



Licence Professionnelle Métrologie chimique et nucléaire
2024-2025 UE XLP5CE033

Les techniques chromatographiques- HPLC et GC

Stéven RENAULT
steven.renault@cirs-imn.fr

Maître de conférences



Licence Professionnelle Métrologie chimique et nucléaire 2024-2025 UE XLP5CE033

HPLC et GC :
-12 heures de CTDI
-24 heures de TP



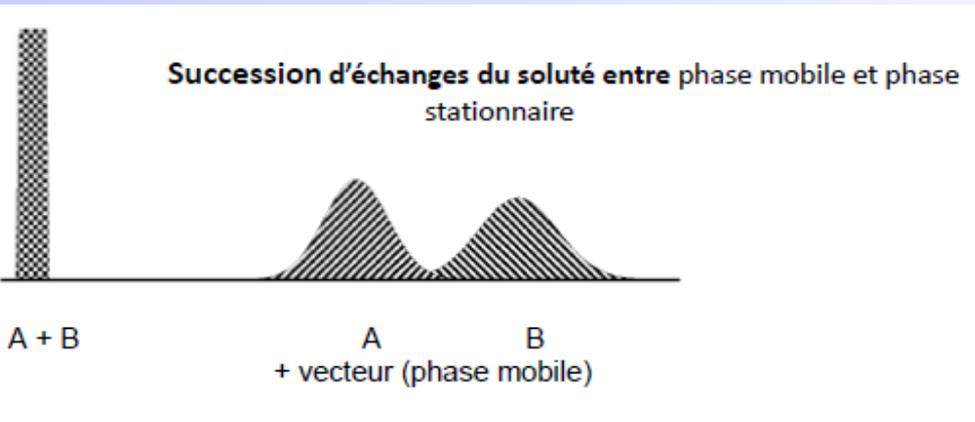
Licence Professionnelle Métrologie chimique et nucléaire
2024-2025 UE XLP5CE033

Introduction à la chromatographie



Introduction

chromatographie = séparation physique de composés entre deux phases non miscibles ; une phase mobile (éluant – PM) et une phase stationnaire (PS) ; suivant leur affinité pour les deux phases



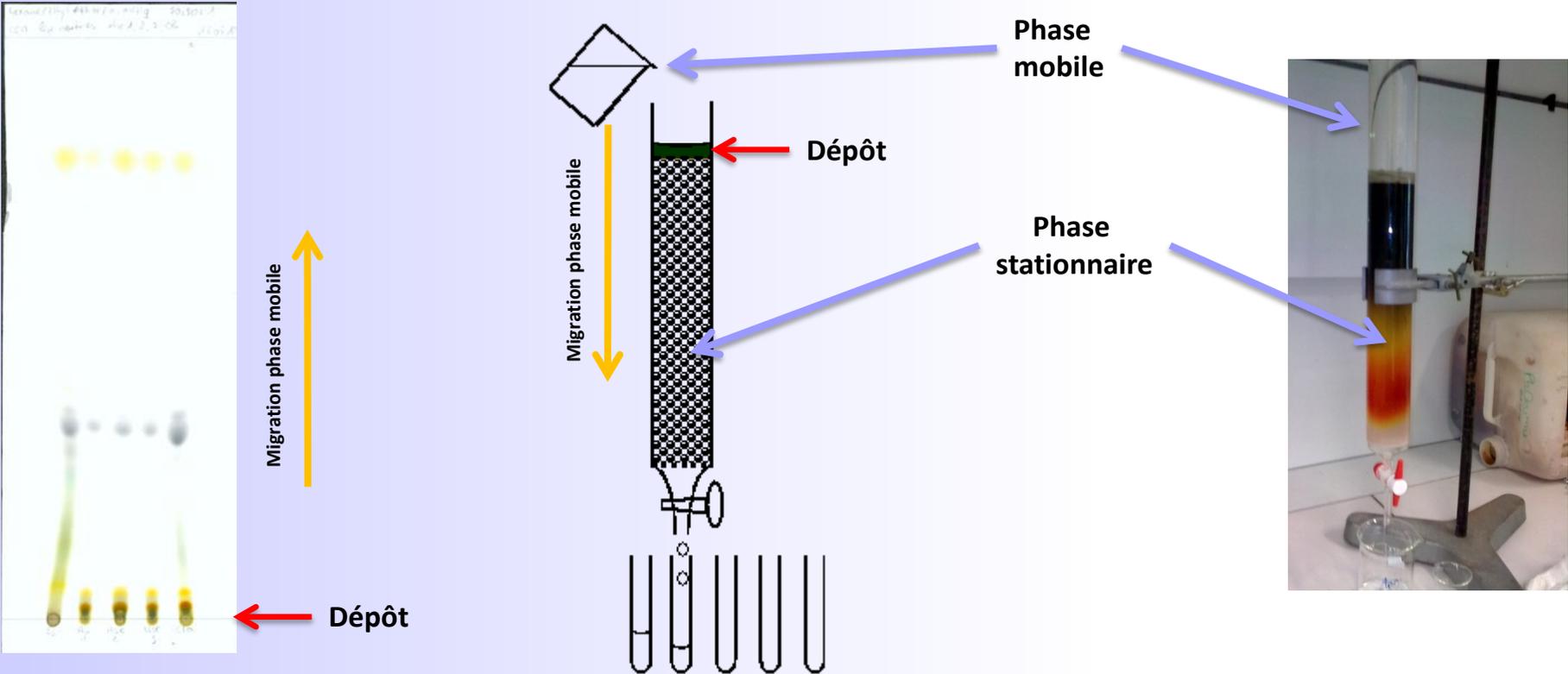
Applications :

- Qualitative : identification
- Quantitative : dosage
- Préparative : purification

Introduction

chromatographie = séparation physique de composés entre deux phases non miscibles ; une phase mobile (éluant – PM) et une phase stationnaire (PS) ; suivant leur affinité pour les deux phases

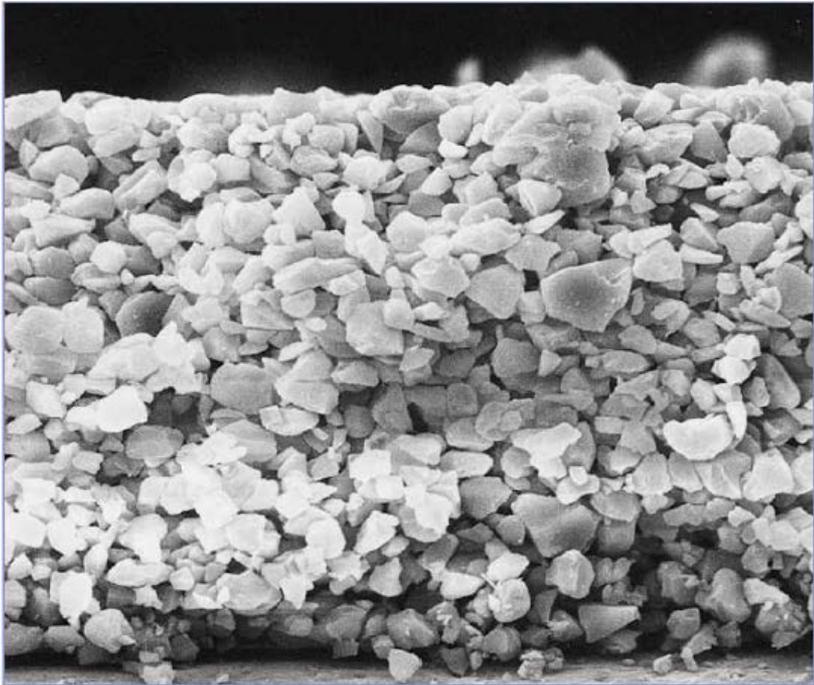
Succession de processus élémentaires d'échanges du soluté entre phase mobile et phase stationnaire



Introduction

chromatographie = séparation physique de composés entre deux phases non miscibles ; une phase mobile (éluant – PM) et une phase stationnaire (PS) ; suivant leur affinité pour les deux phases

Succession de processus élémentaires d'échanges du soluté entre phase mobile et phase stationnaire



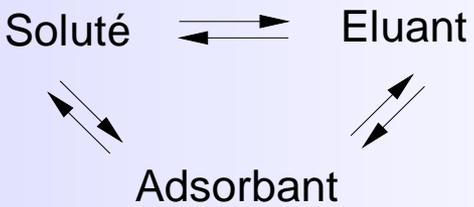
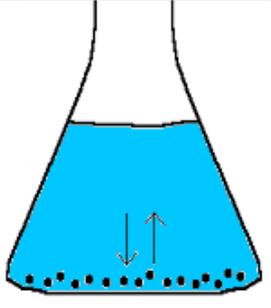
Cliché au microscope électronique de la coupe d'une plaque d'aluminium recouverte de gel de silice (agrandissement x 500)

Introduction

chromatographie = séparation physique de composés entre deux phases non miscible ; une phase mobile (éluant – PM) et une phase stationnaire (PS) ; suivant leur affinité pour les deux phases

Le soluté est en équilibre constant entre la phase mobile et la phase stationnaire

Équilibre	Nature PM	Nature PS	Paramètre prépondérant
Adsorption	Liquide	solide	Affinité pour une phase solide



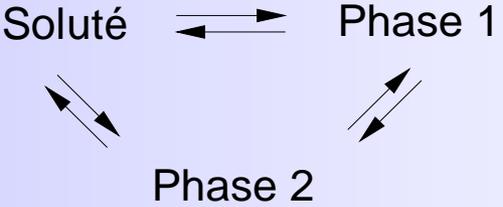
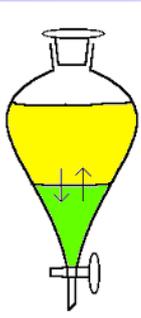
Établissement de liaisons faibles (réversible) entre solutés et PS
Entraînement par PM

Introduction

chromatographie = séparation physique de composés entre deux phases non miscible ; une phase mobile (éluant – PM) et une phase stationnaire (PS) ; suivant leur affinité pour les deux phases

Le soluté est en équilibre constant entre la phase mobile et la phase stationnaire

Équilibre	Nature PM	Nature PS	Paramètre prépondérant
Adsorption	Liquide	solide	Affinité pour une phase solide
Extraction	Liquide	Liquide	Solubilité / coefficient de partage



$$K = \frac{C_s}{C_m}$$

K : coefficient de partage
C_s : concentration du soluté dans PS
C_m : concentration du soluté dans PM

Solubilité relative entre PM et PS

Introduction

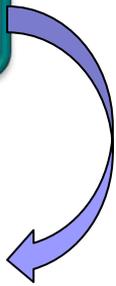
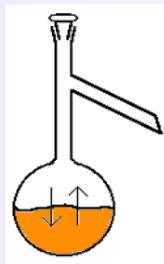
chromatographie = séparation physique de composés entre deux phases non miscible ; une phase mobile (éluant – PM) et une phase stationnaire (PS) ; suivant leur affinité pour les deux phases

Le soluté est en équilibre constant entre la phase mobile et la phase stationnaire

Équilibre	Nature PM	Nature PS	Paramètre prépondérant
Adsorption	Liquide	solide	Affinité pour une phase solide
Extraction	Liquide	Liquide	Solubilité / coefficient de partage
Distillation	Gaz	Liquide ou solide	Volatilité du soluté



HPLC



GC



Introduction

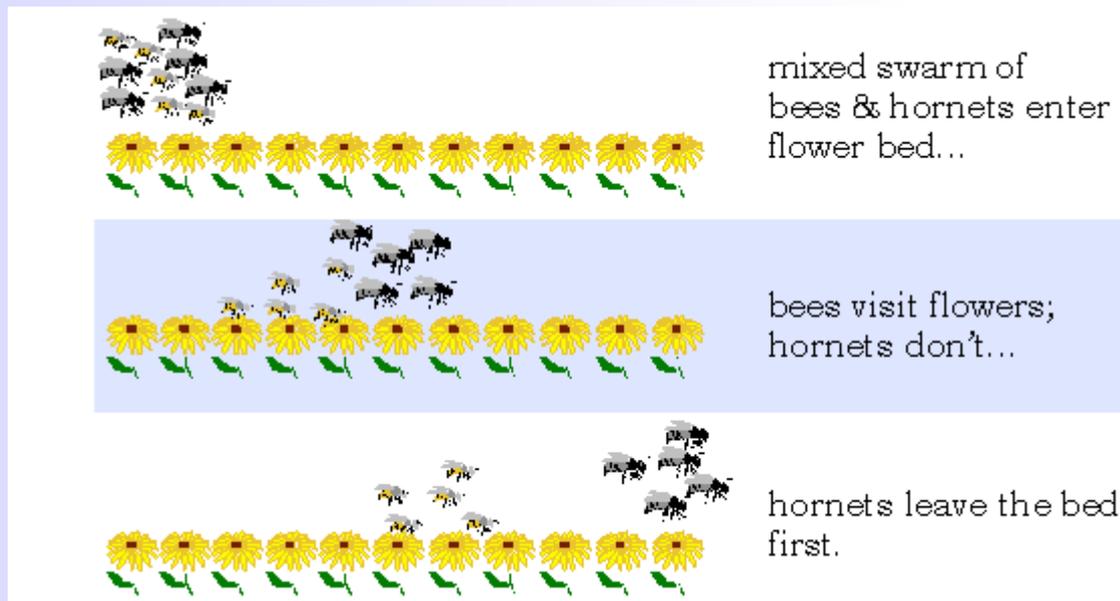
chromatographie = séparation physique de composés entre deux phases non miscible ; une phase mobile (éluant – PM) et une phase stationnaire (PS) ; suivant leur affinité pour les deux phases

Le soluté est en équilibre constant entre la phase mobile et la phase stationnaire

La progression se fait par entraînement dans la phase mobile

Plus un composé a d'« affinité » pour la phase mobile, plus il progressera vite

Plus un composé a d'« affinité » pour la phase stationnaire, moins il progressera vite





Introduction

chromatographie = séparation physique de composés entre deux phases non miscible ; une phase mobile (éluant – PM) et une phase stationnaire (PS) ; suivant leur affinité pour les deux phases

Le soluté est en équilibre constant entre la phase mobile et la phase stationnaire

La progression se fait par entraînement dans la phase mobile

Plus un composé a d'« affinité » pour la phase mobile, plus il progressera vite

Plus un composé a d'« affinité » pour la phase stationnaire, moins il progressera vite





Introduction

chromatographie = séparation physique de composés entre deux phases non miscible ; une phase mobile (éluant – PM) et une phase stationnaire (PS) ; suivant leur affinité pour les deux phases

Le soluté est en équilibre constant entre la phase mobile et la phase stationnaire

La progression se fait par entraînement dans la phase mobile

Plus un composé a d'« affinité » pour la phase mobile, plus il progressera vite

Plus un composé a d'« affinité » pour la phase stationnaire, moins il progressera vite



Introduction– équilibres mis en jeu – Interactions

chromatographie = séparation physique de composés entre deux phases non miscible ; une phase mobile (éluant – PM) et une phase stationnaire (PS) ; suivant leur affinité pour les deux phases

Le soluté est en équilibre constant entre la phase mobile et la phase stationnaire

La progression se fait par entraînement dans la phase mobile

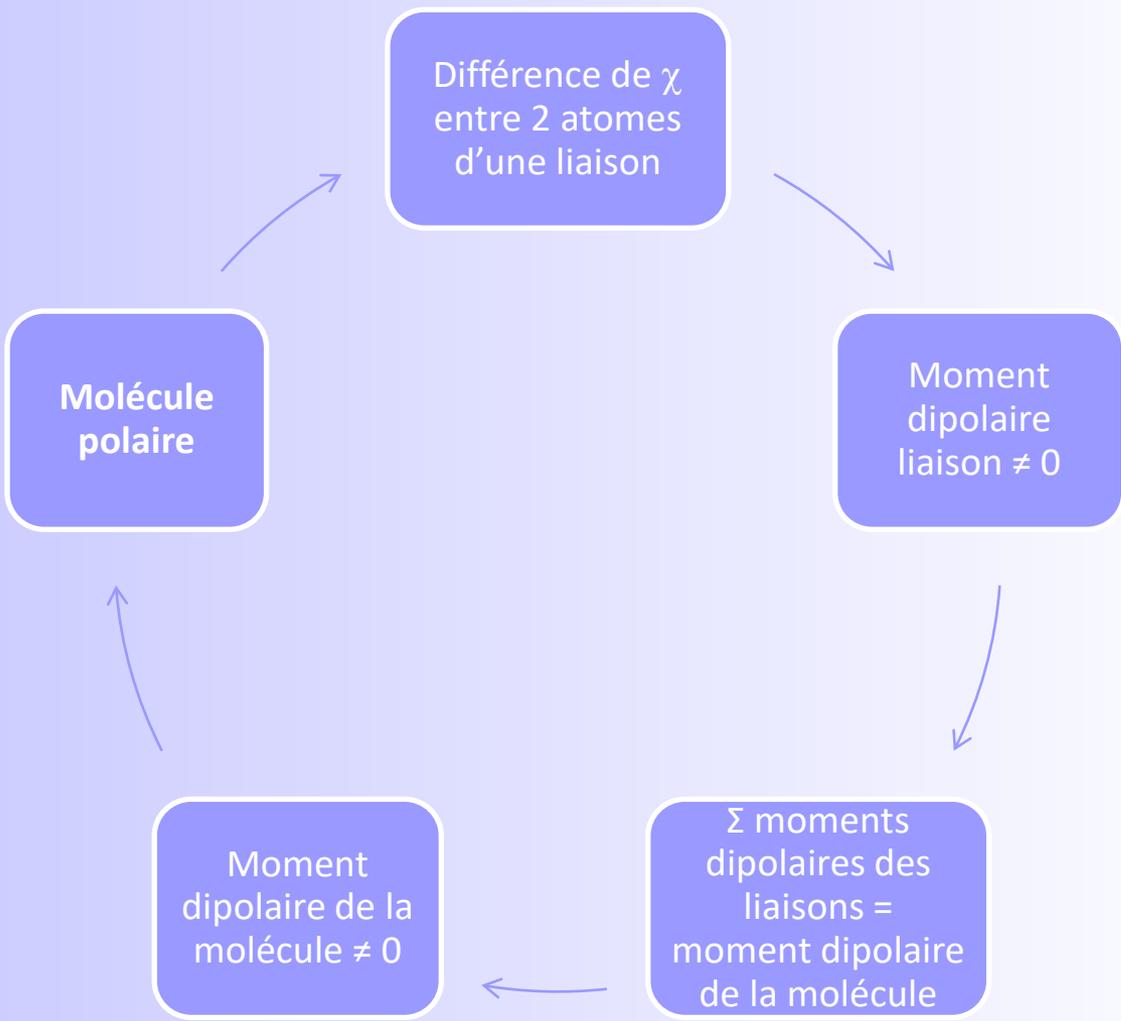
Plus un composé a d'« affinité » pour la phase mobile, plus il progressera vite

Plus un composé a d'« affinité » pour la phase stationnaire, moins il progressera vite

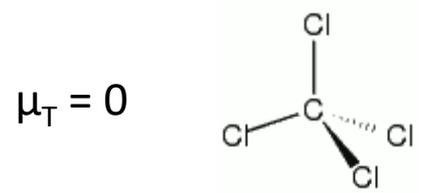
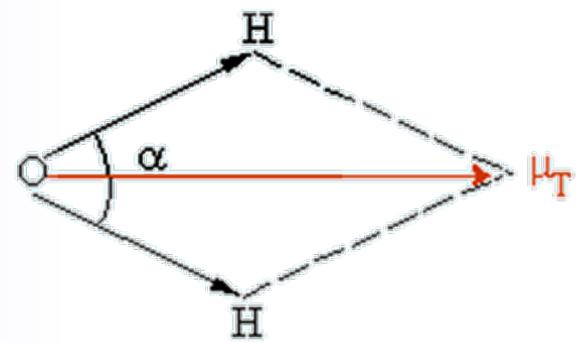
L' « affinité » dépend de plusieurs paramètres :

- solubilité
- polarité
- interactions électroniques
- interactions hydrophiles / hydrophobes

Introduction– équilibres mis en jeu – Interactions – Polarité



χ : électronégativité = capacité d'un atome à attirer à lui les électrons d'une liaison





Introduction – équilibres mis en jeu – Interactions – Polarité en HPLC

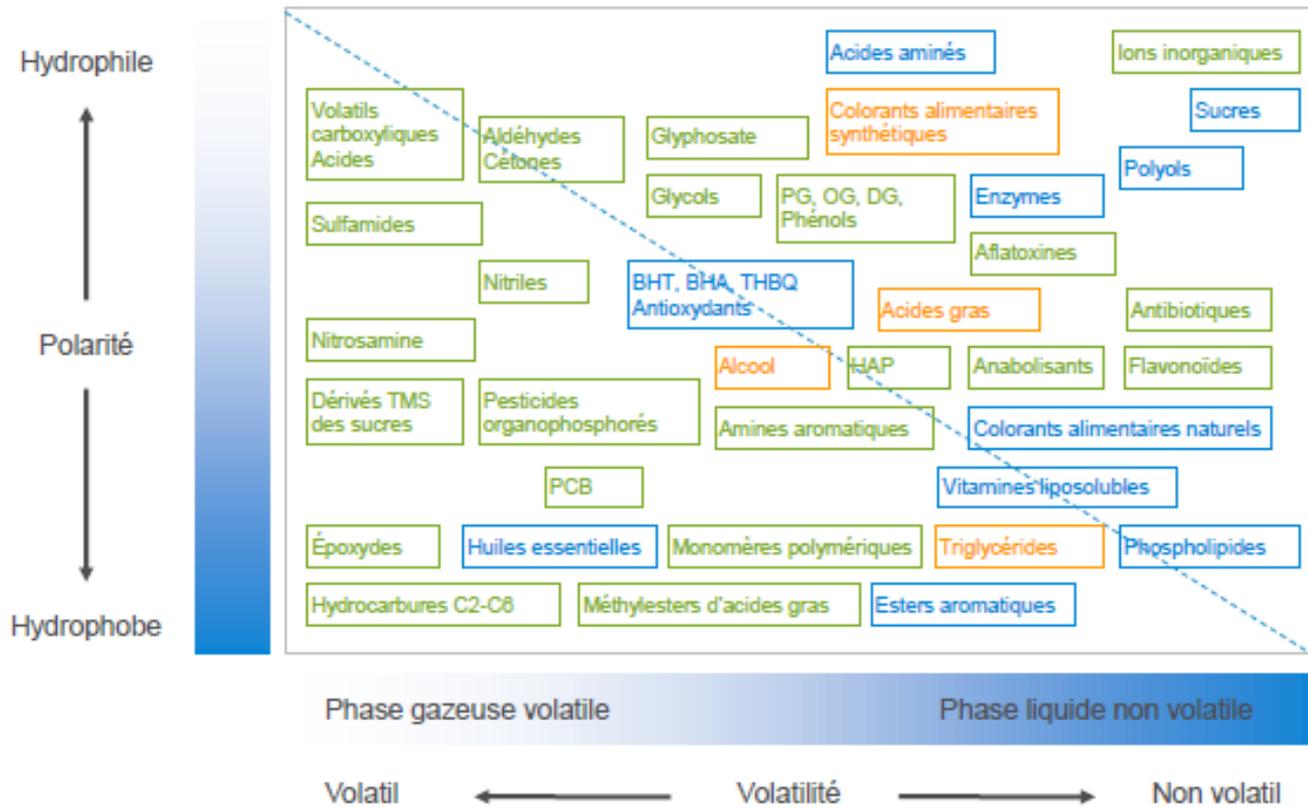
Nature PS	Nature PM	Type chromatographie
Polaire	Apolaire ou peu polaire	Phase normale
Apolaire	Polaire	Phase inverse

Phase normale : les composés les plus **apolaires** sont élués en premier

Phase inverse : les composés les plus **polaires** sont élués en premier

« Qui se ressemble s’assemble »

Quelle technique de séparation pour quel composé ?

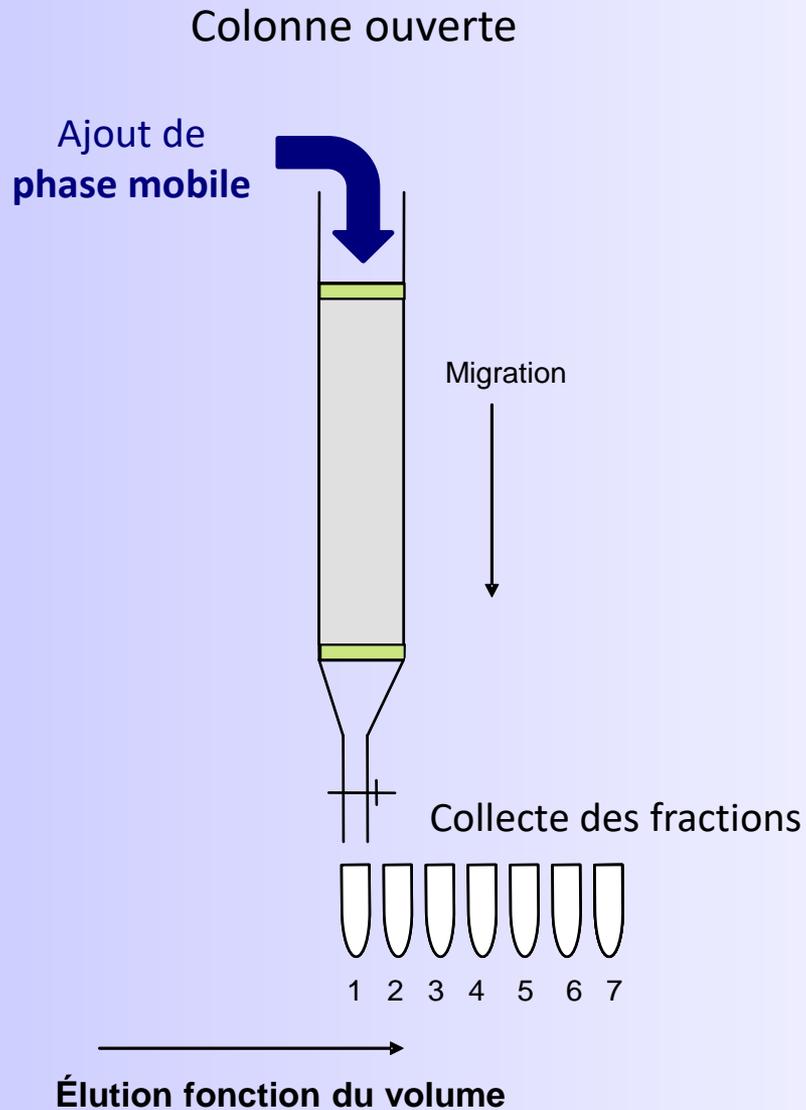




Licence Professionnelle Métrologie chimique et nucléaire
2024-2025 UE XLP5CE033

La chromatographie en phase liquide

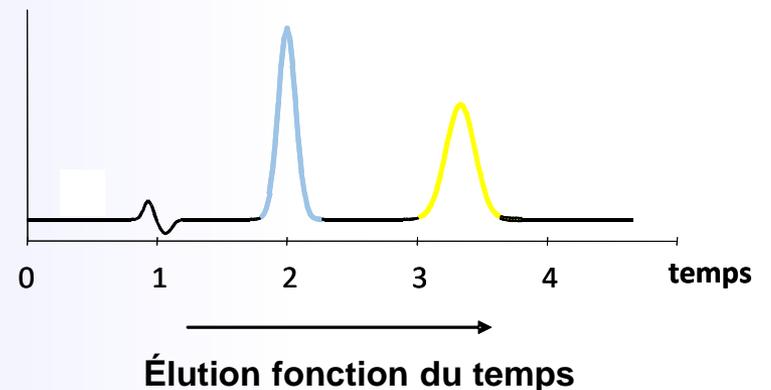
Lien entre colonne ouverte et HPLC ?



HPLC



Avec un détecteur : Chromatogramme



Pour composés non volatils et/ou thermosensibles



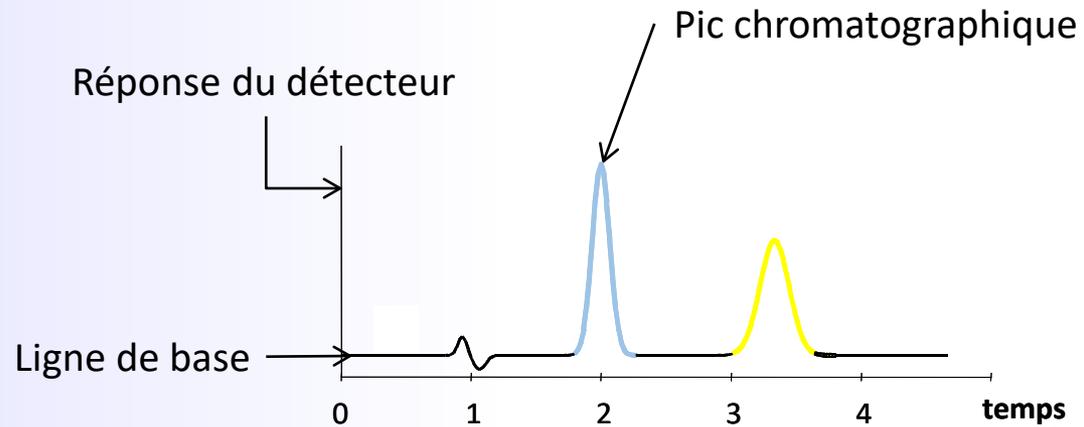
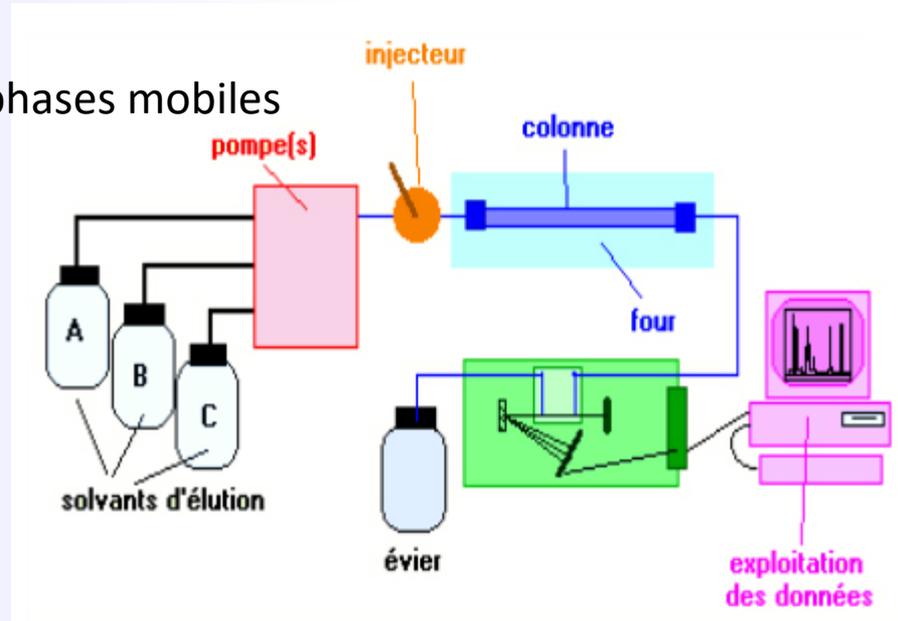
Solvant(s) d'éluion / phases mobiles

Pompes

Passeur d'échantillons
injecteur

Four + colonne

détecteur



Plan

1. La phase mobile
2. Les pompes
3. L'injecteur
4. Les colonnes
5. Les détecteurs
6. Les paramètres chromatographiques
7. Comment optimiser une séparation ?



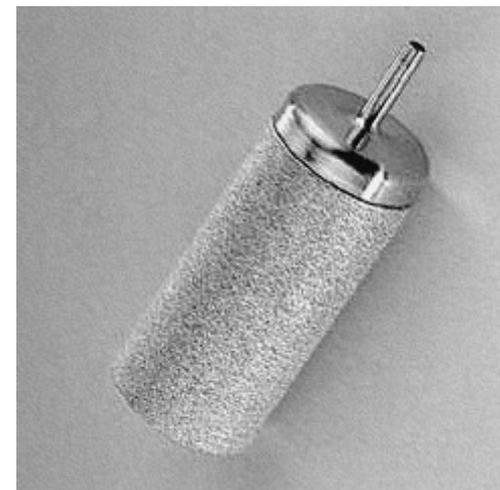
1. La phase mobile

Mélange de solvants permettant l'élution des composés

Miscibles en toutes proportions

Exempts de poussières → Filtration + Utilisation de crépines

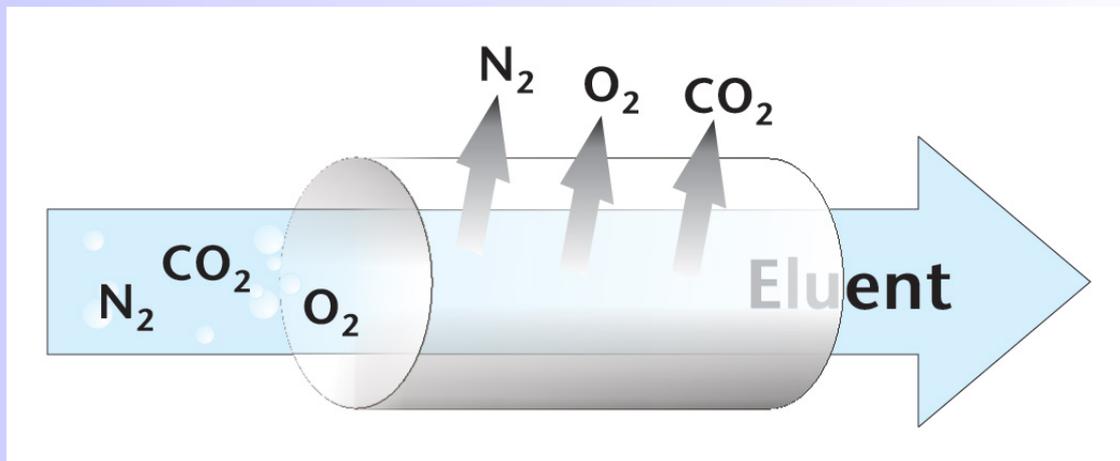
Exempts de gaz dissous → Dégazeur en ligne



Les poussières et particules solides risquent de boucher la colonne et de l'endommager.

Les gaz dissous peuvent créer des bulles et perturber la séparation ou au pire d'endommager la colonne.

Pour dégazer, l'éluent passe dans une membrane sous vide perméable aux gaz mais pas aux liquides.

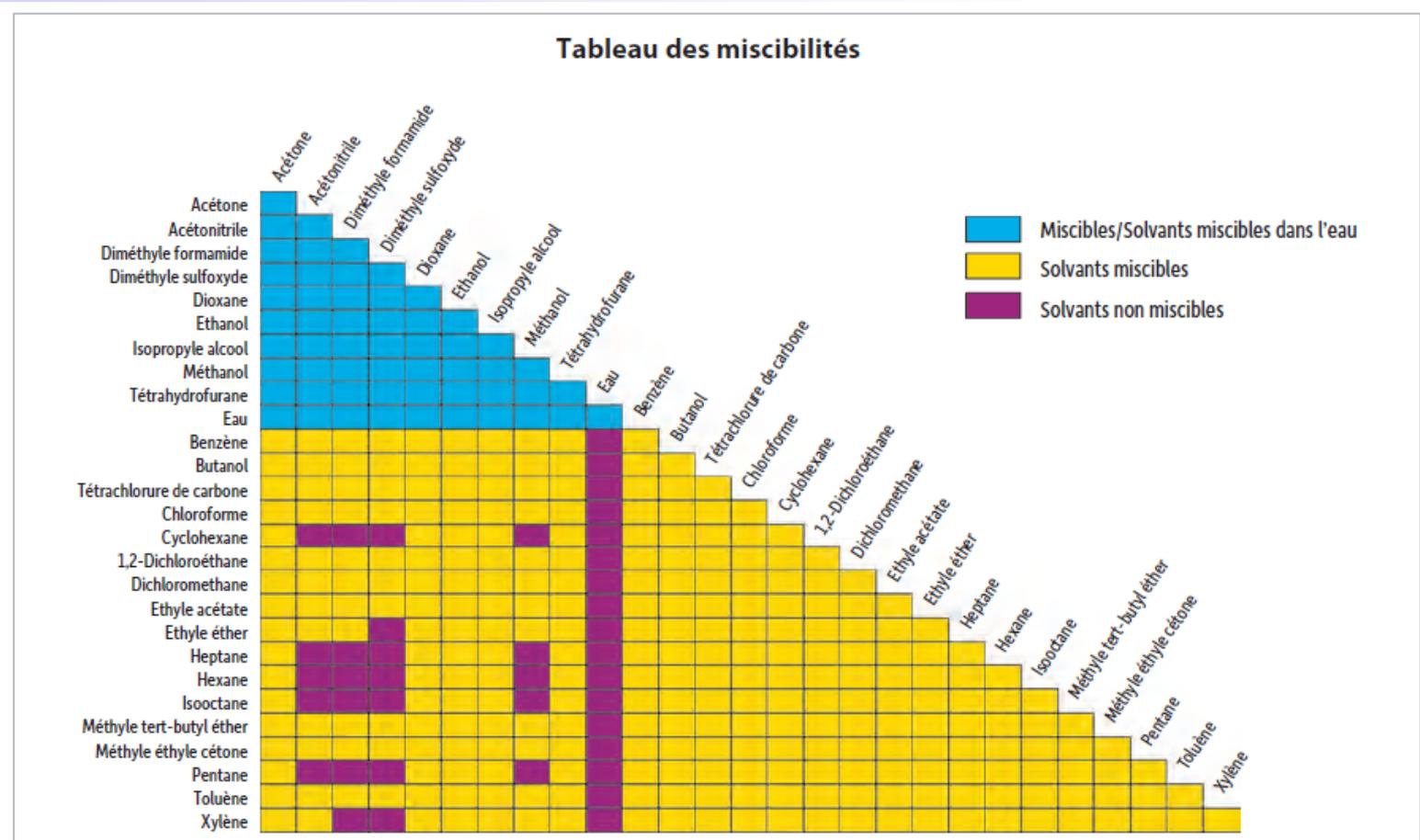




1. La phase mobile

Mélange de solvants permettant l'élution des composés

Miscibles en toutes proportions





1. La phase mobile

Mélange de solvants permettant l'élution des composés

Miscibles en toutes proportions

Exempts de poussières —————> Filtration + Utilisation de crépines

Exempts de gaz dissous —————> Dégazeur en ligne

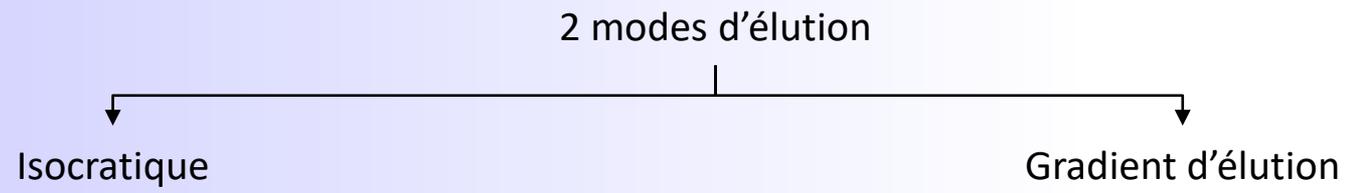
Pour les solvants organiques : Qualité LC ou LC/MS

Pour l'eau :

- Eau Milli-Q filtrée sur 0,22 μm (ne pas refiltrer)
- Si préparation d'un tampon, refiltrer sur 0,22 μm
- Éviter les voies aqueuse à 100%
 - si phase aqueuse seule, changer tous les jours en UPLC ou tous les deux jours en HPLC **en changeant de bouteille**
 - Sinon préparer directement des bouteilles avec 5 à 10% de solvant organique

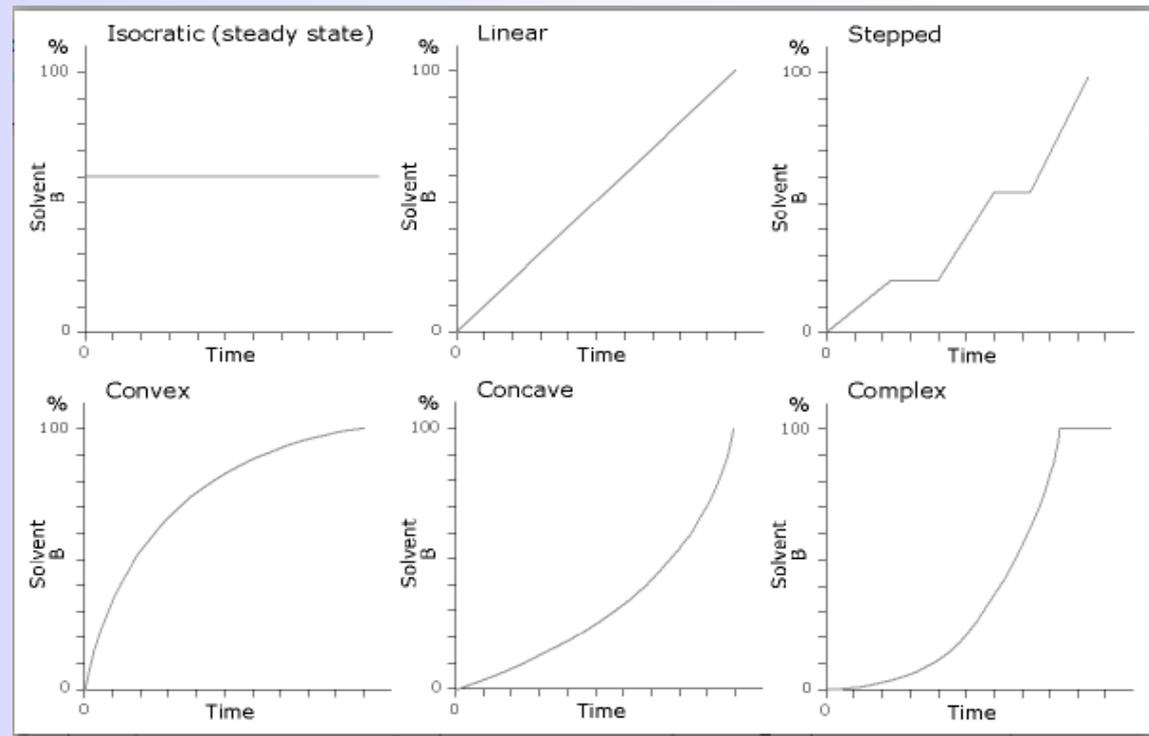


1. La phase mobile



Composition constante en fonction du temps

Composition varie en fonction du temps
Mélange de 2 à 4 solvants





1. La phase mobile
2. Les pompes
3. L'injecteur
4. Les colonnes

5. Les détecteurs
6. Les paramètres chromatographiques
7. Comment optimiser une séparation ?

1. La phase mobile

Force éluante = capacité d'un solvant à éluer \pm rapidement des solutés

Silice ou alumine ou phase stationnaire polaire (NPC) : ϵ^0
force éluante \nearrow quand $\epsilon^0 \nearrow$

Phase stationnaire apolaire (RPC) : index de polarité P' de Rohrschneider
force éluante \nearrow quand $P' \searrow$

	Phases polaires		Phases apolaires	
	ϵ^0	Force éluante	P'	Force éluante
C_xF_y	-0,2	Faible	-2	Forte
C_nH_{2n+2}	0		0,1	
CCl_4	0,11		1,6	
Toluène	0,22		2,4	
CH_2Cl_2	0,30		3,1	
Éther éthylique	0,43		2,8	
Acétate d'éthyle	0,48		4,4	
THF	0,53		4,0	
Acétone	0,53		5,1	
CH_3CN	0,52		5,8	
CH_3OH	0,70		5,1	
H_2O	>0,7	Forte	10,2	Faible

1. La phase mobile

Mélanges binaires

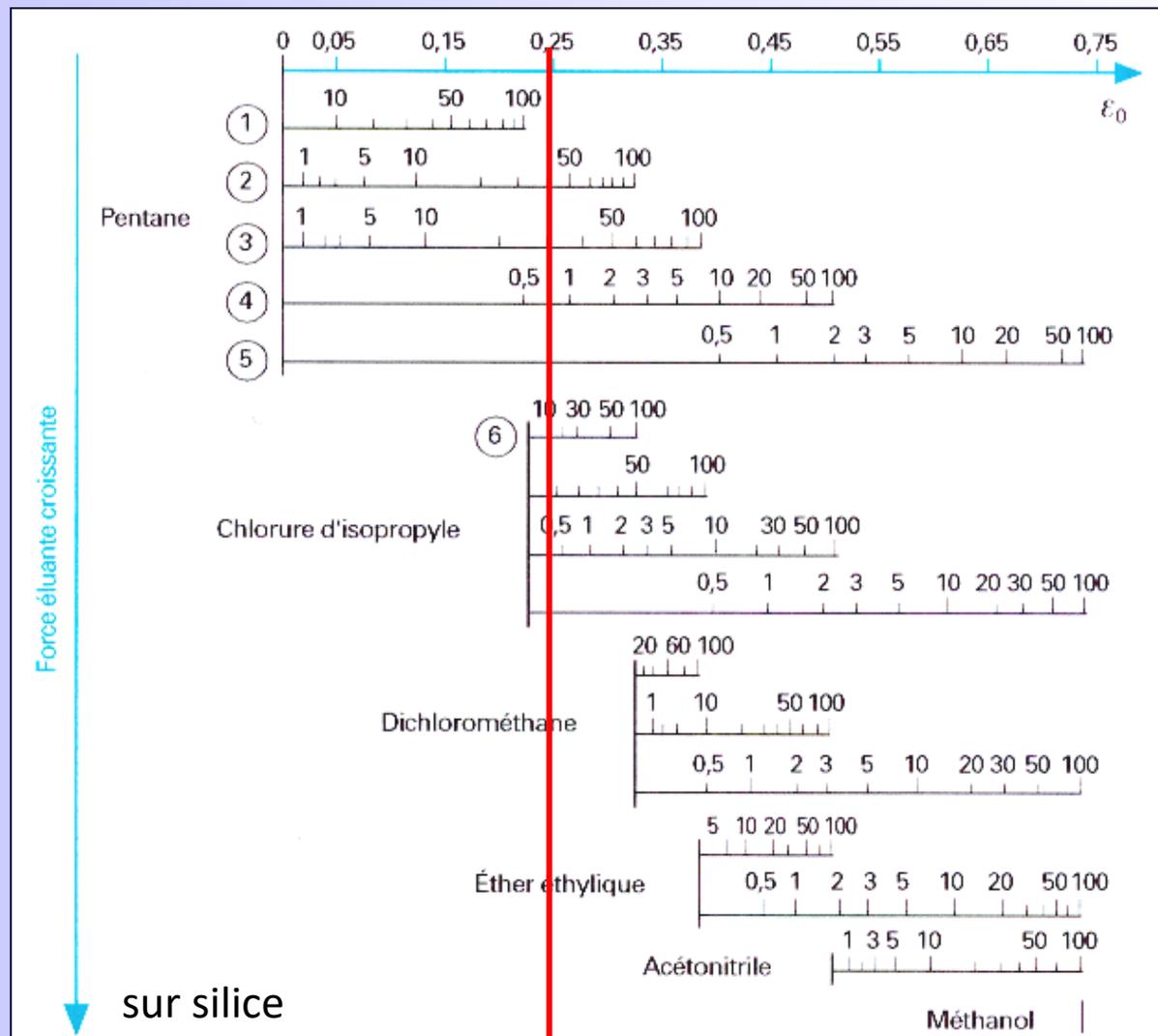
force éluante ϵ^0 varie rapidement pour faibles % de solvant fort puis plus lentement

Plusieurs mélanges binaires possibles pour une même force éluante ϵ^0

Éviter faibles % d'un solvant

- % en volume
- ① de chlorure d'isopropyle dans le pentane
 - ② de dichlorométhane dans le pentane
 - ③ d'éther éthylique dans le pentane
 - ④ d'acétonitrile dans le pentane
 - ⑤ de méthanol dans le pentane
 - ⑥ de dichlorométhane dans le chlorure d'isopropyle, etc...

	ϵ^0
C_nH_{2n+2}	0
Chlorure d'isopropyle	0,23
CH_2Cl_2	0,30
Éther éthylique	0,43
CH_3CN	0,52
CH_3OH	0,70



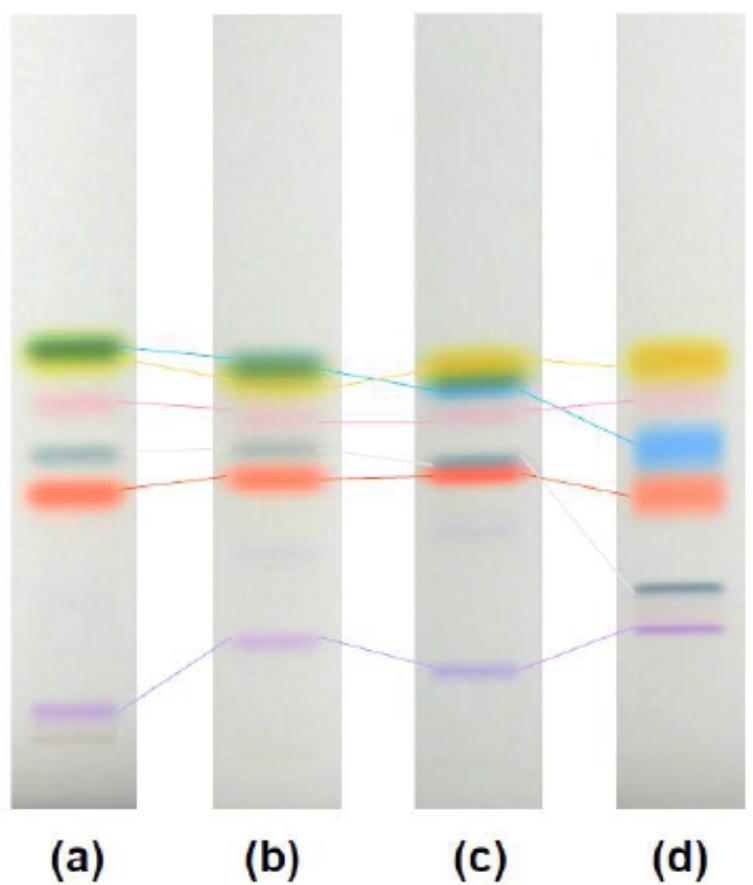
1. La phase mobile
2. Les pompes
3. L'injecteur
4. Les colonnes

5. Les détecteurs
6. Les paramètres chromatographiques
7. Comment optimiser une séparation ?

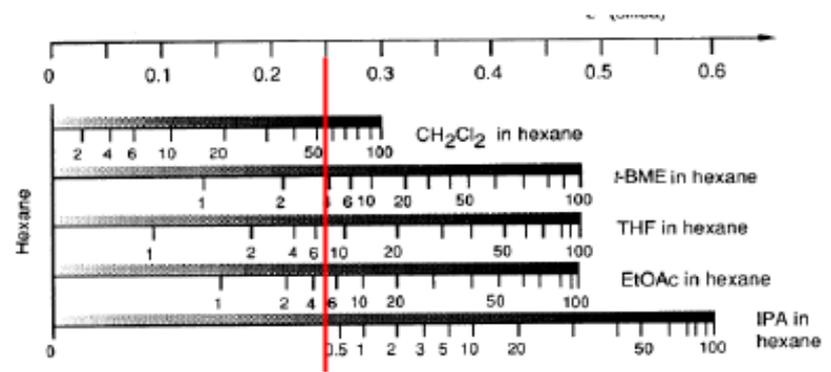
1. La phase mobile

Illustration par un exemple de chromatographie planaire

même force éluante mais pas forcément même sélectivité



- a) Hexane + 5% acétate d'éthyle
- b) Hexane + 10% acétone ($\epsilon^\circ = 0,25$)
- c) Hexane + 0,5% isopropanol
- d) Chloroforme ($\epsilon^\circ = 0,26$)

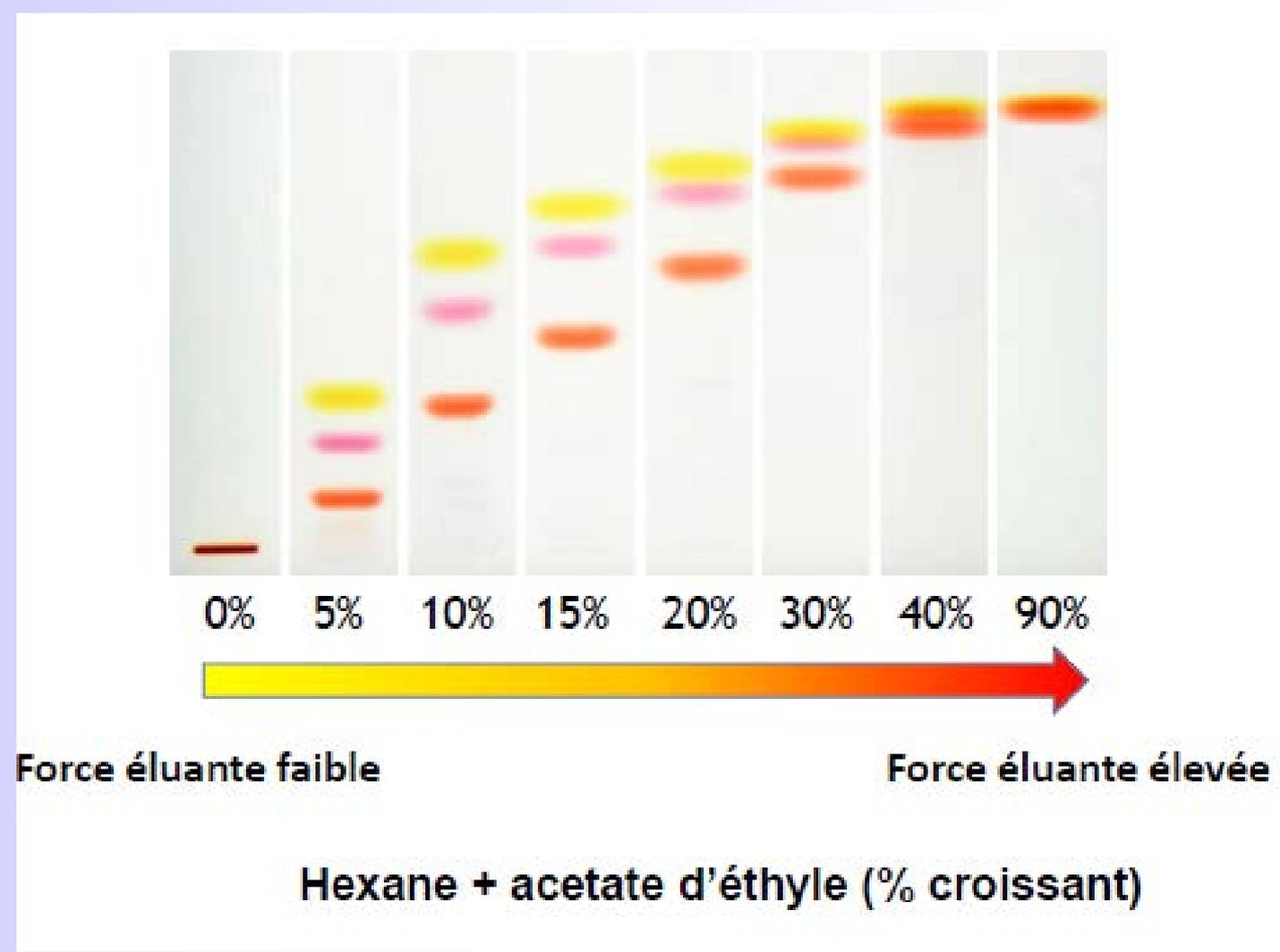


- 1. La phase mobile
- 2. Les pompes
- 3. L'injecteur
- 4. Les colonnes

- 5. Les détecteurs
- 6. Les paramètres chromatographiques
- 7. Comment optimiser une séparation ?

1. La phase mobile

Illustration par un exemple de chromatographie planaire



Comment bien préparer 500 mL d'une phase mobile méthanol/eau (90/10 v/v) ?

- A. Avec une éprouvette graduée, mesurer 50 mL d'eau et compléter à 500 mL avec le méthanol
- B. Avec une éprouvette graduée, mesurer 450 mL de méthanol et compléter à 500 mL avec de l'eau
- C. Avec deux éprouvettes graduées, mesurer 50 mL d'eau et 450 mL de méthanol et mélanger
- D. Peser 50 g d'eau et 450 g de méthanol, et les mélanger.

Plusieurs réponses possibles

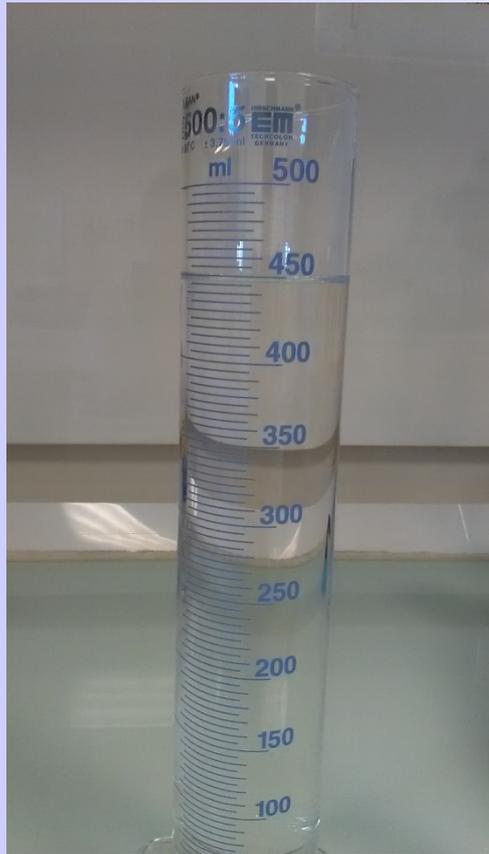
Comment bien préparer 500 mL d'une phase mobile méthanol/eau (90/10 v/v) ?

- A. Avec une éprouvette graduée, mesurer 50 mL d'eau et compléter à 500 mL avec le méthanol
- B. Avec une éprouvette graduée, mesurer 450 mL de méthanol et compléter à 500 mL avec de l'eau
- C. Avec deux éprouvettes graduées, mesurer 50 mL d'eau et 450 mL de méthanol et mélanger
- D. Peser 50 g d'eau et 450 g de méthanol, et les mélanger.



- 2. Les pompes
- 3. L'injecteur
- 4. Les colonnes

1. La phase mobile



450 mL MeOH

+



50 mL H₂O



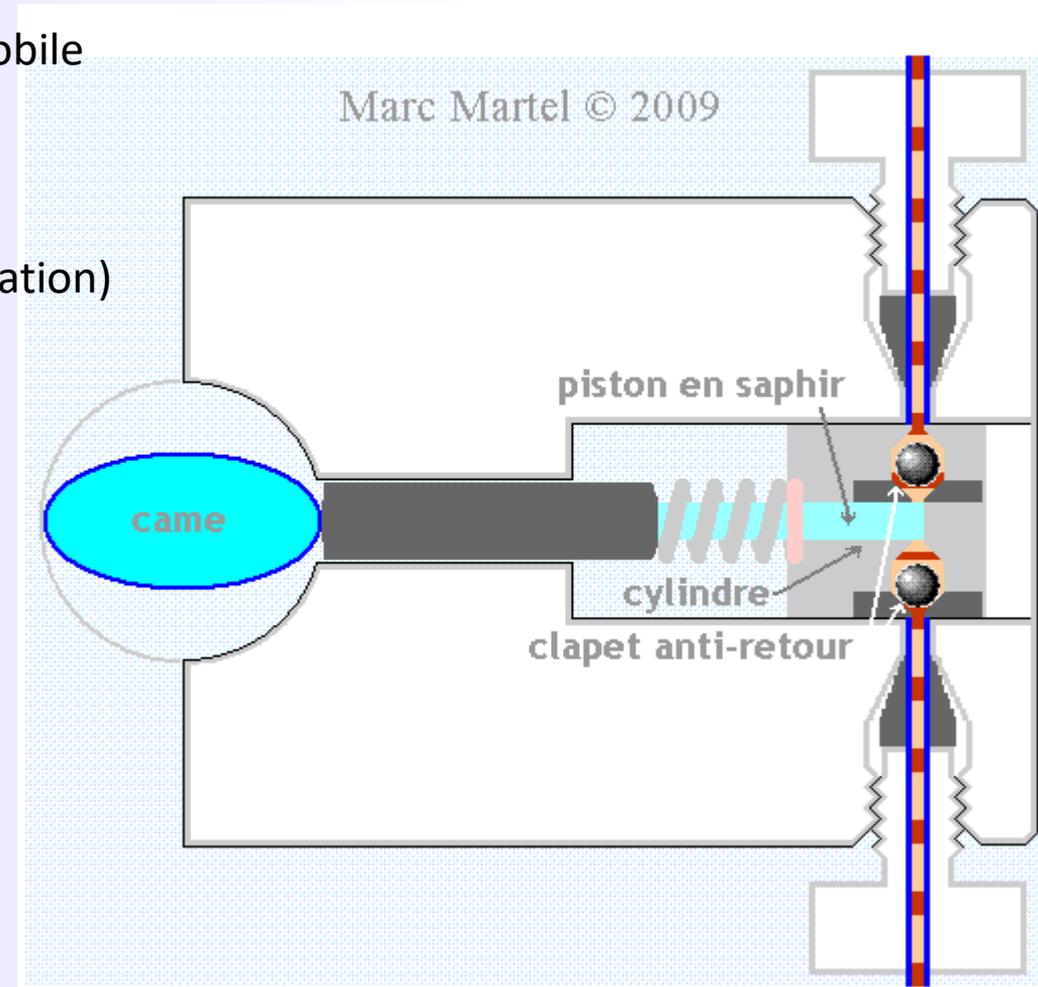
480 mL

Les interactions entre molécules de MeOH et de H₂O sont plus fortes que celles entre molécules de MeOH seules et de H₂O seules donc V diminue ; la solution n'est plus idéale.



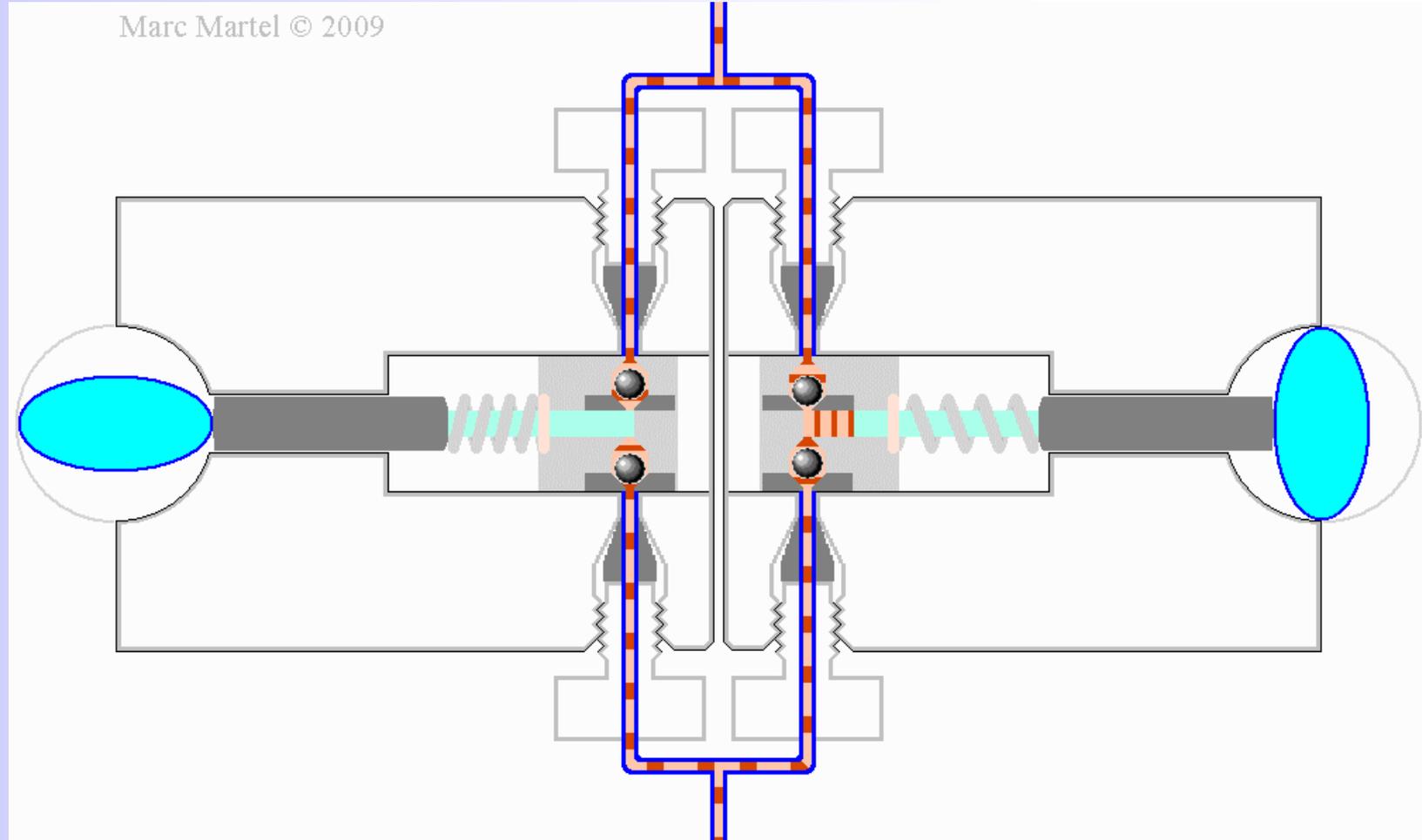
2. Pompes

- Permettre la circulation de la phase mobile
- Gestion du débit
- Supporter les hautes pressions
- Absence de pulsations
- Débit constant (moins de 0,5 % de variation)
- Résistance aux solvants

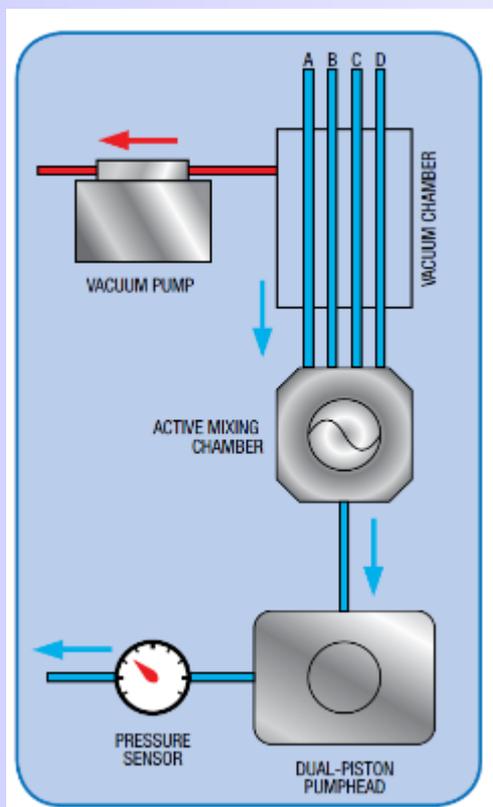




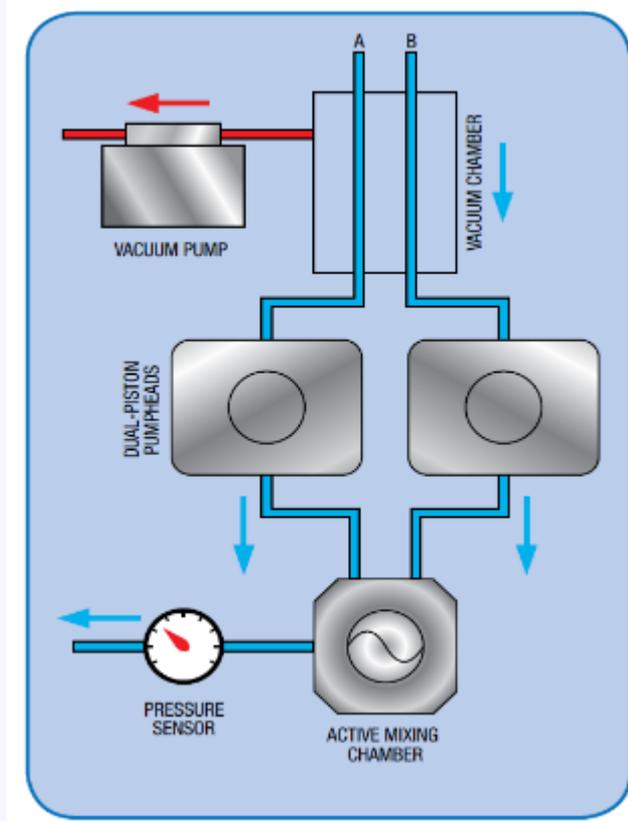
2. Pompes



2. Pompes



Gradient basse-pression



Gradient haute-pression

2. Pompes

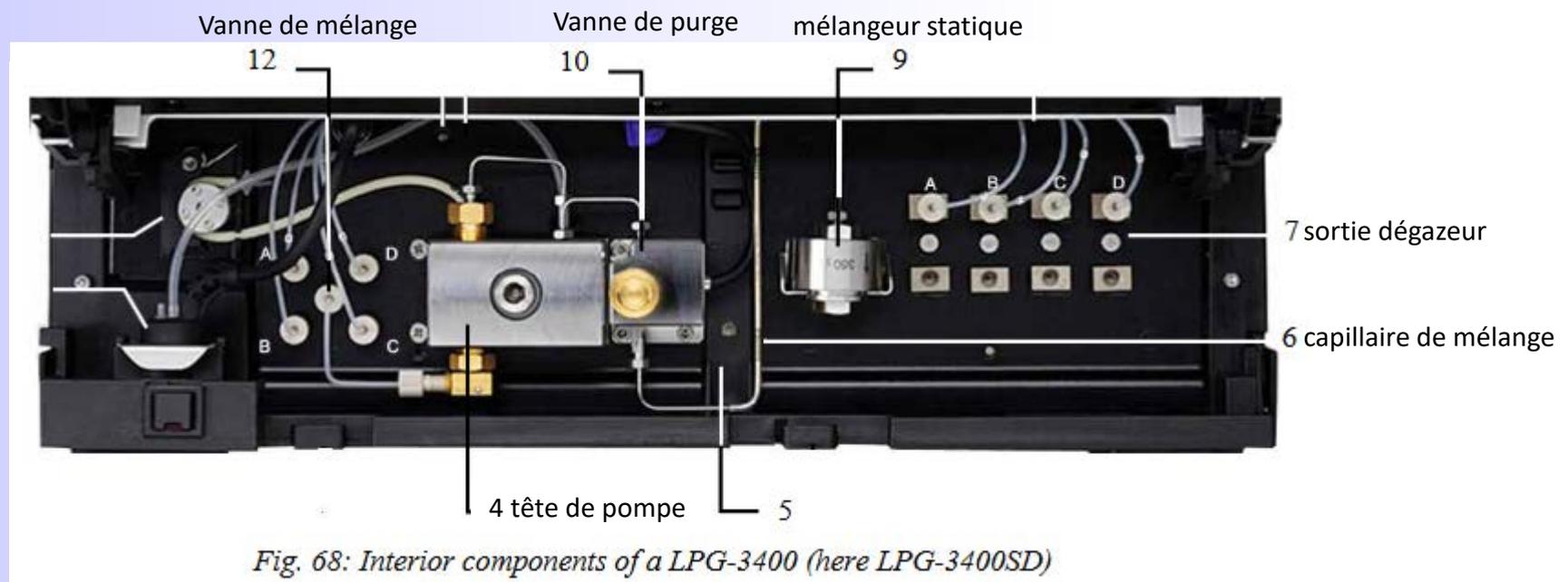
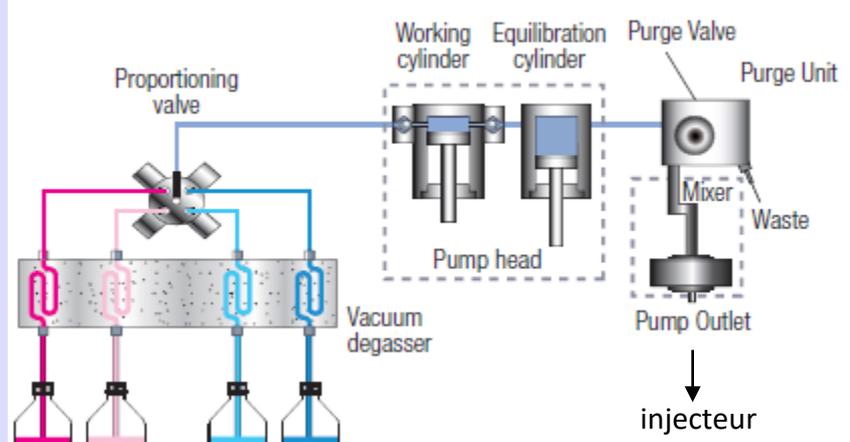
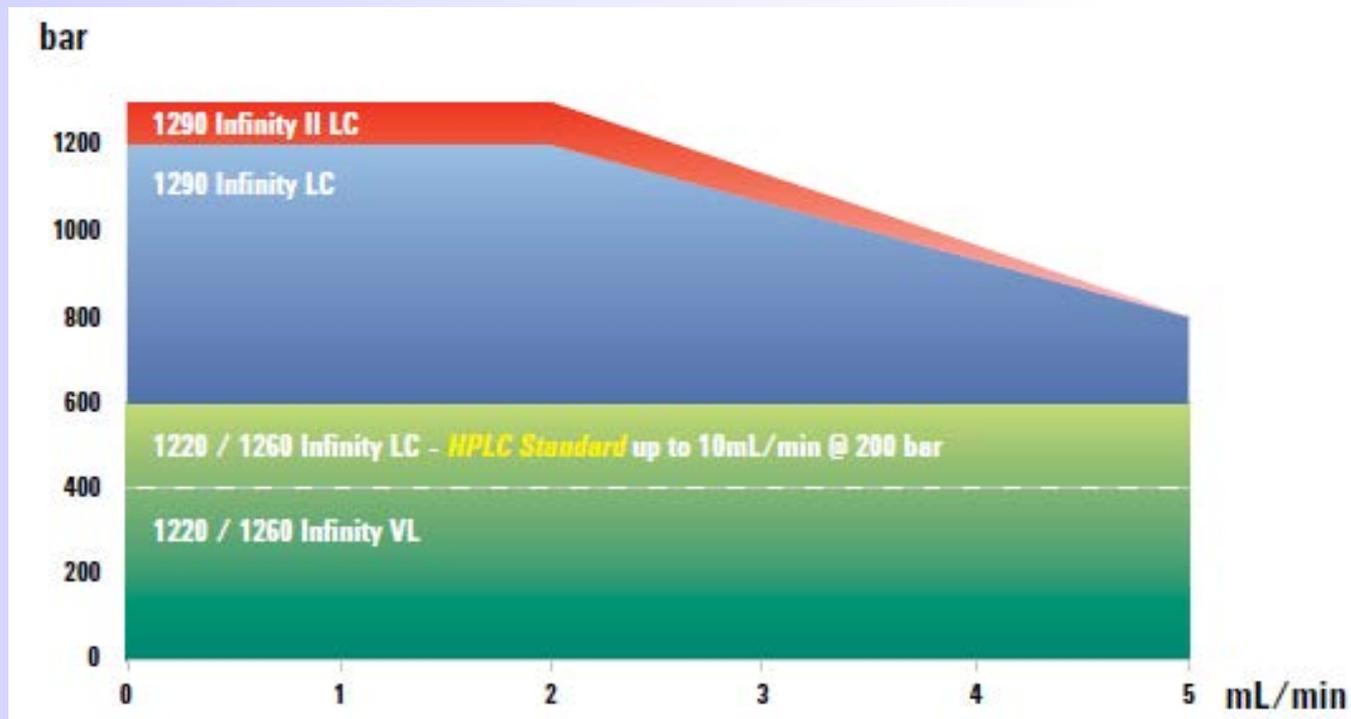


Fig. 68: Interior components of a LPG-3400 (here LPG-3400SD)





2. Pompes

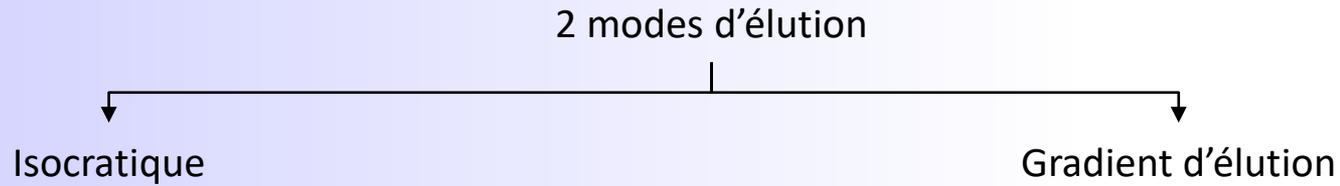


Pressions en HPLC : max 400 bar
Pressions en UPLC : max 1300 bar



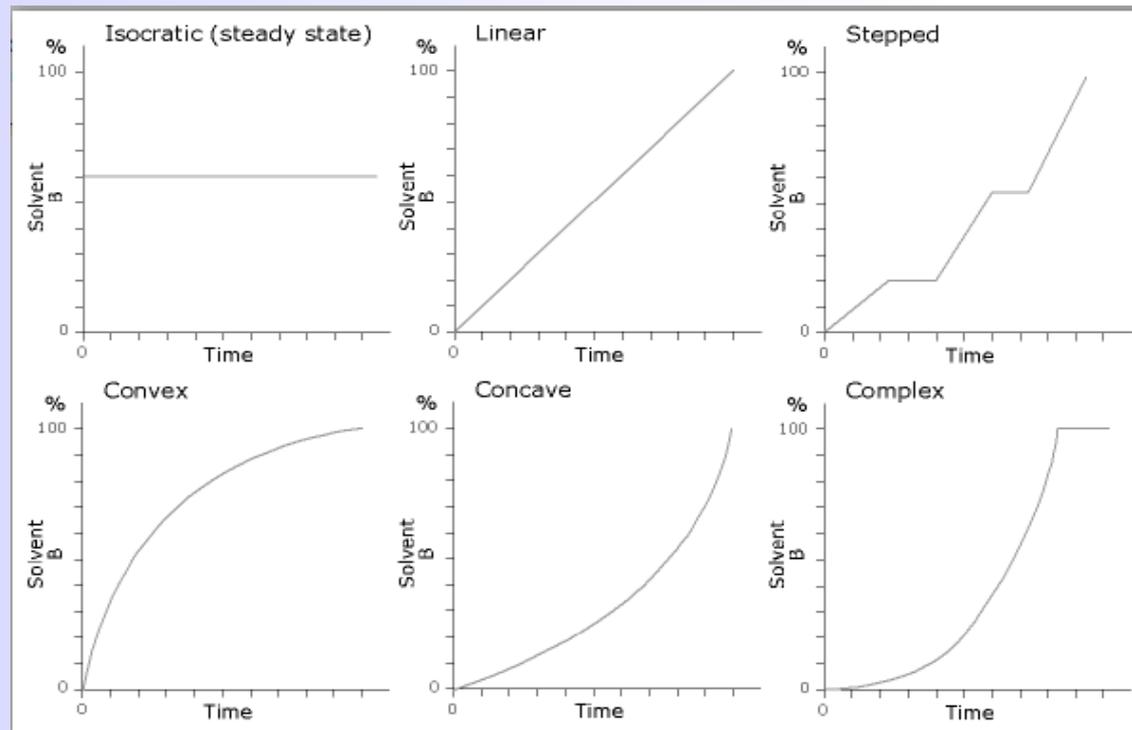
- 2. Les pompes
- 3. L'injecteur
- 4. Les colonnes

2. Pompes – modes d'élution



Composition constante en fonction du temps

Composition varie en fonction du temps
Mélange de 2 à 4 solvants





2. Pompes – Retard au gradient d'élution (Dwell volume)

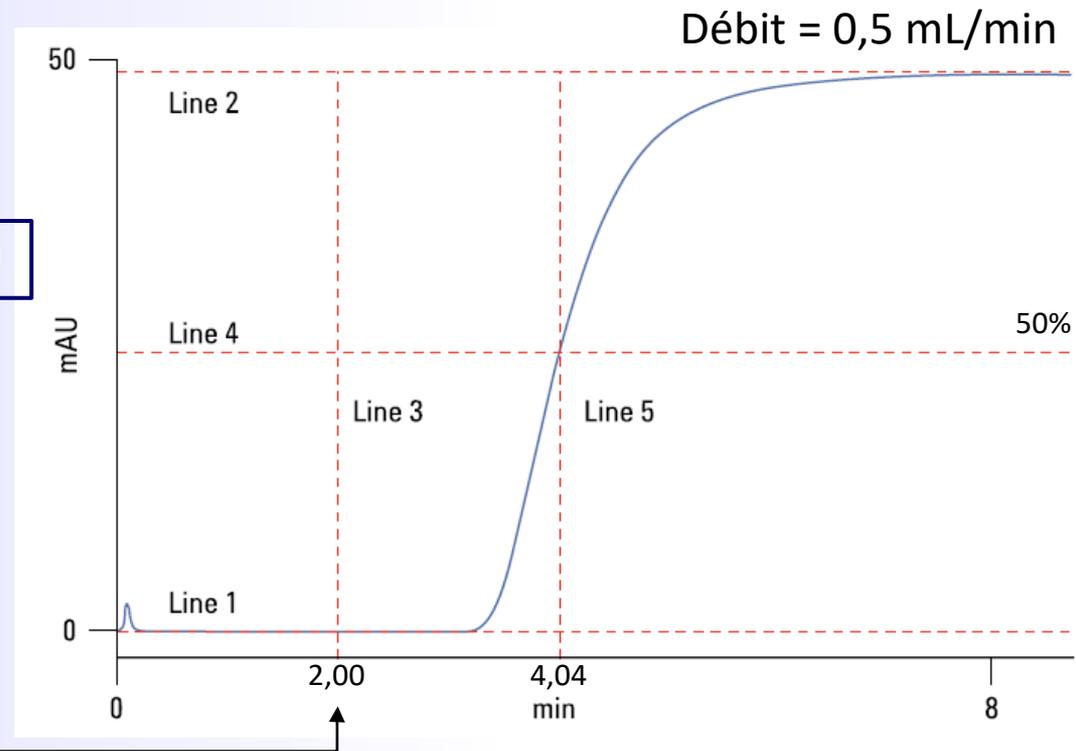
Volume entre la pompe et la tête de colonne = tubulures, chambre de mélange

Doit être mesuré pour chaque système

Comment faire ?

Faire un changement rapide de composition du solvant sans colonne

Enregistrer le signal



$$DV = (t(50\%) - t(\text{changement})) \times D$$

$$DV = 1,02 \text{ mL}$$

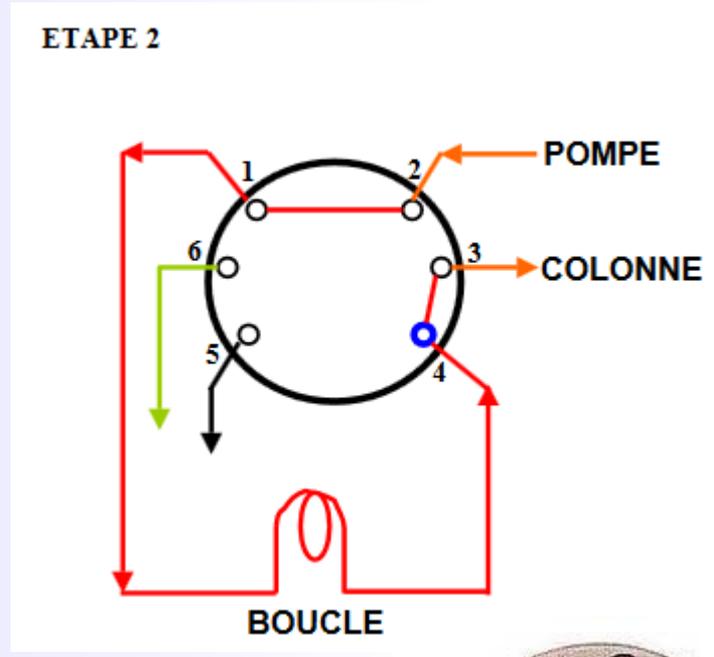
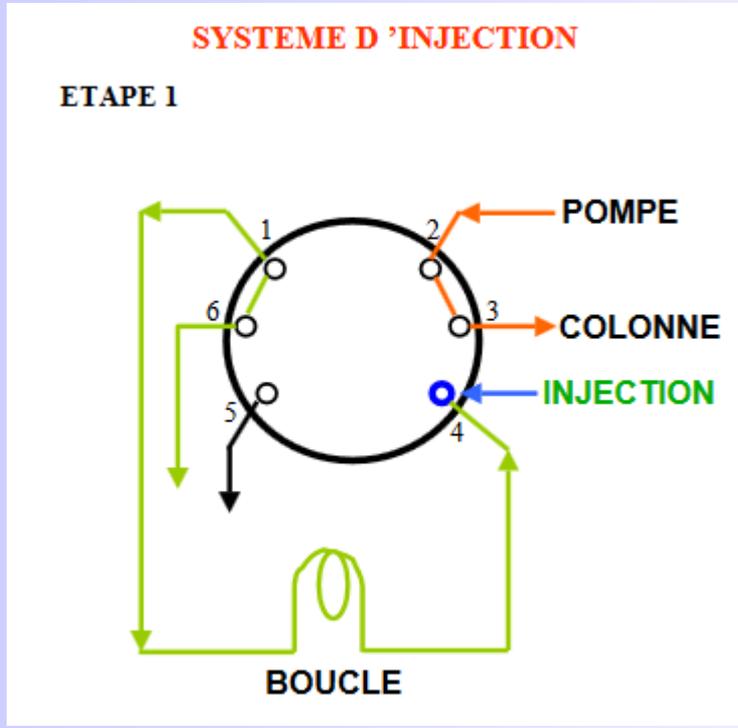
Changement gradient



- 1. La phase mobile
- 2. Les pompes
- 3. L'injecteur
- 4. Les colonnes

- 5. Les détecteurs
- 6. Les paramètres chromatographiques
- 7. Comment optimiser une séparation ?

3. Injecteur

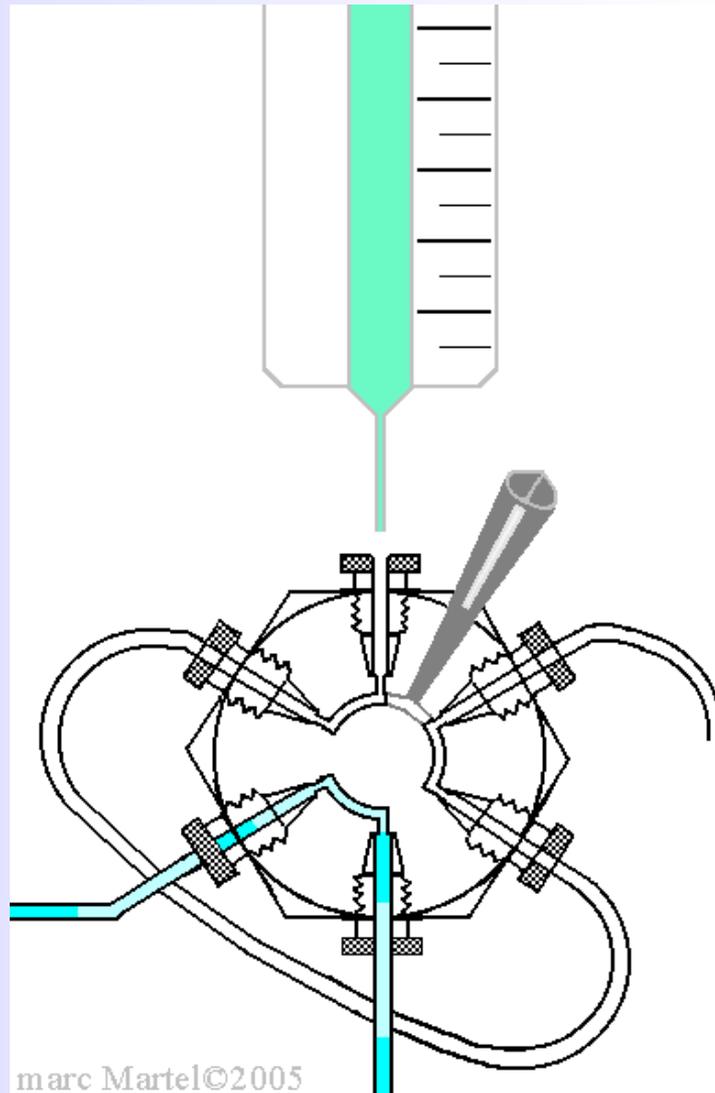


Source: cours univ Aix-Marseille (Claude Aubert)





3. Injecteur



Attention au choix du solvant de rinçage pour l'aiguille afin d'éviter les contaminations croisées

3. Injecteur

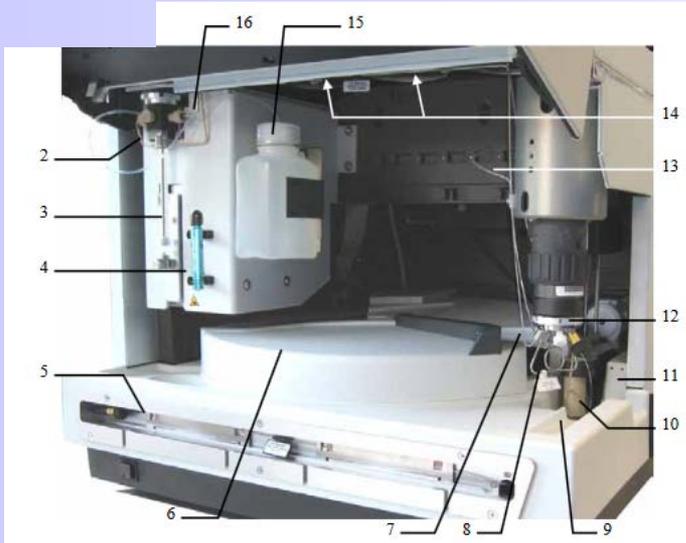
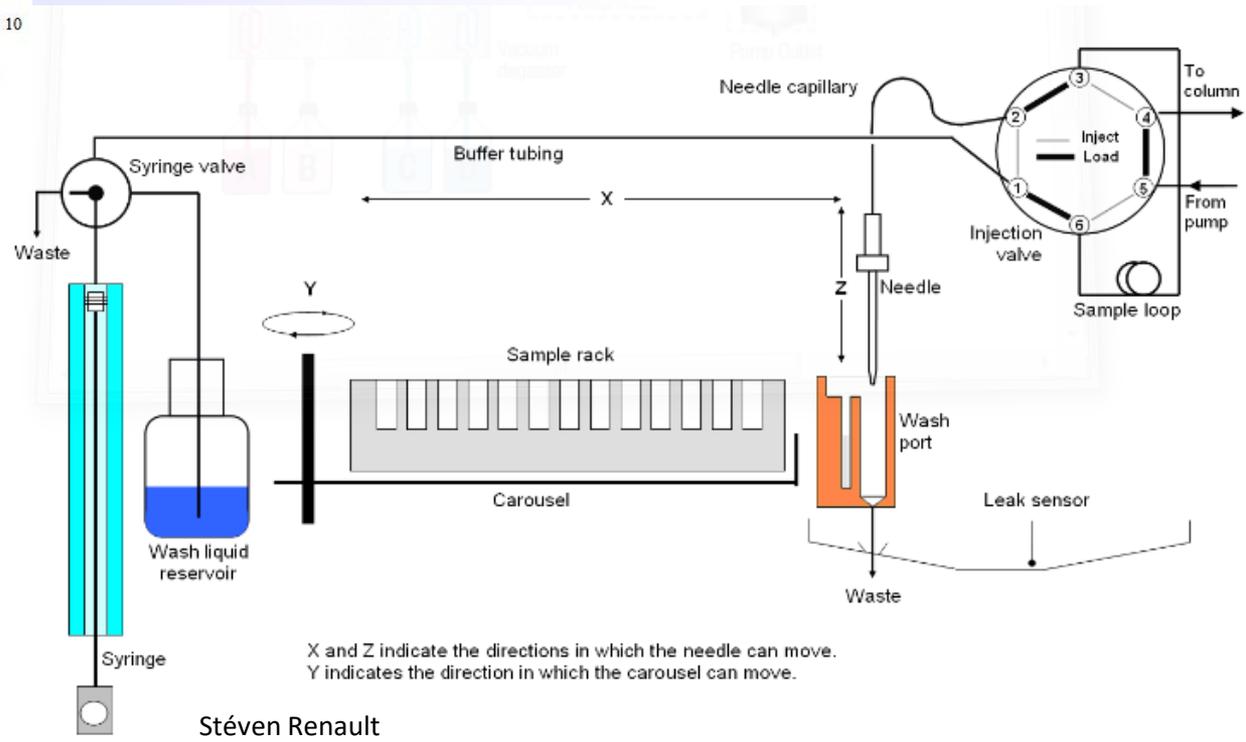


Fig. 2: Interior components

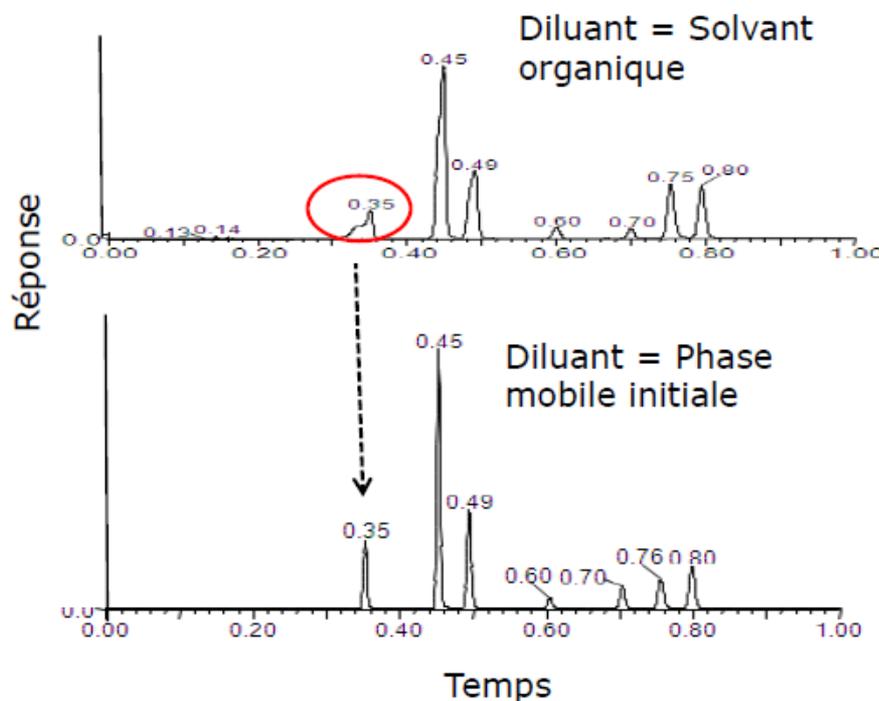


X and Z indicate the directions in which the needle can move.
Y indicates the direction in which the carousel can move.



3. Injecteur – préparation de l'échantillon

ATTENTION au choix du solvant de dilution



Si le solvant d'injection est trop fort

- ▶ Fronting sur le 1^{er} pic
- ▶ Tous les pics sont déformés
- ▶ Perte de sensibilité
- ▶ Changement de résolution

Séparation sur colonne de phase inverse, conditions initiales de gradient = 95%eau 5%ACN



3. Injecteur – préparation de l'échantillon

ATTENTION à la qualité de l'échantillon injecté



Donepezil Tablet dilué
préparé selon la
monographie
SALE (très mauvaise)



Echantillon après filtration
sur 0.2µm
Particules très fines:
Solution trouble (toujours
mauvaise)



Echantillon après filtration
et centrifugation à
12000RPM
Solution limpide(OK)

©2015 Waters Corporation

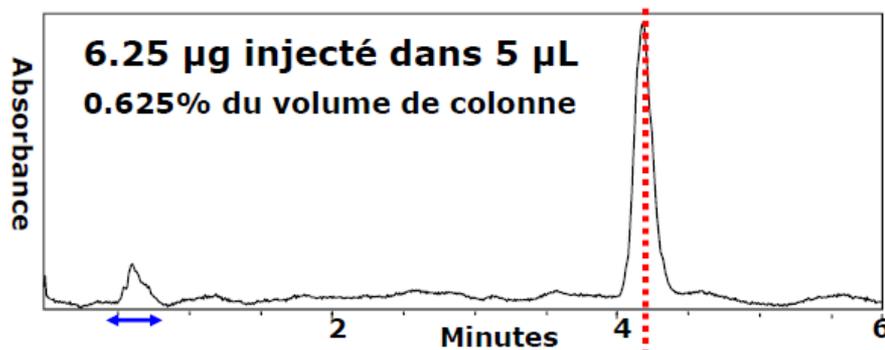
La préparation de l'échantillon est primordiale !



3. Injecteur – préparation de l'échantillon

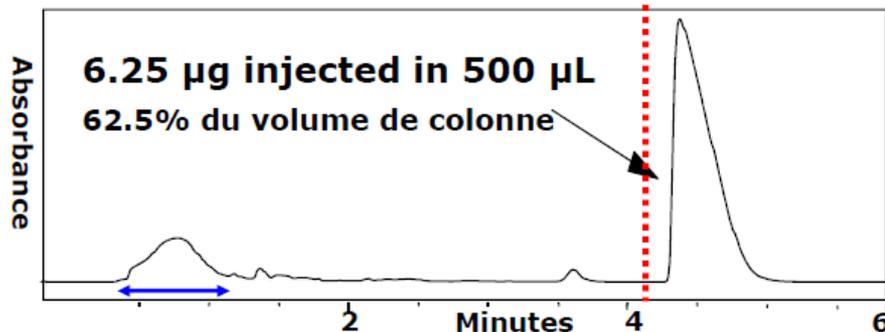
ATTENTION à la quantité d'échantillon injecté

- En analytique, volume d'injection compris entre **1 à 5%** du volume total de la colonne :



Volume de la colonne:
0.8 mL (800 µL)
(4.6 X 50mm ODS)

Premier pic observé
bien plus large
(← →)



Le volume d'éluion
du pic se déplace
proportionnellement
au volume injecté
(.....)



4. Les colonnes

Tube le plus souvent en acier
Longueur de 3 à 25 cm

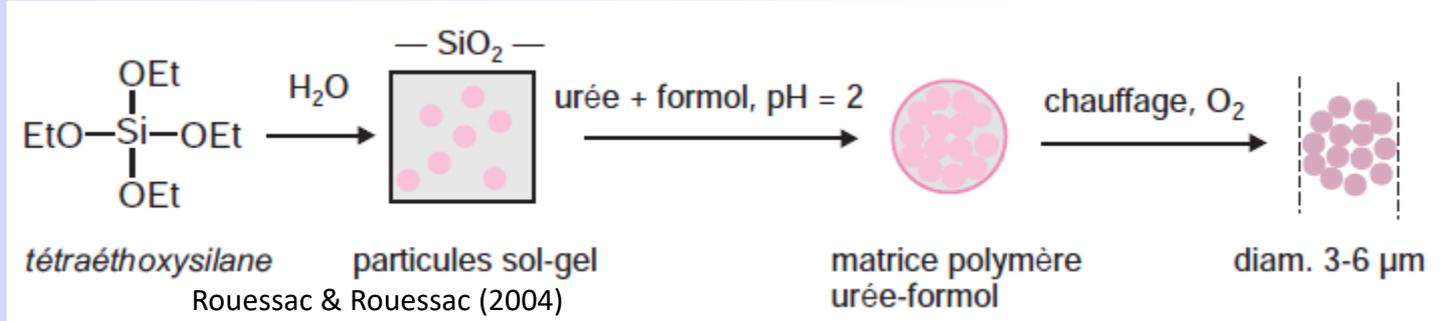


Classification des colonnes en fonction de leur diamètre interne (DI)

Colonnes	DI (mm)
Préparative	30 – 50
Semi-préparative	10 – 21,2
« standard »	3,2 – 4,6
<i>Narrow-bore</i>	2,0 – 3
<i>Micro-bore</i>	1
capillaire	< 1

Column Length	Column Volume (mL)									
	Column internal diameter (mm)									
	1.0	2.1	3.0	3.9	4.6	7.8	10	19	30	50
15 mm	–	0.1	–	–	–	–	–	–	–	–
20 mm	–	0.1	0.1	–	0.3	–	–	–	–	–
30 mm	–	0.1	0.2	–	0.5	–	2.4	8	–	–
50 mm	0.1	0.2	0.3	–	0.8	2.4	4	14	35	98
100 mm	0.1	0.4	0.7	1.2	1.7	5	8	28	70	–
150 mm	0.1	0.5	1.0	1.8	2.5	7	12	42	106	294
250 mm	–	0.9	1.8	–	4	–	20	70	176	490
300 mm	–	–	–	–	–	14	24	85	212	589

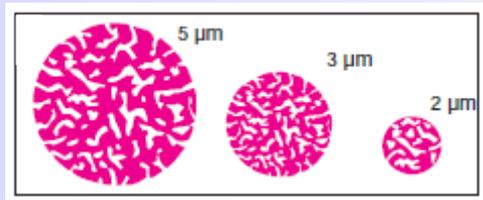
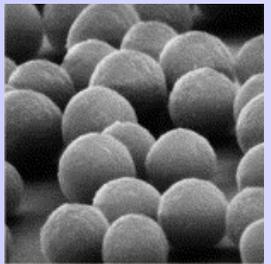
4. Les colonnes – le gel de silice



Formation du gel

Microparticules sphériques

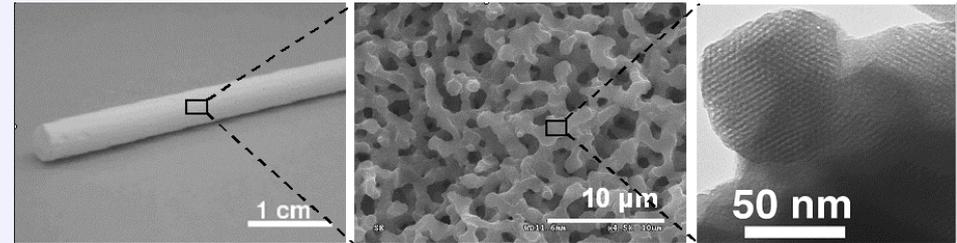
Diamètre constant dans la colonne (1 – 12 μm)
 Remplissage de la colonne a posteriori



Felix C. Leinweber, Ulrich Tallarek (2003).
J. Chrom. A, 1006, pp 207–228

Monolithe poreux

Un seul tenant / Formation direct dans la colonne
 Reproductibilité plus difficile à maîtriser
 Macroporosité > 50 nm / mésoporosité (2-50 nm)
 ↔ particules sphériques 3 μm en efficacité
 Diminution perte de charge
 ↔ particules sphériques 11 μm en terme de pression



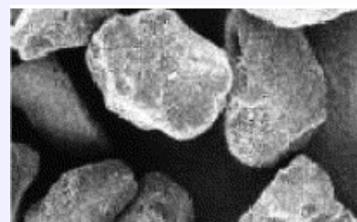
- 1. La phase mobile
- 2. Les pompes
- 3. L'injecteur
- 4. Les colonnes

- 5. Les détecteurs
- 6. Les paramètres chromatographiques
- 7. Comment optimiser une séparation ?

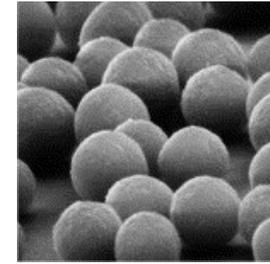
4. Les colonnes – Particulaires

Particules de silice

Entièrement poreuses, le plus souvent sphérique, différents diamètres (1,7 à 20 μm)
Remplissage de la colonne a posteriori



Particules irrégulières

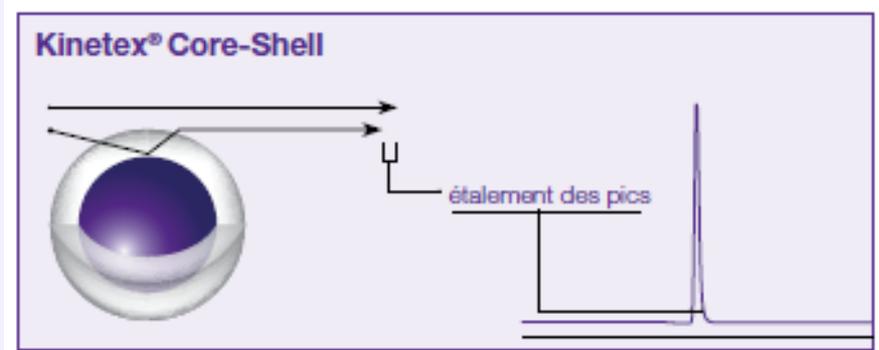
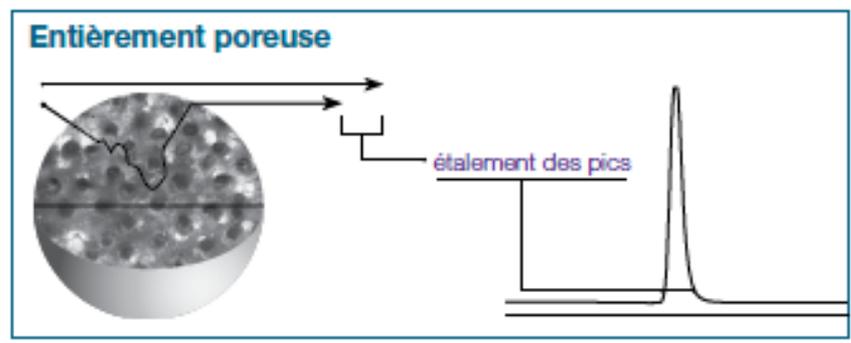
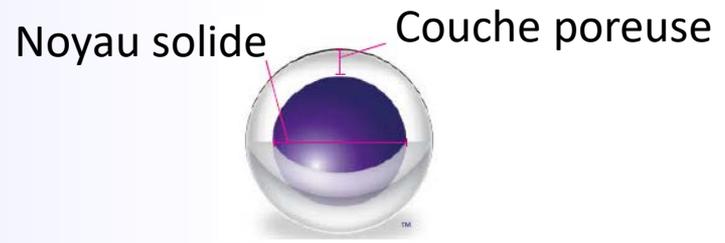


Particules sphériques

Felix C. Leinweber, Ulrich Tallarek (2003). Journal of Chromatography A, 1006, Issues 1-2, pp 207-228

Core-shell

Particules sphériques avec noyau solide et couche poreuse
Diamètre de 1,5 à 2,5 μm
Pics très fins





La phase mobile

2. Les pompes

3. L'injecteur

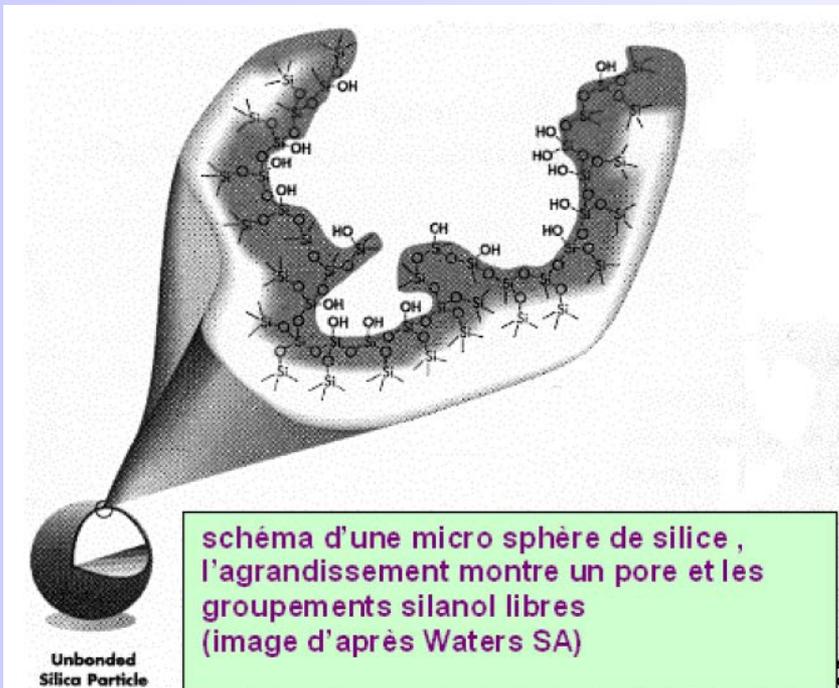
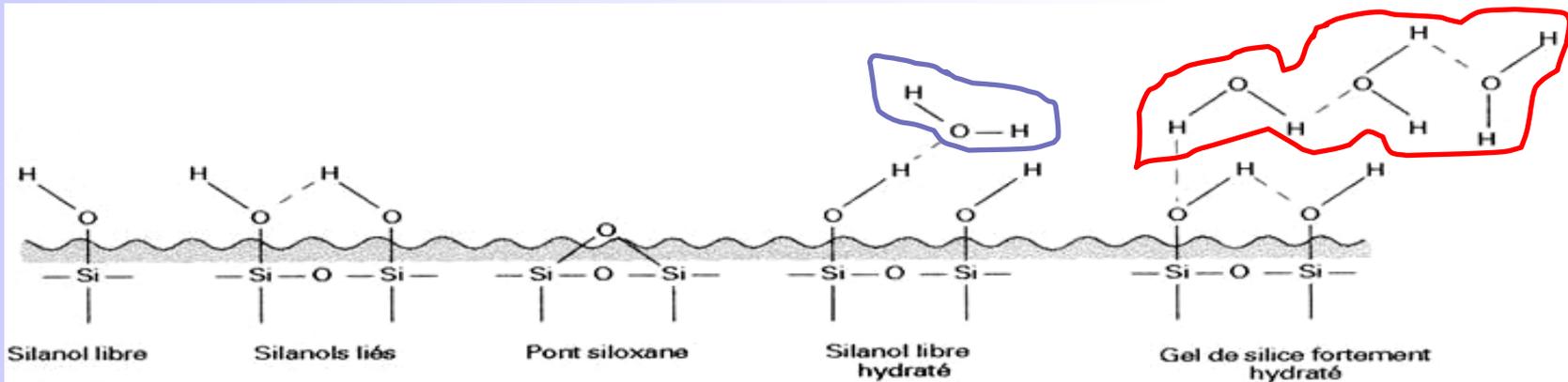
4. Les colonnes

5. Les détecteurs

6. Les paramètres chromatographiques

7. Comment optimiser une séparation ?

4. Les colonnes – Particulaires non greffées



Sites d'interaction	E adsorption
silanols libres	Forte
silanols liés (liaisons H)	Plus faible
silanols libres hydratés	



- 2. Les pompes
- 3. L'injecteur
- 4. Les colonnes

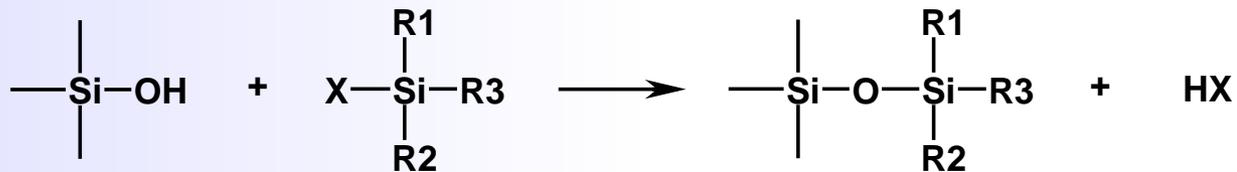
- 5. Les détecteurs
- 6. Les paramètres chromatographiques
- 7. Comment optimiser une séparation ?

4. Les colonnes – Particulaires greffées

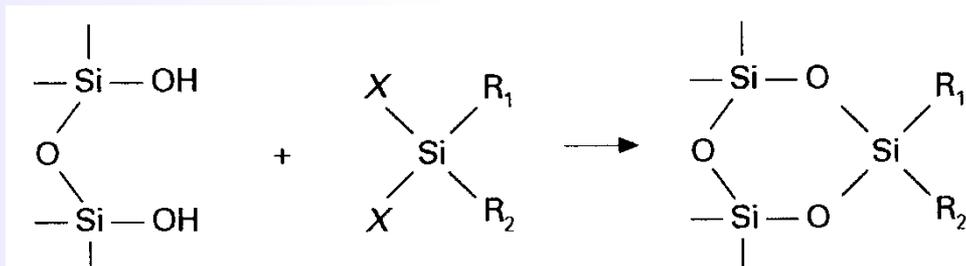
Réaction entre chloro- ou alkoxy silane et silice (en absence de traces d'eau)

Peut être effectuée avec silane mono-, di- ou trifonctionnel

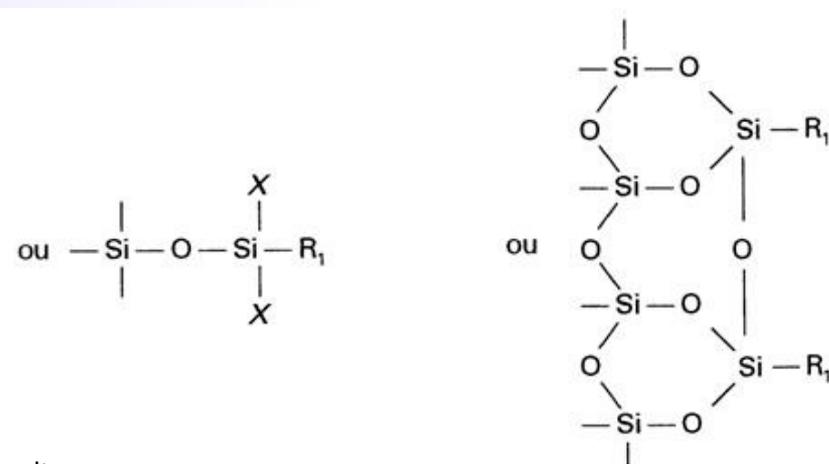
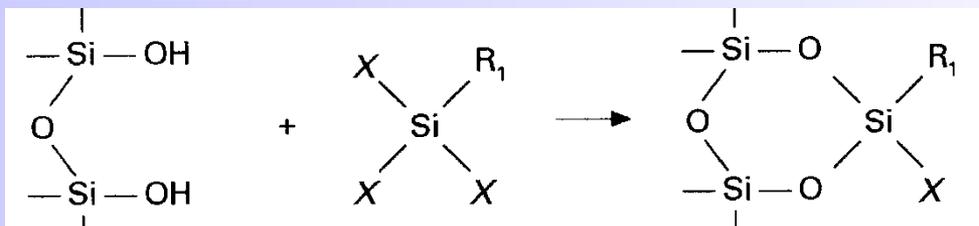
Silane monofonctionnel



Silane difonctionnel



Silane trifonctionnel





- 2. Les pompes
- 3. L'injecteur
- 4. Les colonnes

- 5. Les détecteurs
- 6. Les paramètres chromatographiques
- 7. Comment optimiser une séparation ?

4. Les colonnes – Particulaires greffées

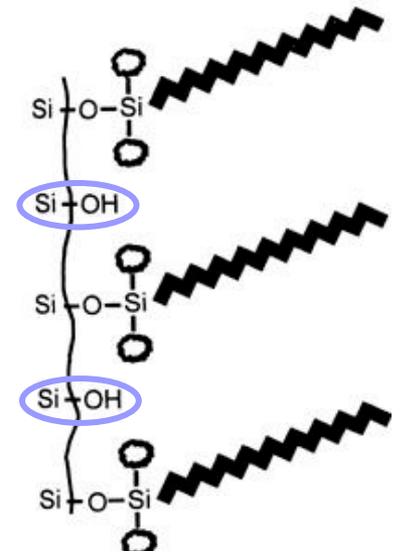
Silane monofonctionnel

Greffage "monomérique", dense, + reproductible

Pics + fins

+ fragile aux pH acides ou basiques

C-8 et C-18



Silane di- ou tri-fonctionnel

Greffage "polymérique", moins dense,

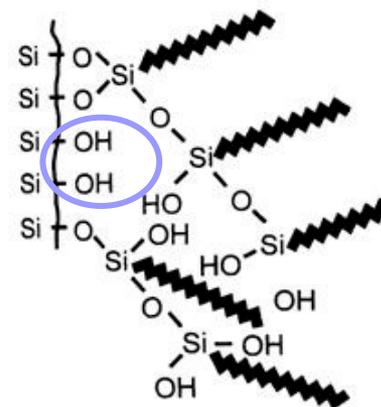
⇒ moins hydrophobe

Greffage - reproductible

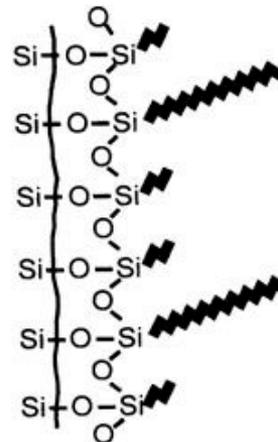
Pics - fins

+ stables aux pH acides ou basiques

A. VERTICAL POLYMERIZATION

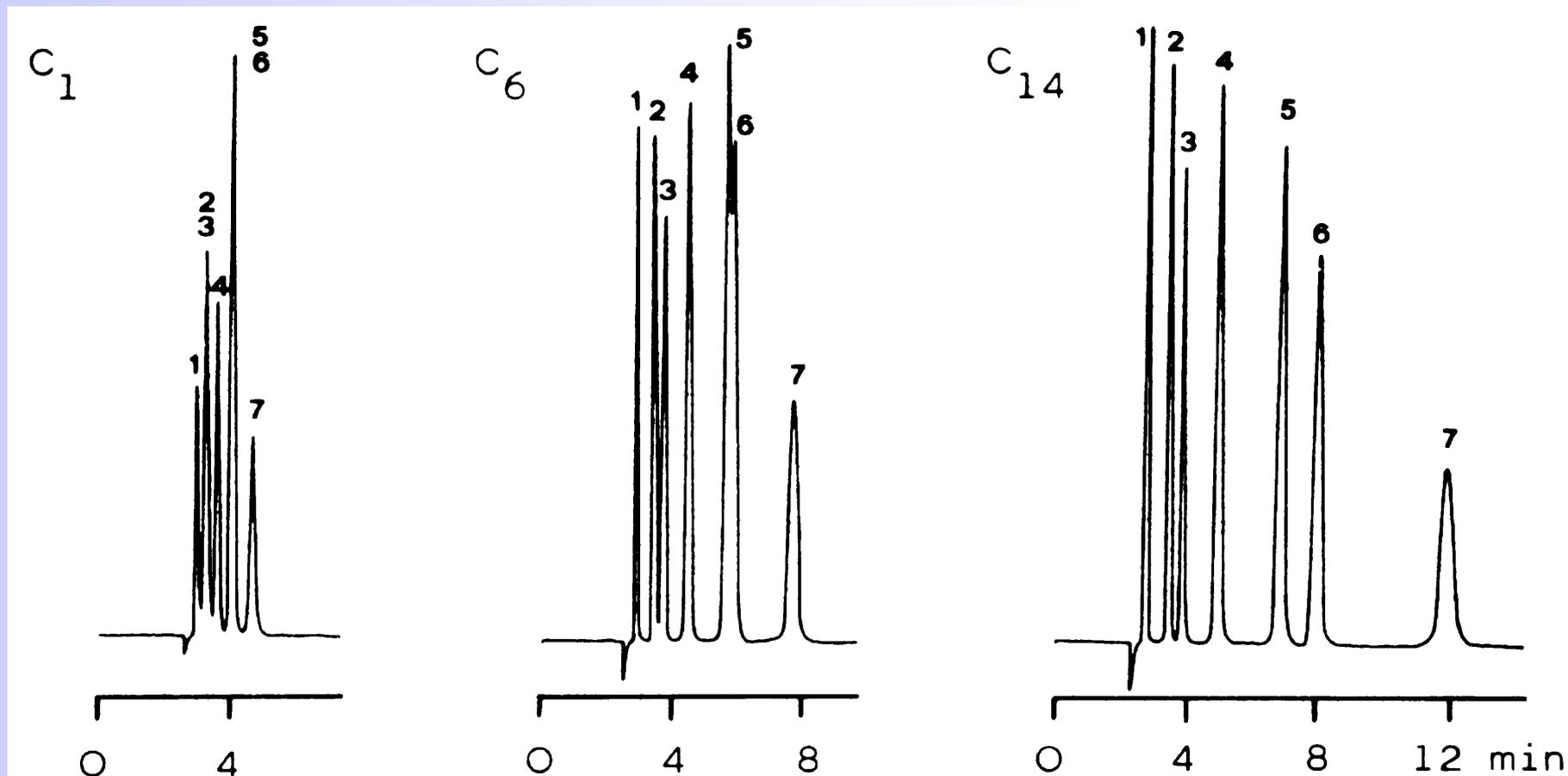


B. HORIZONTAL POLYMERIZATION



- 1. La phase mobile
- 2. Les pompes
- 3. L'injecteur
- 4. Les colonnes
- 5. Les détecteurs
- 6. Les paramètres chromatographiques
- 7. Comment optimiser une séparation ?

4. Les colonnes – Particulaires greffées – Influence du greffon



1= acétone; 2= p-méthoxyphénol; 3= phénol; 4= m-crésol; 5= 3,5 xylénol; 6= anisole; 7= p-phénylphénol;
 phase mobile méthanol/eau 60/40 v/v

Rétention ↗ quand longueur ↗

1. La phase mobile
2. Les pompes
3. L'injecteur
4. Les colonnes

5. Les détecteurs
6. Les paramètres chromatographiques
7. Comment optimiser une séparation ?

4. Les colonnes – Particulaires non greffées et greffées

	Phase normale (NPC)	Phase inverse (RPC)
	Polaires	Apolaires
Phases stationnaires	<ul style="list-style-type: none">• non greffées : silice, alumine ⇒ chromatographie d'adsorption• greffées : diol, NH₂, nitro, cyano ⇒ chromatographie de partage	<ul style="list-style-type: none">• non greffées : carbone graphite ⇒ chromatographie d'adsorption• greffées : C₁₈, C₈, C₆H₅, C₄, C₁... ⇒ chromatographie de partage



La phase mobile

2. Les pompes

3. L'injecteur

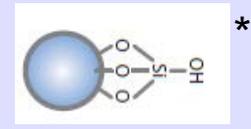
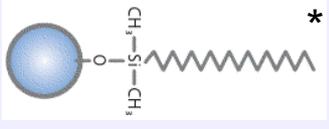
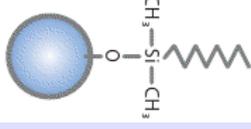
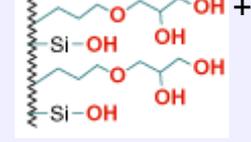
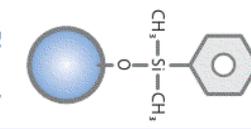
4. Les colonnes

5. Les détecteurs

6. Les paramètres chromatographiques

7. Comment optimiser une séparation ?

4. Les colonnes – Particulaires – Résumé

Type PS	Composés analysés	Exemples	Chromato	Mécanisme de rétention	Représentation de la PS
Silice	Composés polaires	Glycolipides	Normale	adsorption	 *
C18	Hydrophobes (C/HA élevé)	Acides gras, glycérides	inverse	partage	 *
C8	Moyennement à hautement polaire	Petites protéines, stéroïdes	inverse	partage	 *
diol	Plutôt polaires	Peptides, protéines Pesticides, herbicides, phospholipides	Inverse et normale	partage	 *
phenyl	Soluble dans l'eau groupement aromatique	HAP	Inverse et normale	partage	 *

- 1. La phase mobile
- 2. Les pompes
- 3. L'injecteur
- 4. Les colonnes

- 5. Les détecteurs
- 6. Les paramètres chromatographiques
- 7. Comment optimiser une séparation ?

4. Les colonnes – Mode HILIC

Nature PS	Nature PM	Type chromatographie
Polaire	Apolaire ou peu polaire	Phase normale
Apolaire	Polaire	Phase inverse

Composés très polaires, ioniques = peu retenus en phase inverse
et problème de solubilité dans PM phase normale



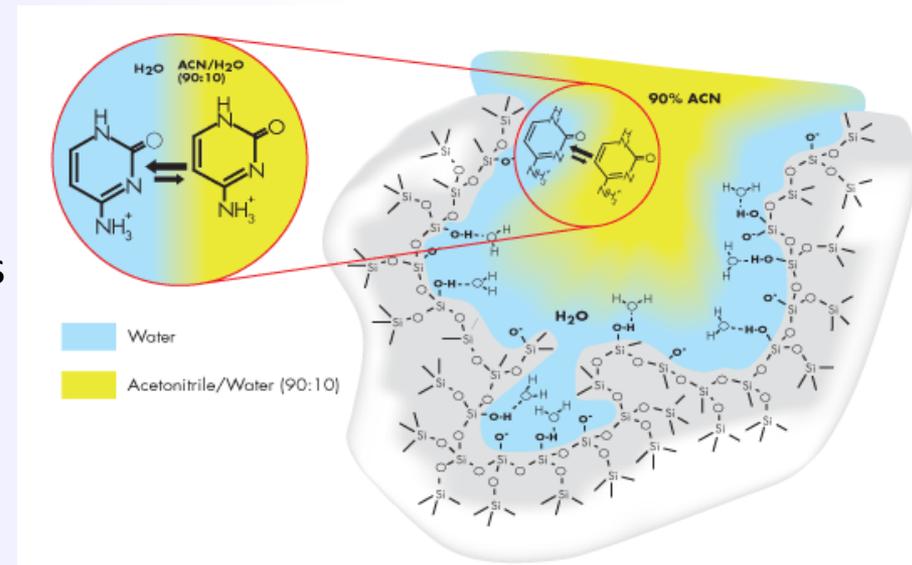
HILIC
*Hydrophilic Interaction
Chromatography*
« phase normale aqueuse »

PS polaire (silice, cyano, diol...) + couche H₂O
PM > 80 % solvant organique miscible dans
H₂O et le reste = H₂O

➡ Meilleure rétention des composés polaires
H₂O = solvant fort

➡ Chromato de partage

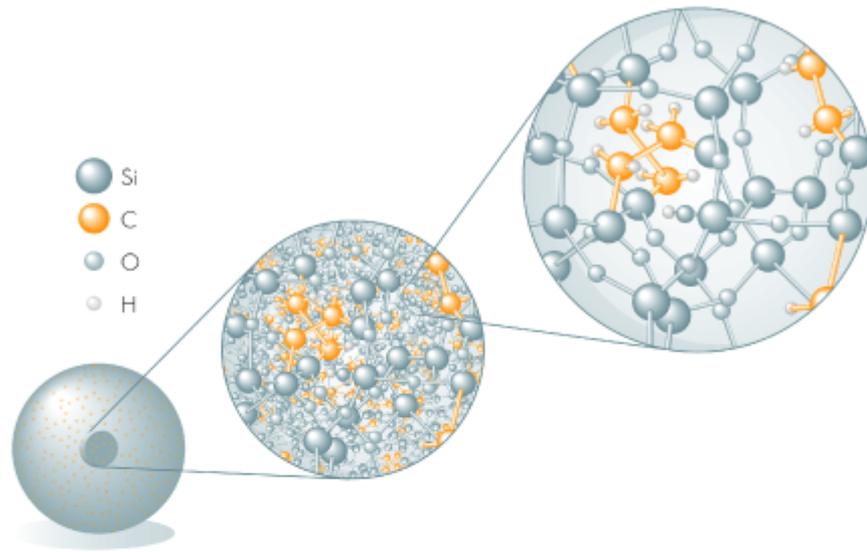
➡ Utilisée pour les sucres, peptides





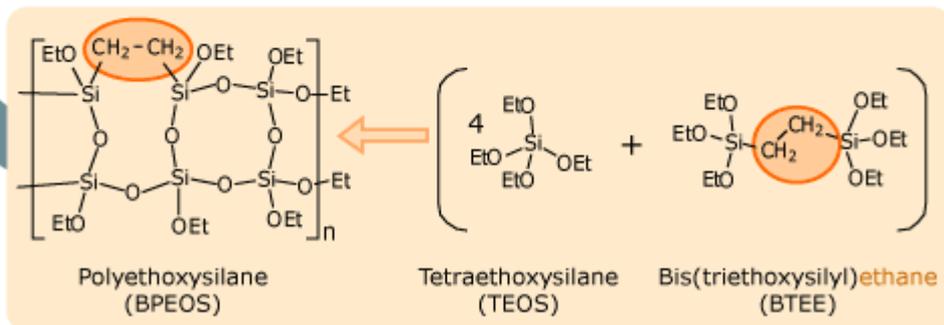
4. Les colonnes – Particulaires BEH

Ethylene Bridged Hybrid (BEH)



Technologie différente
 Si-O-Si remplacé par Si-CH₂-CH₂-Si
 Plus stable à pH basique
 Plus stable aux hautes pressions

Existe pour les modes
 HILIC : amide
 Phase inverse : C4, C8, C18, phenyl



Anal. Chem. 2003, 75, 6781-6788

1. La phase mobile
2. Les pompes
3. L'injecteur
4. Les colonnes

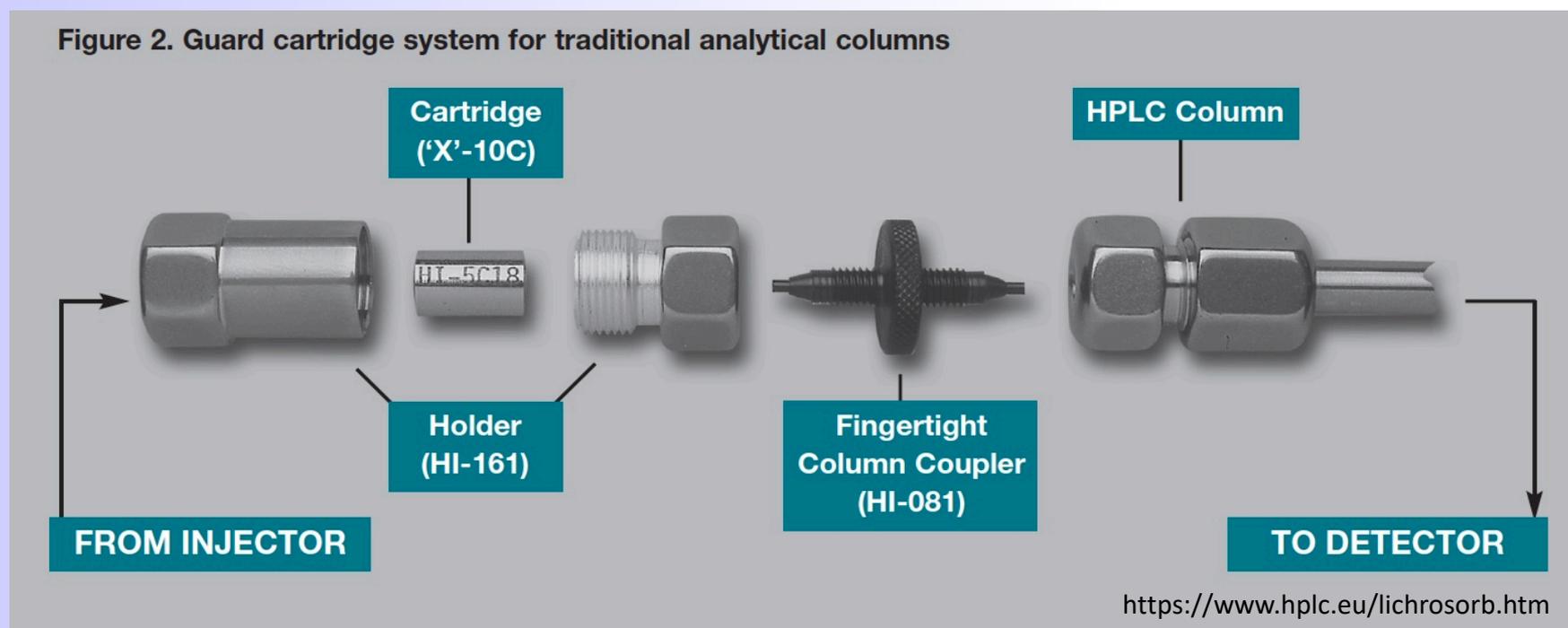
5. Les détecteurs
6. Les paramètres chromatographiques
7. Comment optimiser une séparation ?

4. Les colonnes – Type de chromatographie

	Phase normale (NPC)	Phase inverse (RPC)
	Polaires	Apolaires
Phases stationnaires	<ul style="list-style-type: none"> • non greffées : silice, alumine ⇒ chromatographie d'adsorption • greffées : diol, NH₂, nitro, cyano ⇒ chromatographie de partage 	<ul style="list-style-type: none"> • non greffées : carbone graphite ⇒ chromatographie d'adsorption • greffées : C₁₈, C₈, C₆H₅, C₄, C₁... ⇒ chromatographie de partage
Solvant faible	hexane	eau
Solvants forts	CH ₂ Cl ₂ ; CH ₃ -CO-OC ₂ H ₅ ; THF	CH ₃ OH ; CH ₃ CN ; THF
Ordre élution (k)	alcanes < alcènes < aromatiques, R-Hal < R-O-R < R-NO ₂ < R-CO-R, R-CO-OR < R-OH, R-NH ₂ < (< R-COOH, H₂O)	alcanes > alcènes > ... > ... > R-OH > R-COOH

4. Les colonnes – Bonnes pratiques

Utiliser des pré-colonnes avec même chimie que la colonne pour préserver la colonne



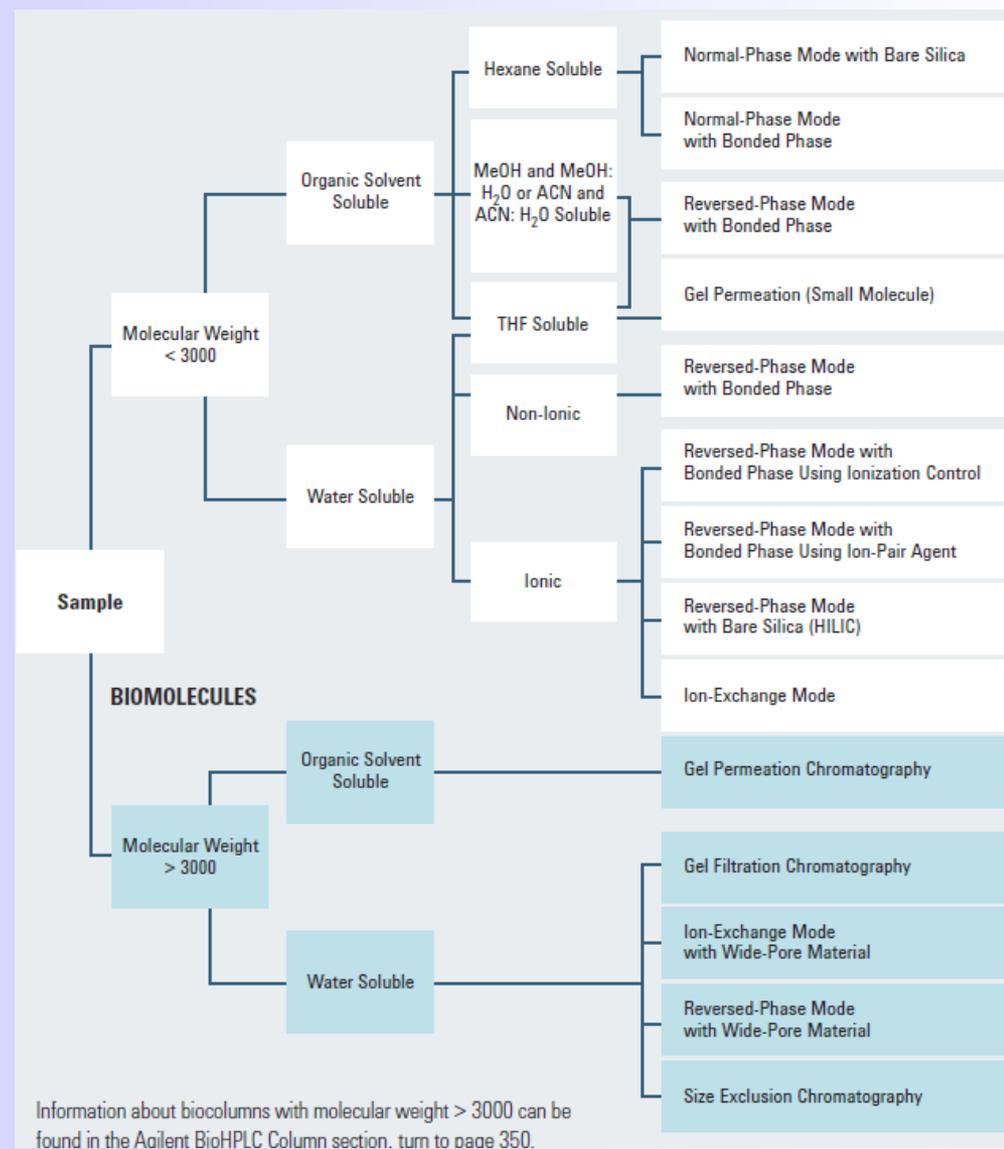
Inconvénients

- Source de fuites potentielles
- Augmentation du temps de rétention

1. La phase mobile
2. Les pompes
3. L'injecteur
4. Les colonnes

5. Les détecteurs
6. Les paramètres chromatographiques
7. Comment optimiser une séparation ?

4. Les colonnes – Bonnes pratiques – Comment choisir une colonne ?

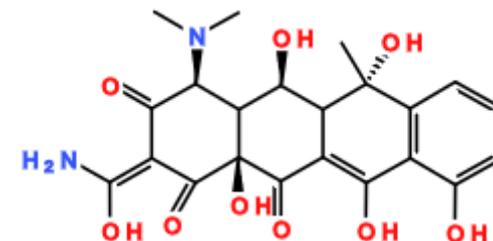


Soluble =
solubilité > 10⁻⁴ M

1. La phase mobile
2. Les pompes
3. L'injecteur
4. Les colonnes
5. Les détecteurs
6. Les paramètres chromatographiques
7. Comment optimiser une séparation ?

4. Les colonnes – Bonnes pratiques – Application : Dosage de l'oxytétracycline

Antibiotique de la famille des tétracyclines
Utilisé contre les infections bactériennes oculaires



Propriétés physico-chimiques (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)

<i>Property Name</i>	<i>Property Value</i>
<i>Molecular Weight</i>	460.4 g/mol
<i>XLogP3</i>	-1.6
<i>Hydrogen Bond Donor Count</i>	7
<i>Hydrogen Bond Acceptor Count</i>	10
<i>Rotatable Bond Count</i>	2
<i>Exact Mass</i>	460.14818 g/mol
<i>Monoisotopic Mass</i>	460.14818 g/mol
<i>Formal Charge</i>	0
<i>Complexity</i>	1000
<i>Isotope Atom Count</i>	0
<i>Defined Atom Stereocenter Count</i>	6
<i>Undefined Atom Stereocenter Count</i>	0
<i>Defined Bond Stereocenter Count</i>	0
<i>Undefined Bond Stereocenter Count</i>	0
<i>Water solubility</i>	$6.80 \times 10^{-4} M$
<i>Covalently-Bonded Unit Count</i>	1

Comment est le poids moléculaire ?

A. $< 3000 \text{ g/mol}$

B. $> 3000 \text{ g/mol}$



Comment est le poids moléculaire ?

A. $< 3000 \text{ g/mol}$

B. $> 3000 \text{ g/mol}$



L'oxytétracycline est-elle soluble dans l'eau ou dans un solvant organique ?

A. Soluble dans l'eau

B. Soluble dans un solvant organique

L'oxytétracycline est-elle soluble dans l'eau ou dans un solvant organique ?

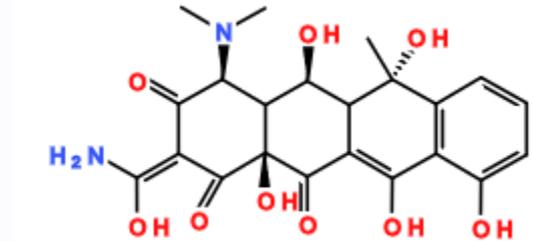
A. Soluble dans l'eau

B. Soluble dans un solvant organique

Quelle est la nature de la molécule ?

A. ionique

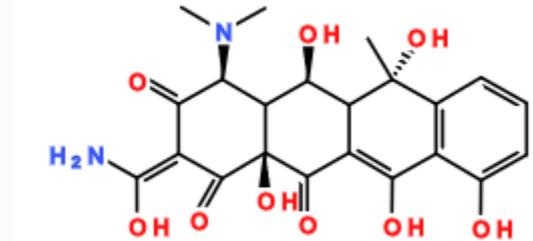
B. Non ionique



Quelle est la nature de la molécule ?

A. ionique

B. Non ionique



Quel type de chromatographie sera utilisé ?

- A. Phase normale
- B. Phase normale greffée
- C. Phase inverse
- D. HILIC

Quel type de chromatographie sera utilisé ?

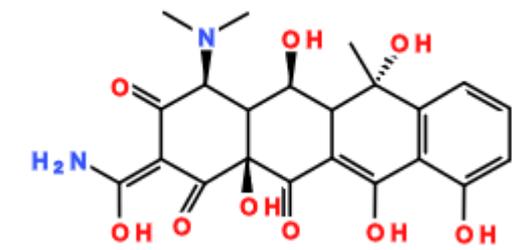
- A. Phase normale
- B. Phase normale greffée
- C. Phase inverse
- D. HILIC

1. La phase mobile
2. Les pompes
3. L'injecteur
4. Les colonnes

5. Les détecteurs
6. Les paramètres chromatographiques
7. Comment optimiser une séparation ?

4. Les colonnes – Bonnes pratiques – Application : Dosage de l'oxytétracycline

Antibiotique de la famille des tétracyclines
Utilisé contre les infections bactériennes oculaires



Non-ionique	Phase inverse	C8, Phenyl-Hexyl, Biphenyl, F5, Polar C18	170
		Synergi Polar-RP, Hydro-RP	253
		Luna C8(2), C18(2), Luna PFP(2)	199
		Luna Omega C18, Omega PS C18, Omega Polar C18	211
		Gemini C18, NX-C18	159
		Onyx C18	233

Comment choisir parmi ces colonnes ?

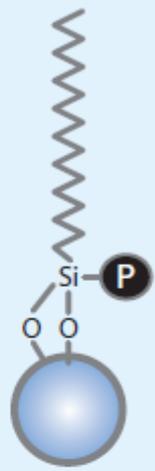
- Faire en fonction de celles disponibles dans le labo
- Discuter avec les commerciaux
- Regarder par rapports aux interactions si celles-ci sont connues

1. La phase mobile
2. Les pompes
3. L'injecteur
4. Les colonnes
5. Les détecteurs
6. Les paramètres chromatographiques
7. Comment optimiser une séparation ?

4. Les colonnes – Bonnes pratiques – Choix de la colonne – interactions « électroniques »

Caractéristiques physiques :

Taille des particules :	1.9 µm, 3 µm ou 5 µm, sphériques
Taille des pores :	140 Å
Taux de carbone :	6%
Gamme de pH :	2.5 à 8
Température limite :	80 °C
Code USP :	L1
Type :	C18 modifiée
Ligand :	Exclusivité Restek



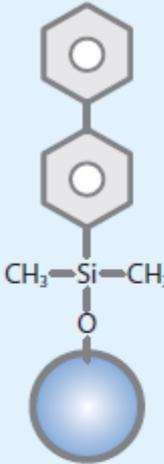
Aqueous C18

Profil d'interaction USLC®
(Voir page 120)



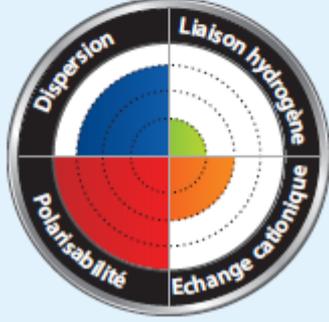
Caractéristiques physiques :

Taille des particules :	1.9 µm, 3 µm ou 5 µm, sphériques
Taille des pores :	140 Å
Taux de carbone :	8%
« Endcappée »	
Gamme de pH :	2.5 à 8
Température limite :	80 °C
Code USP :	L11
Type :	phényle
Ligand :	« Biphenyl » exclusif



Biphenyl

Profil d'interaction USLC®
(Voir page 120)



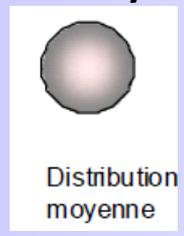
1. La phase mobile
2. Les pompes
3. L'injecteur
4. Les colonnes

5. Les détecteurs
6. Les paramètres chromatographiques
7. Comment optimiser une séparation ?

4. Les colonnes – Bonnes pratiques – Choix de la colonne – interactions – Forces de dispersion

dipôle induit – dipôle induit (London)
énergie faible, peu sélectives

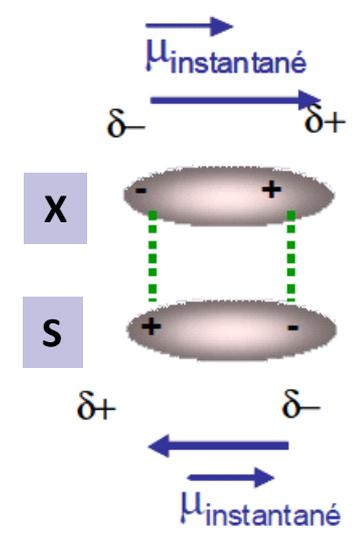
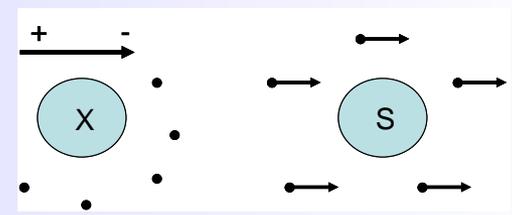
Molécule symétrique : moment dipolaire statistiquement nul



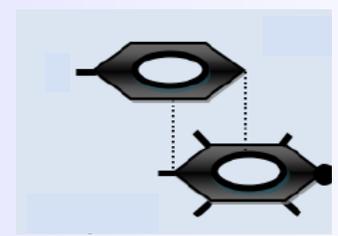
X

Mouvement des électrons autour de X

- ⇒ **moment dipolaire induit** qui polarise S
- ⇒ **interaction** entre X et S



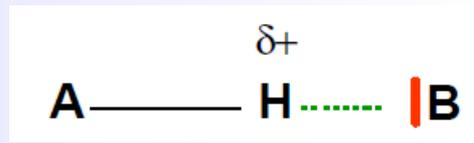
Exemple : Interactions $\pi \pi$



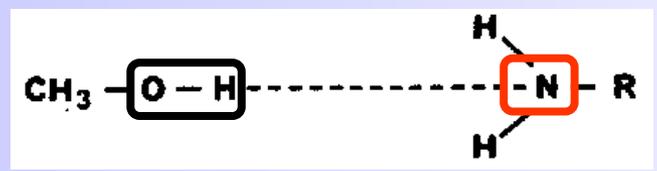
Composés aromatiques et insaturés



4. Les colonnes – Bonnes pratiques – Choix de la colonne – interactions – Liaisons hydrogène



- **Atomes A et B** = atomes électronégatifs (N, O, F)
- **B** : possède au moins une **paire d' e⁻ libre** (N, O, F...).



Interactions entre : 1 **accepteur de protons** (base)
et 1 **donneur de protons** (acide)

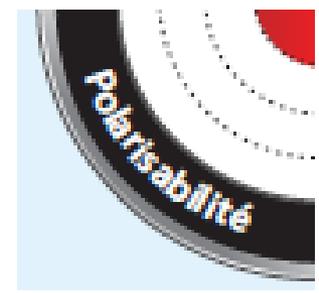
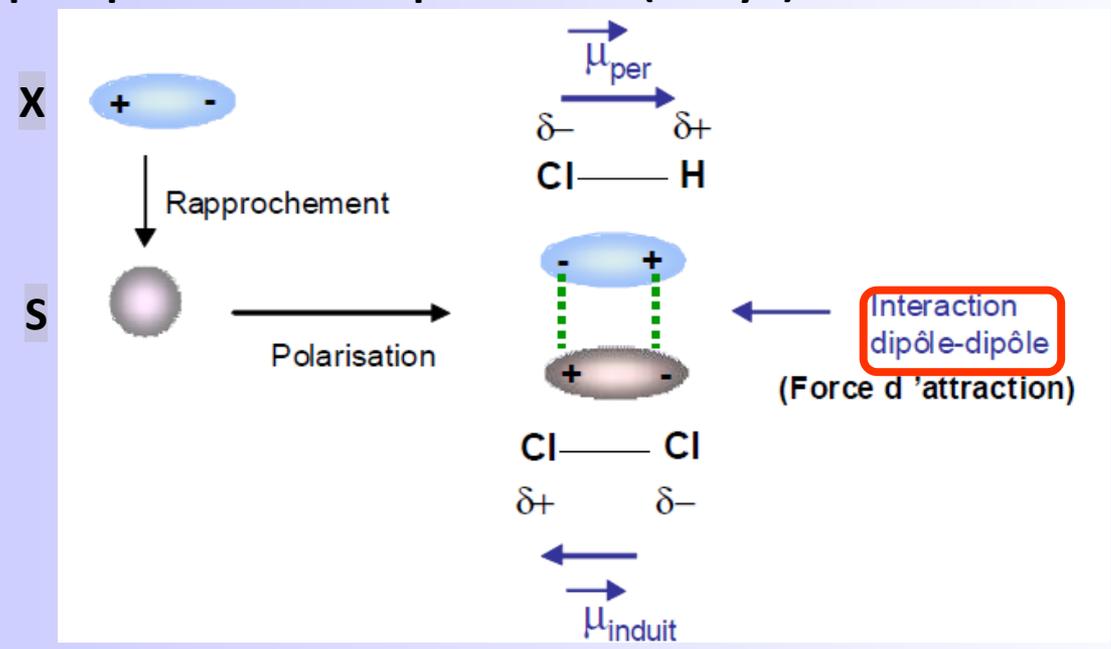
- **Donneurs forts** : alcools, acides, phénols, CHCl₃
- **Accepteurs forts** : amines I et II, sulfoxydes

1. La phase mobile
2. Les pompes
3. L'injecteur
4. Les colonnes

5. Les détecteurs
6. Les paramètres chromatographiques
7. Comment optimiser une séparation ?

4. Les colonnes – Bonnes pratiques – Choix de la colonne – interactions – Polarisabilité

dipôle permanent – dipôle induit (Debye)

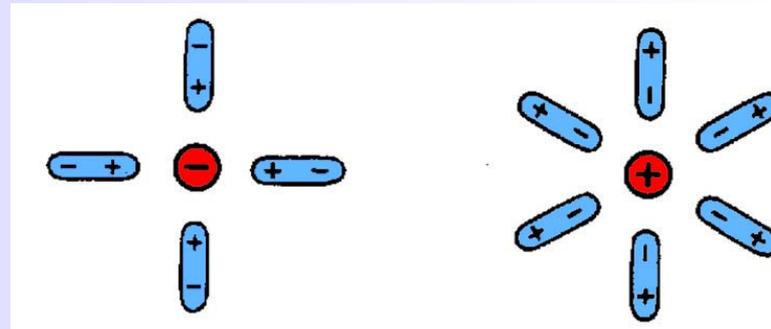


- X a **moment dipolaire permanent** :
- ⇒ polarisation de S
- ⇒ alignement des 2 dipôles

1. La phase mobile
2. Les pompes
3. L'injecteur
4. Les colonnes

5. Les détecteurs
6. Les paramètres chromatographiques
7. Comment optimiser une séparation ?

4. Les colonnes – Bonnes pratiques – Choix de la colonne – interactions – échange cationique



Interactions entre des ions solvatés



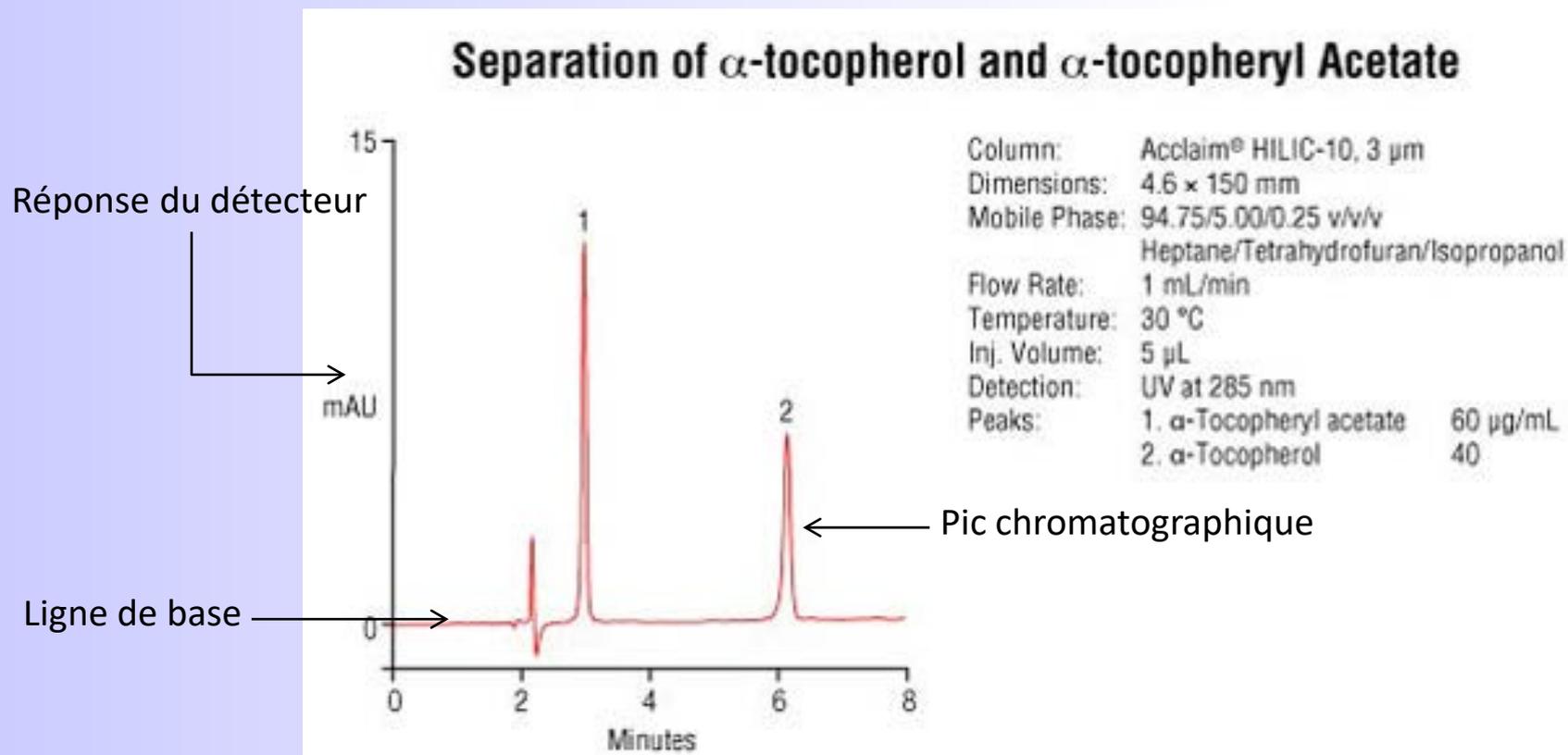
4. Les colonnes – Bonnes pratiques – Choix de la colonne – interactions – Résumé

Interactions	Énergie (kJ/mol)	Type de molécules
Forces de dispersion	0,5 à 10	Toutes les molécules
Liaison H	8 à 40	Molécules possédant des H labiles
Interactions dipolaires	0,5 à 10	Molécules possédant : alcool, éther, amide, amine, nitrile
Interactions diélectriques	40 à 85	Ions



5. Les détecteurs

Objectif : visualiser les composés analysés sous forme d'un pic chromatographique





5. Les détecteurs

Objectif : visualiser les composés analysés sous forme d'un pic chromatographique

Propriétés
générales des
solvants et solutés

Propriétés spécifiques
des solutés

Indice de réfraction = réfractomètre
Diffusion de la lumière = DEDL
Ionisation = détecteur d'aérosols chargés
Ionisation = spectromètre de masse

Fluorescence = fluorimètre
Absorption dans l'UV = barrette de diode
(le plus courant)



5. Les détecteurs

Détecteurs	Composés analysés	Avantages	Inconvénients
Réfractomètre	Tous	universel	Limite de détection haute Sensible à la température et au gradient d'élution
Fluorimètre	Fluorescent (HAP..)	Limite de détection basse	Non universel
UV (barrettes de diodes)	Chromophores	Très sensibles Information sur spectre UV	Non universel
Diffusion de la lumière (DEDL ou ELSD)	Tous	universel	Sensible au gradient d'élution
Détecteur d'aérosols chargés	Tous	universel	Sensible au gradient d'élution
Spectrométrie de masse	Tous (suivant mode d'ionisation)	Information structurale	Coût élevé

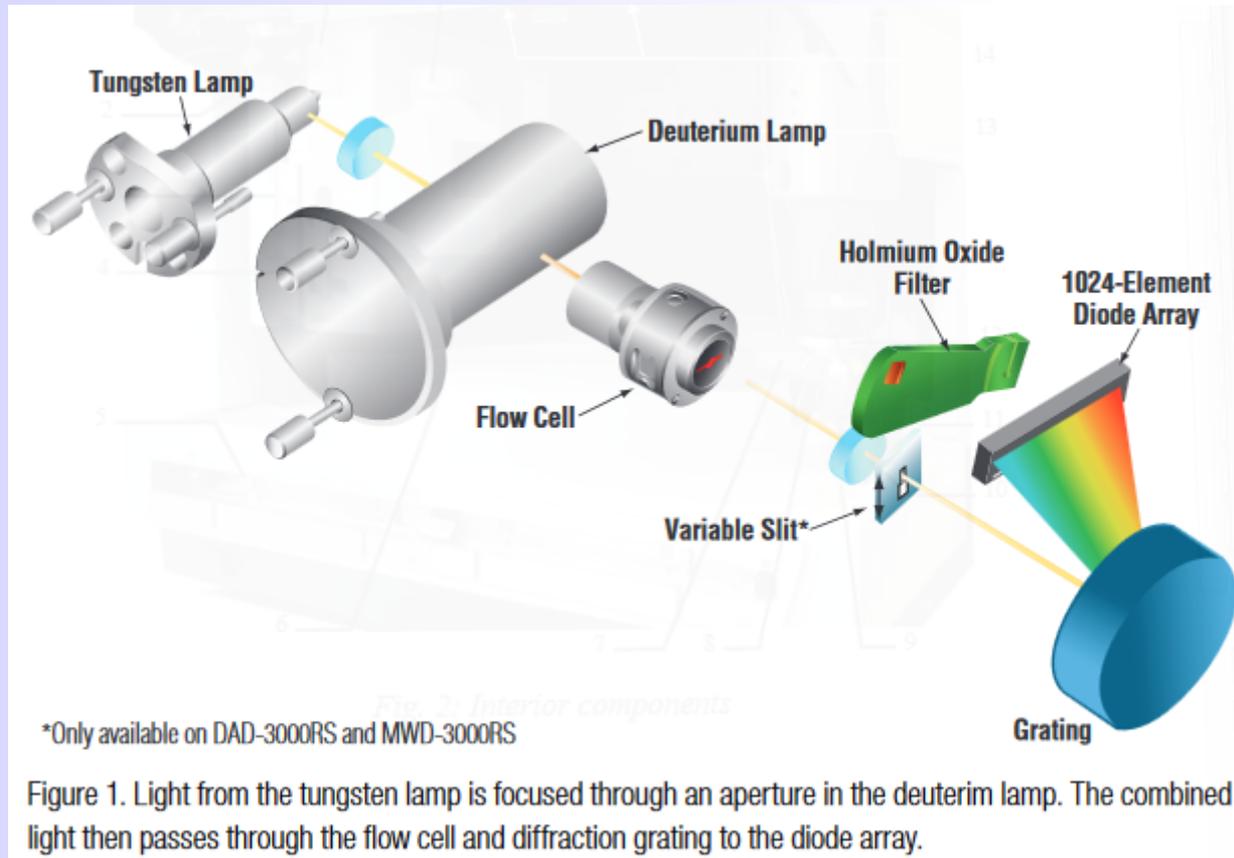
destructifs



- 2. Les pompes
- 3. L'injecteur
- 4. Les colonnes

- 5. Les détecteurs
- 6. Les paramètres chromatographiques
- 7. Comment optimiser une séparation ?

5. Les détecteurs – UV/visible





- 2. Les pompes
- 3. L'injecteur
- 4. Les colonnes

- 6. Les paramètres chromatographiques
- 7. Comment optimiser une séparation ?

5. Les détecteurs – UV/visible

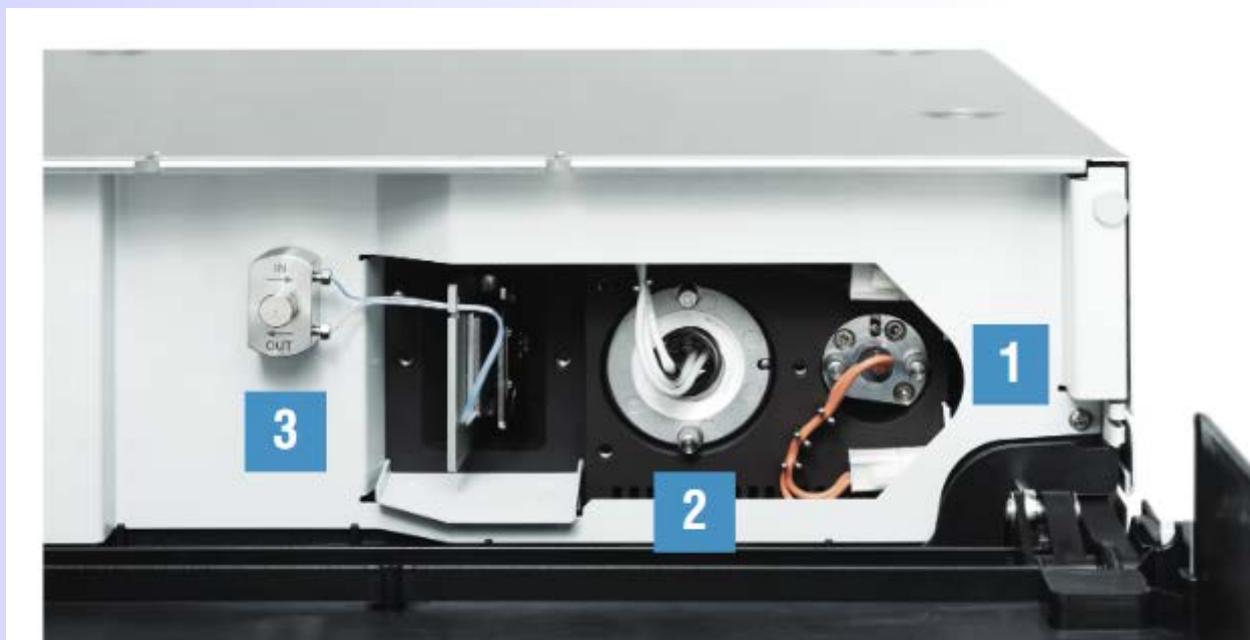


Figure 7. Ergonomic internal front design (after removal of flow cell/lamps covers): direct access to 1) the D2 and tungsten lamps, 2) the flow cell, and 3) the flow cell adapter block for easy operation and maintenance.



- 2. Les pompes
- 3. L'injecteur
- 4. Les colonnes

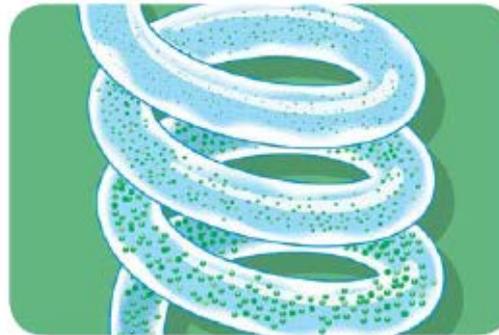
- 6. Les paramètres chromatographiques
- 7. Comment optimiser une séparation ?

5. Les détecteurs – DEDL

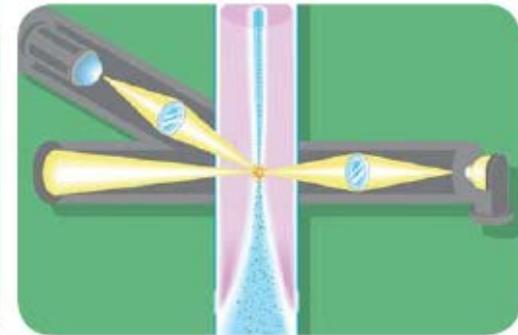
3 étapes :



nébulisation (air ou azote)



évaporation du solvant



Sedere®

détection par diffusion
de la lumière

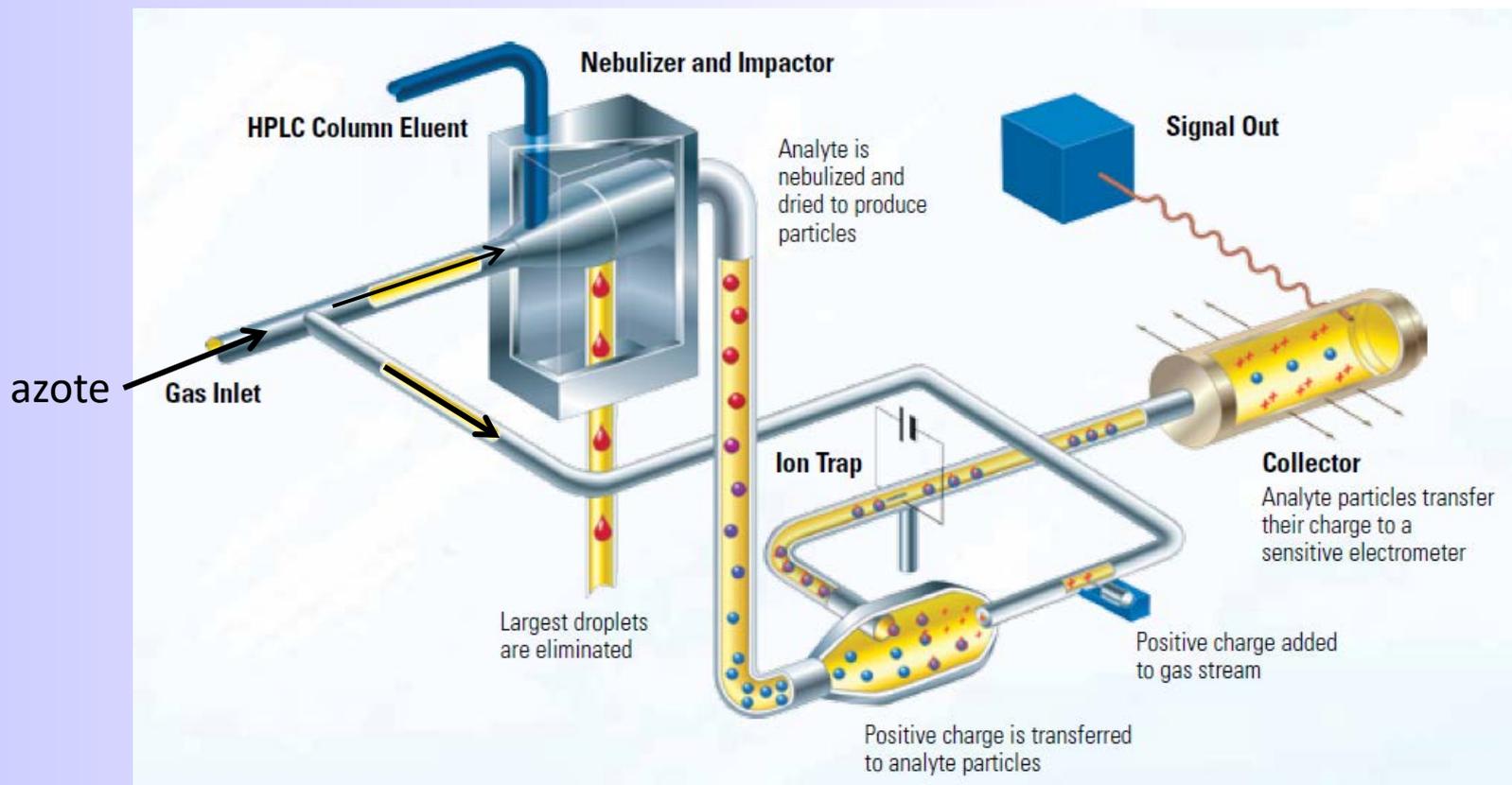


- 2. Les pompes
- 3. L'injecteur
- 4. Les colonnes

- 5. Les détecteurs
- 6. Les paramètres chromatographiques
- 7. Comment optimiser une séparation ?

5. Les détecteurs – Détecteur d'aérosols chargés (DAC)/Charged aerosol detector (CAD)

Nom commerciaux : Corona™, Vanquish™



Thermo Fisher™

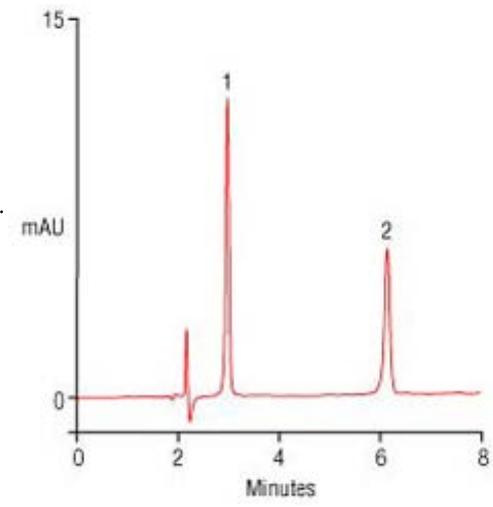
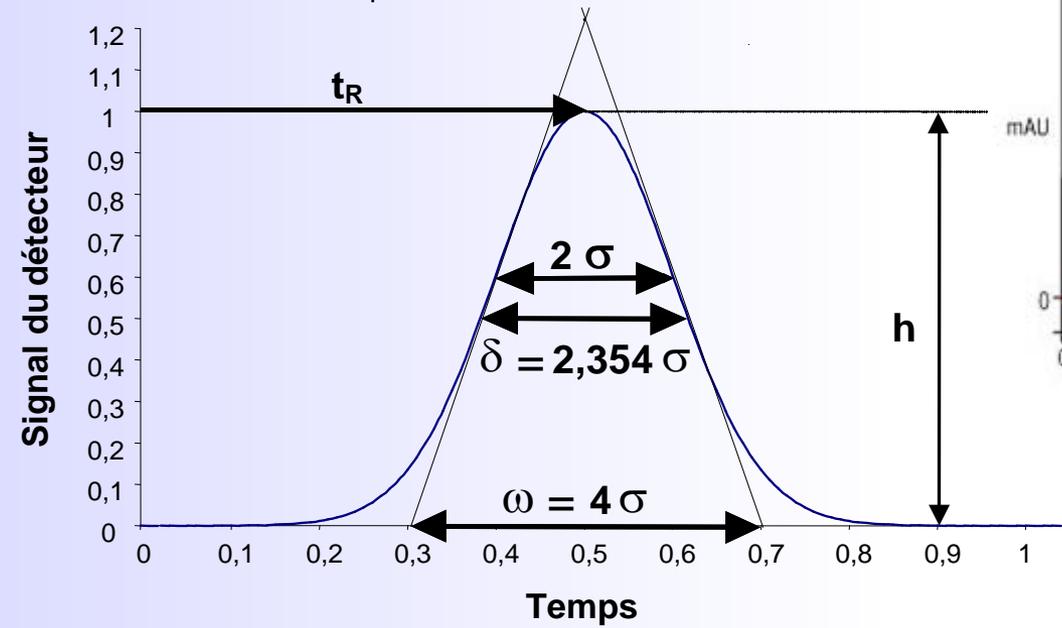
1. La phase mobile
2. Les pompes
3. L'injecteur
4. Les colonnes

5. Les détecteurs
6. Les paramètres chromatographiques
7. Comment optimiser une séparation ?

6. Les paramètres chromatographiques – Pic idéal

Pic idéal : Courbe de Gauss centré sur t_r

t_R = temps de rétention
 = temps entre injection et maximum du pic

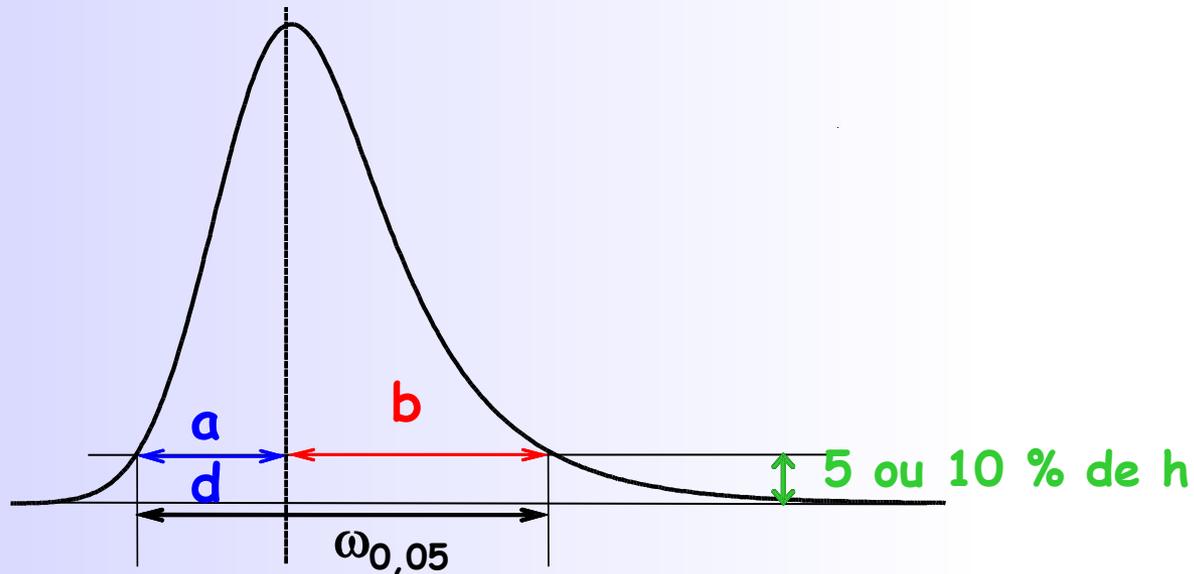


$\delta = \omega_{0,5} =$ largeur à mi-hauteur ($\delta = 2,354 \sigma$)
 $\sigma =$ écart-type
 $\omega =$ largeur à la base du pic ($\omega = 4 \sigma$)
 $h =$ hauteur du pic = f(concentration)
 $A = 1,062 \times h \times \delta =$ surface du pic = f(quantité)

1. La phase mobile
2. Les pompes
3. L'injecteur
4. Les colonnes

5. Les détecteurs
6. Les paramètres chromatographiques
7. Comment optimiser une séparation ?

6. Les paramètres chromatographiques – Pic réel



A_s = facteur d'asymétrie

$$A_s = \frac{b}{a}$$

à 10 % de hauteur

- 1. La phase mobile
- 2. Les pompes
- 3. L'injecteur
- 4. Les colonnes

- 5. Les détecteurs
- 6. Les paramètres chromatographiques
- 7. Comment optimiser une séparation ?

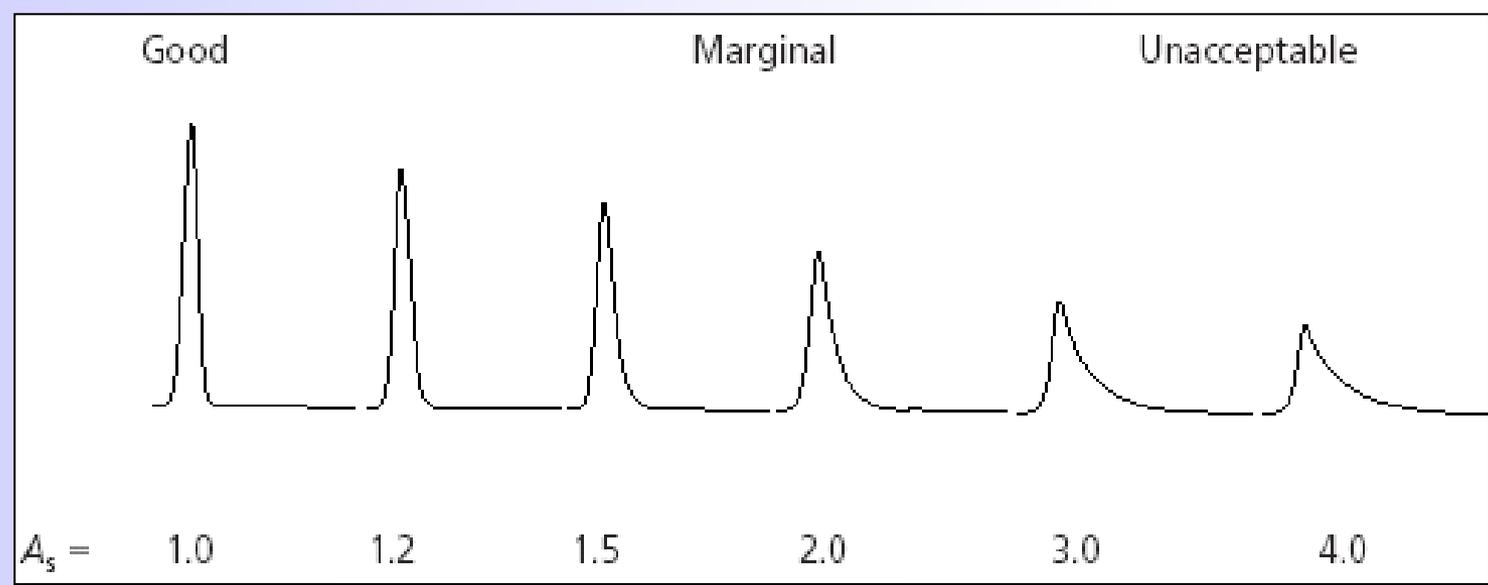
6. Les paramètres chromatographiques – Pic réel

Causes d'asymétrie

présence de **volume morts** :
interaction avec les **silanols** :
cations métalliques de la silice :
coélution de deux pics :
saturation de la colonne :

chambre de mélange / tubulures
produits **basiques**
produits **acides**
 t_R voisins
limite: 1 mg injecté ?

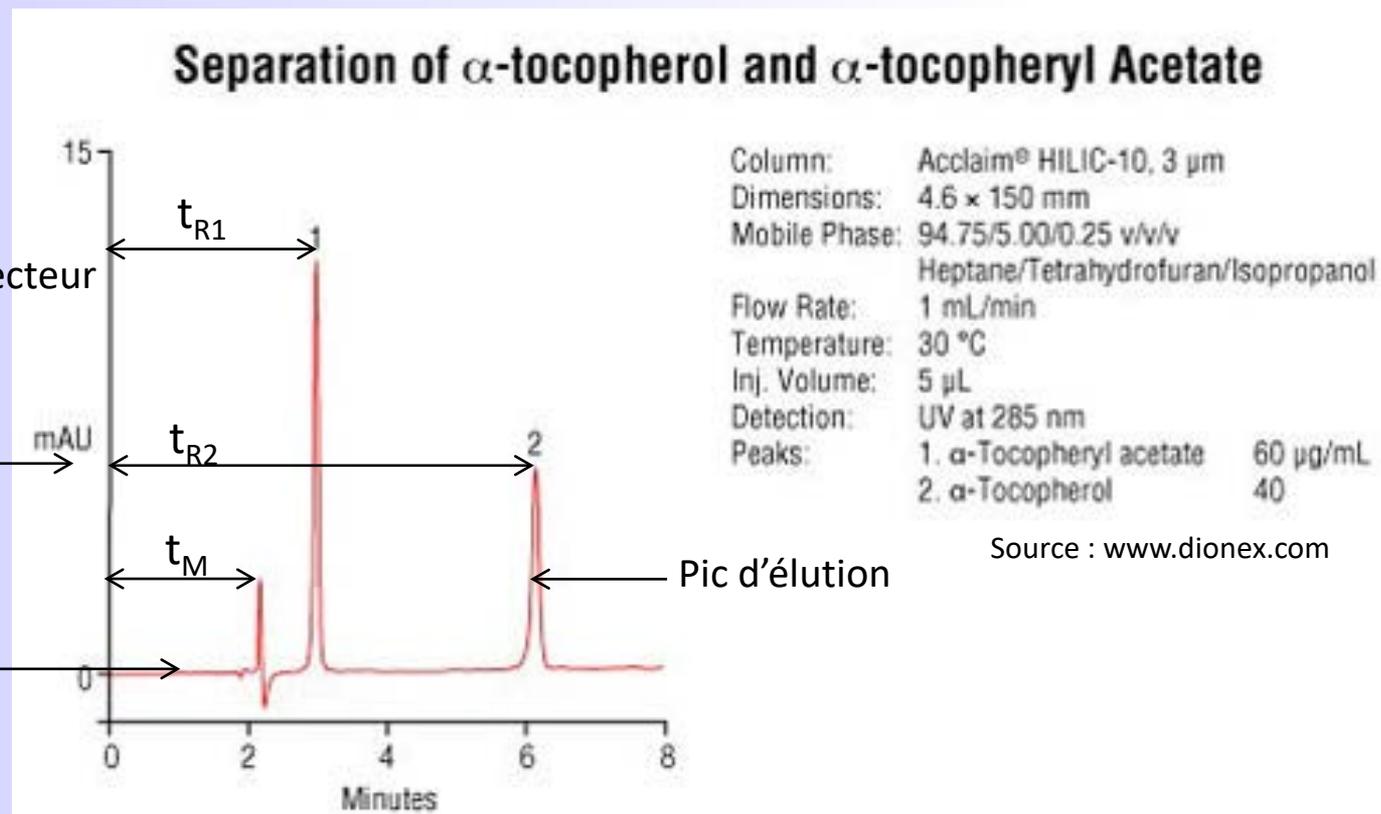
Exemples d'asymétrie



1. La phase mobile
2. Les pompes
3. L'injecteur
4. Les colonnes

5. Les détecteurs
6. Les paramètres chromatographiques
7. Comment optimiser une séparation ?

6. Les paramètres chromatographiques – Données de rétention



t_{R1} : temps de rétention du composé 1 = temps entre injection et maximum du pic

t_M : temps mort = temps de rétention d'un composé non retenu

V_M : volume mort = volume d'élution d'un composé non retenu

V_{R1} : Volume de rétention du composé 1 = volume d'élution du composé 1

D: débit de la phase mobile

$$V_M = t_M \times D$$

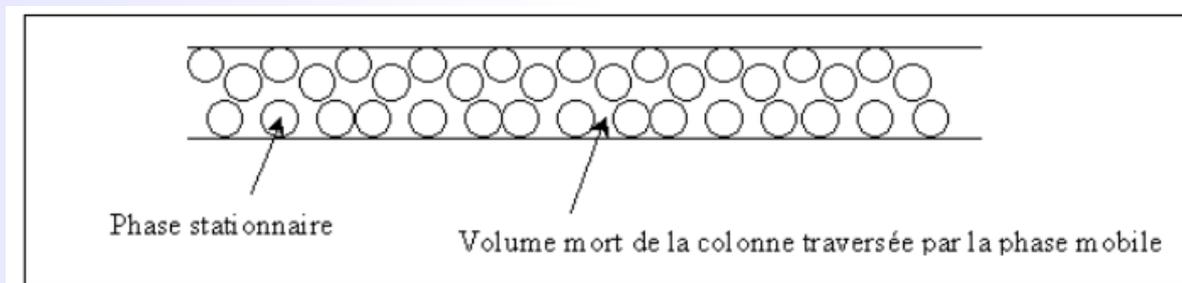
$$V_R = t_R \times D$$



6. Les paramètres chromatographiques – Données de rétention

Volume mort = volume de phase mobile extra-colonne + volume de phase mobile dans la colonne

volumes des **raccords** et **tubulures**
volume de **injecteur**
volume **cellule** du **détecteur**



Détermination du volume mort :

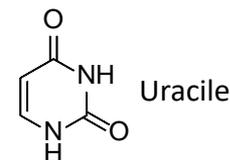
- Théoriquement par la géométrie de la colonne $V_m = \pi \times (d_c/2)^2 \times L \times p$

d_c : diamètre de la colonne

p : porosité de la colonne (colonne totalement poreuse : $p \approx 0,68$, colonne fused core : $p \approx 0,55$)

- Expérimentalement par injection d'un produit non retenu par la colonne

Exemple : Uracile, produit polaire non retenu par une colonne C18 phase inverse





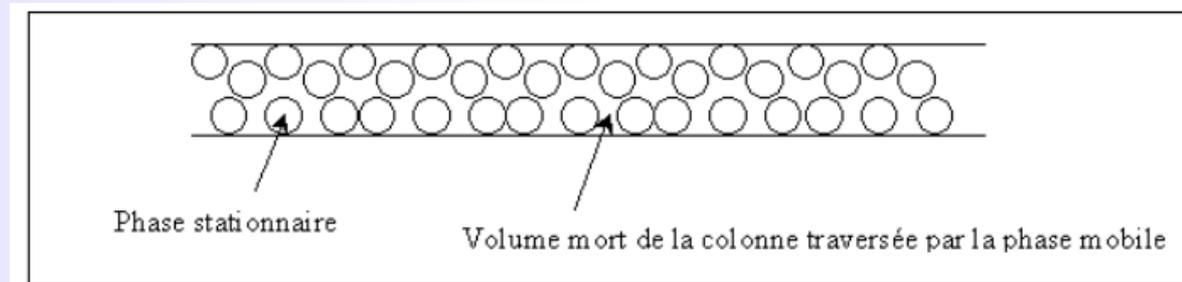
- 2. Les pompes
- 3. L'injecteur
- 4. Les colonnes

- 6. Les paramètres chromatographiques
- 7. Comment optimiser une séparation ?

6. Les paramètres chromatographiques – Données de rétention

Volume mort = volume de phase mobile extra-colonne + volume de phase mobile dans la colonne

volumes des **raccords** et **tubulures**
 volume de **injecteur**
 volume **cellule** du **détecteur**



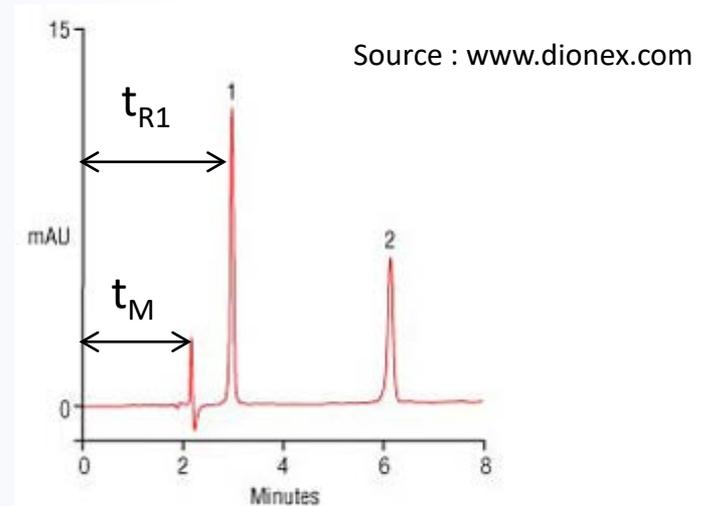
Facteur de rétention k

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

$$k \geq 0$$

k traduit capacité de rétention du soluté sur la colonne

$2 < k < 10$ de manière optimale





- 2. Les pompes
- 3. L'injecteur
- 4. Les colonnes

6. Les paramètres chromatographiques – Performance d'une colonne

Nombre de plateaux théorique N

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{\omega} \right)^2 = 5,54 \left(\frac{t_R}{\delta} \right)^2$$

Omega ou delta en min

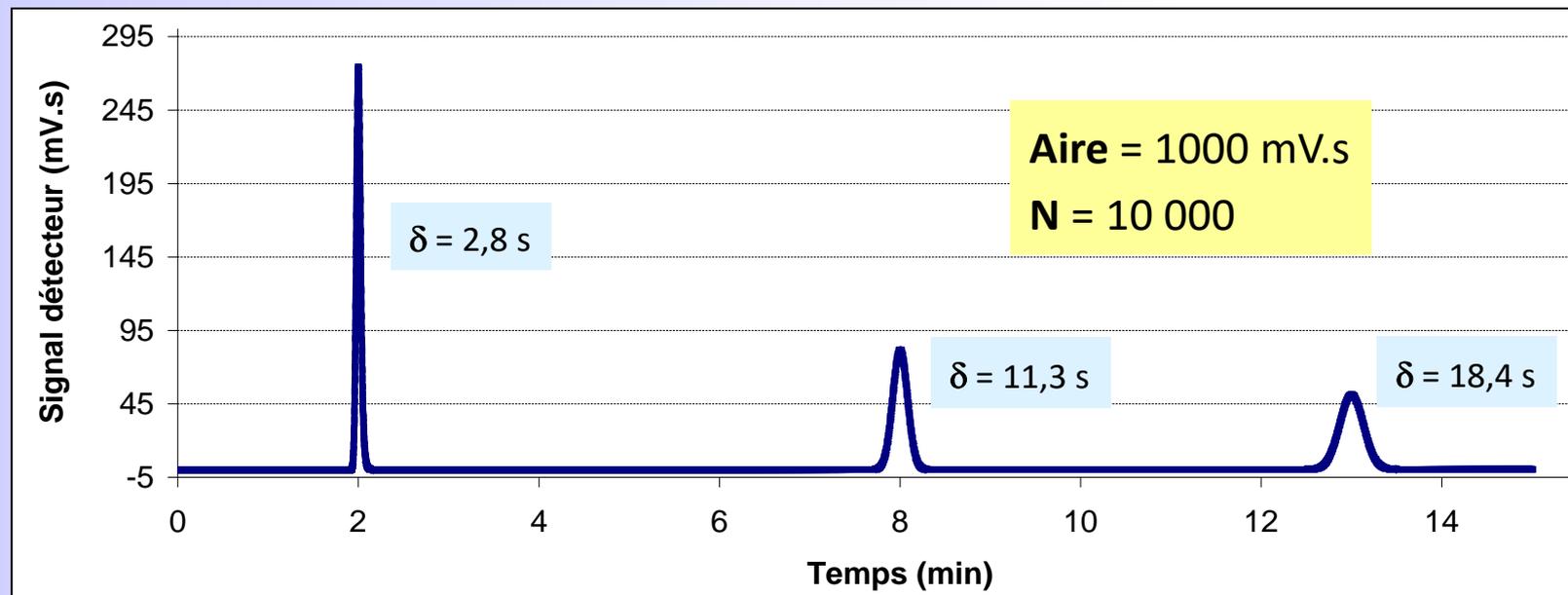
N ↗ quand L ↗ ou d_p ↘

N traduit efficacité d'une colonne

Plus N augmente plus efficacité augmente

N constante pour une colonne dans conditions données

donc ω augmente lorsque t_r augmente





6. Les paramètres chromatographiques – Performance d'une colonne

Hauteur d'un plateau théorique H

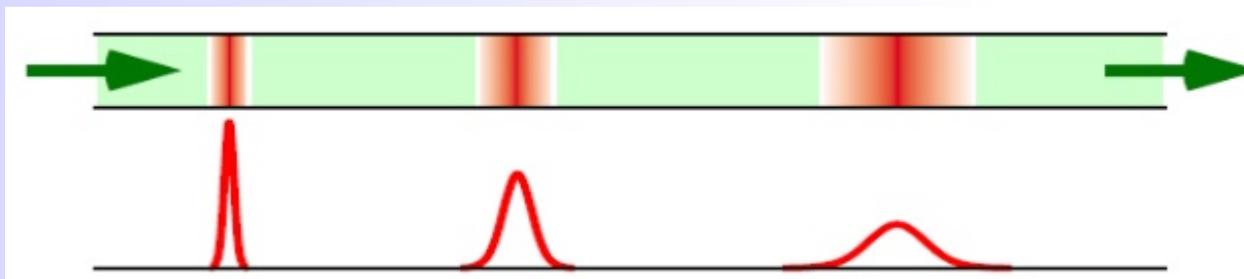
$$H = \frac{L}{N} \text{ Avec } L \text{ longueur de la colonne}$$

H permet de comparer les colonnes entre elles

Plus H diminue plus les pics sont fins

N permet de juger **efficacité**
H permet de juger de **qualité** } d'une colonne

H = mesure globale de l'étalement des pics





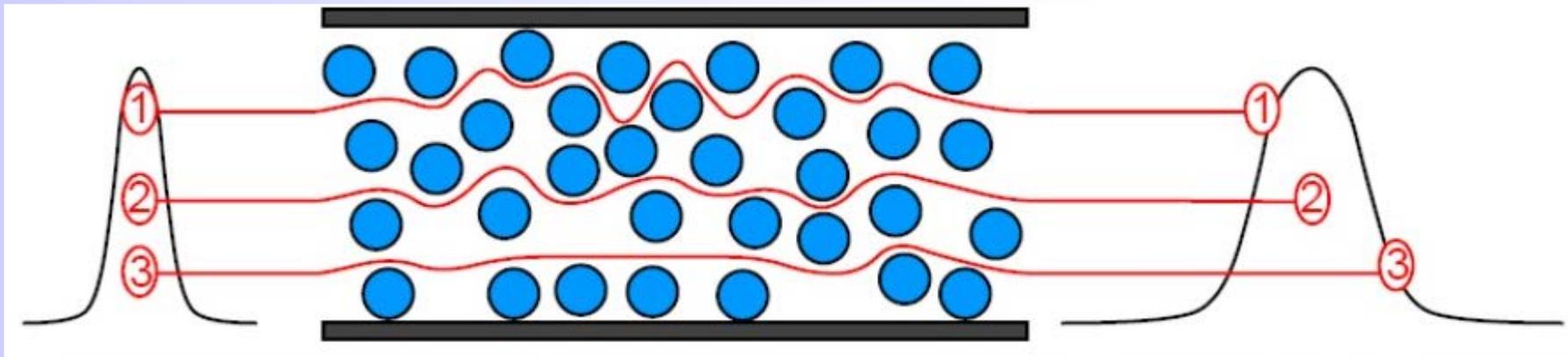
- 2. Les pompes
- 3. L'injecteur
- 4. Les colonnes

6. Les paramètres chromatographiques – Facteurs d'élargissement du pic

a. Anisotropie d'écoulement (colonnes particulières)

Diffusion d'Eddy (ou diffusion turbulente)

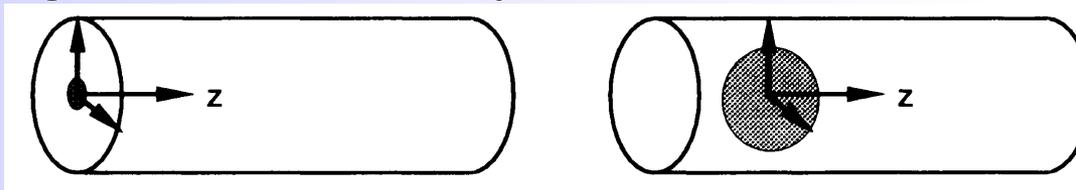
Il existe différents chemins pour traverser la colonne



Élargissement peu affecté par vitesse linéaire de phase mobile

b. Diffusion moléculaire longitudinale

Traduit **élargissement** dans **direction parallèle à axe de colonne**

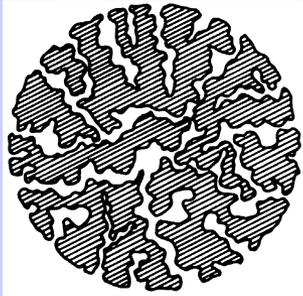


= **Diffusion** des molécules de soluté **sans influence externe**

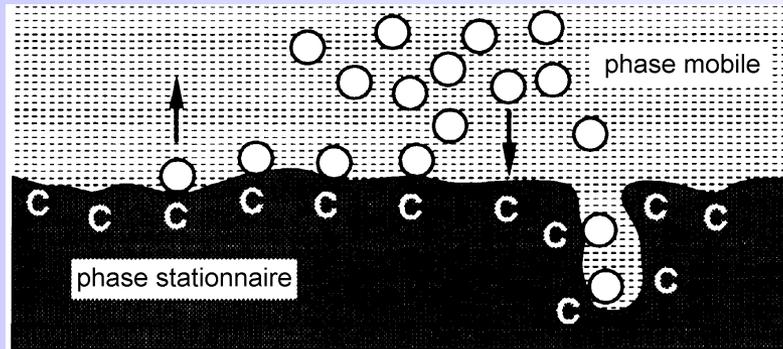


6. Les paramètres chromatographiques – Facteurs d'élargissement du pic

c. Résistance au transfert de masse



Molécule de soluté dans un pore



- Cesse d'être transportée par phase mobile
⇒ **prend du retard**

- **Interagit avec PS**

⇒ **élargissement pic**

Élargissement des pics ↗ si :

viscosité phase mobile (PM) ↗

taille particules de phase stationnaire (PS)

- 1. La phase mobile
- 2. Les pompes
- 3. L'injecteur
- 4. Les colonnes

- 5. Les détecteurs
- 6. Les paramètres chromatographiques
- 7. Comment optimiser une séparation ?

6. Les paramètres chromatographiques – Courbe de Van Deemter

Facteurs d'élargissement résumé dans la Courbe de Van Deemter $H = f(u)$

$$H = A + \frac{B}{u} + C \times u$$

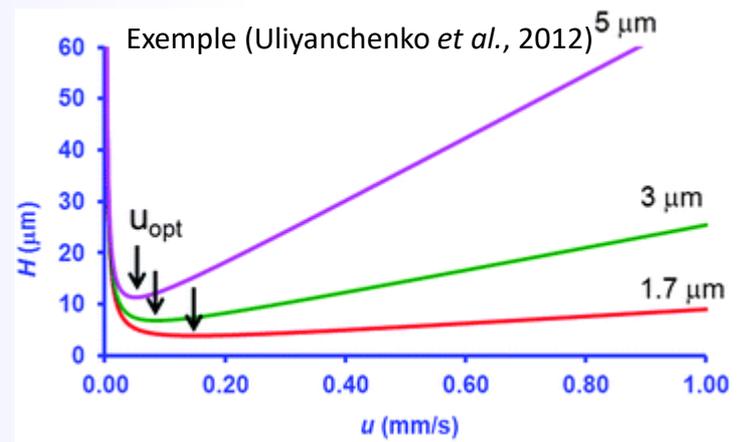
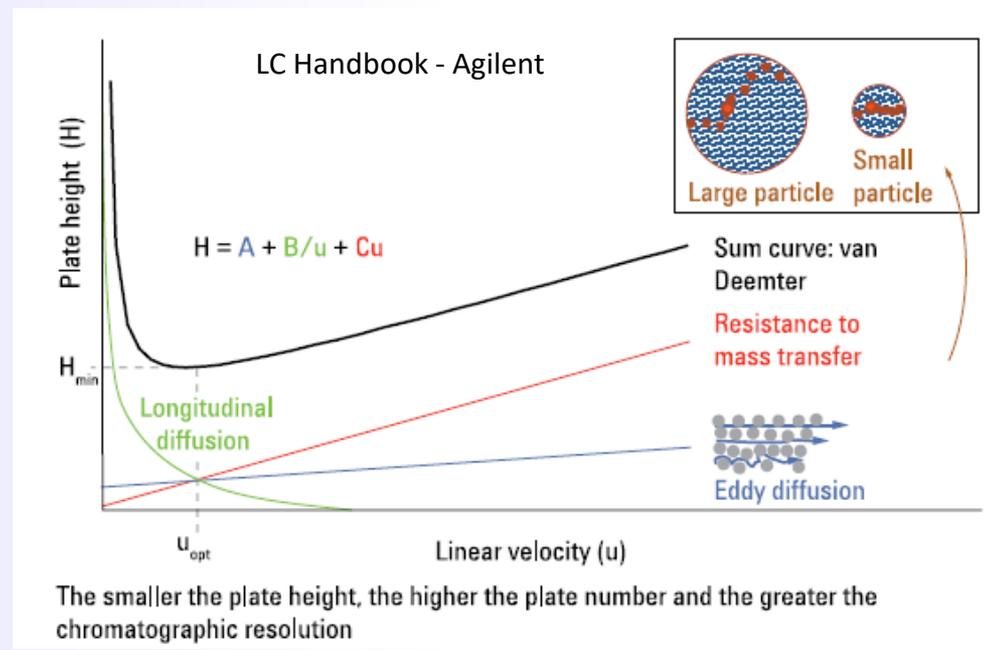
Anisotropie d'écoulement

Diffusion longitudinale

Résistance au transfert de masse

$$u = \frac{D \times L}{V_M} = \frac{L}{t_M}$$

Existe un débit optimal pour chaque colonne



1. La phase mobile
2. Les pompes
3. L'injecteur
4. Les colonnes

5. Les détecteurs
6. Les paramètres chromatographiques
7. Comment optimiser une séparation ?

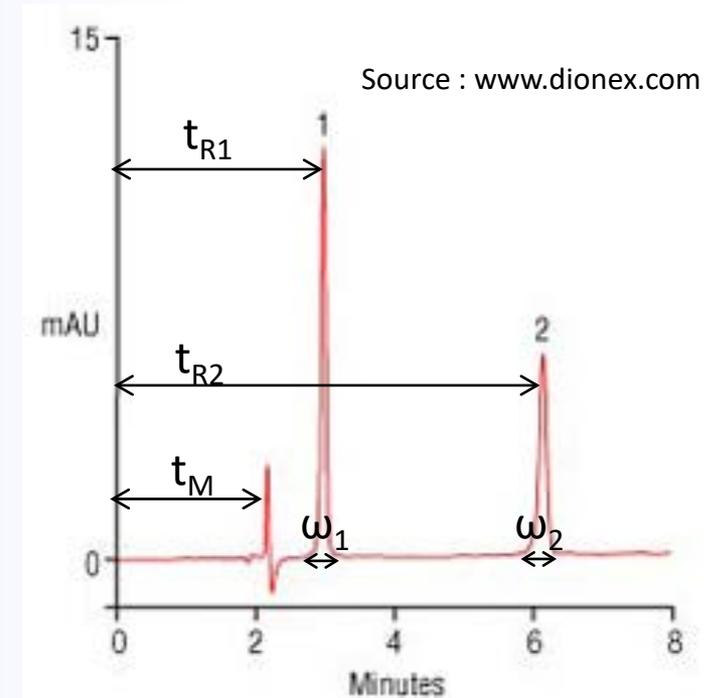
6. Les paramètres chromatographiques – Données de séparation

Sélectivité α

$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_M}{t_{R1} - t_M}$$

α toujours > 1

permet de mesurer la différence de comportement de 2 solutés par rapport aux phases stationnaire et mobile



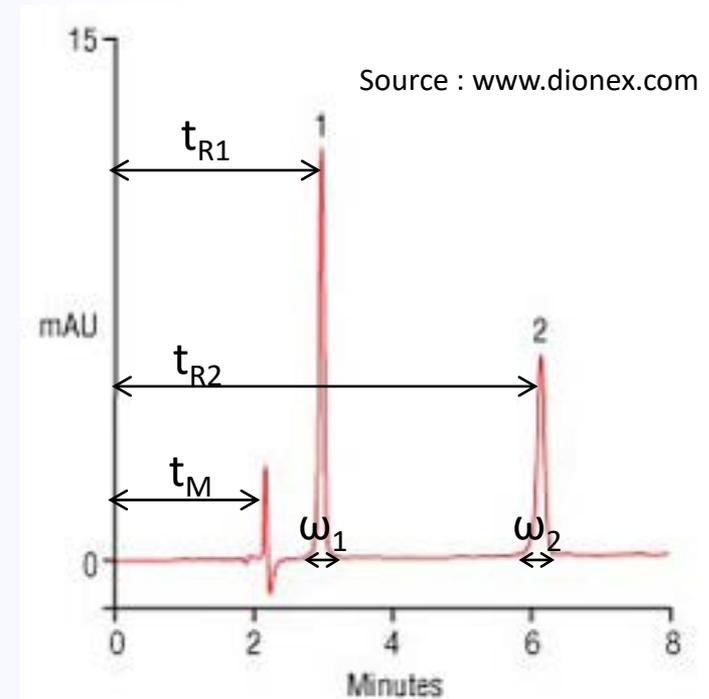
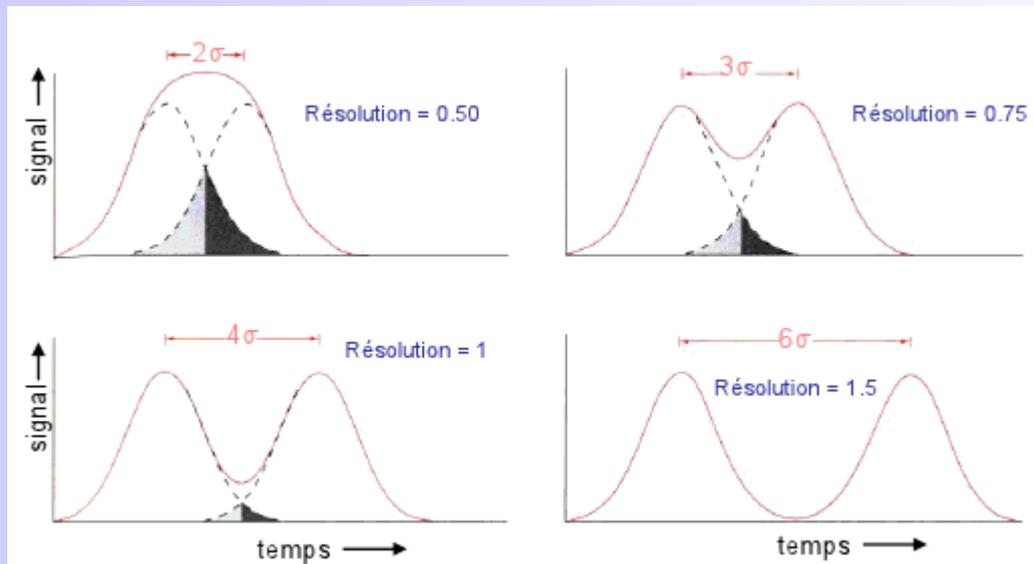


6. Les paramètres chromatographiques – Données de séparation

Résolution R_s

$$R_s = 2 \times \frac{t_{R2} - t_{R1}}{\omega_1 + \omega_2} = 1,18 \times \frac{t_{R2} - t_{R1}}{\delta_1 + \delta_2}$$

Si $R_s \geq 1,5$ alors séparation totale





6. Les paramètres chromatographiques – Données de séparation

Résolution R_s

$$R_s = 2 \times \frac{t_{R2} - t_{R1}}{\omega_1 + \omega_2} = 1,18 \times \frac{t_{R2} - t_{R1}}{\delta_1 + \delta_2}$$

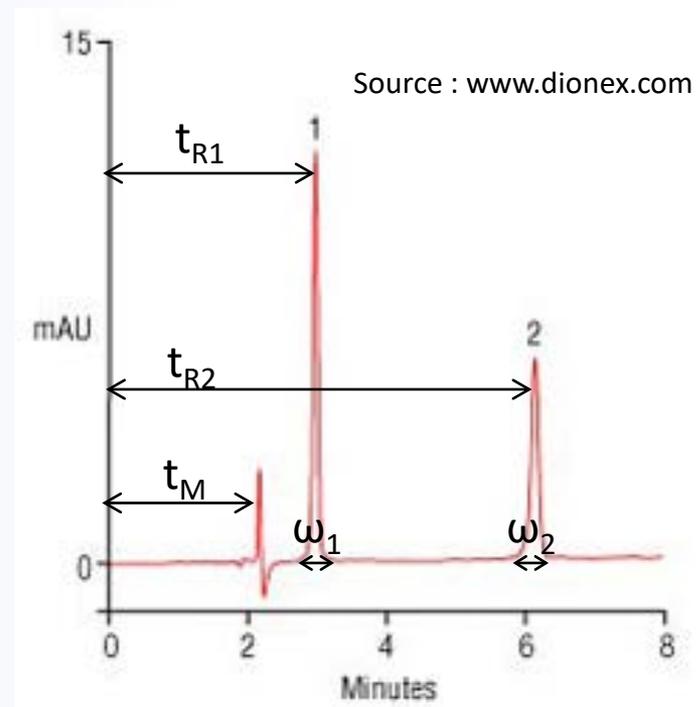
Si $R_s \geq 1,5$ alors séparation totale

Relation de Purnell

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \times \frac{\alpha - 1}{\alpha} \times \frac{k_2}{1 + k_2}$$

Pour augmenter R_s on pourra agir sur

- Efficacité de colonne ($\nearrow N$ ou $\searrow H$)
- Sélectivité (α)
- Facteurs de rétention (k)





- 1. La phase mobile
- 2. Les pompes
- 3. L'injecteur
- 4. Les colonnes

- 5. Les détecteurs
- 6. Les paramètres chromatographiques
- 7. Comment optimiser une séparation ?

6. Les paramètres chromatographiques – Perte de charge d'une colonne

$$\Delta P = \Phi \frac{\eta \times L \times u}{d_p^2}$$

ΔP en Pa

1 MPa = 10 bar = 9,87 atm;
 1000 psi = 70 bar
 ou 100 bar = 1450 psi

ΔP (loi de Darcy) Dépend de :

- **u** : vitesse linéaire phase mobile (m/s)
- **L** : longueur de colonne en m
- **η** : viscosité de éluant (Pa.s)
- **d_p** : diamètre des particules (m)

$$u = \frac{D \times L}{V_M}$$

Facteur de résistance à écoulement de colonne (Φ) :
 ≈ **500** pour particules forme sphérique
 ≈ **1000** pour particules de forme irrégulière

	exemple ①	exemple ②
u	25 cm / 2,5 min	15 cm / 1,5 min
L	25 cm	15 cm
η	0,7·10 ⁻³ Pa s (méthanol)	1,5·10 ⁻³ Pa s (méthanol/eau 30/70)
d_p	5 μm	3 μm
ΔP		

Si $\Delta P_{\text{expérimental}} > 1,5\Delta P_{\text{théorique}} \Rightarrow$ **colonne bouchée**
 Si $\Delta P_{\text{expérimental}} < 0,7\Delta P_{\text{théorique}} \Rightarrow$ **fuite** ou problème de **débit**



- 1. La phase mobile
- 2. Les pompes
- 3. L'injecteur
- 4. Les colonnes

- 5. Les détecteurs
- 6. Les paramètres chromatographiques
- 7. Comment optimiser une séparation ?

6. Les paramètres chromatographiques – Perte de charge d'une colonne

$$\Delta P = \Phi \frac{\eta \times L \times u}{d_p^2}$$

ΔP en Pa

1 MPa = 10 bar = 9,87 atm;
 1000 psi = 70 bar
 ou 100 bar = 1450 psi

ΔP (loi de Darcy) Dépend de :

- **u** : vitesse linéaire phase mobile (m/s)
- **L** : longueur de colonne en m
- **η** : viscosité de éluant (Pa.s)
- **d_p** : diamètre des particules (m)

$$u = \frac{D \times L}{V_M}$$

Facteur de résistance à écoulement de colonne (Φ) :
 ≈ **500** pour particules forme sphérique
 ≈ **1000** pour particules de forme irrégulière

	exemple ①	exemple ②
u	25 cm / 2,5 min	15 cm / 1,5 min
L	25 cm	15 cm
η	0,7·10 ⁻³ Pa s (méthanol)	1,5·10 ⁻³ Pa s (méthanol/eau 30/70)
d_p	5 μm	3 μm
ΔP	120 bar	420 bar !!

Si $\Delta P_{\text{expérimental}} > 1,5 \Delta P_{\text{théorique}} \Rightarrow$ **colonne bouchée**
 Si $\Delta P_{\text{expérimental}} < 0,7 \Delta P_{\text{théorique}} \Rightarrow$ **fuite** ou problème de **débit**



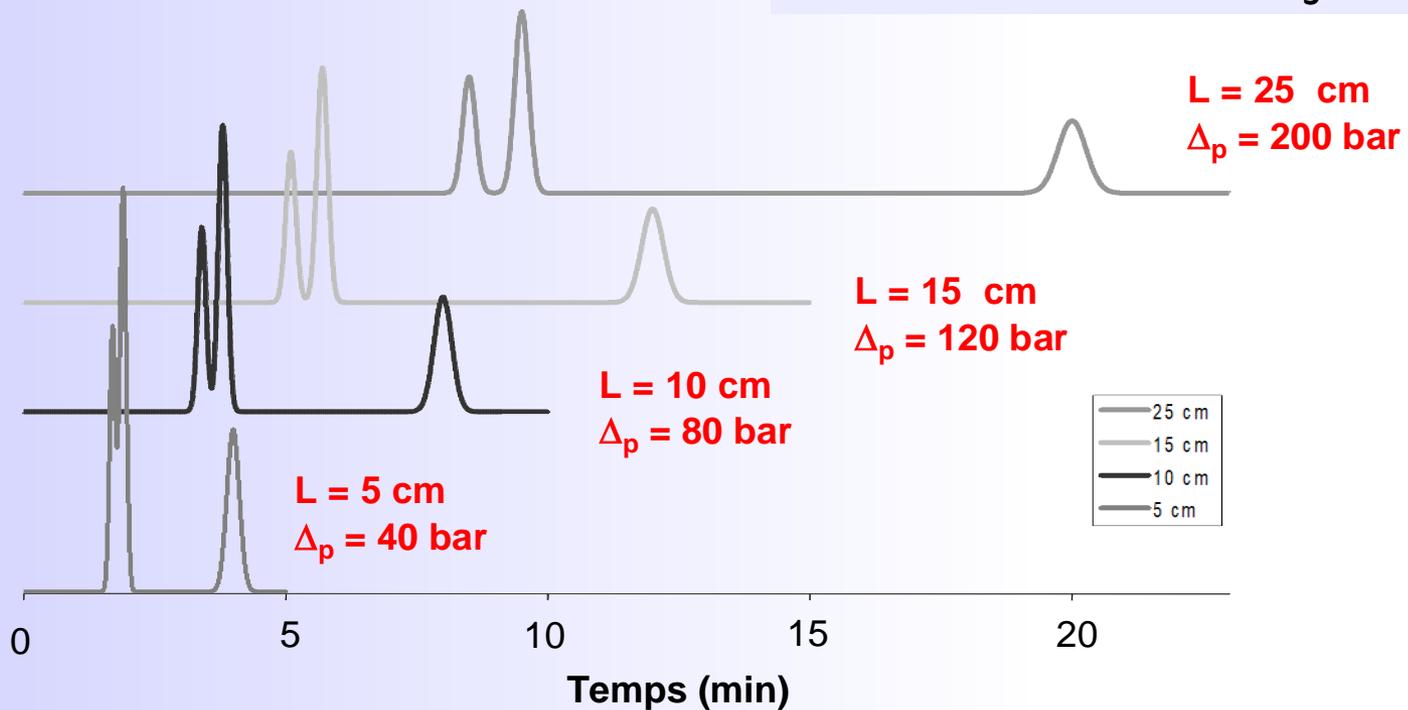
7. Comment optimiser une séparation ? Améliorer la résolution – Colonne

Pour augmenter R_s on pourra agir sur

- Efficacité de colonne ($\nearrow N$ ou $\searrow H$)
- Sélectivité (α)
- Facteurs de rétention (k)

$\nearrow N$ en \nearrow la longueur de la colonne

Si $L \times 5 \Rightarrow N \times 5 \Rightarrow R_s \times \sqrt{5}$

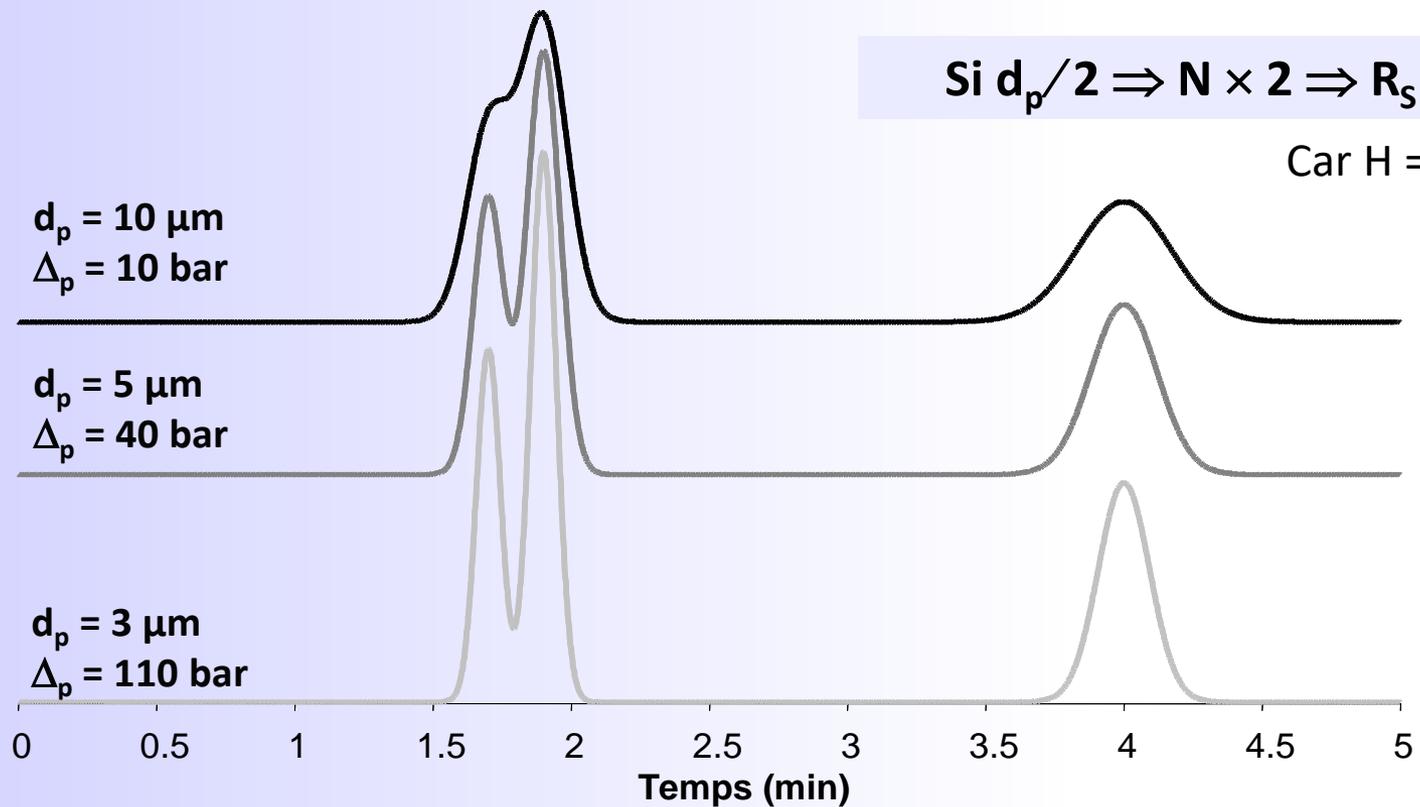


7. Comment optimiser une séparation ? Améliorer la résolution – Colonne

Pour augmenter R_s on pourra agir sur

- Effacité de colonne ($\nearrow N$ ou $\searrow H$)
- Sélectivité (α)
- Facteurs de rétention (k)

$\nearrow N$ ou $\searrow H$ en \searrow diamètre des particules



Si $d_p/2 \Rightarrow N \times 2 \Rightarrow R_s \times \sqrt{2}$

Car $H = 3 d_p$

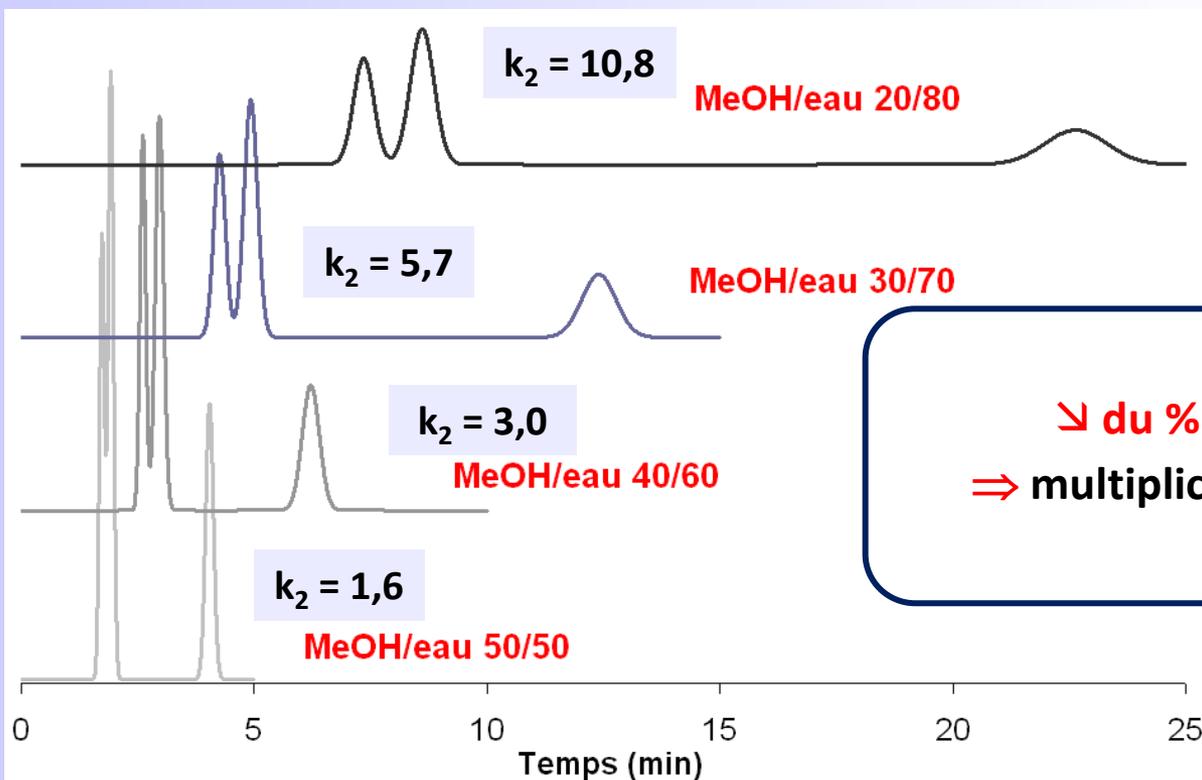


7. Comment optimiser une séparation ? Améliorer la résolution – Phase mobile

Pour augmenter R_s on pourra agir sur

- Efficacité de colonne ($\nearrow N$ ou $\searrow H$)
- Sélectivité (α)
- Facteurs de rétention (k)

Modifier k en modifiant composition de phase mobile



Phase inverse

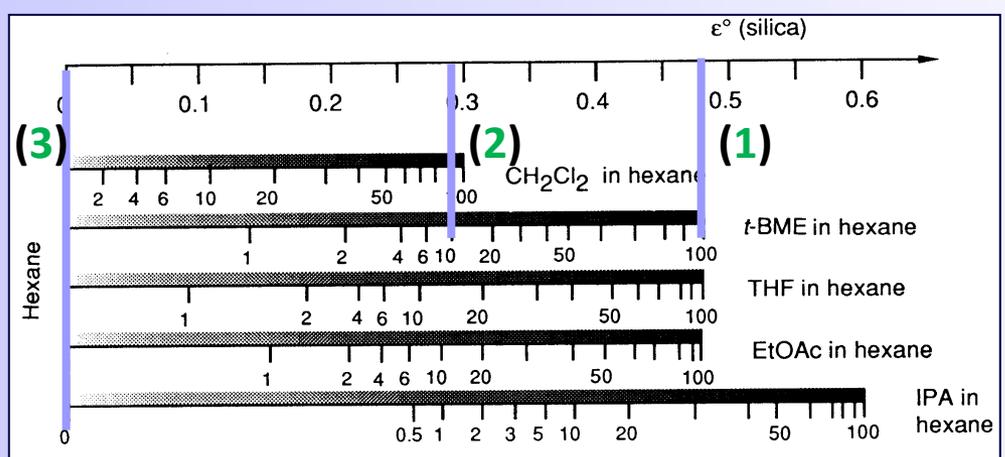
\searrow du % de solvant fort de 10%
 \Rightarrow multiplication de k par 2 (MeOH, ACN)
à 2,8 (THF)

1. La phase mobile
2. Les pompes
3. L'injecteur
4. Les colonnes

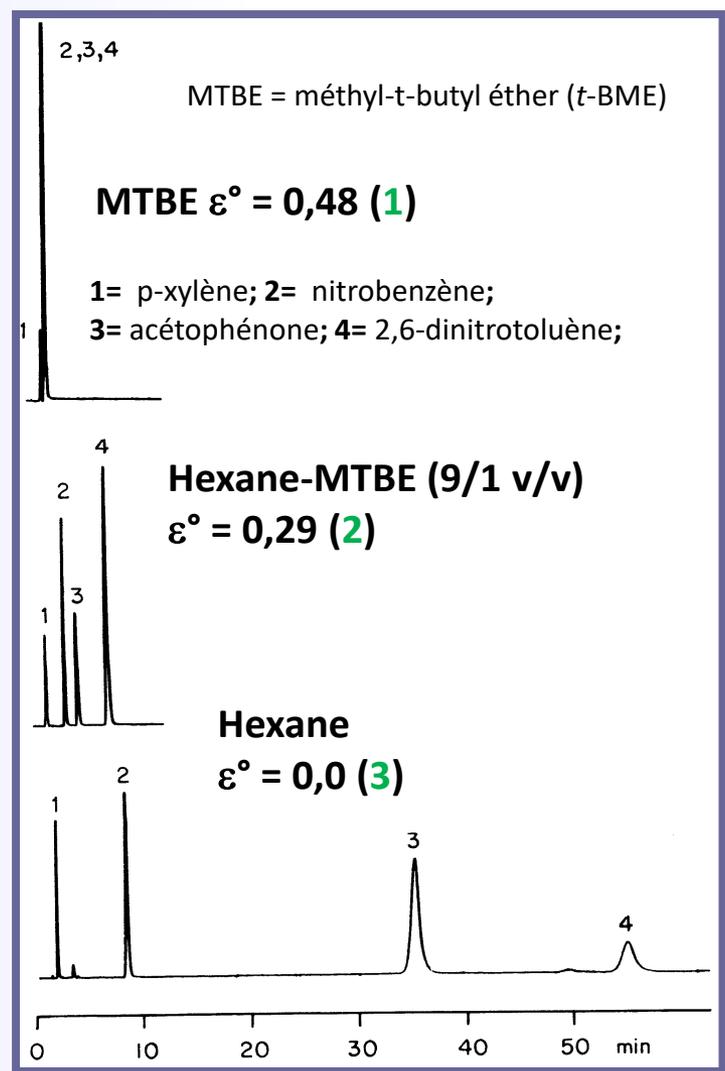
5. Les détecteurs
6. Les paramètres chromatographiques
7. Comment optimiser une séparation ?

7. Comment optimiser une séparation ? Améliorer la résolution – Phase mobile

En phase normale



Colonne : Lichrosorb SI60; 25cm×3,2mm; 5 μm ;
Débit : 1 mL/min; **UV :** 254 nm



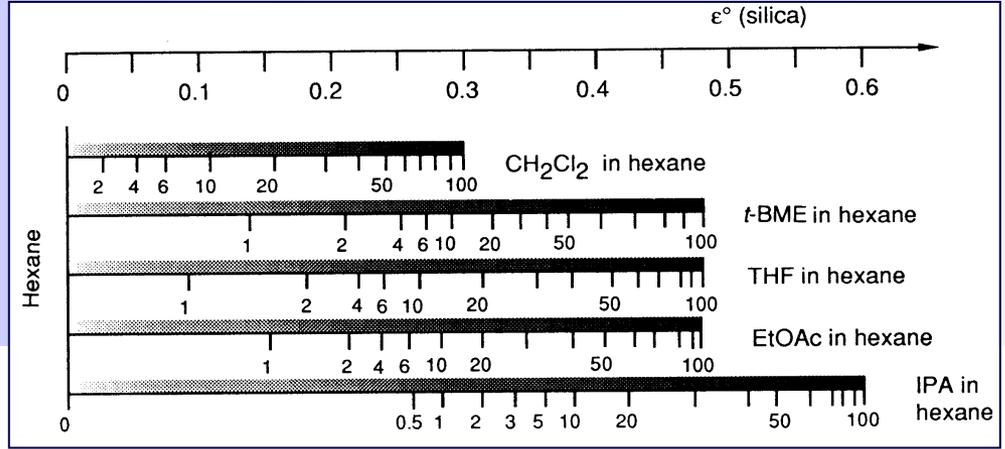


- 1. La phase mobile
- 2. Les pompes
- 3. L'injecteur
- 4. Les colonnes

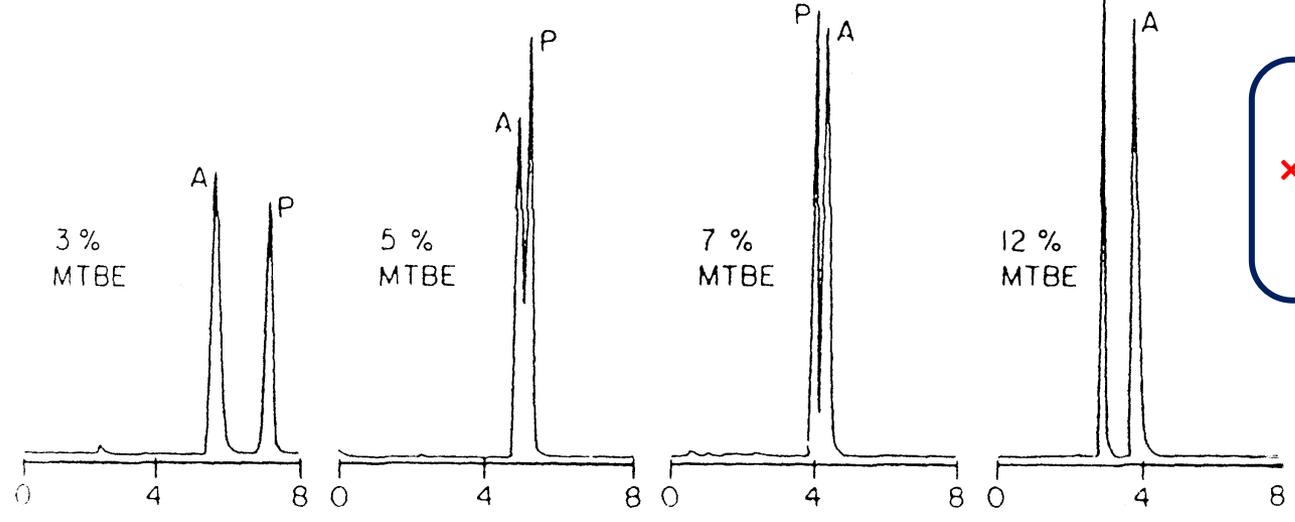
- 5. Les détecteurs
- 6. Les paramètres chromatographiques
- 7. Comment optimiser une séparation ?

7. Comment optimiser une séparation ? Améliorer la résolution – Phase mobile

En phase normale



Séparation de l'aniline (A) et du phénol (P)
Colonne : cyano-propyl; 25cm×4,6mm; 5µm;
Débit : 1 mL/min;
Phases mobile : mélanges d'hexane et de MTBE



Phase normale
 × du % de solvant fort par 2
 ⇒ division de k par 2 à 3

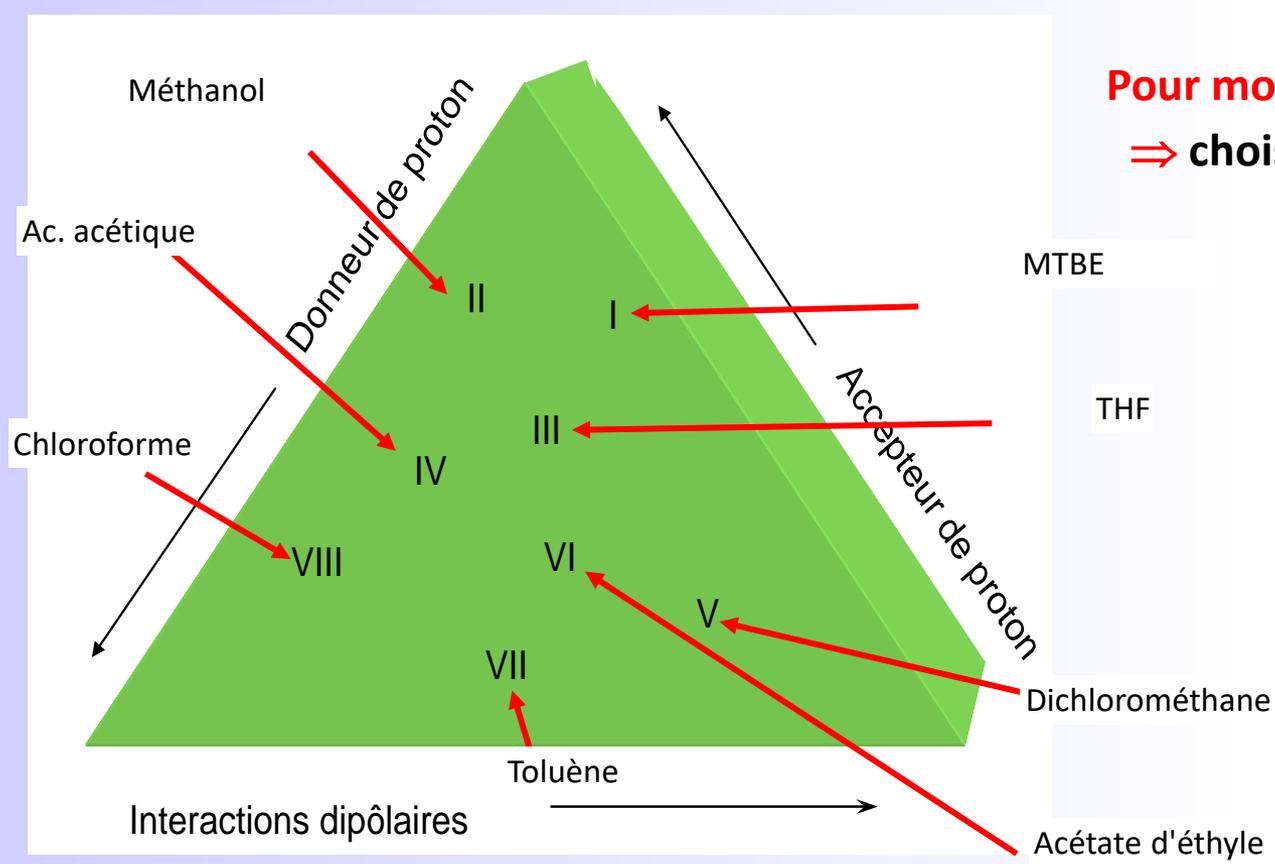
- 1. La phase mobile
- 2. Les pompes
- 3. L'injecteur
- 4. Les colonnes

- 5. Les détecteurs
- 6. Les paramètres chromatographiques
- 7. Comment optimiser une séparation ?

7. Comment optimiser une séparation ? Améliorer la résolution – Phase mobile

En phase normale

interactions spécifiques entre soluté et solvant



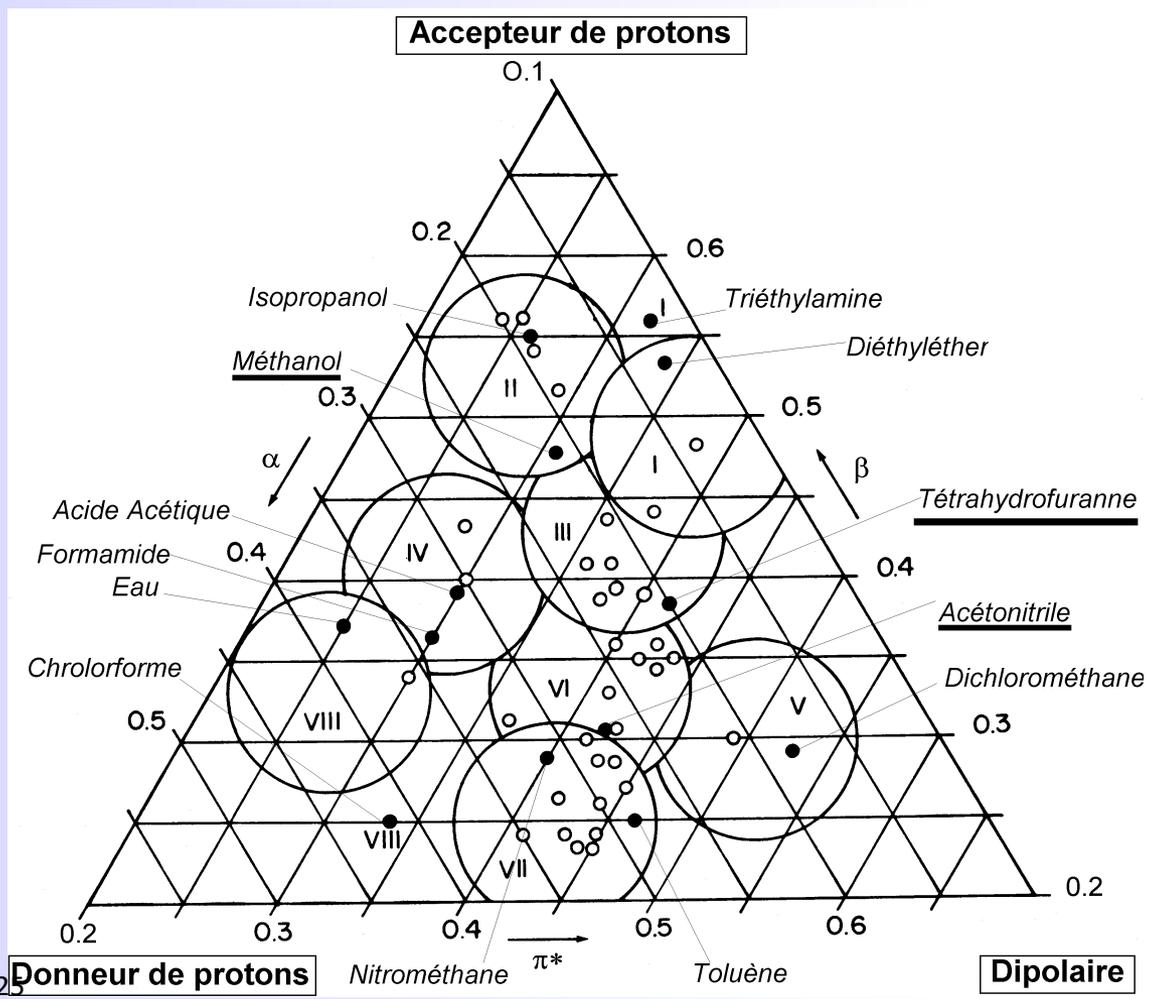
Pour modifier sélectivité de PM
⇒ choisir solvants de classe ≠

- 1. La phase mobile
- 2. Les pompes
- 3. L'injecteur
- 4. Les colonnes

- 5. Les détecteurs
- 6. Les paramètres chromatographiques
- 7. Comment optimiser une séparation ?

7. Comment optimiser une séparation ? Améliorer la résolution – Phase mobile

Triangle de Snyder interactions spécifiques entre soluté et solvant



1. La phase mobile
2. Les pompes
3. L'injecteur
4. Les colonnes

5. Les détecteurs
6. Les paramètres chromatographiques
7. Comment optimiser une séparation ?

7. Comment optimiser une séparation ? Améliorer la résolution – Phase mobile

Classes de solvants : groupes de sélectivité

Classement en fonction de :

- Interaction **dipôle-dipôle**
- Caractère **accepteur** ou **donneur** de **protons**

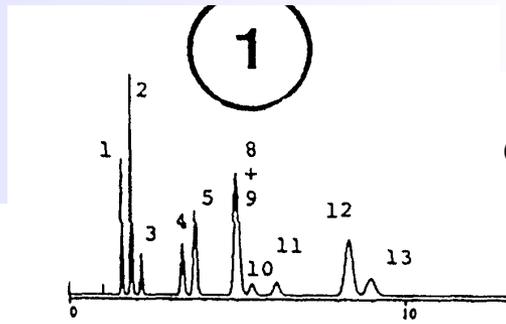
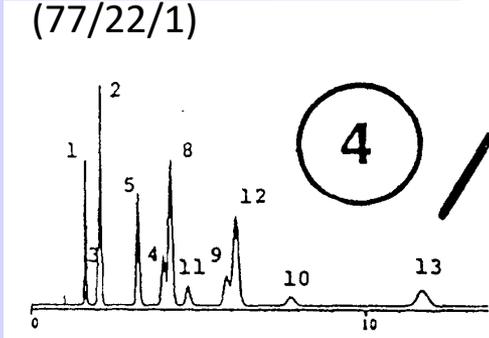
Groupe	Solvant	Polarité des solvants P'
I	Triéthylamine	1,9
	Méthyl-t-butyl éther	2,7
	Ether éthylique	2,8
II	n-Butanol, Propanol	3,9
	Ethanol	4,3
	Methanol	5,1
III	Tétrahydrofurane	4,0
	Pyridine	5,3
	Diméthylformamide	6,4

IV	Acide acétique	6,0
	Formamide	9,6
V	Dichlorométhane	3,1
	1,2-Dichloroéthane	3,5
VI	Acétate d'éthyle	4,4
	Acétone	5,1
	Acétonitrile	5,8
VII	Toluène	2,4
	Nitrobenzène	4,4
VIII	Chloroforme	4,1
	Eau	10,2

Exemple de variation de sélectivité (à force éluante similaire)

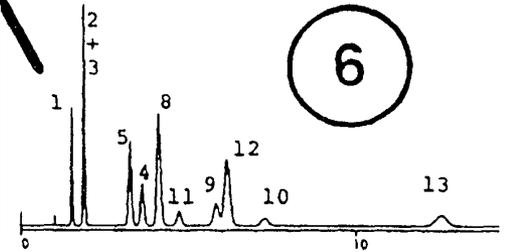
Séparation de naphthalènes substitués

④ Hexane/CH₂Cl₂/MTBE
(77/22/1)

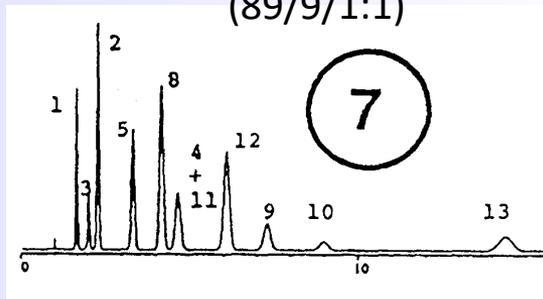


① Hexane/CH₂Cl₂ (42/58)

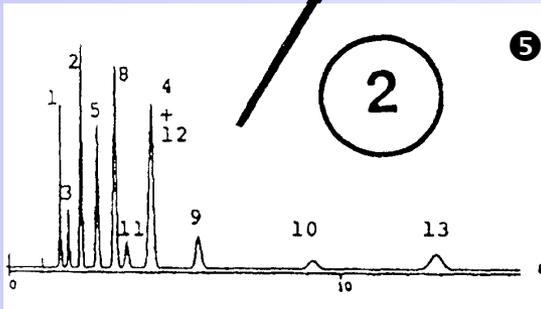
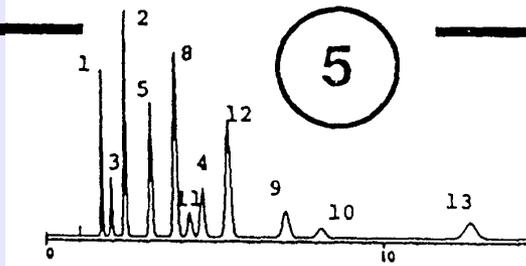
⑥ Hexane/CH₂Cl₂/ACN (69/30/1)



⑦ Hexane/CH₂Cl₂/MTBE/ACN
(89/9/1:1)

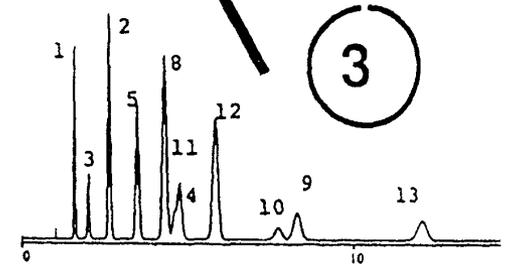


⑤ Hexane/CH₂Cl₂/MTBE/ACN (92/5/2:2)



② Hexane/MTBE (96/4)

2024-2025



③ Hexane/CH₂Cl₂/ACN
(87/10/3)

Stéven Renault

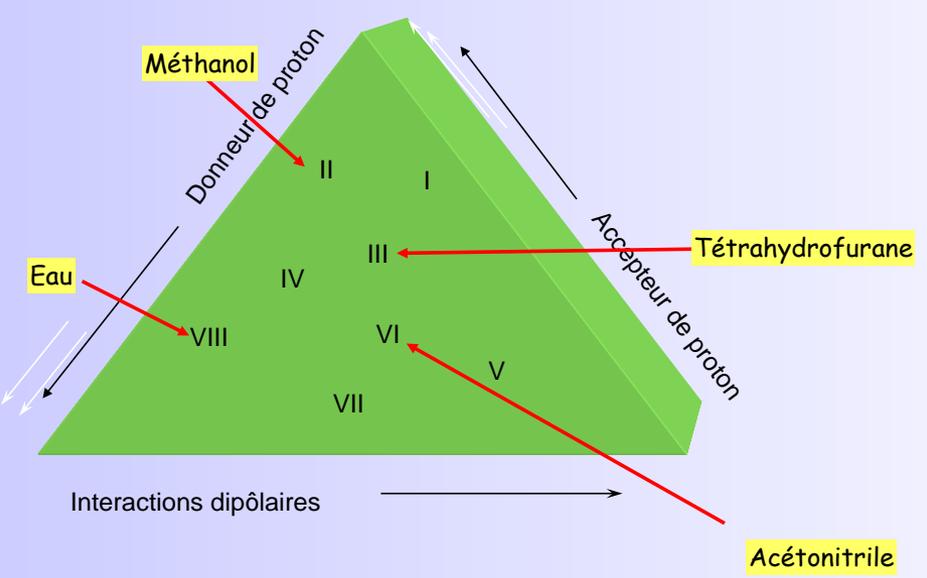
1. La phase mobile
2. Les pompes
3. L'injecteur
4. Les colonnes

5. Les détecteurs
6. Les paramètres chromatographiques
7. Comment optimiser une séparation ?

7. Comment optimiser une séparation ? Améliorer la résolution – Phase mobile

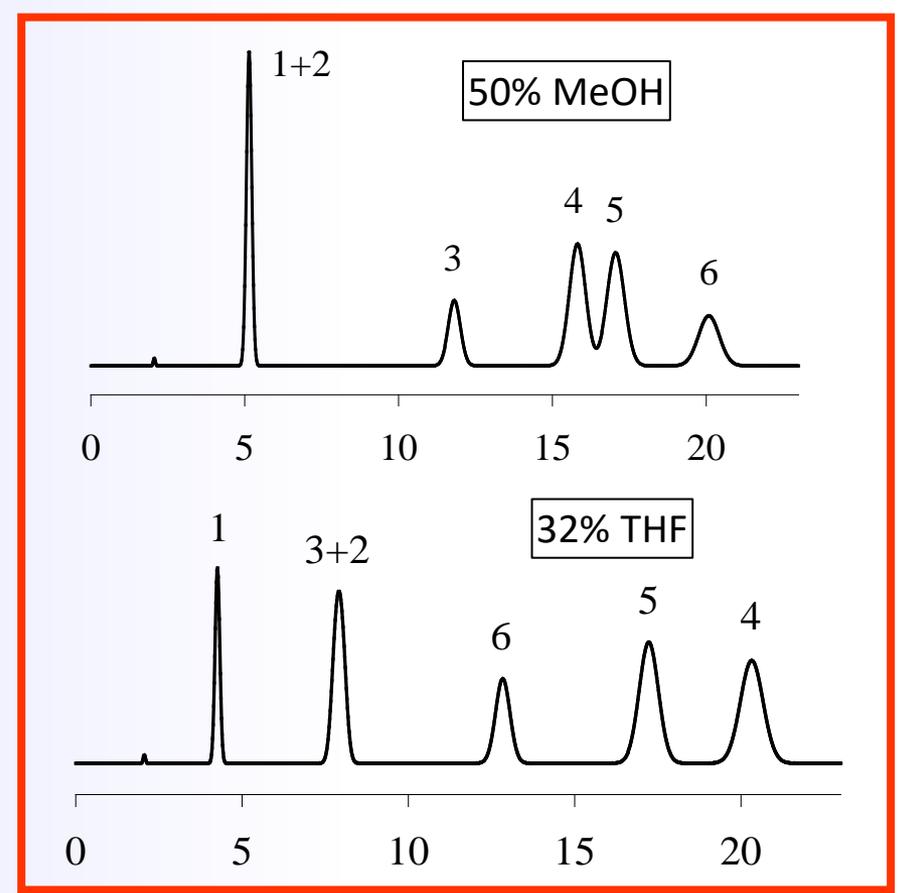
En phase inverse

**Exemple de variation de sélectivité
(à force éluante similaire)**



**Méthanol, acétonitrile, THF
= solvants de classe ≠**

Séparation de composés aromatiques



1= alcool benzylique; 2= phénol;
3= 3-phényl propanol; 4= 2,4-dimethyl phénol;
5= benzène; 6= diéthylphthalate

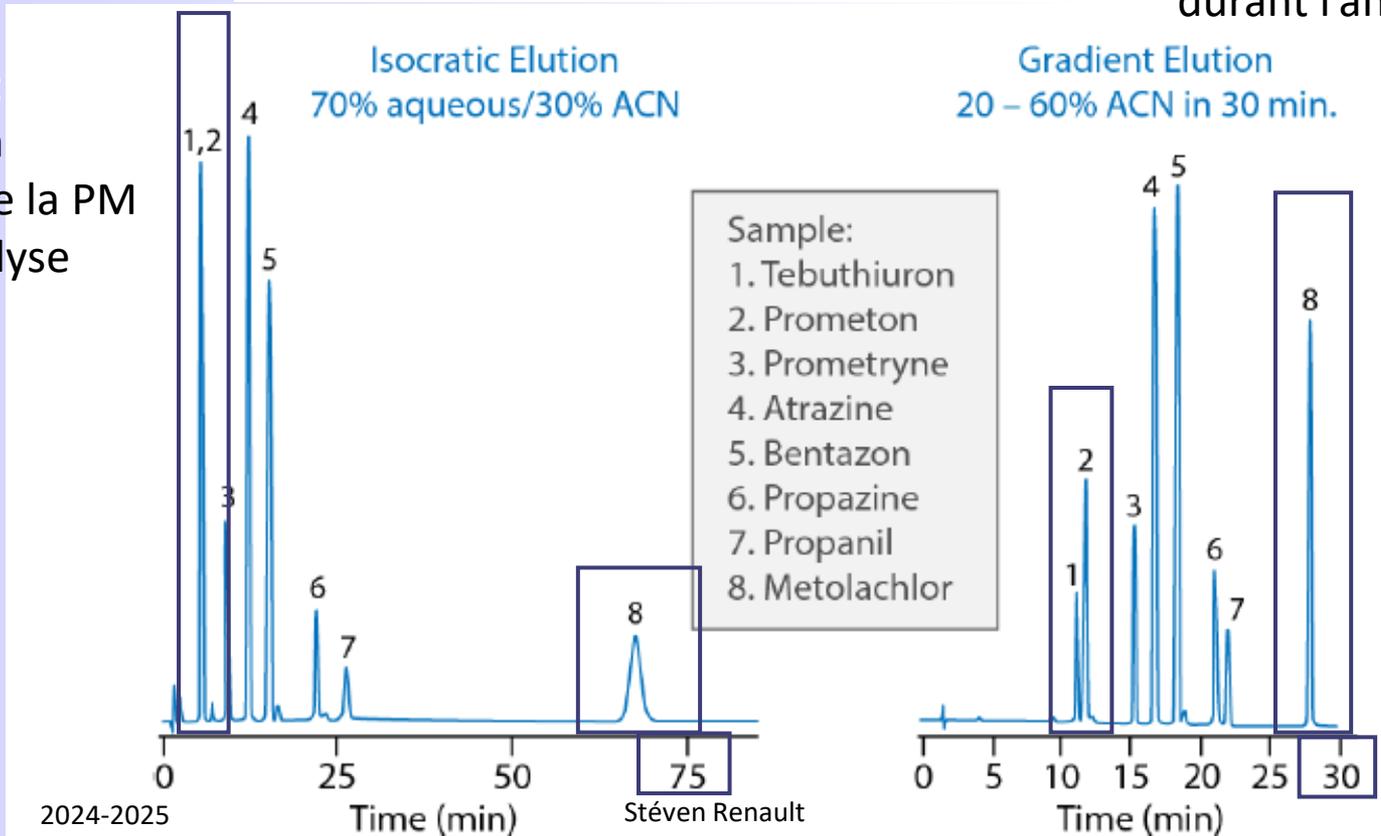
7. Comment optimiser une séparation ? Améliorer la résolution – Phase mobile

Utilisation du gradient d'élution

Column: ZORBAX C₁₈, 4.6 x 150 mm, 5 μm
Mobile Phase: A: H₂O with 0.1% TFA, pH 2
 B: Acetonitrile
Flow Rate: 1.0 mL/min
Temperature: 35 °C

Gradient :
 modification de
 composition de la PM
 durant l'analyse

Isocratique :
 composition
 constante de la PM
 durant l'analyse





7. Comment optimiser une séparation ? Améliorer la résolution – Phase mobile

Utilisation du gradient d'élution

Optimisation des paramètres du gradient à l'aide de formule (cas d'un massif de pics à séparer) :

$$\%B_{i_{\text{initial optimisé}}} = \%B_{\text{initial}} + (t_i - t_d - t_m) \times \frac{\Delta\%B}{t_g} - 10$$

$$\%B_{f_{\text{final optimisé}}} = \%B_{\text{initial}} + (t_f - t_d - t_m) \times \frac{\Delta\%B}{t_g} - 10$$

Avec :

$\%B_{\text{initial}}$: pourcentage initial du solvant fort dans le gradient

t_i : temps de rétention du premier pic à séparer (min)

t_f : temps de rétention du dernier pic à séparer (min)

t_d : temps de latence (dwell time, min)

t_m : temps mort (min)

$\Delta\%B$: différence entre les pourcentages initiaux et finaux du solvant fort dans le gradient

t_g : temps de gradient (min)



7. Comment optimiser une séparation ? Améliorer la résolution – Influence du pH

En phase inverse pour composés acido-basiques ($2 < pK_a < 9$)

Espèces acido-basiques : ionisation \pm grande en fonction du pH

Espèces sous forme moléculaire : plus retenues en phase inverse

Espèces sous forme ionisée : faiblement retenues en phase inverse

\Rightarrow **k** des composés acido-basiques **varie en fonction** du **pH** de **phase mobile**

Maîtrise du pH pour éviter

- **variations des t_R** en fonction de **concentration** des solutés
- **variations non linéaires de surface (ou hauteur) de pic** en fonction de **concentration**

7. Comment optimiser une séparation ? Améliorer la résolution – Influence du pH

En phase inverse pour composés acido-basiques ($2 < pK_a < 9$)

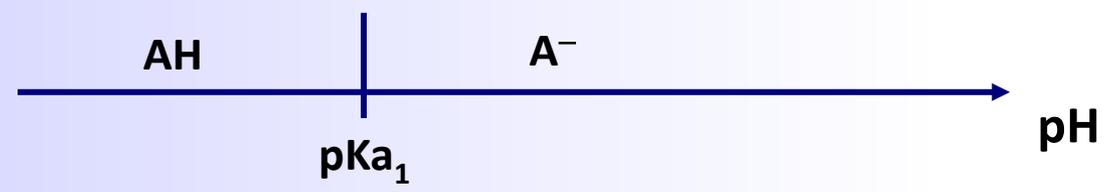
Équilibre acido-basique de HA



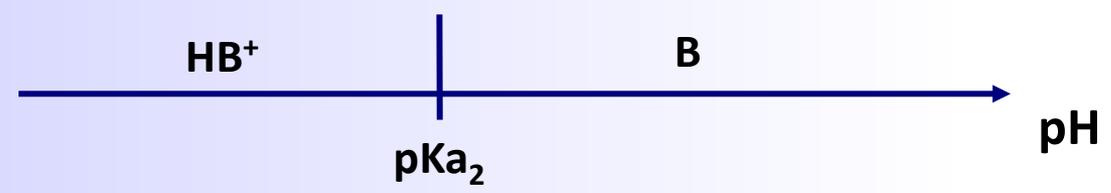
avec
$$K_a = \frac{|\text{H}_3\text{O}^+| |\text{B}|}{|\text{A}|}$$

Diagramme de prédominance des espèces

Cas d'un acide AH



Cas d'une base B



7. Comment optimiser une séparation ? Améliorer la résolution – Influence du pH

En phase inverse pour composés acido-basiques ($2 < pK_a < 9$)

Variation de k en fonction du pH

◆ À $pH < pK_a - 2$

Forme acide A prédomine $\Rightarrow k \approx k_A$ avec $k_A = k$ de forme acide

◆ À $pH > pK_a + 2$

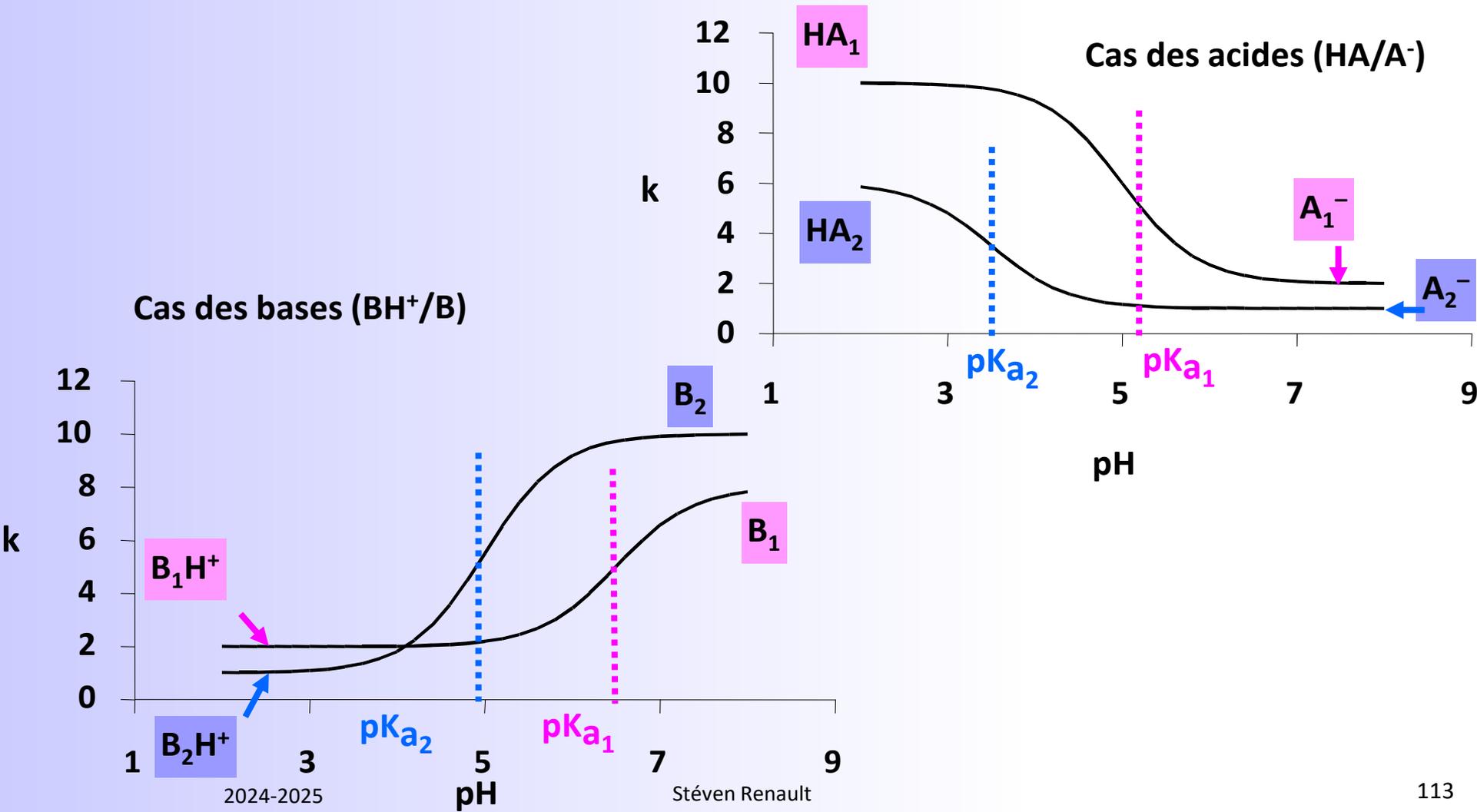
Forme basique B prédomine $\Rightarrow k \approx k_B$ avec $k_B = k$ de forme basique

◆ À $pK_a - 2 < pH < pK_a + 2$:

Formes A et B coexistent $\Rightarrow k_A < k < k_B$ ou $k_B < k < k_A$

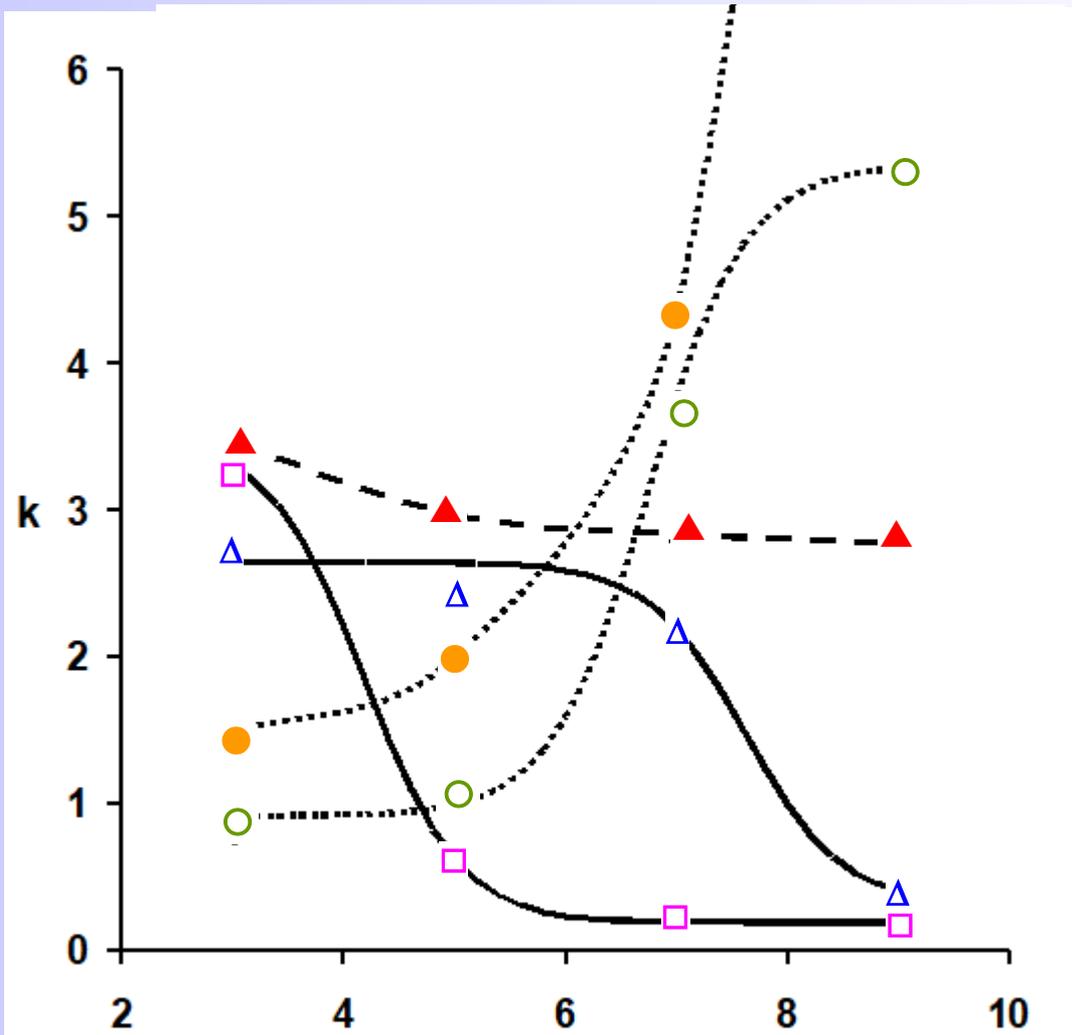
7. Comment optimiser une séparation ? Améliorer la résolution – Influence du pH

En phase inverse pour composés acido-basiques ($2 < pK_a < 9$)



7. Comment optimiser une séparation ? Améliorer la résolution – Influence du pH

En phase inverse pour composés acido-basiques ($2 < pK_a < 9$)



Composés	pK_a
 (●) méthylamphétamine	10,1

Quelle proposition est correcte.

- A. une solution tampon est un mélange d'un acide fort et d'une base forte.
- B. le pH d'une solution tampon varie peu lors d'un ajout important d'acide ou de base.
- C. une solution tampon permet de fixer le pH d'un milieu.
- D. Une solution tampon est un mélange d'un acide faible et de sa base faible conjuguée dans n'importe quelles proportions.

Quelle proposition est correcte.

- A. une solution tampon est un mélange d'un acide fort et d'une base forte.
- B. le pH d'une solution tampon varie peu lors d'un ajout important d'acide ou de base.
- C. **une solution tampon permet de fixer le pH d'un milieu.**
- D. Une solution tampon est un mélange d'un acide faible et de sa base faible conjuguée dans n'importe quelles proportions.



7. Comment optimiser une séparation ? Améliorer la résolution – Influence du pH

En phase inverse pour composés acido-basiques ($2 < pK_a < 9$)

Comment fixer le pH de la phase mobile ?

Utilisation de « tampons »

Tampon	Acidités		
	pKa ₁	pKa ₂	pKa ₃
phosphate	2,1	7,2	12,3
Citrate	3,1	4,7	6,4
formate	3,8	-	-
acétate	4,8	-	-
ammoniaque	9,2	-	-
borate	9,2	-	-
diéthylamine	10,5	-	-

Pour préparer une solution tampon à pH = 6,5, j'utilise de préférence le tampon

A. phosphate

B. citrate

C. acétate

D. ammoniacque

Tampon	Acidités		
	pKa ₁	pKa ₂	pKa ₃
phosphate	2,1	7,2	12,3
Citrate	3,1	4,7	6,4
formate	3,8	-	-
acétate	4,8	-	-
ammoniacque	9,2	-	-
borate	9,2	-	-
diéthylamine	10,5	-	-

Pour préparer une solution tampon à $\text{pH} = 6,5$, j'utilise de préférence le tampon

A. phosphate

B. citrate

C. acétate

D. ammoniacque

Tampon	Acidités		
	pKa_1	pKa_2	pKa_3
phosphate	2,1	7,2	12,3
Citrate	3,1	4,7	6,4
formate	3,8	-	-
acétate	4,8	-	-
ammoniacque	9,2	-	-
borate	9,2	-	-
diéthylamine	10,5	-	-



7. Comment optimiser une séparation ? Améliorer la résolution – Appariement d'ions

Objectif

Améliorer la rétention des composés très ioniques ou très polaires sur colonne apolaire

Moyen

Diminuer leur caractère ionique pour augmenter la rétention

Application

À utiliser lorsque la modification de pH ne suffit pas

Mise en œuvre

Ajouter à la phase mobile un composé, appelé **contre-ion**, porteur d'une chaîne carbonée (peu polaire) et d'un groupement de charge opposée à celle du composé à séparer

Si soluté à séparer : S^+

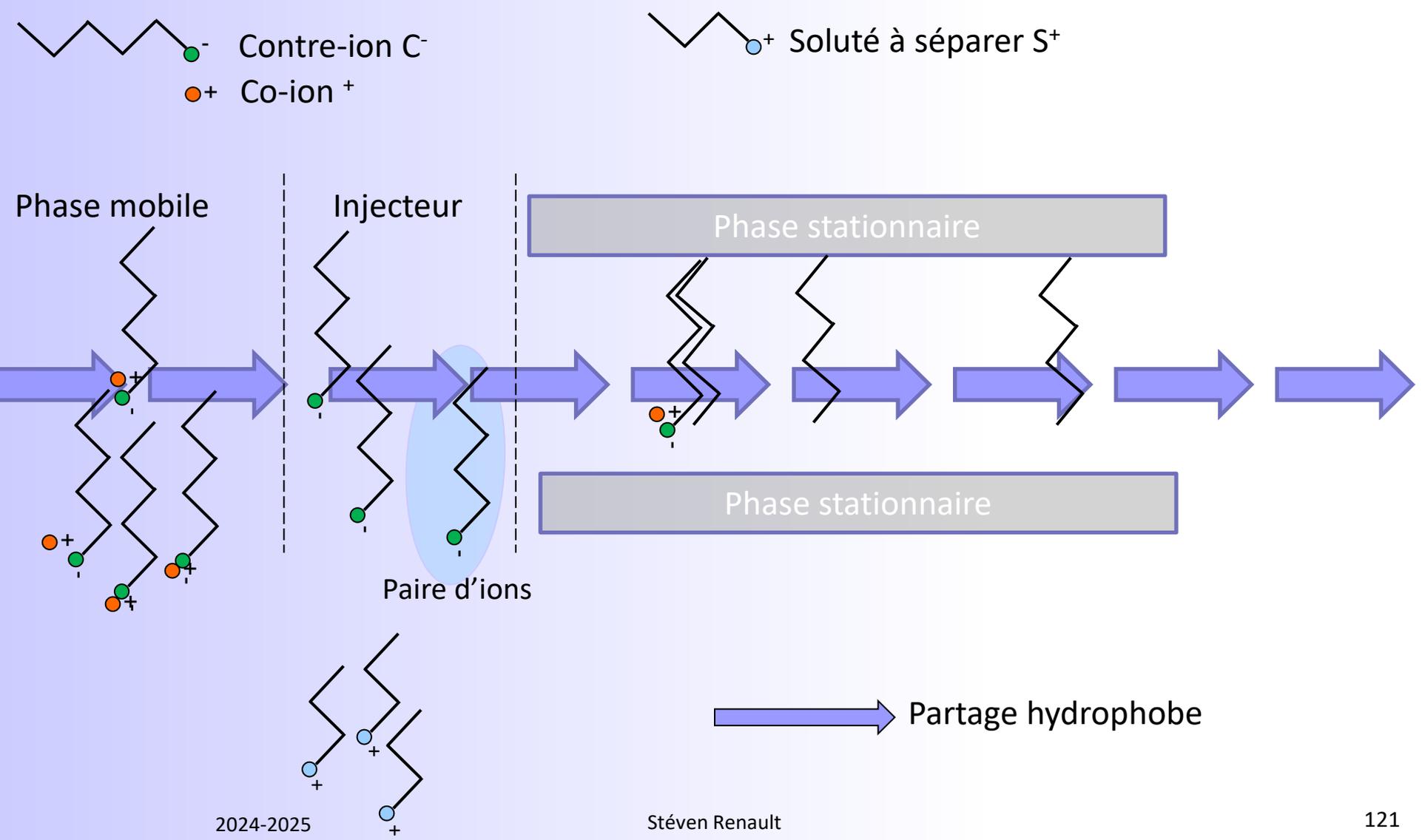


Alors contre-ion C^-

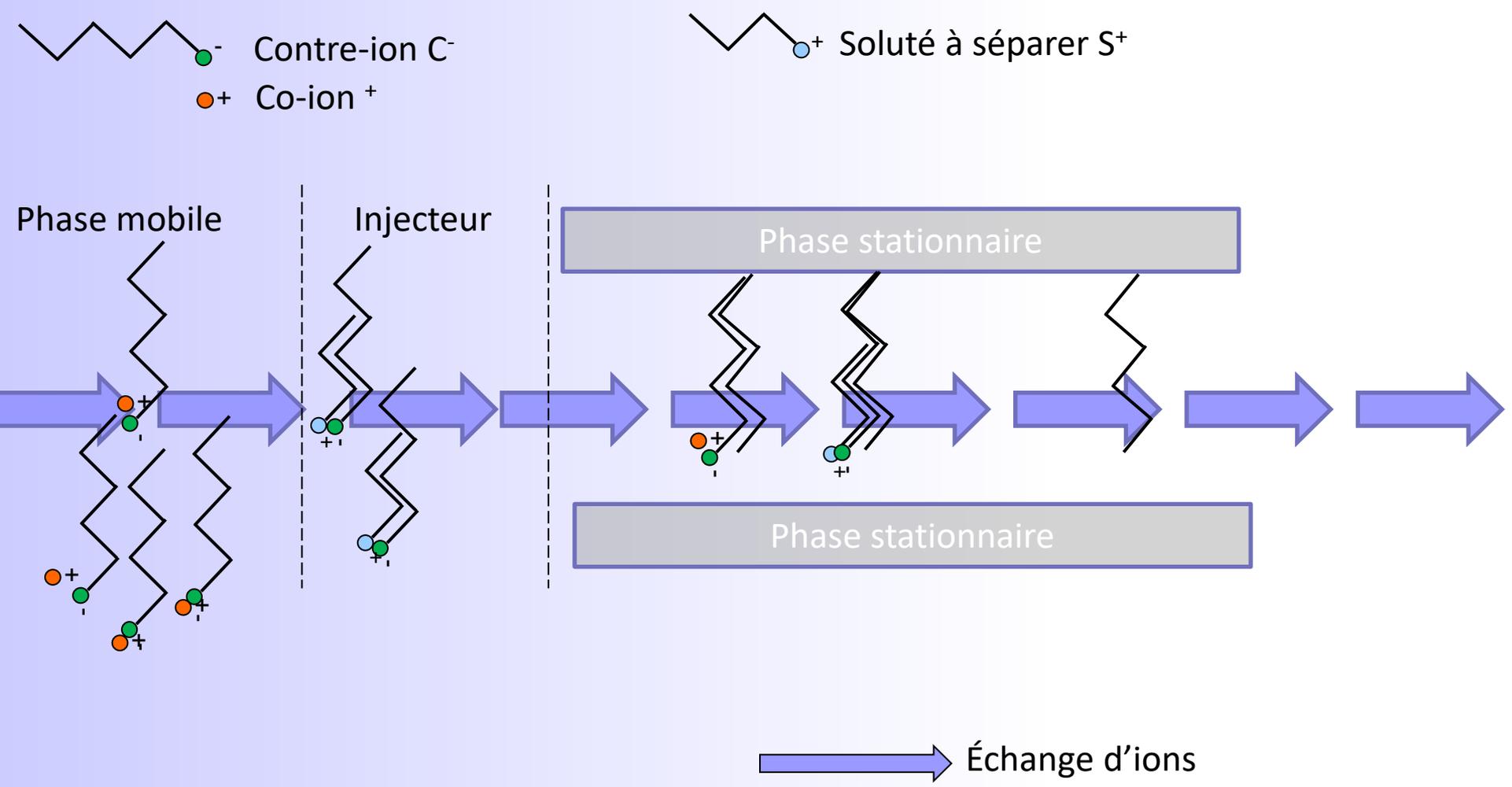


Co-ion $^+$

7. Comment optimiser une séparation ? Améliorer la résolution – Appariement d'ions



7. Comment optimiser une séparation ? Améliorer la résolution – Appariement d'ions





7. Comment optimiser une séparation ? Améliorer la résolution – Appariement d'ions

= **phase stationnaire apolaire (C₁₈)** +
phase mobile hydro-organique contenant un **contre-ion** (hydrophobe)

		Solutés	
		Cationiques	Anioniques
Contre-ions	Anioniques	Alkyl et arylsulfonates -octanesulfonate Alkylsulfates -dodécylsulfate Anions inorganiques -perchlorate -trifluoroacétate	Ammoniums quaternaires -tétrabutylammonium -cétyltriméthylammonium (cétrimide) Amines protonées -octylammonium
	Cationiques		



7. Comment optimiser une séparation ? Améliorer la résolution – Appariement d'ions

Si **soluté** forme **paire d'ions avec un contre-ion**

◆ Concentration et longueur de chaîne alkyle du contre-ion

k solutés ↗ quand :

- **concentration** contre-ion ↗

- **longueur chaîne alkyle** du contre-ion ↗

◆ Pourcentage de solvant fort de phase mobile

k solutés ↘ quand : % de solvant fort de PM ↗

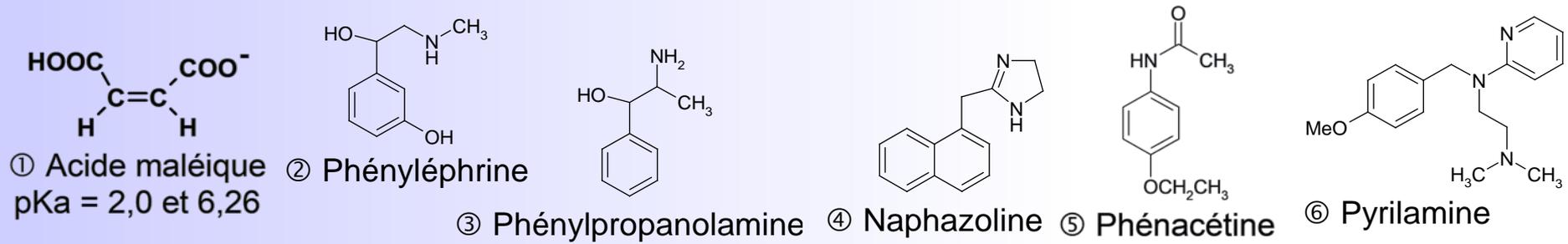
◆ pH de phase mobile

k solutés ↗ quand ionisation des solutés ↗

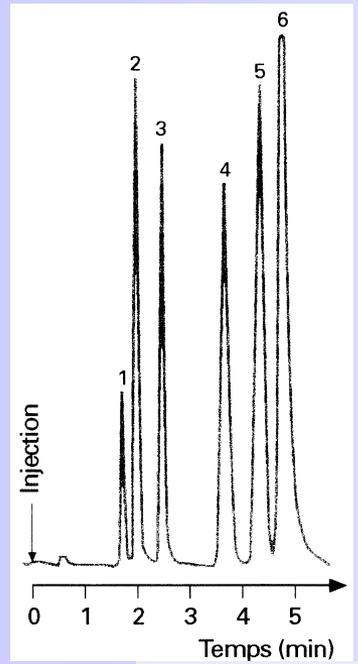
- **acide HA** : rétention maximale pour $\text{pH} \geq \text{pKa} + 2$

- **base B** : rétention maximale pour $\text{pH} \leq \text{pKa} - 2$

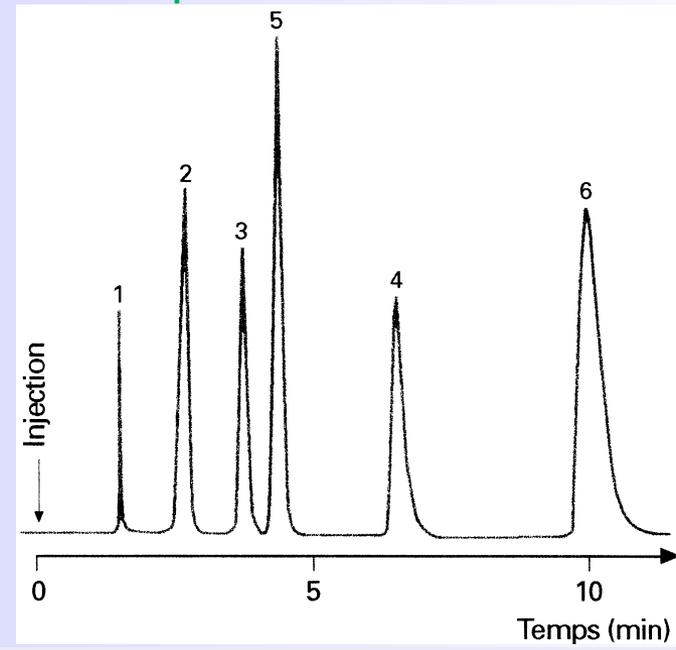
7. Comment optimiser une séparation ? Améliorer la résolution – Appariement d'ions



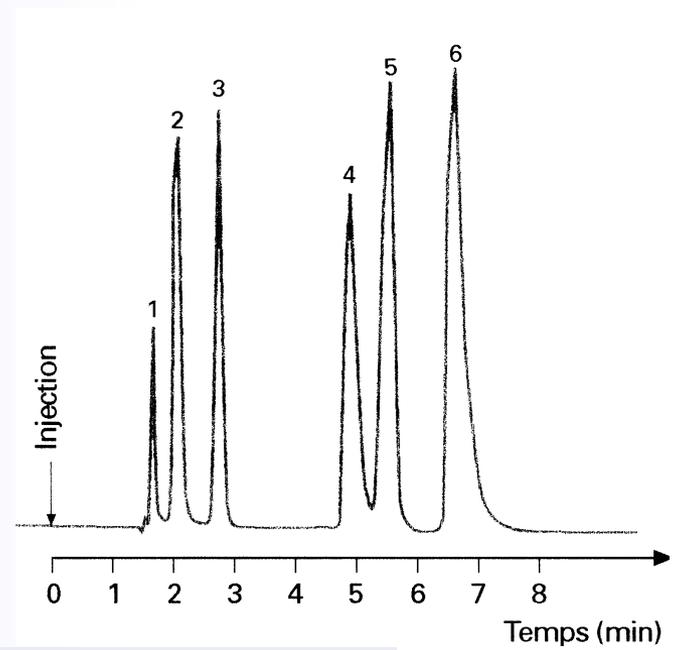
MeOH/eau **50/50 v/v**
 Pentane sulfonate Na 5.10^{-3} M



MeOH/eau **50/50 v/v**
 Heptane sulfonate Na 5.10^{-3} M



MeOH/eau **45/55 v/v**
 Pentane sulfonate Na 5.10^{-3} M



Colonne : μ Bondapak C₁₈, 30×0,40 cm, 10 μ m; Débit : 2 mL/min;
 Phase mobile : MeOH/eau + **acide acétique 1%** + **réactif appariement d'ions**



7. Comment optimiser une séparation ? Augmenter la température

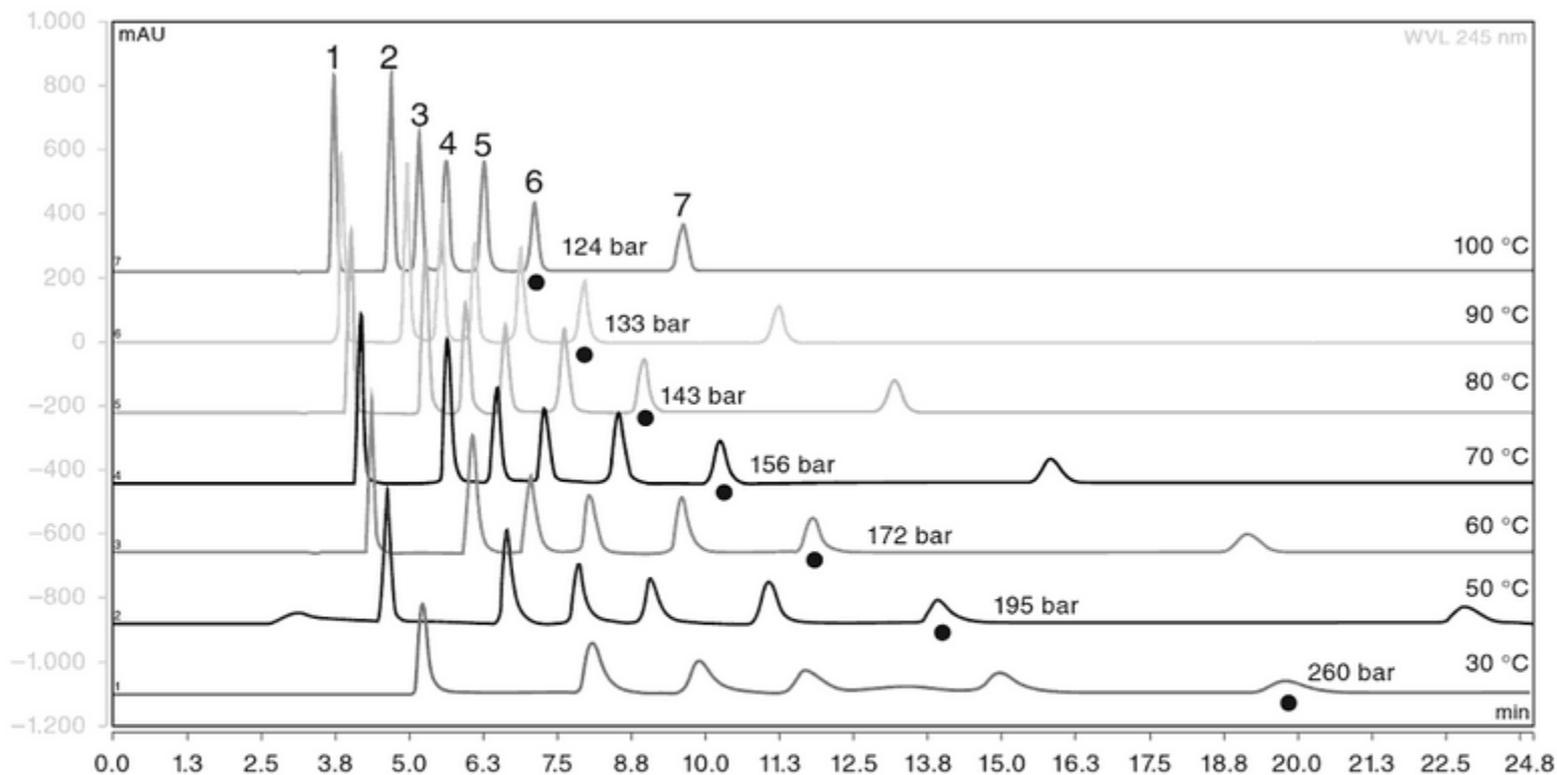


Figure 2.11 Separation of alkylphenones on a C18-modified polyvinyl alcohol (PVA) phase over a wide range of temperature. Column: Shodex® ET-RP1 4D 5 µm, 250 mm × 3 mm; eluent: H₂O/MeOH/25/75

v/v; flow: 0.5 ml/min; peaks: (1) acetophenone, (2) propiophenone, (3) butyrophenone, (4) pentanophenone, (5) hexanophenone, (6) heptanophenone, (7) octanophenone.



7. Comment optimiser une séparation ? Augmenter la température

Viscosité des solvants diminue avec la température

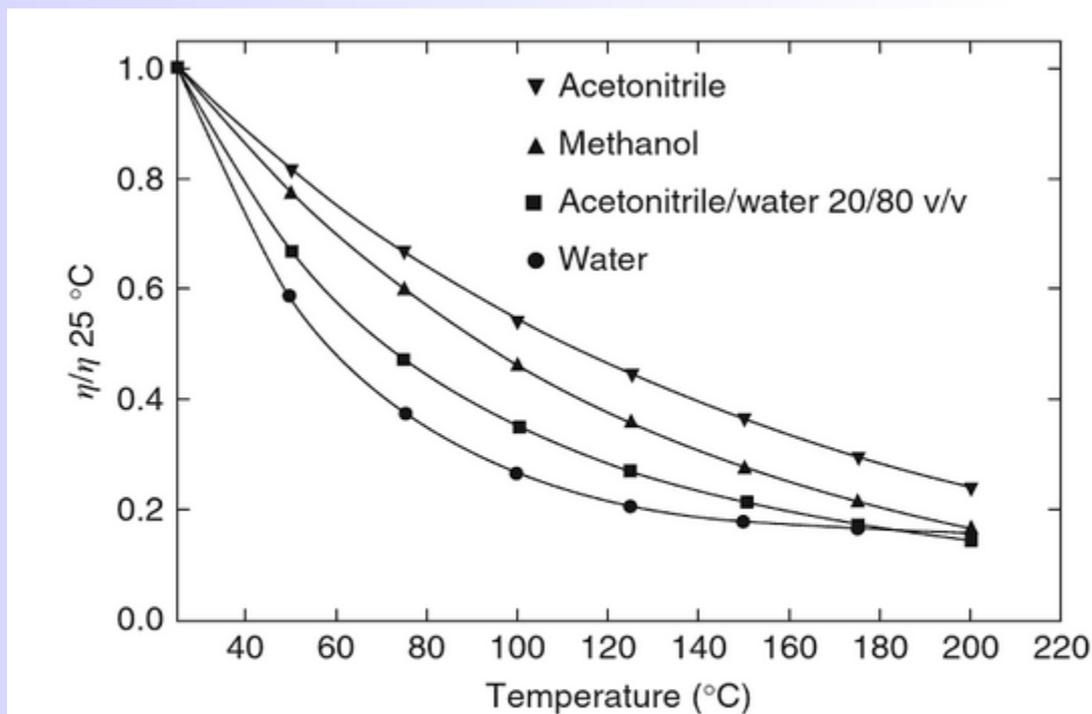
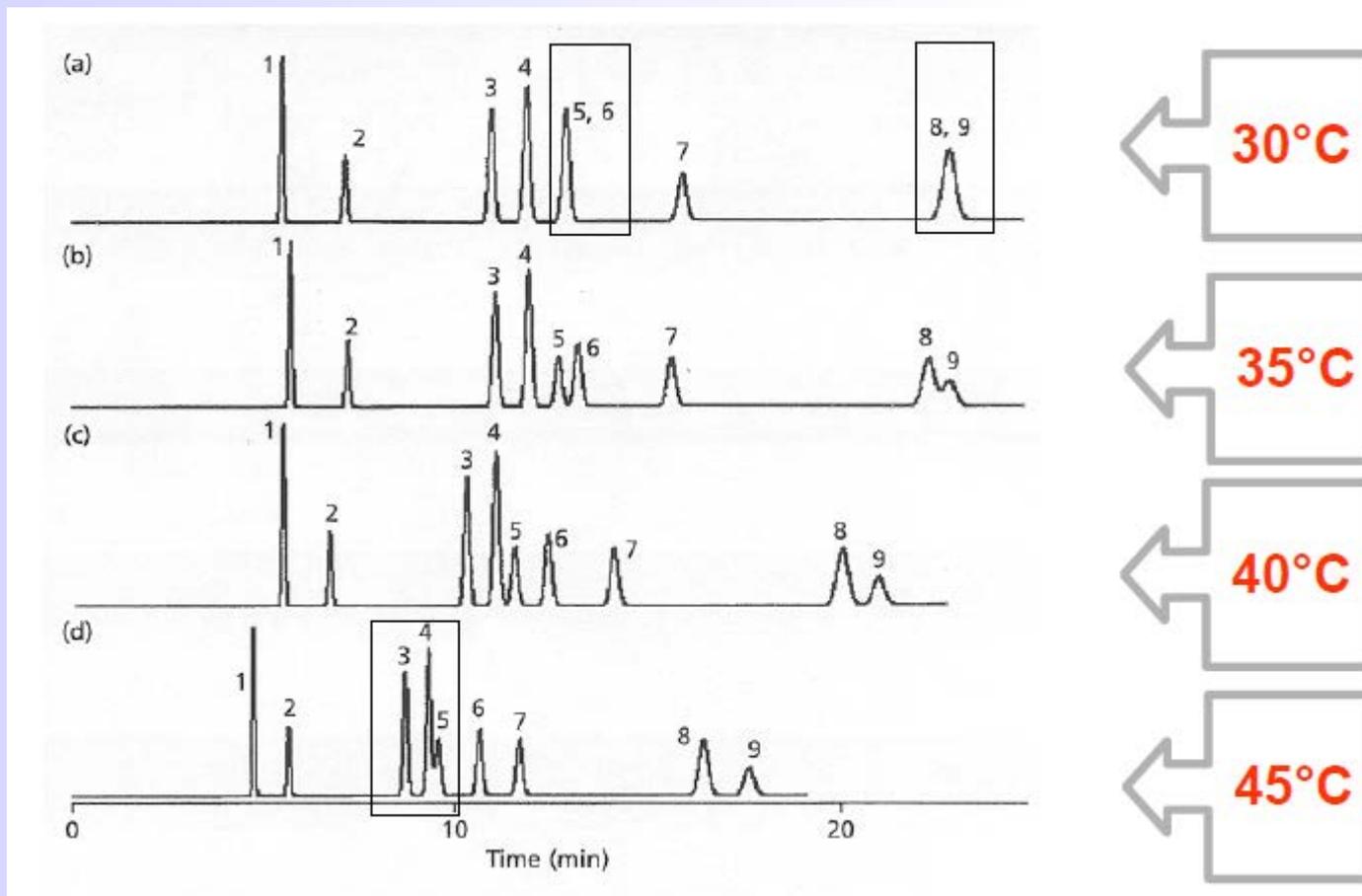


Figure 2.14 Dependence of the (dynamic) viscosity η on temperature for three representative HPLC solvents and one acetonitrile–water mixture. Curves show the progression as relative values of η related to the viscosity at 25°C.

The HPLC Expert: Possibilities and Limitations of Modern High Performance Liquid Chromatography (2016)



7. Comment optimiser une séparation ? Augmenter la température



7. Comment optimiser une séparation ? En résumé

Bonne séparation = compromis entre résolution et temps d'analyse

- Choix de la colonne (remplissage, phase, diamètre, longueur...)
- Choix du débit
- Choix des éluants
- Mode d'élution
 - Isocratique = PM de composition constante
 - gradient d'élution = composition variable dans le temps
- Température du four
 - Si T augmente, viscosité des solvants diminue, pics plus fins

Qu'avez-vous retenu du cours ?

Le temps écoulé entre l'injection et la détection d'un composé non retenu est

- A. le temps mort
- B. le temps d'analyse
- C. le temps de rétention
- D. le temps court

Le temps écoulé entre l'injection et la détection d'un composé non retenu est

- A. le temps mort
- B. le temps d'analyse
- C. le temps de rétention
- D. le temps court

Le chromatogramme est le tracé de _____ en fonction de _____

- A. La concentration de l'analyte en fonction du temps
- B. la concentration du solvant fort en fonction du temps
- C. la largeur des pics en fonctions du temps
- D. la réponse du détecteur en fonction du temps

Le chromatogramme est le tracé de _____ en fonction de _____

- A. La concentration de l'analyte en fonction du temps
- B. la concentration du solvant fort en fonction du temps
- C. la largeur des pics en fonctions du temps
- D. la réponse du détecteur en fonction du temps

La séparation entre deux pics successifs est correcte lorsque _____ est supérieur(e) à 1,5.

- A. La sélectivité
- B. Le facteur de rétention
- C. La résolution
- D. Le nombre de plateaux théoriques

La séparation entre deux pics successifs est correcte lorsque _____ est supérieur(e) à 1,5.

- A. La sélectivité
- B. Le facteur de rétention
- C. La résolution
- D. Le nombre de plateaux théoriques

Le détecteur UV est un détecteur universel.

A. VRAI

B. FAUX

Le détecteur UV est un détecteur universel.

A. VRAI

B. FAUX



Lorsque la phase stationnaire est en silice,

- A. les composés apolaires sont élués en dernier
- B. le mécanisme de rétention est l'absorption
- C. le solvant fort est le moins polaire
- D. Aucune de ces propositions n'est correcte



Lorsque la phase stationnaire est en silice,

- A. les composés apolaires sont élués en dernier
- B. le mécanisme de rétention est l'absorption
- C. le solvant fort est le moins polaire
- D. Aucune de ces propositions n'est correcte



Licence Professionnelle Métrologie chimique et nucléaire
2024-2025 UE XLP5CE033

Les techniques chromatographiques- HPLC et GC

Stéven RENAULT
steven.renault@cnr-s-imn.fr

Maître de conférences