

Méthodes de séparation analytiques

Phases stationnaires d'adsorption en HPLC

La colonne chromatographique: phases stationnaires d'adsorption

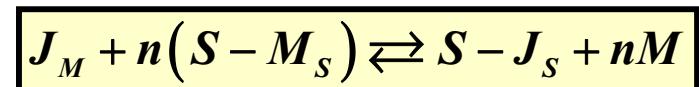
Généralités

- ⇒ 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 gels de silice sont utilisables dans une gamme de pH de 2 à 8 alors que ceux d'alumine sont utilisables dans une gamme de pH de 6 à 12.
- ⇒ Les phases inverses sont à base de carbone poreux ou de graphite (stabilité de pH 1 à pH 13).
- ⇒ 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.
- ⇒ Plus les interactions entre l'éluant et la phase stationnaire sont fortes, moins les interactions entre les solutés et la phase stationnaire le seront.

- ⇒ La pureté des solvants constituant l'éluant est primordiale car des impuretés peuvent avoir une forte affinité pour la phase stationnaire et par conséquent réduire grandement l'efficacité de la colonne.
- ⇒ Une partie M de la phase mobile s'adsorbe sur la phase stationnaire S lors de l'équilibrage de la colonne (étape de conditionnement de la colonne chromatographique).



- ↳ Les mécanismes de rétention d'un soluté J sont basés sur l'adsorption-désorption de ce dernier sur la phase stationnaire S . Il s'établit alors une compétition entre l'adsorption de J et la désorption de la phase mobile M de la phase stationnaire S .
- ↳ Une molécule de soluté J désorbe n molécules de phase mobile M adsorbées sur la phase stationnaire S :



↳ La théorie de Snyder permet d'estimer le facteur de rétention $k'_{(J)}$ d'un soluté J :

$$k'_{(J)} = K_{D(J)} \frac{V_s}{V_M} = K_{D(J)} \frac{V_a W_a}{V_M}$$

V_a : volume d'éluant adsorbé par masse de phase stationnaire ($\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$)

W_a : masse de phase stationnaire dans la colonne (g)

V_s : volume de phase stationnaire effective (mL)

V_M : volume de phase mobile effective (mL)

↳ En exprimant le logarithme de $k'_{(J)}$, on obtient une relation linéaire en fonction des énergies libres d'adsorption des molécules de soluté (E_0) et d'éluant (ϵ_0) sur la phase stationnaire:

$$\log k'_{(J)} = \log \left(\frac{V_a W_a}{V_M} \right) + B(E_0 - A_s \epsilon_0)$$

↳ Pour une phase stationnaire donnée, la nature de l'éluant conditionne donc le facteur de rétention $k'_{(J)}$ à travers ε_0 . Les différentes valeurs de ε_0 sont données dans le fichier solvants HPLC.

↳ Liste des termes de l'équation de Synder:

B : activité de la phase stationnaire (de 0 à 1, typiquement: 0,5 - 0,9)

E_0 : énergie libre d'adsorption des molécules de soluté J sur la phase stationnaire dans les conditions standards ($E_0 = -\Delta_{ads}G^{\theta}_S / 2,3 RT$)

A_S : surface occupée par une mole de soluté sur la phase stationnaire (cm^2)

ε_0 : énergie libre d'adsorption des molécules d'éluant par unité de surface de solvant adsorbé dans les conditions standards ($\varepsilon_0 = -\Delta_{ads}G^{\theta}_M / 2,3 RT A_M$)

A_M : Surface occupée par une mole d'éluant sur la phase stationnaire (cm^2)

Phases stationnaires normales

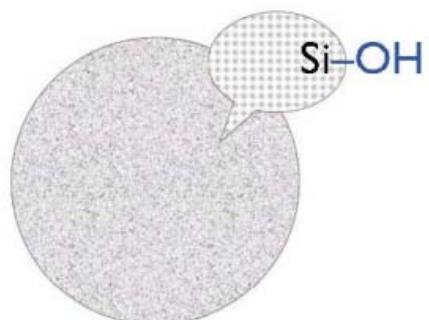
⇒ Ce type de phases stationnaires requiert un éluant peu polaire. Le solvant de base est un alcane (*n*-hexane, *n*-heptane, isoctane...) et le solvant sélectif est un solvant plus polaire.

⇒ 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

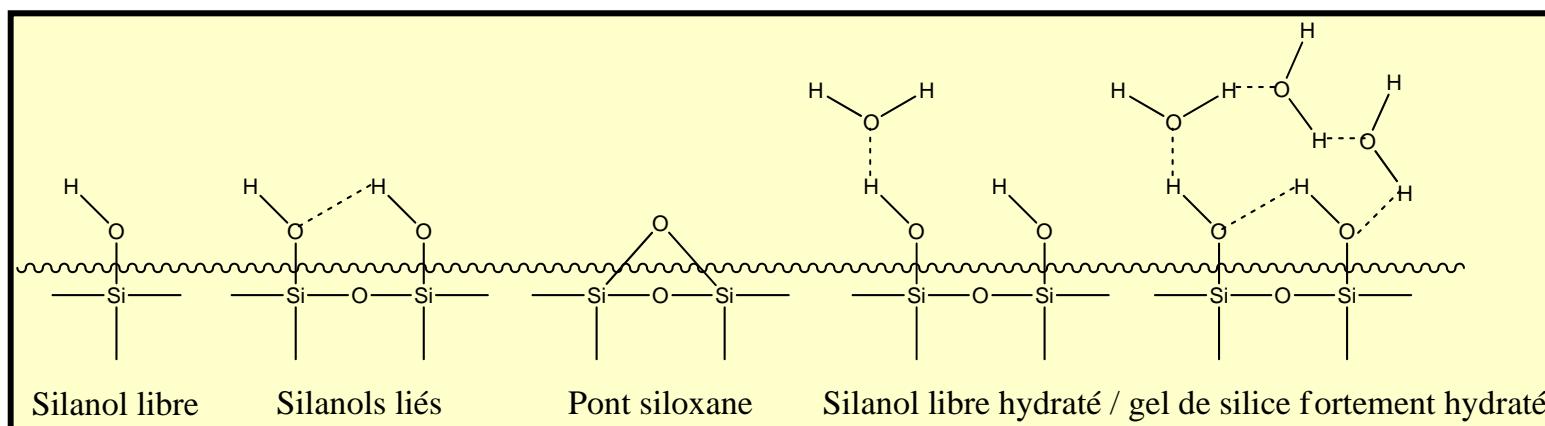
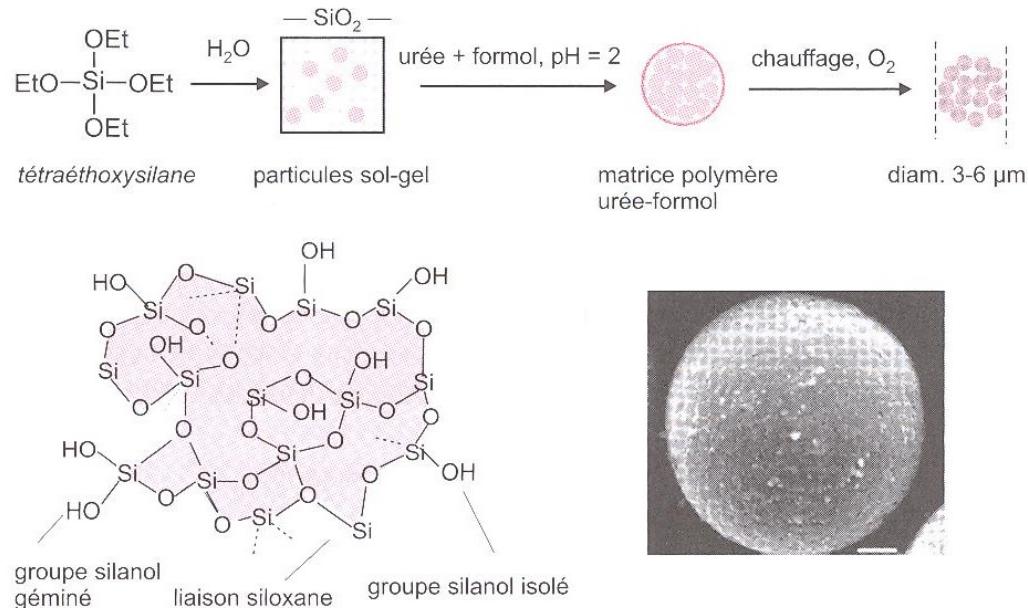
⇒ Les phases stationnaires à base de silice SiO_2 sont obtenues par hydrolyse-condensation du silicate de sodium $[(\text{Na}_2\text{SiO}_3)_x(\text{NaOH})_y(\text{H}_2\text{O})_z]$ en milieu acide. Le gel obtenu a pour structure: $[\text{SiO}_{(2-x/2)}(\text{OH})_x]_n(\text{H}_2\text{O})_p$.

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



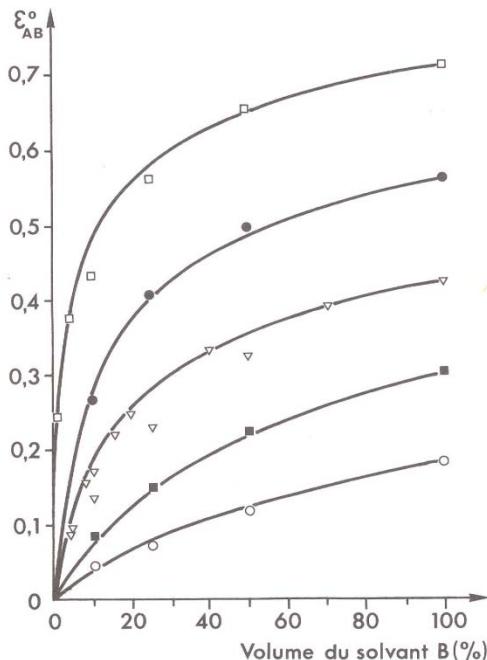
- Particules sphériques: 3, 5, 7, 10 μm
- Densité: 2,2 $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$
- Densité de remplissage: 0,4 - 0,7 $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$
- Diamètre des pores: 6, 10, 30, 50, 100 nm
- Surface spécifique: 20, 50, 120, 250, 450 $\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$
- Silanol: 5 / nm^2 , soit 8 $\mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}$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

Chromatographie HPLC



- ↳ 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.
- ↳ 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.
- ↳ Le pouvoir de séparation des gels d'alumine est toutefois moins bon que celui de la silice.
- ↳ L'alumine étant un oxyde basique, elle convient bien pour la séparation des acides et/ou des solutés qui sont instables en milieu acide.
- ↳ Les interactions solutés/phase stationnaire font aussi intervenir les forces de dispersion de London, forces électrostatiques, liaisons hydrogènes...

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



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).

⇒ En mode isocratique, plutôt que d'utiliser la relation de Synder, on préférera:

$$\log k'_{(J)} = \log k'_{(J)B} - m \log x_B$$

↳ Dans cette équation, B est relatif au solvant le plus polaire. $k'_{(J)B}$ représente le facteur de rétention du soluté lorsque l'éluant est uniquement constitué de B . x_B représente la fraction molaire du solvant B dans l'éluant et m est une constante.

⇒ En mode gradient, on sera en présence de relations empiriques qui dépendent de la nature de l'éluant, de la phase stationnaire considérée et des solutés à séparer.

⇒ Du fait de leur manque d'inertie et de stabilité chimiques, les phases stationnaires à base de silice et d'alumine sont de moins en moins répandues. La silice, reste néanmoins le matériau de base des phases stationnaires actuelles. Grâce à la réactivité des groupes silanols et au contrôle de la morphologie des particules synthétisées, la silice reste un support idéal pour le développement de phases stationnaires greffées, phases stationnaires de partage.

⇒ L'alumine, est quasiment abandonnée en tant que phase stationnaire. Elle est parfois utilisée comme matériau de base dérivatisable comme l'est la silice. La zircone (ZrO_2) peut être utilisée à des fins identiques (stabilité de pH 7 à pH 13).

Phases stationnaires inverses

- ⇒ Ce type de phase stationnaire requiert un éluant polaire. 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 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

- ⇒ 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.
- ⇒ 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 inverses à base de silice modifiée, phases stationnaires de partage.