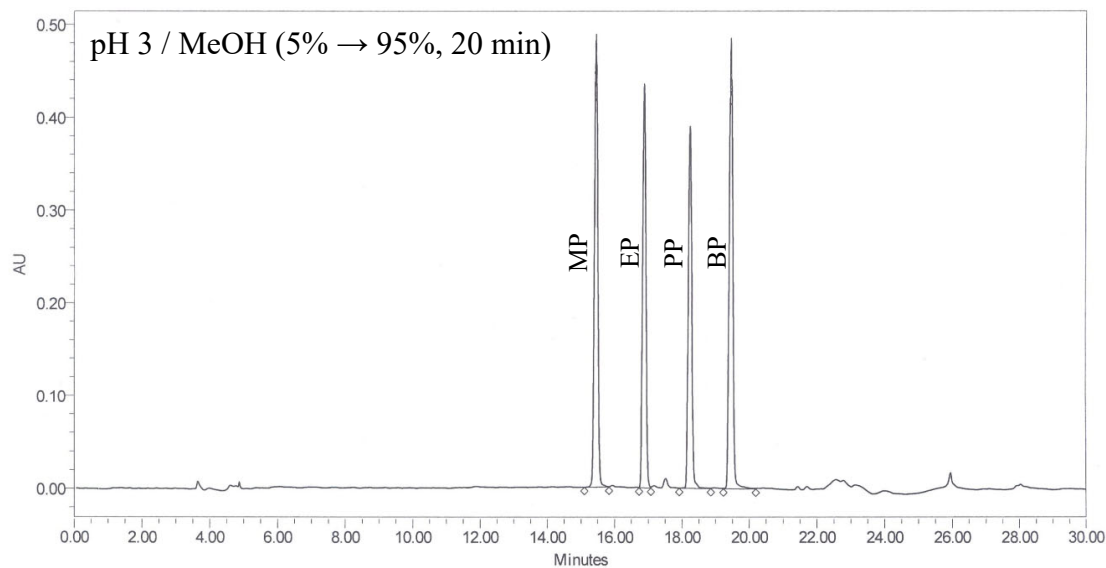


➡ L'échantillon est constitué d'un mélange équiconcentrationnel à $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de parabènes. Les parabènes sont: *para*-hydroxybenzoate de méthyle (MP), d'éthyle (EP), de propyle (PP) et de butyle (BP).

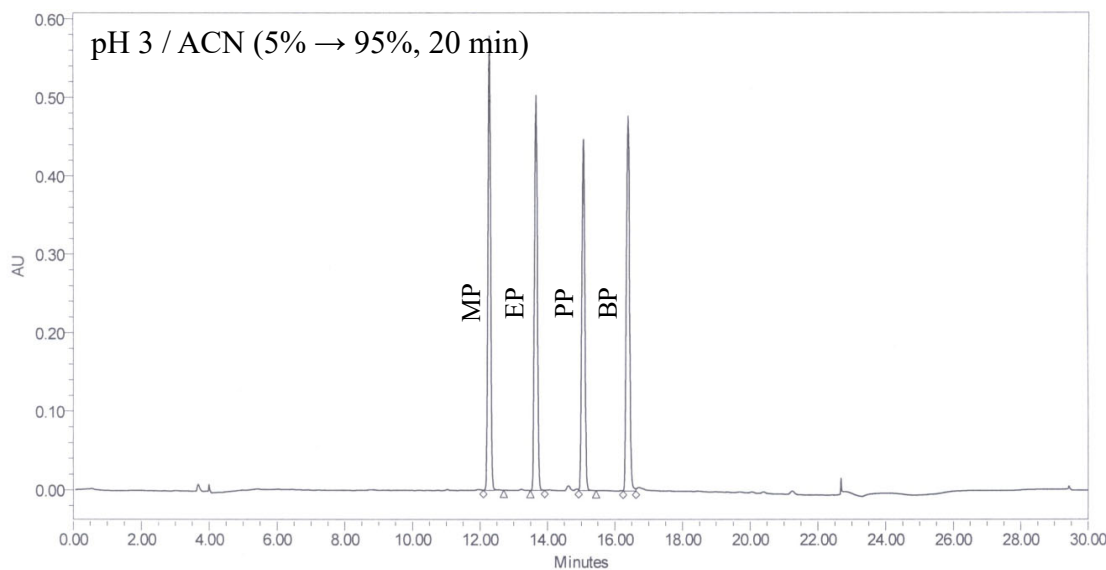
➡ Les quatre parabènes ont un pK_a compris entre 8,2 et 8,3:



➡ Le volume de mélange injecté est de $20 \text{ } \mu\text{L}$:

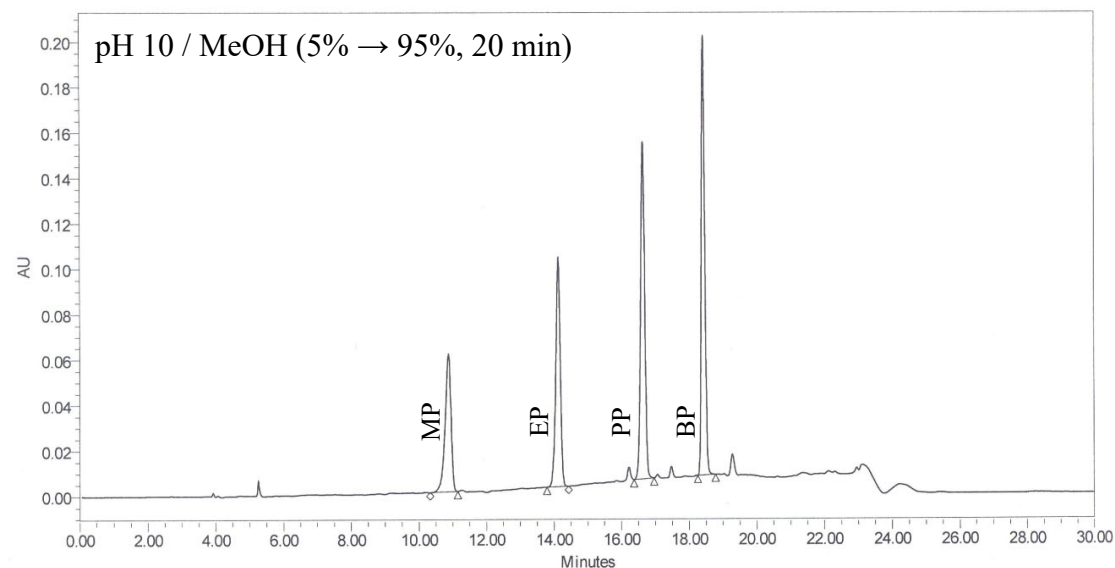


Le solvant de base de l'éluant est un tampon acide formique / formiate d'ammonium à 10 mM (pH 3)

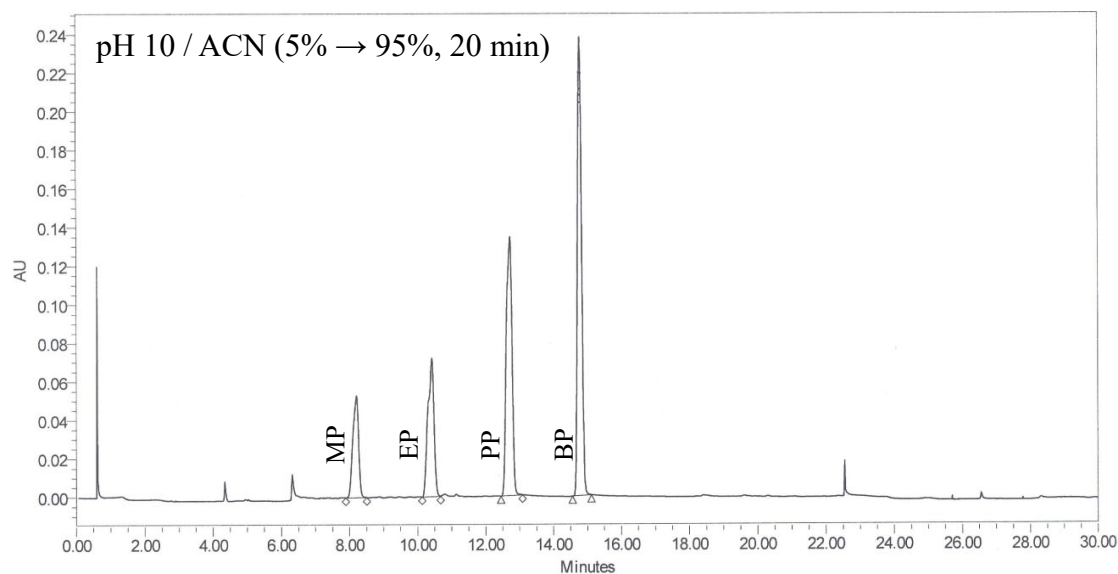


Le solvant sélectif de l'éluant est du méthanol ou de l'acétonitrile

Colonne Nucléodur C18 gravity 4,6 mm × 250 mm × 5 µm, mode gradient linéaire pendant 20 min à 0,8 mL·min⁻¹: 5% à 95% de B (A: solvant de base; B: solvant sélectif)



Le solvant de base de l'éluant est un tampon hydrogencarbonate d'ammonium / carbonate d'ammonium à 10 mM (pH 10)



Le solvant sélectif de l'éluant est du méthanol ou de l'acétonitrile

Colonne Nucléodur C18 gravity 4,6 mm × 250 mm × 5 µm, mode gradient linéaire pendant 20 min à 0,8 mL·min⁻¹: 5% à 95% de B (A: solvant de base; B: solvant sélectif)

➡ En se basant sur les chromatogrammes obtenus, on peut reconnaître les influences de l'éluant comme décrites auparavant, à savoir:

- influence de la polarité de l'éluant grâce au mode gradient.
- influence des propriétés chimiques de l'éluant à travers la nature du solvant sélectif: acétonitrile ou méthanol.
- influence du pH de l'éluant car les parabènes sont des acides qui se déprotonnent fortement à pH basique ($\text{pH} > 9$).

➡ D'après ces essais on peut dire que:

- le mode gradient conduit à des pics chromatographiques fins et équidistants (série de parabènes homologues supérieurs).
- un éluant acide est favorable à une bonne séparation (parabène neutre à ces pHs)
- l'acétonitrile conduit à une séparation plus rapide que celle réalisée à l'aide de méthanol.

La nature des solutés à séparer

- ⇒ En chromatographie en phase inverse, il est très difficile voire impossible de séparer des solutés polaires ou ioniques.
- ⇒ Dans le cas le plus simple, un changement de pH de la phase mobile permet de rendre le soluté neutre.
- ⇒ Lorsque les pHs à atteindre ne sont pas compatibles avec la phase stationnaire, on a recours à la chromatographie par paire d'ions (PIC, paired ion chromatography).
- ⇒ Dans le cadre de la PIC, on ajoute à la phase mobile un sel comportant une partie peu polaire et un groupe de charge opposée à celle du composé à séparer.
- ⇒ On utilise en général des sels d'alkylammonium (R_3N^+), d'alkylsulfonate ($R_3SO_3^-$) d'arylsulfonates ($Ar_3-SO_3^-$).
- ⇒ D'autres substances comme les anions trifluoroacétate (CF_3COO^-), acétate (CH_3COO^-), formiate ($HCOO^-$) ou phosphate (PO_4^{3-}) sont aussi utilisés. Il s'agit ici d'une interaction sans modification chimique du soluté.

- Dans tous les cas de figure, ces sels sont ajoutés en faible concentration (≤ 50 mM).
- Si on utilise de l'acide trifluoroacétique (un acide fort totalement dissocié dans l'eau) ou de l'acide formique, sa concentration ne dépasse pas 1% (v/v) dans l'éluant.
- les concentrations standards en acide trifluoroacétique ou formique sont de l'ordre de 0,1% (v/v).
- Lorsque l'on travaille en mode gradient, l'agent de paire d'ion est ajouté dans les solvants de base et sélectif qui constitueront l'éluant pour pallier à une variation de la ligne de base au cours de la chromatographie.
- Cette technique est particulièrement appliquée pour la séparation des bases de l'ADN, ARN avec des contre-ions cationiques comme des sels d'alkylammonium (R_3N^+).
- On utilise la PIC pour la séparation des acides aminés, peptides et protéines avec des contre-ions anioniques comme l'acide formique ($HCOO^-$) ou l'acide trifluoroacétique (CF_3COO^-).

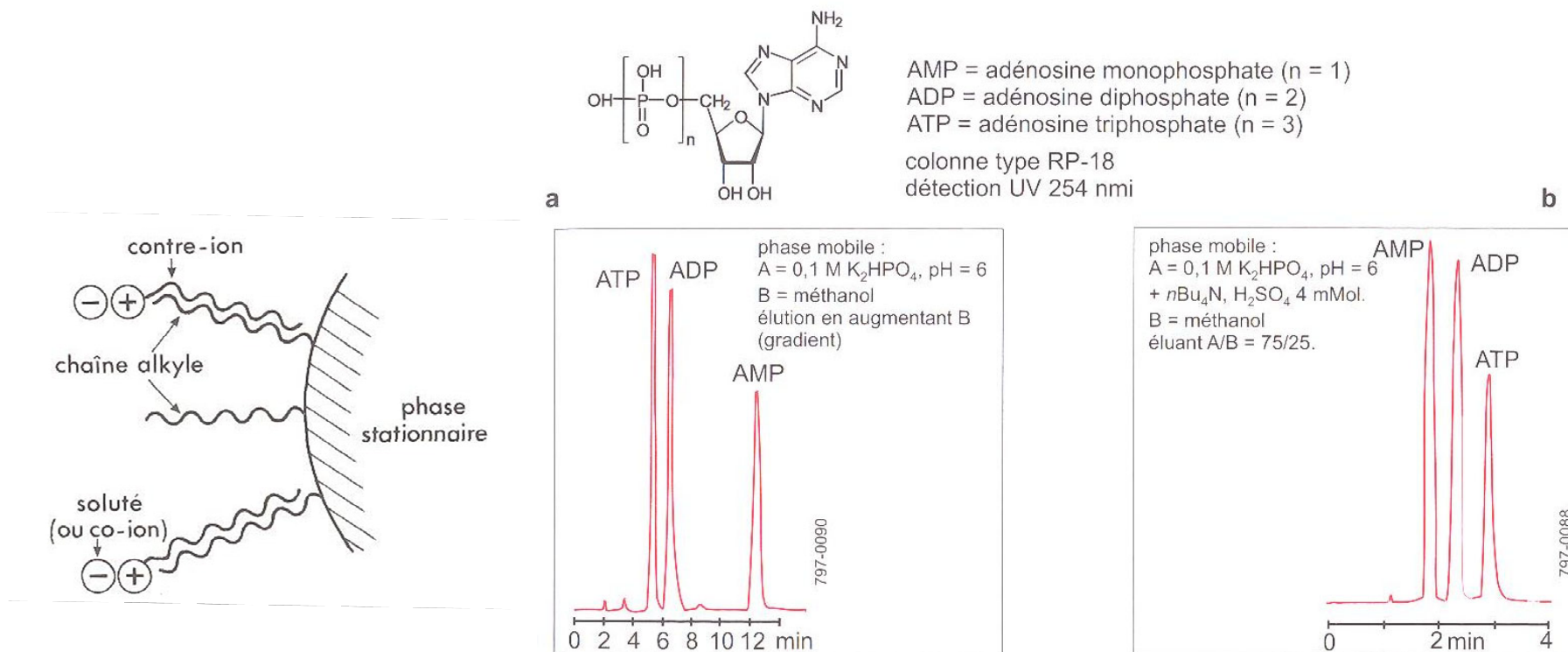


Figure 2.18 Effet de l'appariement d'ions sur une séparation avec une colonne à polarité inversée. Le chromatogramme d'un mélange de 3 nucléotides montre en a la situation normale avec une élution dans l'ordre des polarités décroissantes ; en b, par contre, situation inversée : l'ATP associé à l'ion tétrabutylammonium est devenu plus lipophile, et est donc plus longtemps retenu (adapté d'un document Alltech).

- ⇒ En dernier lieu, les solutés peuvent être dérivatisés chimiquement pour leur donner des propriétés compatibles avec la phase stationnaire utilisée.
- ⇒ Dans ce cas, il ne s'agit pas d'une modification toujours réversible. Elle ne peut donc pas toujours être appliquée à des fins préparatives mais tout à fait praticable à des fins analytiques. Ces techniques sont connues sous le terme de dérivatisation pré-colonne.
- ⇒ Pour être utilisable, la dérivatisation proposée doit être quantitative, 100% du soluté doit être converti.

Conséquences cinétiques

- ⇒ On doit ici se baser sur l'équation de Van Deemter pour un soluté ***J*** :

$$H_{(J)} = A + \frac{B}{\bar{u}} + C\bar{u}$$

- ⇒ En comparant cette relation générique avec celle donnée en début de chapitre pour un soluté ***J*** en HPLC, on peut faire les rapprochements suivants:

⇒ $A = f(\lambda \text{ et } d_p)$.

⇒ $B = f(\gamma \text{ et } D_{M(J)})$

⇒ $C = f(k'_{(J)}, d_p^2, d_f^2, D_{M(J)} \text{ et } D_{S(J)})$

⇒ Dès lors, on peut regarder l'influence de chaque paramètre discuté précédemment sur A , B et C :

⇒ A est influencé par le diamètre et la morphologie des particules de phase stationnaire.

⇒ B est influencé par la morphologie des particules de phase stationnaire, la nature de l'éluant, la nature du soluté et la température.

⇒ C est influencé par le diamètre des particules de phase stationnaire, l'épaisseur du film et la nature de la phase stationnaire, la nature de l'éluant, la nature du soluté et la température.

⇒ Néanmoins, pour un système donné (colonne, éluant, solutés, température...), toutes ces influences seront minimisées en optimisant le débit de l'éluant pour se situer à la vitesse linéaire d'écoulement moyenne optimale afin d'obtenir le plus grand nombre de plateaux théoriques possible.

⇒ A la vitesse linéaire d'écoulement moyenne optimale, les paramètres déterminants restent le diamètre et la morphologie des particules de la phase stationnaire.

UPLC: Ultra High Pressure Liquid Chromatography

⇒ La diminution de la taille des particules pour augmenter le nombre de plateaux théoriques a pour conséquence directe une augmentation de la perte de charge de la colonne (loi de Darcy). Il faut appliquer une forte pression pour assurer le débit désiré.

⇒ On utilise alors, pour des diamètres de particules inférieur à 3 μm , l'UPLC.

⇒ En UPLC, on applique des pressions de 700 – 1200 Bars au lieu de 200 – 600 Bars en HPLC.

Table 1: Pressure requirements and performance expected for differing stationary-phase particle diameters in a 25 cm long column. Values calculated for an analyte with $k' = 2$, $D_m = 6.0 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ and a mobile-phase viscosity (η) = 1.0 cP.

d_p (μm)	ΔP (psi)	Theoretical plates	Ret. time (min)
5.0	210	25 000	35
3.0	1000	42 000	21
1.5	8000	83 000	10.5
1.0	26 000	125 000	7
0.75	62 000	166 000	5

Figure 2: Chromatograms obtained on a column packed with 1.0 μm particles at run pressures of (a) 45 000 psi and (b) 103 000 psi. See text for separation conditions.

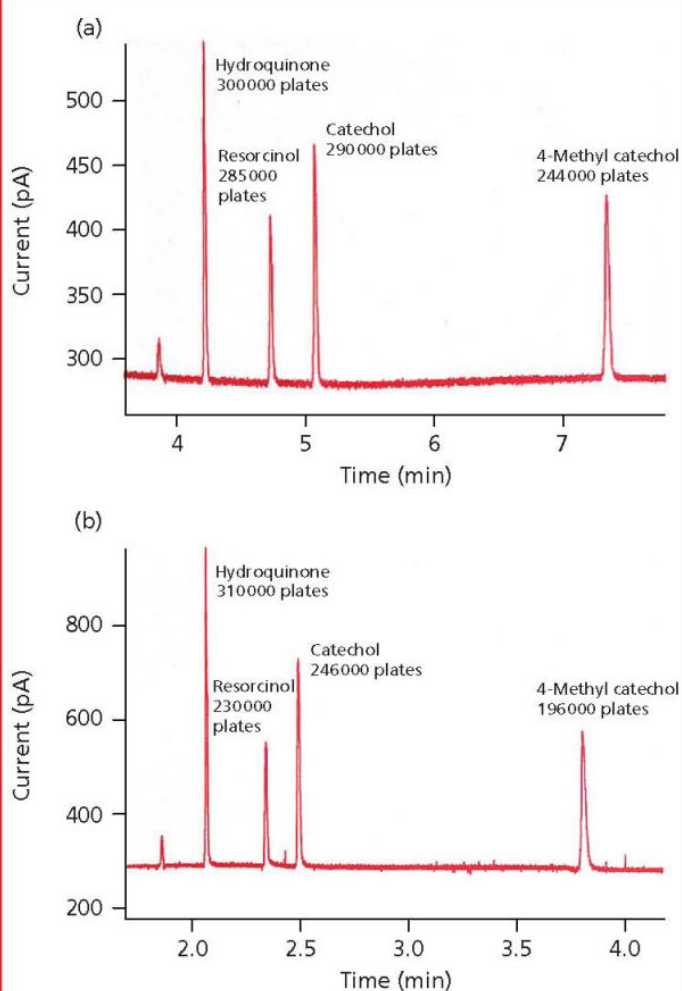
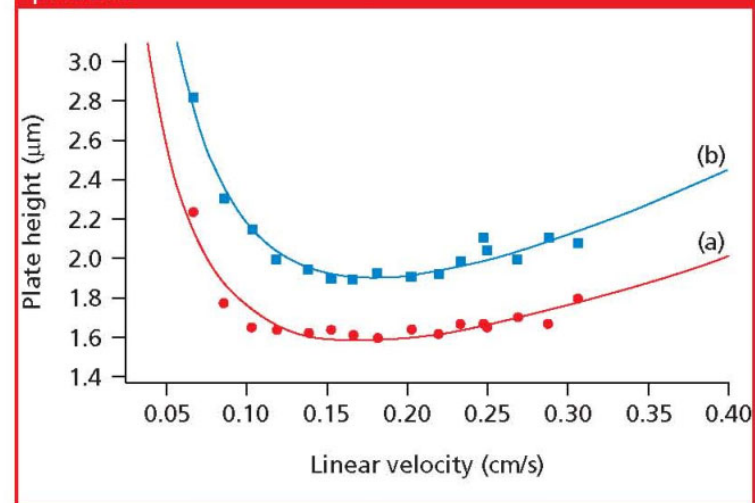


Figure 3: Van Deemter curves for (a) hydroquinone and (b) catechol on a 30 μm \times 37 cm column packed with 1.0 μm particles.



➡ Comparaison entre les séparations de parabènes en HPLC et UPLC (D.T.T. Nguyen et al., *Journal of Chromatography A*, 2006, **1128**, 105-113).

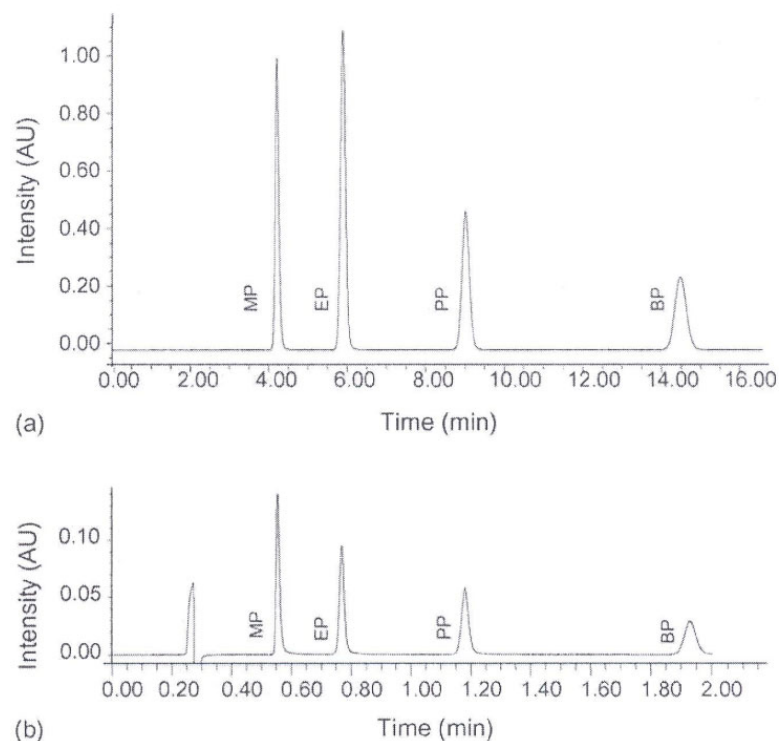


Fig. 2. Chromatograms obtained with a conventional column (a) and a sub-2 μm column (b). Conditions: (a) XTerra RP18, 5 μm, 4.6 × 150 mm column, 30 °C, 10 μL injection volume, 900 μL/min (optimum flow rate); mobile phase: acetonitrile–water, 40:60 (v/v). (b) Acquity BEH C₁₈, 1.7 μm, 2.1 × 50 mm column, 30 °C, 1 μL injection volume, 520 μL/min (optimum flow rate); mobile phase: acetonitrile–water 40:60 (v/v).

➡ Comparaison entre les séparations de principes actifs pharmaceutiques en HPLC et UPLC (D.T.T. Nguyen et al., *Chimia*, 2007, **61**, 186-189).

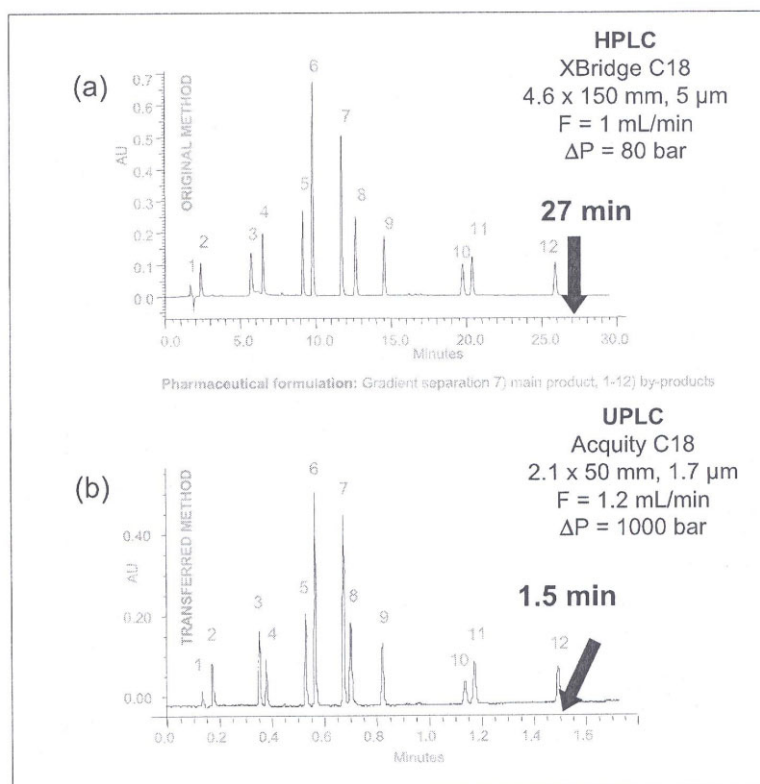
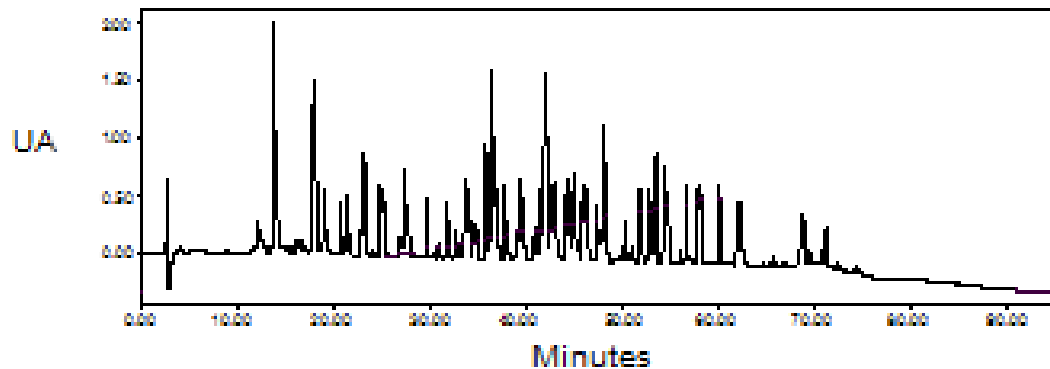
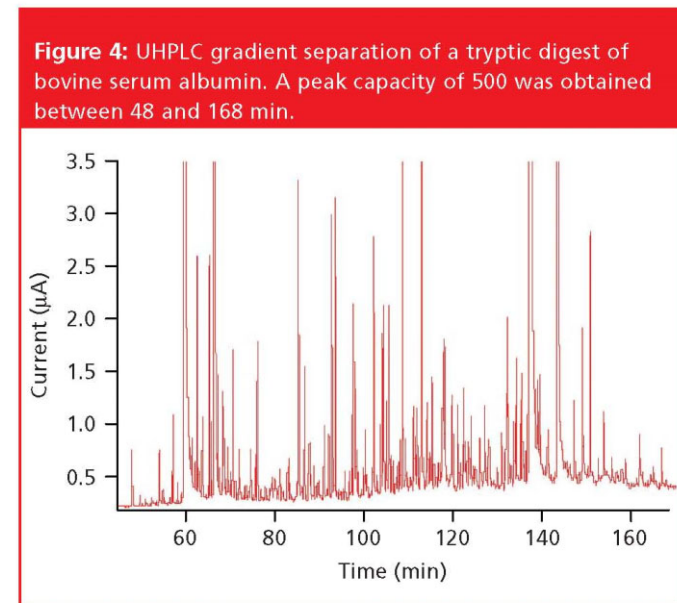


Fig. 4. Gradient separations of a complex pharmaceutical mixture (main compound and its by-products) obtained using (a) HPLC ($d_p = 5 \mu\text{m}$, $\Delta P_{\text{max}} = 400\text{bar}$) and (b) UPLC ($d_p = 1.7 \mu\text{m}$, $\Delta P_{\text{max}} = 1000\text{bar}$)

➡ Chromatogrammes HPLC et UPLC issus de la séparation des peptides générés par digestion enzymatique à la trypsine de la Bovin Serum Albumin (L. Dayon et al., *Electrophoresis*, 2005, **26**, 238-247).



HPLC



UPLC