



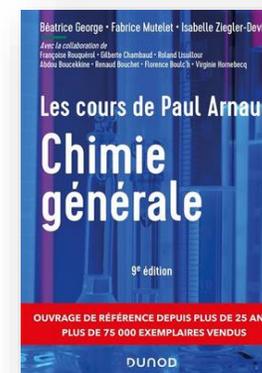
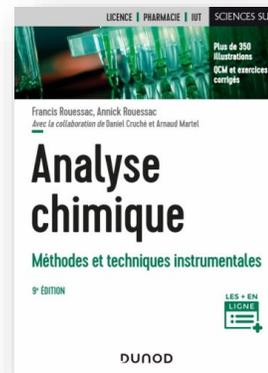
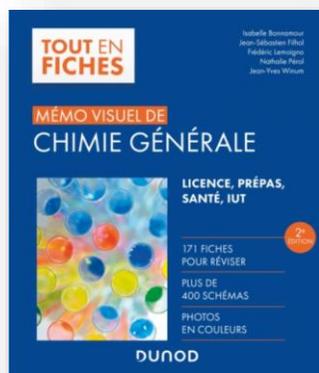
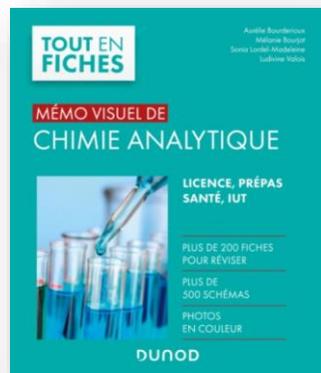
# Techniques Chromatographiques

L2 – Faculté de Chimie de Strasbourg



# Les lectures impératives

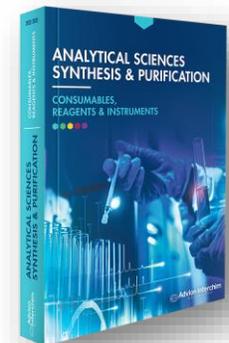
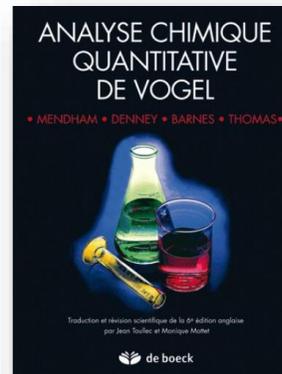
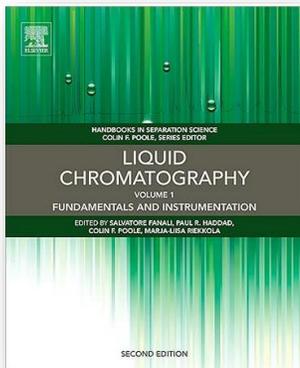
- ✗ Bourderieux A., Bourjot M., Lordel S., Valois L., *Mémo Visuel de Chimie Analytique*, Tout en fiches, Dunod 2020.
- ✗ Bonnamour I., Filhol J.S., Lemoigno F., Pérol N., Winum J.Y. *Mémo Visuel de Chimie Générale*, Tout en fiches, 2<sup>ème</sup> édition, Dunod 2022.
- ✗ Rouessac F., Rouessac A. *Analyse Chimique Méthodes et techniques instrumentale*, 9<sup>ème</sup> édition, Dunod, Paris, 2019.
- ✗ Arnaud P., *Les cours de Paul Arnaud Chimie Générale*, 8<sup>ème</sup> édition, Dunod, Paris, 2016.





# Les lectures pour aller plus loin

- ✗ Poole C., Fanali S., et al *Liquid Chromatography : Fundamentals and Instrumentation*, 2<sup>nd</sup> Edition, Elsevier, Juillet 2017.
- ✗ Vogel A., Mendham J., Denney R. C., Barnes J. D., *Analyse Chimique Quantitative De Vogel*, 6<sup>ème</sup> édition, De Boeck, 2006.
- ✗ Caude M. Jardy A. *Chromatographie en phase liquide Théorie et méthode de séparation* PE 1 455, Technique de l'ingénieur, 1994
- ✗ Arpino P. *Chromatographie en phase Gazeuse* P 1 485, Technique de l'ingénieur, 1996
- ✗ *Analytical Sciences Synthesis & Purification – Consommables Reagents & Instruments*, Interchim 2024 - 2025





Avant de détailler les différents éléments composant une chromatographie en phase liquide, faisons le point sur les différents systèmes de chromatographie liquide :

## × HPLC – High Performance Liquid Chromatography

- Chromatographie de partage (normal ou inverse)
- Chromatographie d'absorption (normal ou inverse)

## × IC – Ionic Chromatography

- Cationique
- Anionique

## × SEC – Steric Exclusion Chromatography

- Perméation sur gel = solvant organique (souvent THF)
- Filtration sur gel = solvant aqueux



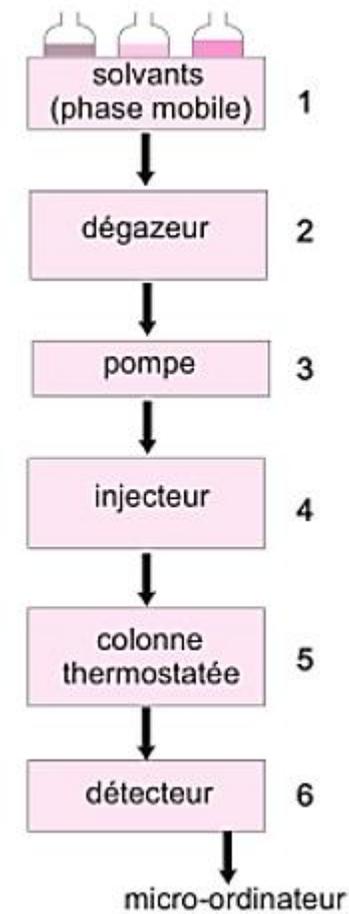
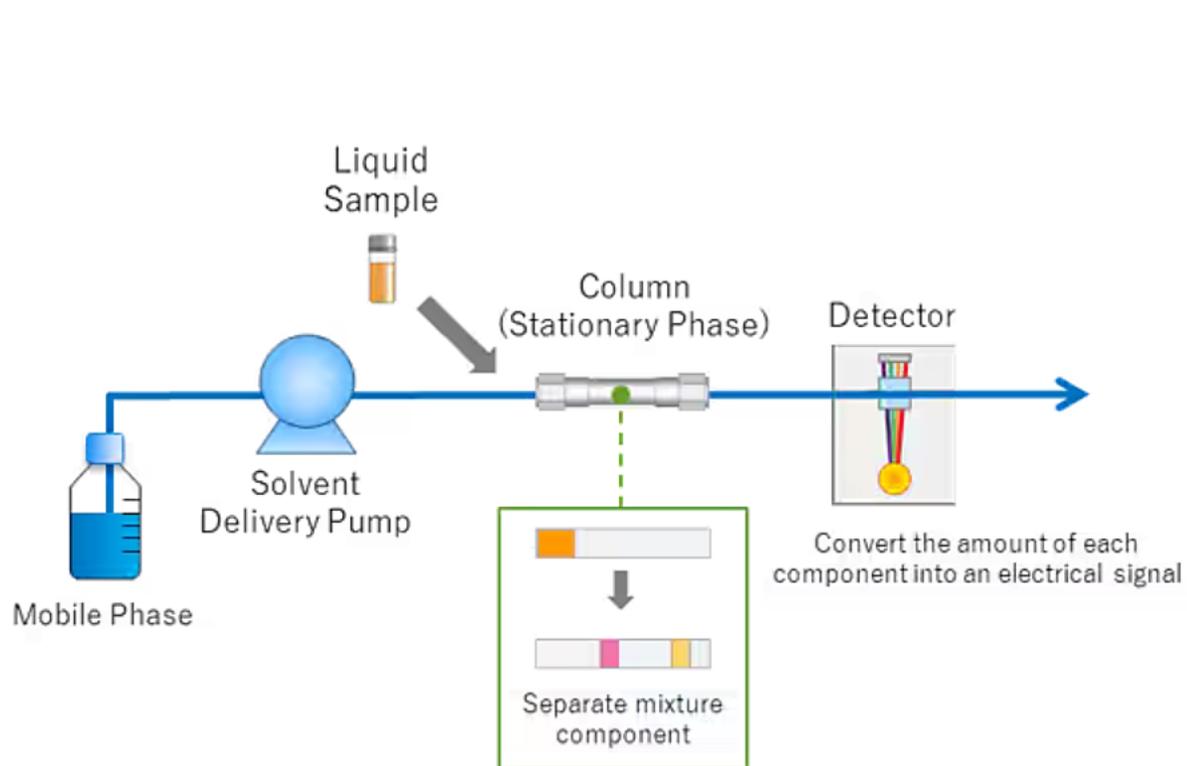
# Le programme

- × **Principe général**
- × **Avant l'injecteur**
  - Dégazeur
  - Mélangeur
  - Pompes
- × **L'injecteur**
  - Vanne 6 voies
- × **Les colonnes**
  - Dimension
  - Phase stationnaire
  - Débit
  - Séparation
- × **Les phases mobiles**
  - Force éluante
  - pH
  - Isocratique VS Gradient
- × **Les détecteurs**





# HPLC Principe général





# HPLC Principe général

✕ L'HPLC ou LC = séparation de composé à l'état liquide (ou solvaté)

→ Les composés **thermosensibles**

→ Les composés de **masses molaires élevées**.

✕ Phase **normale**

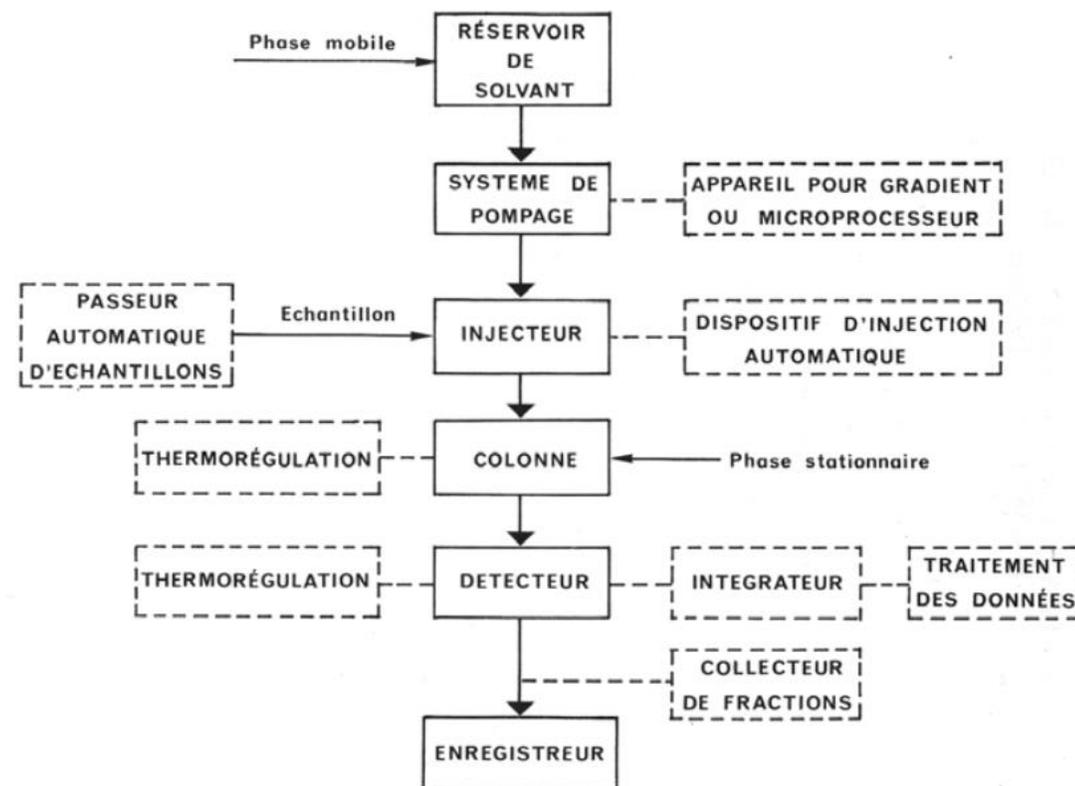
→ Phase stationnaire polaire / phase mobile apolaire

→ Souvent pour la **purification** de produit

✕ Phase **inverse**

→ Phase stationnaire apolaire / phase mobile polaire

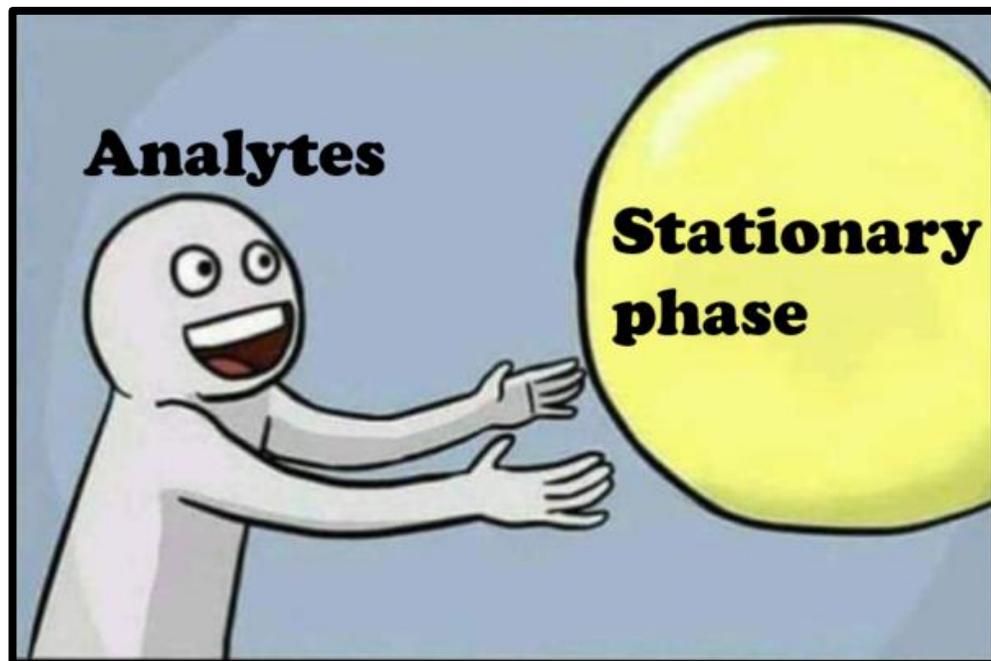
→ Plus courante pour l'**analyse** de molécule.





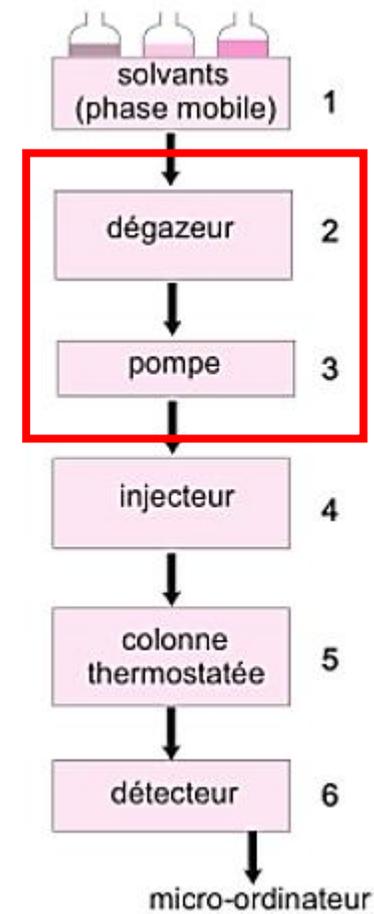
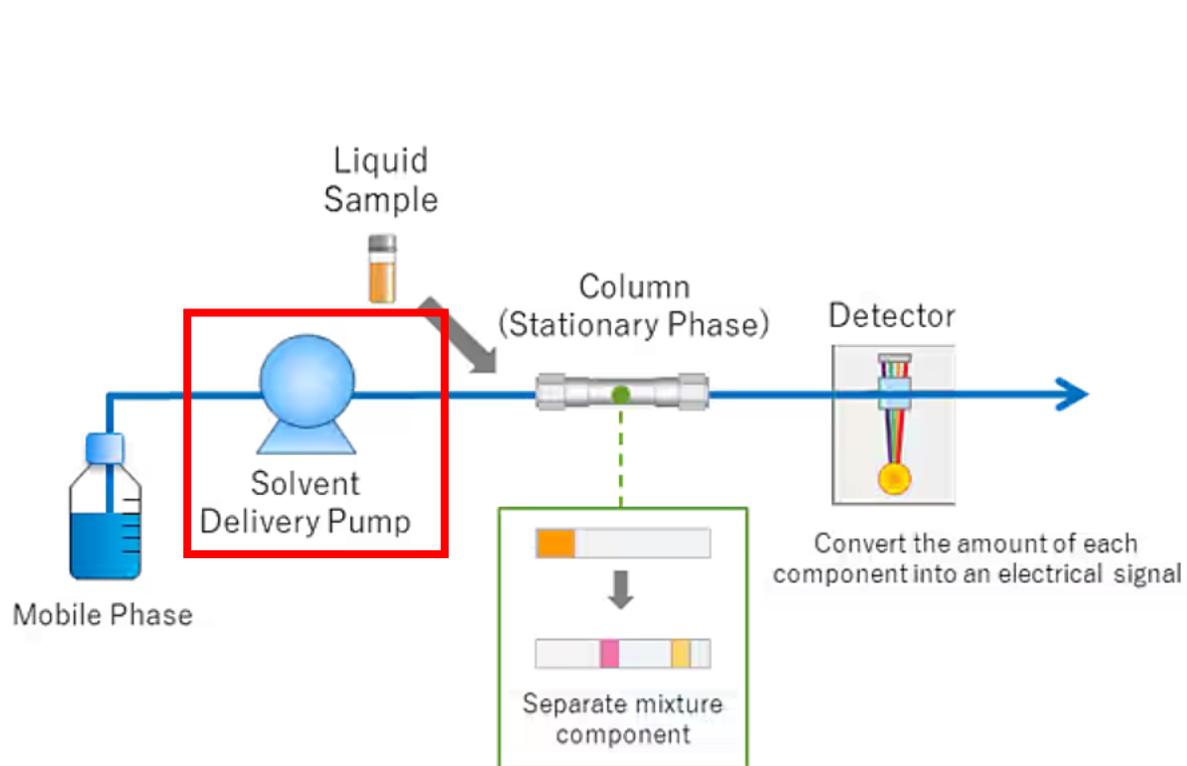
# Un peu de légèreté

✗ Interactions avec le solvant et la colonne !!!





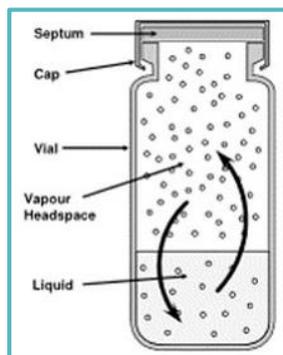
# HPLC Principe général



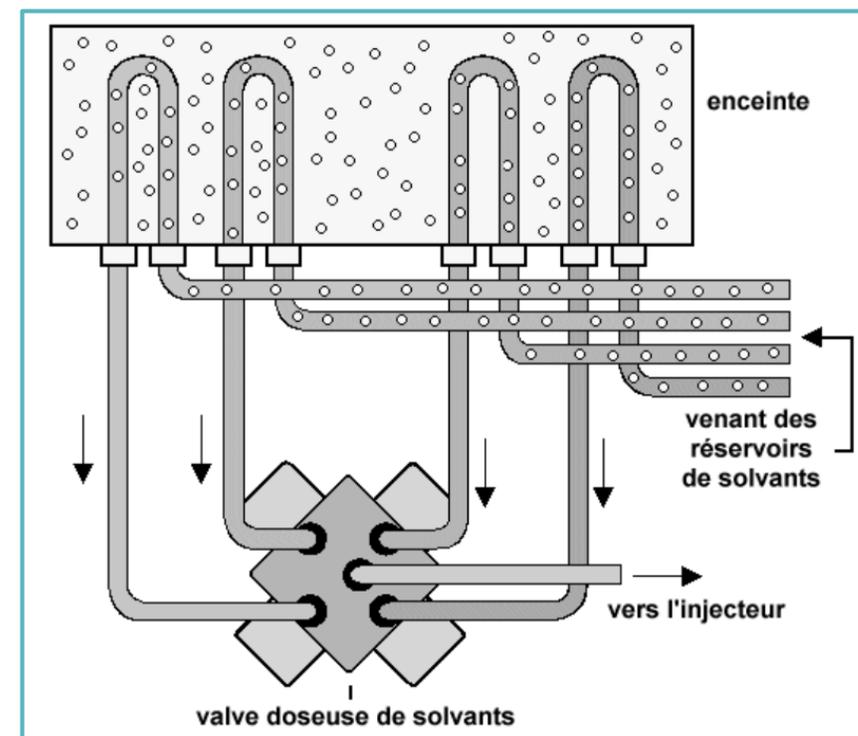


# Le dégazeur

Les **solvants** (phase mobile) constituent avec la **colonne** (phase stationnaire) les deux points centraux de l'HPLC. Ils seront détaillés plus tard. Toutefois pour comprendre l'existence de chaque élément de l'instrument il est bon de se rappeler qu'il existe en permanence un équilibre entre les phases liquide et vapeur.

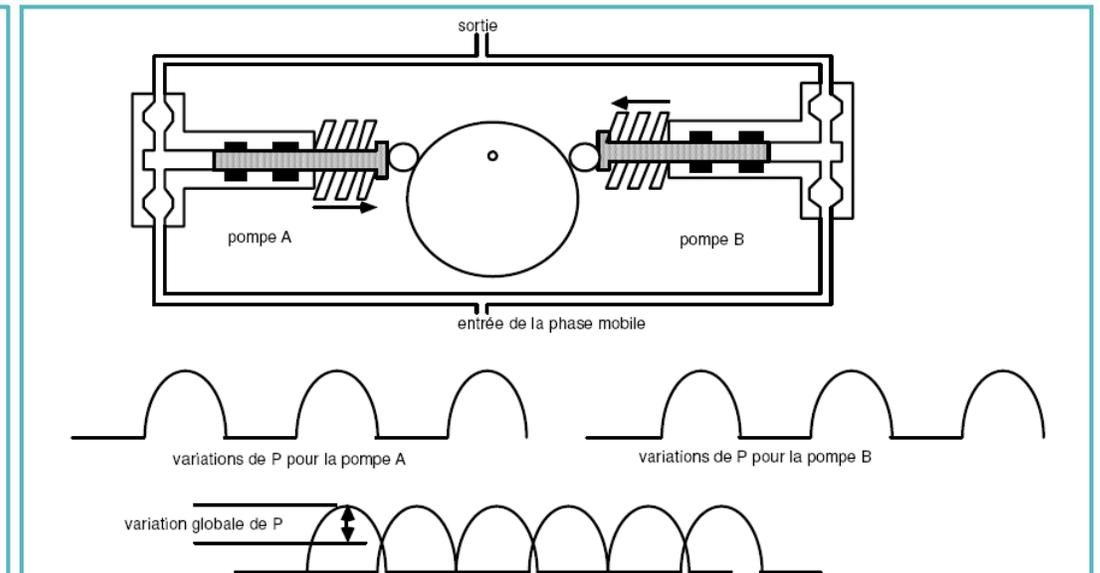
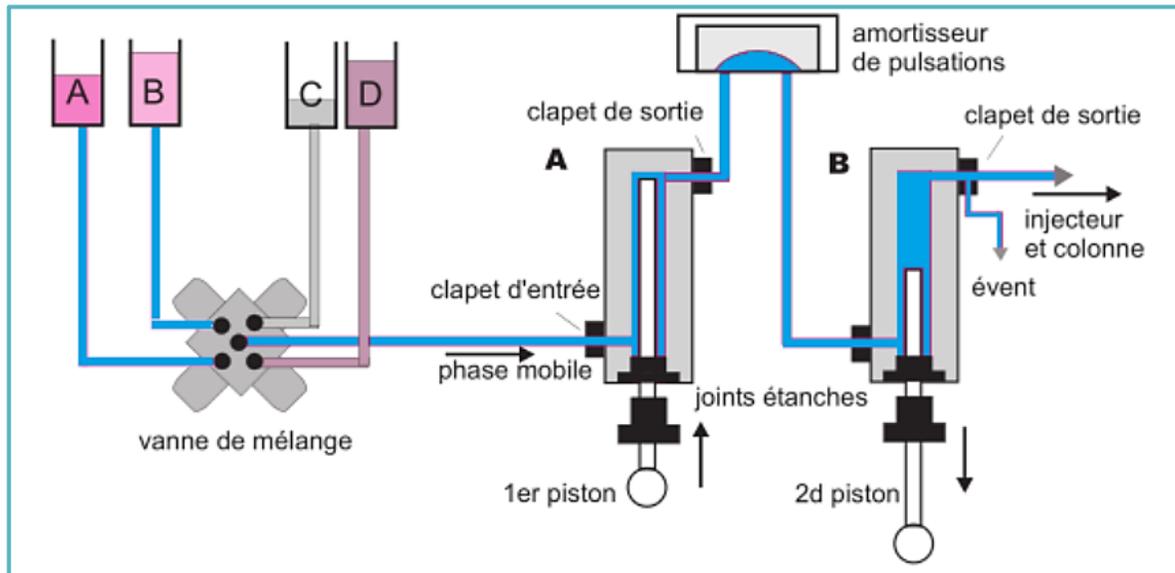
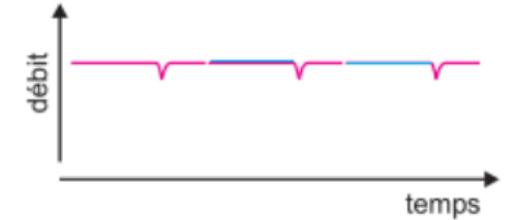


- ✗ Les solvants contiennent du gaz dissous (c'est de l'air évidemment!)
- ✗ Le **dégazeur** a pour rôle d'éliminer ce gaz.
  - Il peut être avant ou après le mélangeur.
  - Il est forcément avant la pompe.
- ✗ Le **mélangeur** a pour rôle de mélanger mécaniquement les solvants
  - La proportion de mélange est gouvernée par les pompes en aval.
  - Composition fixe en solvant = **isocratique**
  - Composition variable pendant l'analyse = **gradient d'éluion**



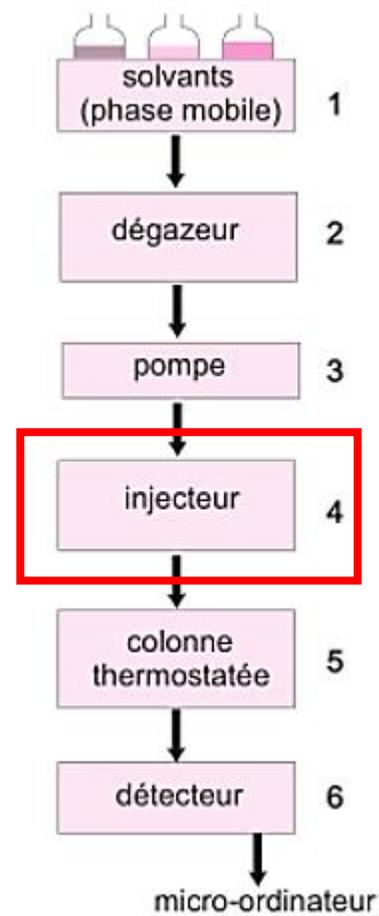
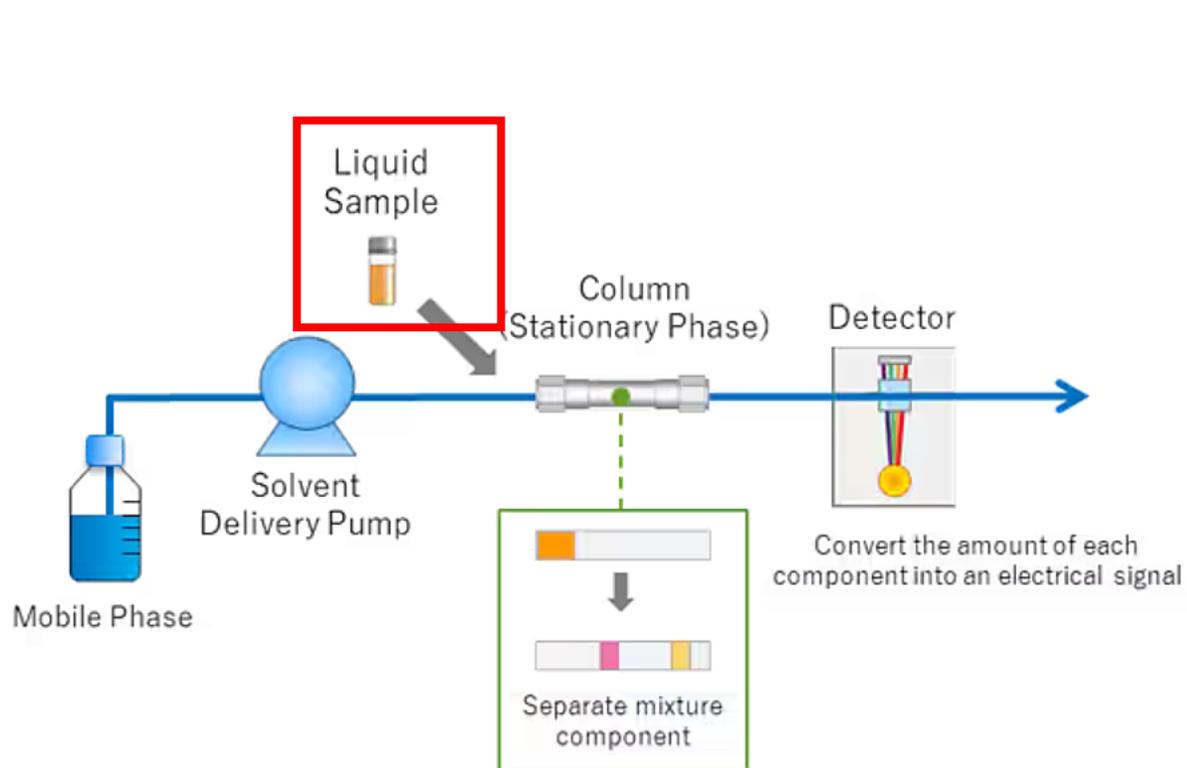
# Le système de pompe

- ✗ Le débit doit être le plus régulier possible. Ce sont des **pistons** qui entraînent la phase mobile.
- ✗ Il existe des systèmes de doubles pistons en **série** ou **parallèle**.
- ✗ Le débit délivré est compris entre quelque  $\mu\text{L}/\text{min}$  et quelques  $\text{mL}/\text{min}$
- ✗ Le débit visé dépend de la colonne et de la pression que pourra supporter le système :
  - 400 Bar HPLC
  - 600 Bar UHPLC
  - 1200 Bar UPLC



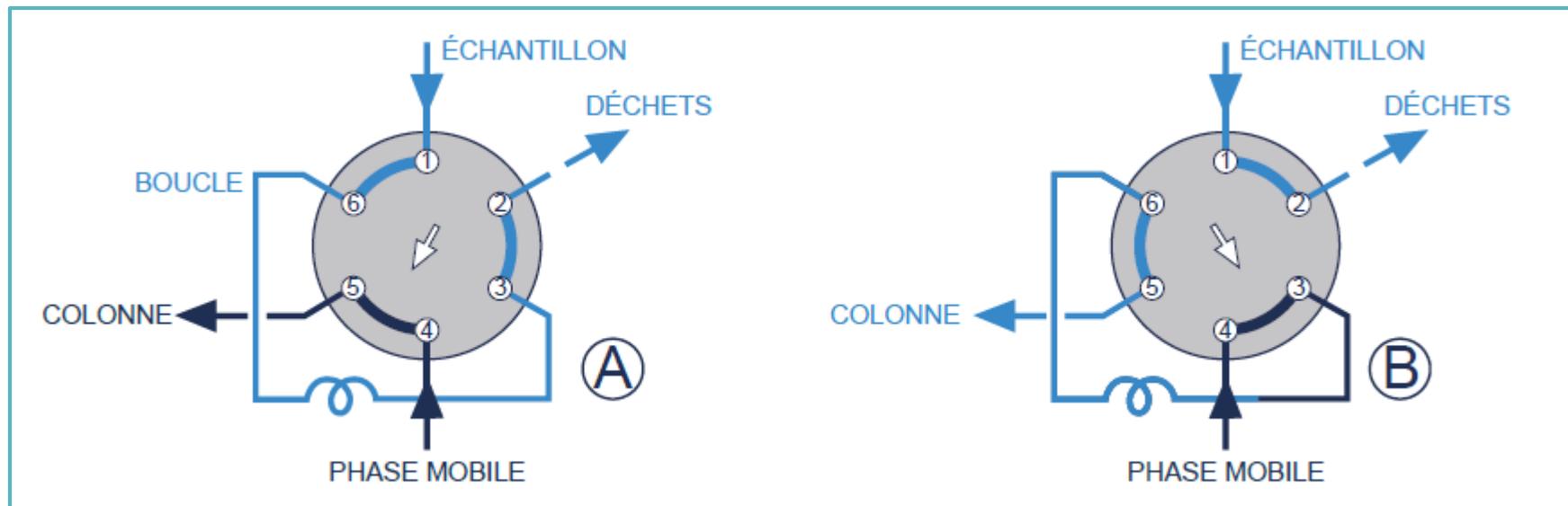


# HPLC Principe général



# Le système d'injection

- ✗ L'injecteur permet d'introduire l'échantillon. Cette étape est maintenant quasi-systématiquement automatisée.
- ✗ Pour éviter une variation locale de la polarité de la phase mobile il est conseillé de **solubiliser l'échantillon** dans un solvant de polarité équivalente à la **phase mobile**.
- ✗ L'injection ne doit pas interrompre la circulation de la phase mobile dans le système.
- ✗ Principe de la **boucle d'injection** :

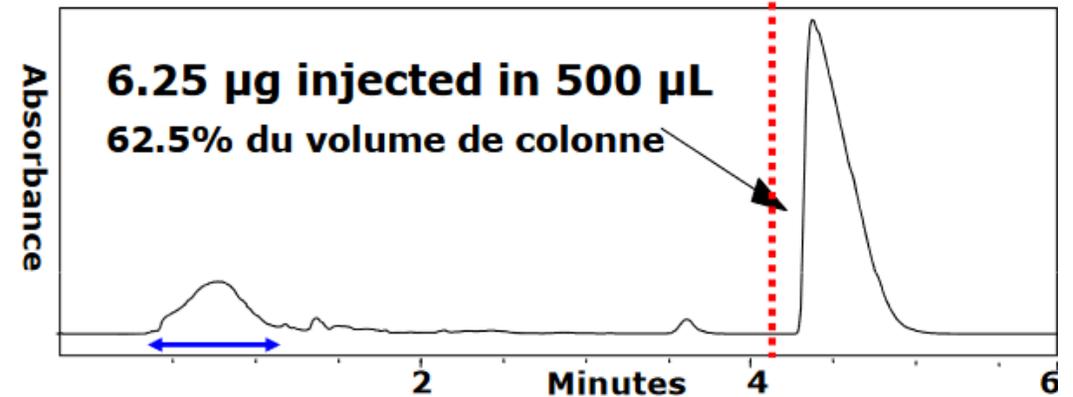
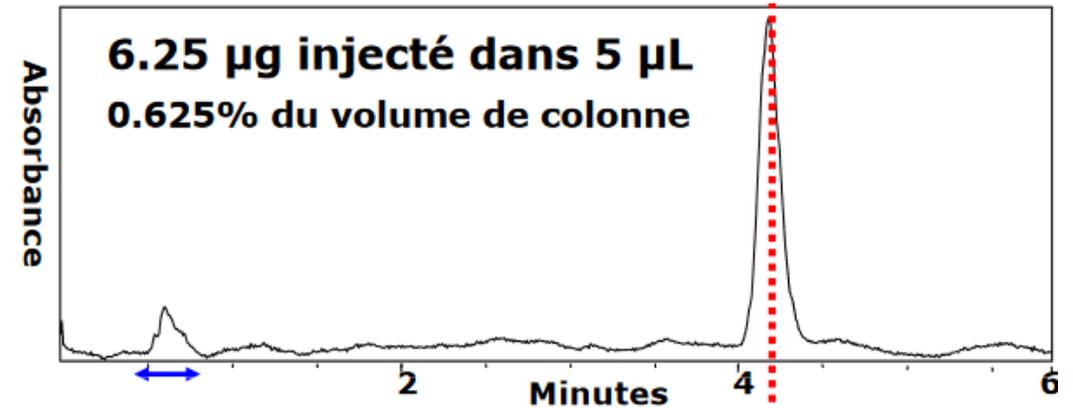




# Le système d'injection

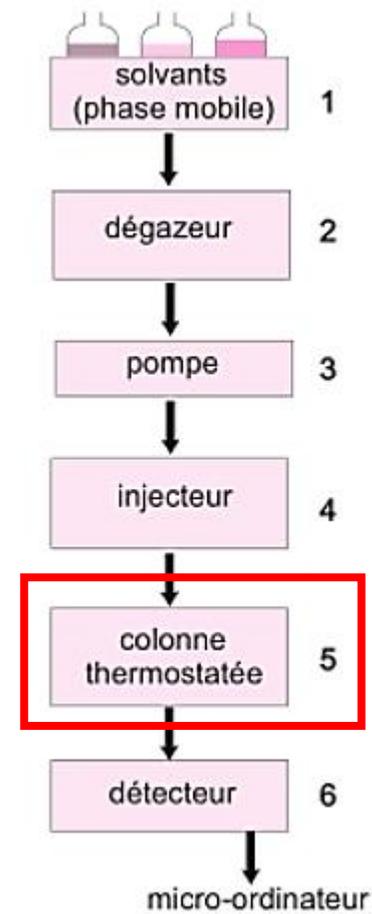
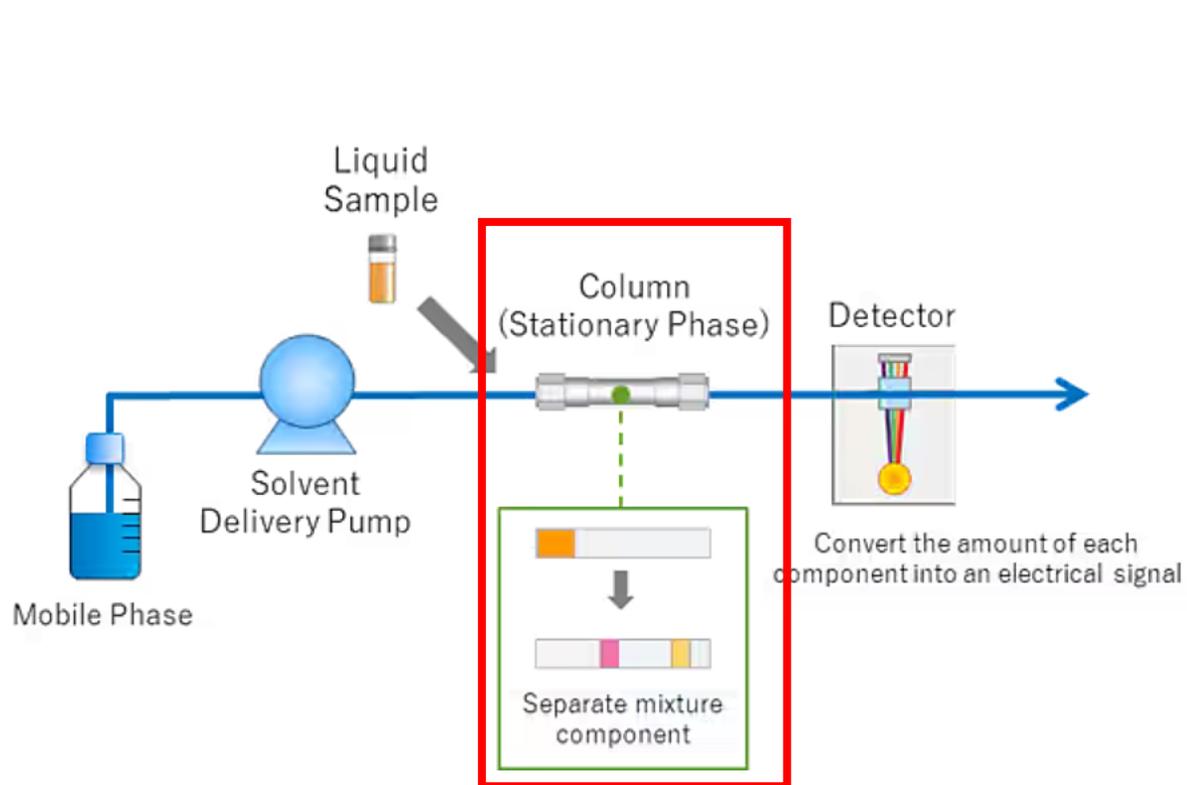
- ✗ Le **volume d'injection** ne doit pas dépasser **1 à 5 % du volume mort** de la colonne.
- ✗ Colonne 50 mm x 4,6 mm x 5  $\mu\text{m}$

- La **même masse** d'analyte est injectée
- Le **volume** injecté est **différent**
- Le volume de la colonne est d'environ 800  $\mu\text{L}$
  
- Elargissement des pics (cf pic 1)
- Décalage des tr (cf pic 1 et 2)
- Déformation des pics (cf pic 2)





# HPLC Principe général





# La phase stationnaire

## Dimensions des colonnes

Les colonnes représentent le cœur du système de séparation. Elles contiennent la phase stationnaire. Elle se situe le plus souvent dans un **four** pour maintenir des **conditions** d'analyse **constantes** entre deux analyses.

✘ Leur taille peut varier :

→ **Longueur** : de 3 cm à 30 cm.

→ **Diamètre interne** : 0,5 mm à 5 cm

→ Diamètre des particules de silice de phase stationnaire (**Granulométrie**) : 1,7  $\mu\text{m}$  à 5  $\mu\text{m}$

✘ On définit alors le volume mort comme le volume de "vide" dans la colonne. En opposition au volume occupé par la phase stationnaire.

✘ On définit aussi la **porosité d'une colonne** :

$$\varepsilon = \frac{V_{\text{phase mobile}}}{V_{\text{colonne}}}$$

✘ La porosité (en générale de l'ordre de 0,6 à 0,8) elle tient compte de :

→ la porosité interstitielle ( $\approx 40\%$ )

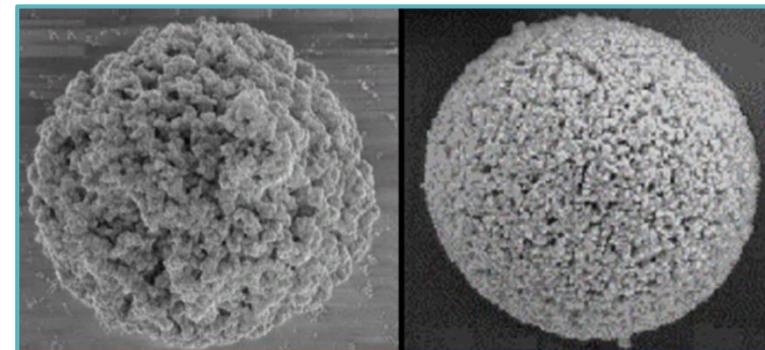
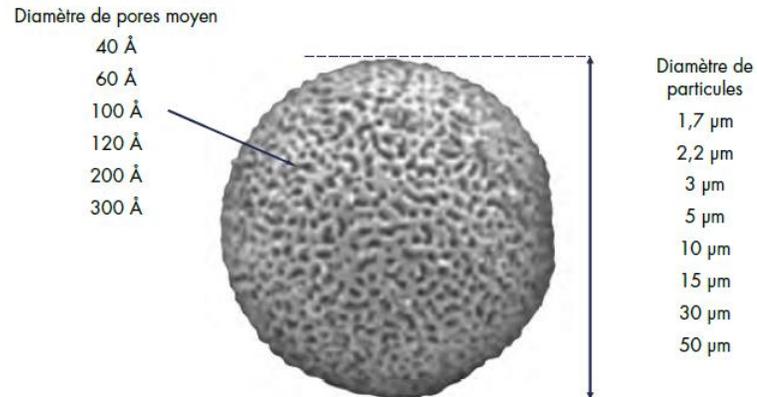
→ la porosité intracrystalline ( $\approx 30\%$ )





# La phase stationnaire

## La granulométrie



✘ La granulométrie est directement liée à l'efficacité de la colonne

Une faible granulométrie entraîne une meilleure efficacité de la colonne mais

- Plus la granulométrie est faible plus la pression augmente
- Plus la pression augmente moins la colonne peut être grande
- Plus la colonne est petite moins le volume d'injection est grand.

✘ Le débit de phase mobile sera donc directement lié à la granulométrie.

"Efficacité théorique plateaux/m"	"Ø des particules µm"	Applications
5 000	50	Flash purification SPE
20 000	15	Flash purification SPE Prep LC
33 000	10	Prep LC
80 000	5	Analytique
130 000	3	Analytique
180 000	2,2	Analytique UHPLC
220 000	1,7	UHPLC



## Le débit dans la colonne

- ✗ Les dimension de la colonne permettent de connaitre le débit de travail.
- ✗ Comme en CPG c'est un facteur avec lequel on s'abstiendra de jouer car il existe un optimum d'efficacité du débit.

### Paramètres usuels HPLC en fonction des dimensions des colonnes

Dimensions colonnes analytiques					Variable selon porosité et granulométrie des silices			
Dimensions mm	Section cm <sup>2</sup>	Volume cm <sup>3</sup>	Rapport / ø 4,6 mm	Rapport / ø 21,2 mm	Débit conventionnel mL/min	t <sub>zéro</sub> pour silice poreuse 5 µm secondes	Volume poreux moy 55 % cm <sup>3</sup>	Volume injectable maxi 1 % Volume poreux en analyse 1 % à 5 % Volume poreux en préparative
50 x 0,5	0,00196	0,0098	0,012	---	0,01	---	0,0054	0,05 µL
150 x 0,5	0,00196	0,0294	0,012	---	0,01	---	0,0162	0,15 µL
250 x 0,5	0,00196	0,0490	0,012	---	0,01	---	0,0270	0,3 µL
30 x 1,0	0,00785	0,0235	0,047	---	0,05	---	0,0129	0,1 µL
50 x 1,0	0,00785	0,0392	0,047	---	0,05	---	0,0216	0,2 µL
75 x 1,0	0,00785	0,0588	0,047	---	0,05	---	0,0323	0,3 µL
100 x 1,0	0,00785	0,0784	0,047	---	0,05	---	0,0431	0,4 µL
150 x 1,0	0,00785	0,1176	0,047	---	0,05	---	0,0647	0,6 µL
250 x 1,0	0,00785	0,1960	0,047	---	0,05	---	0,1078	1 µL
30 x 2,1	0,03460	0,104	0,208	---	0,2	---	0,057	0,6 µL
50 x 2,1	0,03460	0,173	0,208	---	0,2	---	0,095	1 µL
75 x 2,1	0,03460	0,260	0,208	---	0,2	---	0,143	1,5 µL
100 x 2,1	0,03460	0,346	0,208	---	0,2	---	0,190	2 µL
150 x 2,1	0,03460	0,519	0,208	---	0,2	---	0,285	3 µL
250 x 2,1	0,03460	0,865	0,208	---	0,2	---	0,476	5 µL

# La phase stationnaire

## La polarité

✘ Il existe différentes technologies de greffage. Elles permettent de faire varier la polarité et de modifier la porosité :

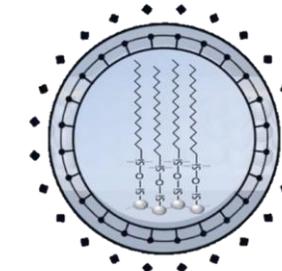
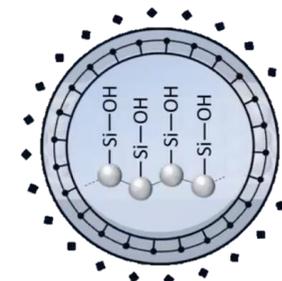


✘ Une colonne polaire verra la surface des particules de silice fonctionnalisée avec des silanols

- La phase stationnaire sera polaire
- La phase mobile devra être apolaire
- Cette configuration est appelée **Phase normale**

✘ Une colonne apolaire verra la surface des particules de silice fonctionnalisée avec des chaînes C18

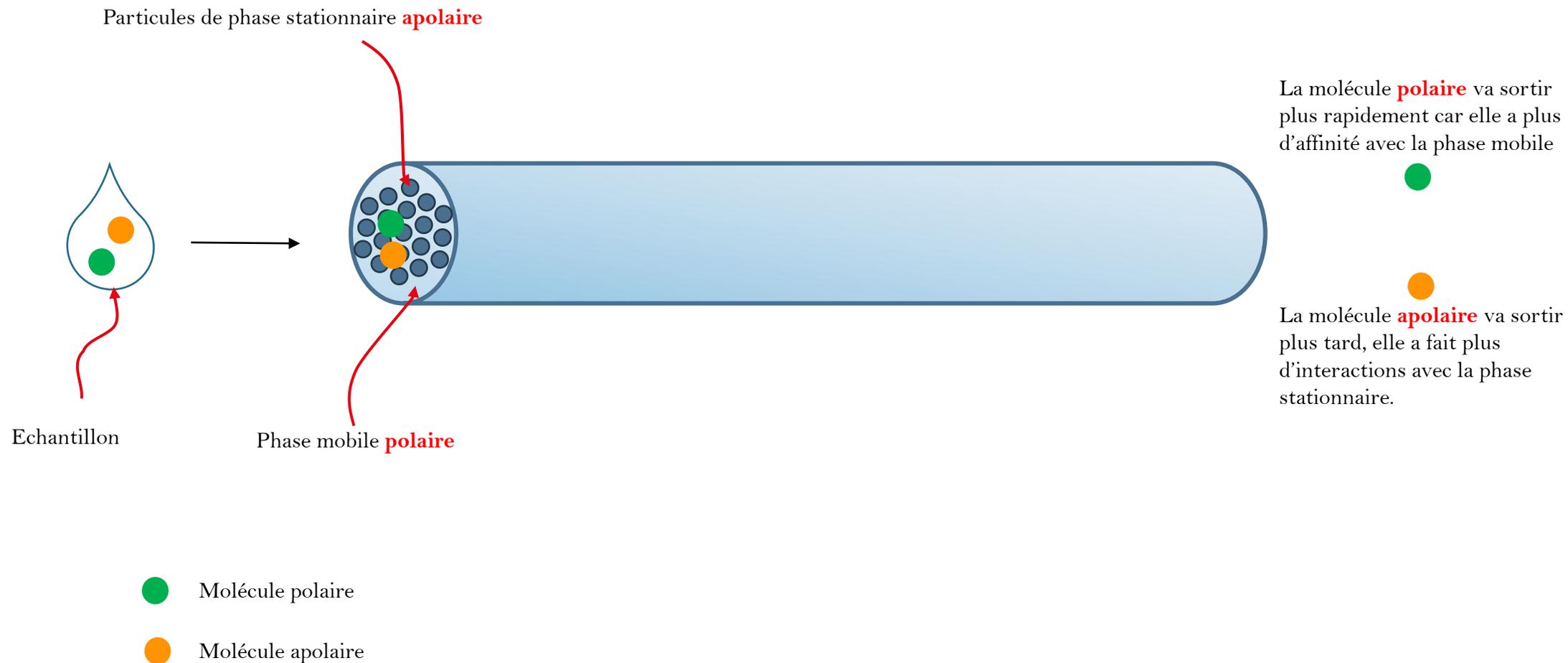
- La phase stationnaire sera apolaire
- La phase mobile devra être polaire
- Cette configuration est appelée **Phase inverse**





# Interactions dans la colonne

## La séparation





# Interactions dans la colonne

Log P



● Molécule très apolaire

● Molécule apolaire



Phase mobile **100% Eau**

Plus lent  
Mieux séparées



**La chromatographie liquide sera un compromis entre le temps de l'analyse et la qualité de la séparation**



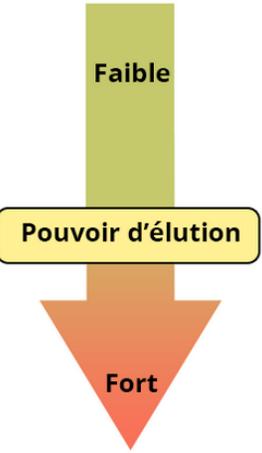
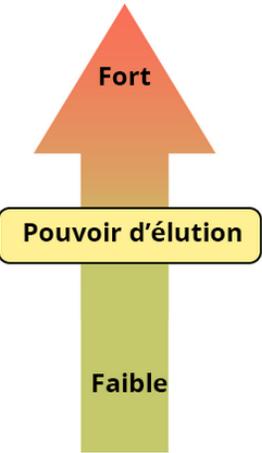
Phase mobile **100% MeOH**

Plus rapide  
Moins séparées



# La phase mobile

- ✘ La phase mobile est un point clé de la séparation en chromatographie liquide
- ✘ En **phase inverse** ou en **phase normale** les solvants polaire ou apolaire n'ont pas tous le même pouvoir d'éluion

Phase stationnaire polaire	Solvants classés par polarité croissante	Phase stationnaire apolaire
	Hexane Toluène Trichloroéthane Dichlorométhane Éther Acétate d'éthyle Acétonitrile Méthanol Eau	

✕ Illustration de la différence de force d'éluion figure 1 :

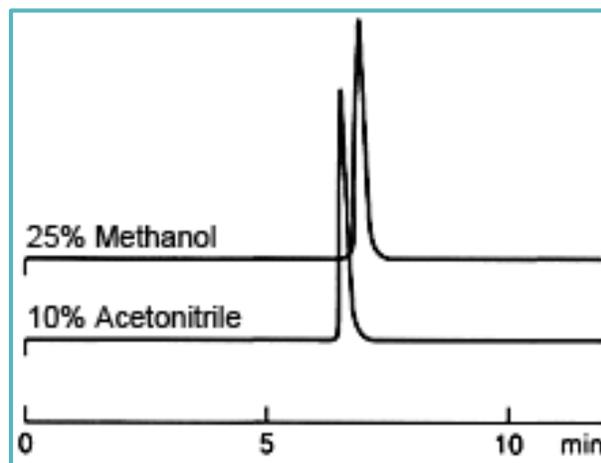


Figure 1 : pic de caféine

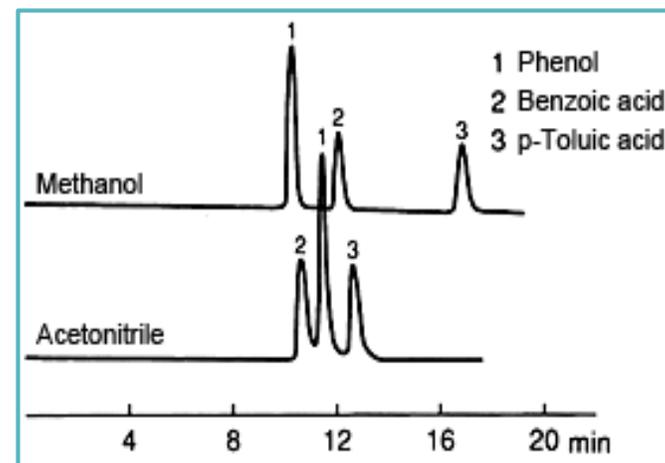
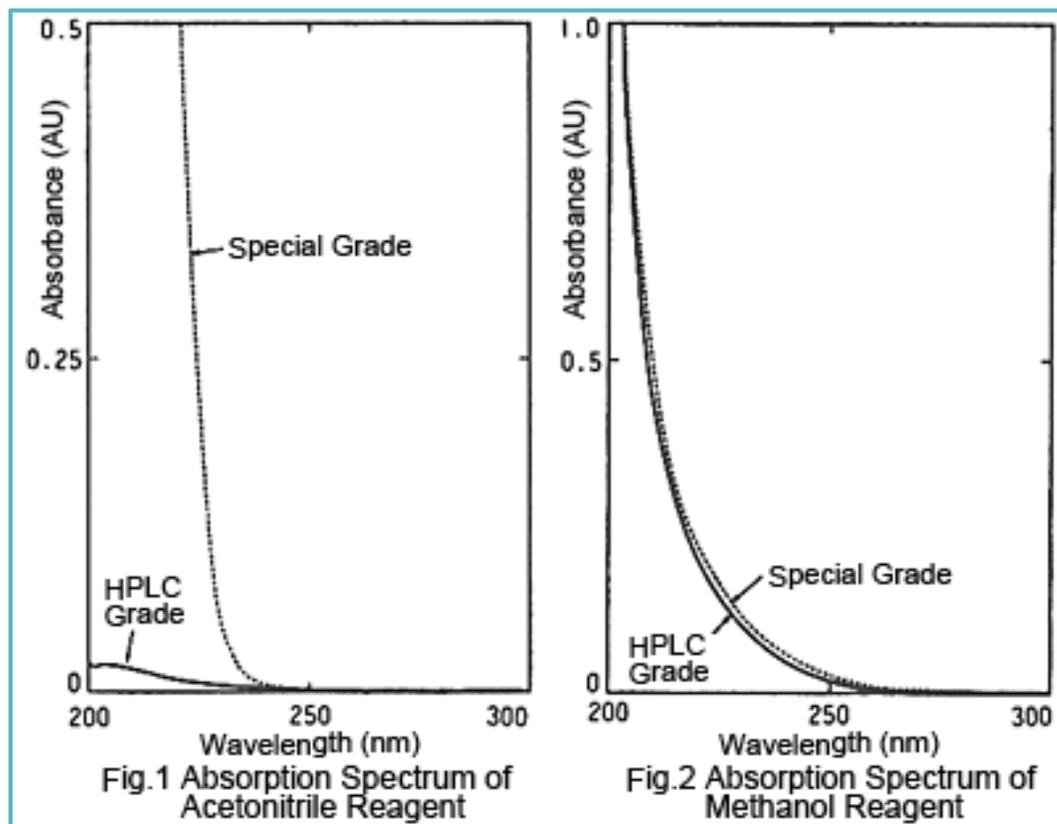


Figure 2 : effet de solvant

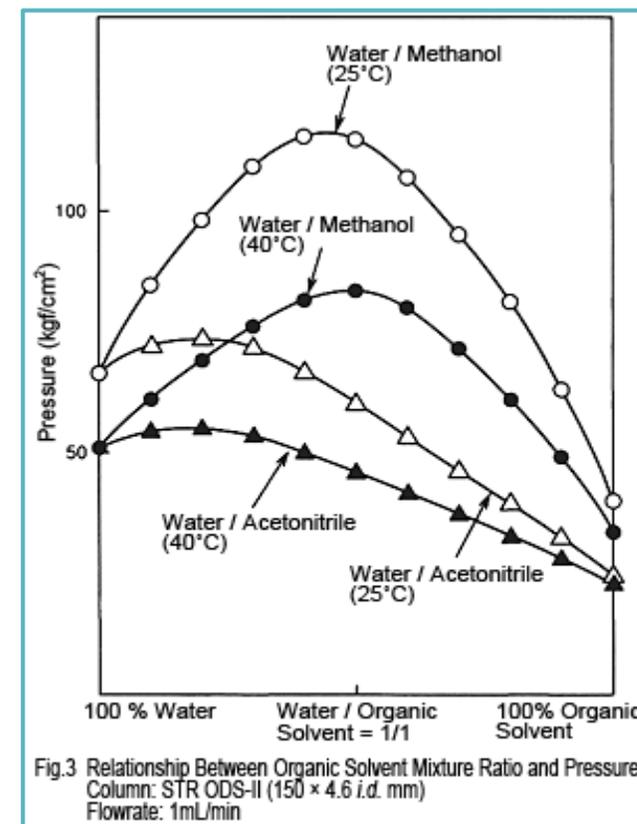
✕ Figure 2 le MeOH a la propriété d'être protique, contrairement à l'acétonitrile. Lors d'analyses de phénol ou d'acide phénolique, les protons labiles du solvant peuvent interagir et dans ce cas favoriser la séparation des molécules. La force d'éluion de l'ACN est supérieur à celle du MeOH.

# La phase mobile

✘ En phase inverse le plus souvent la phase mobile est composée d'H<sub>2</sub>O/Méthanol ou H<sub>2</sub>O/Acétonitrile



Impact sur la détection en UV

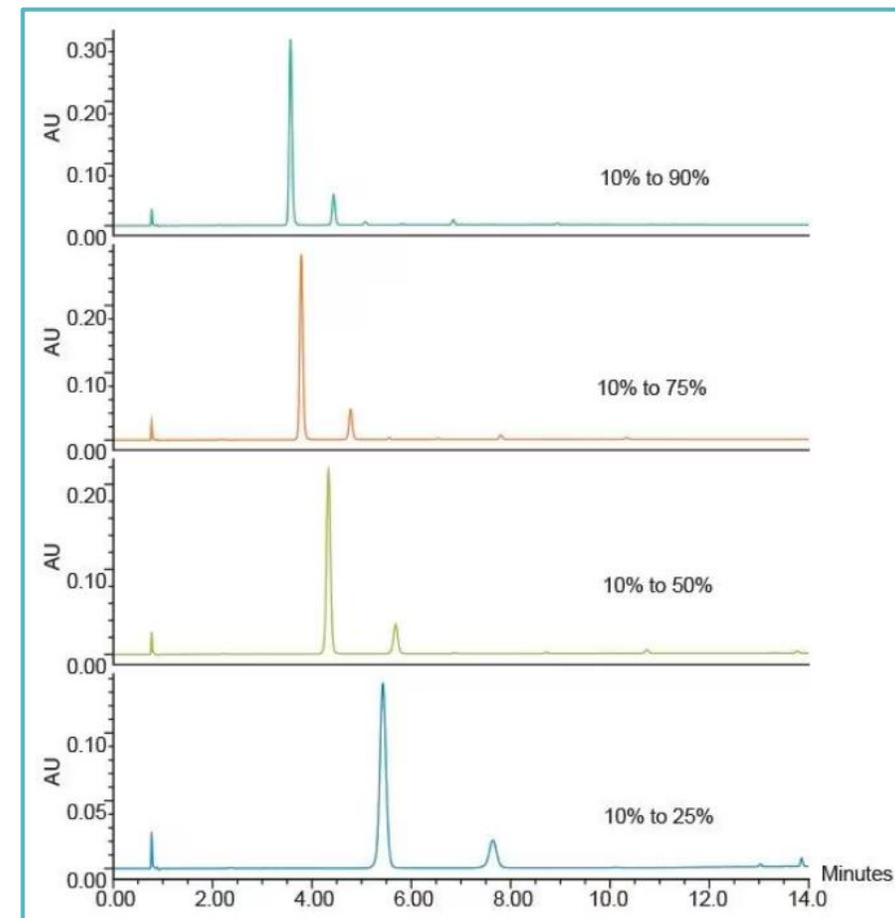


Impact sur la viscosité de la phase mobile  
Intérêt de travailler dans un four à T° constante



# La phase mobile

- ✘ La composition de la phase mobile conditionne la rétention des composés dans la colonne. Il est possible de faire varier cette composition pendant l'analyse pour gagner du temps ou optimiser certaines séparations. C'est le **gradient d'élution**.
- ✘ L'objectif des gradients de référence est de déterminer la concentration approximative de solvant nécessaire pour éluer les composés d'intérêt de la colonne. Ils partent généralement de la même concentration en solvant fort (10 %) et augmentent de façon linéaire jusqu'à 25, 75, 50 et 90-95 %.

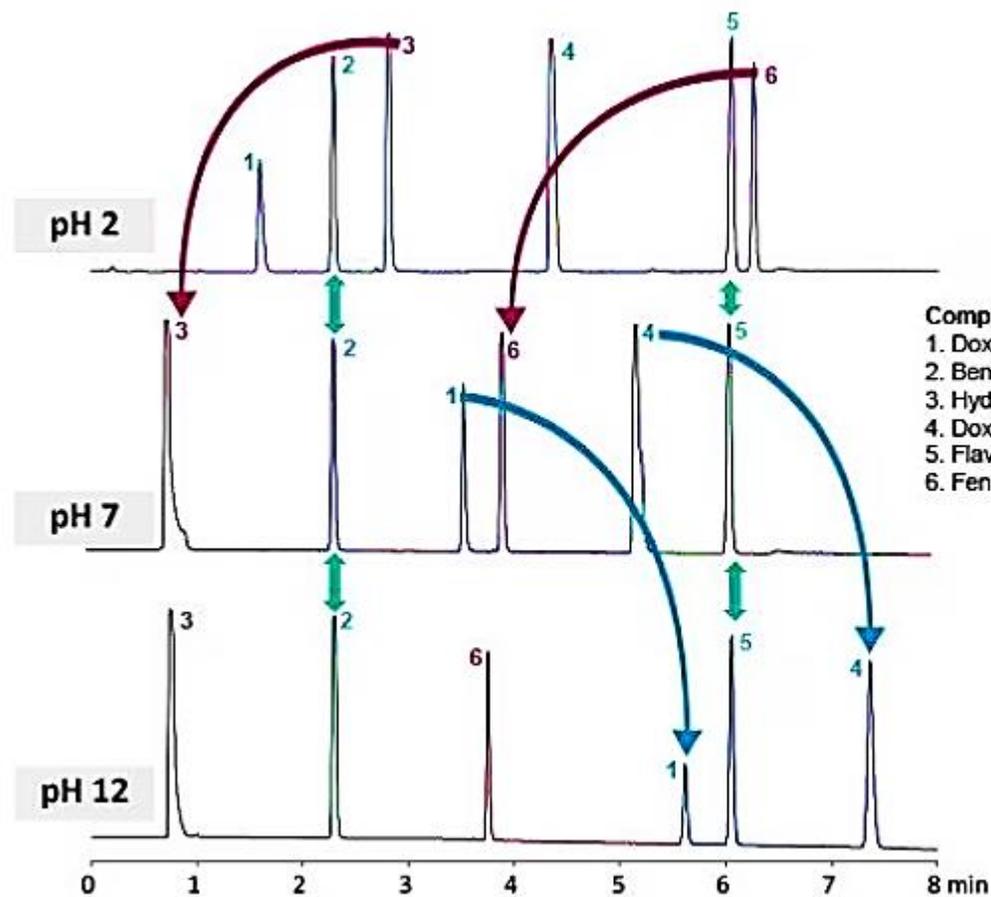




# La phase mobile

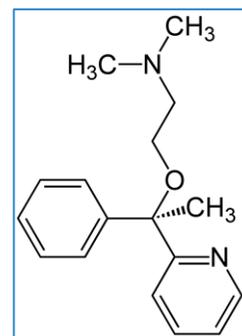
✗ Enfin le pH de la phase mobile sera à surveiller pour des raisons évidente d'influence sur la forme des analytes :

→ [Diagramme Chemicalize](#)

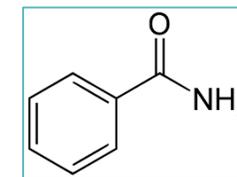


Compounds:

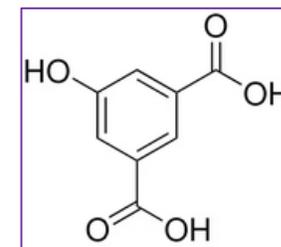
1. Doxylamine (BASIC)
2. Benzamide (NEUTRAL)
3. Hydroxyisophthalic Acid (ACIDIC)
4. Doxepin (BASIC)
5. Flavone (NEUTRAL)
6. Fenopropfen (ACIDIC)



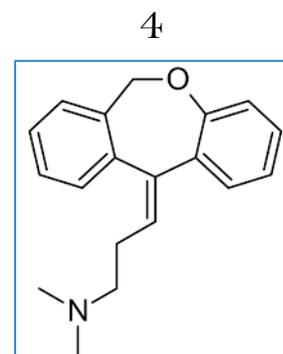
1



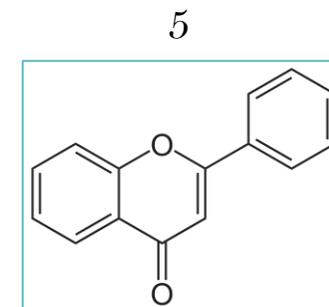
2



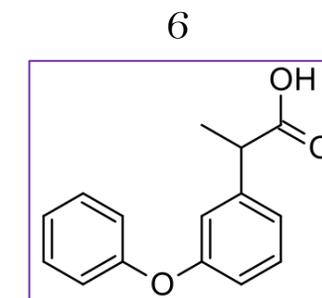
3



4



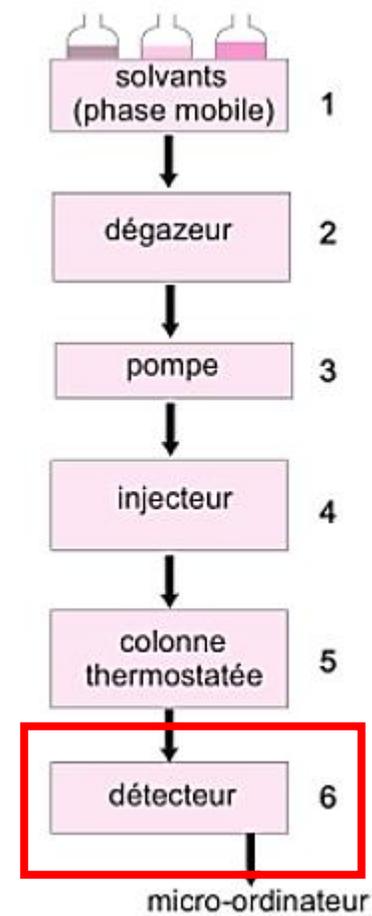
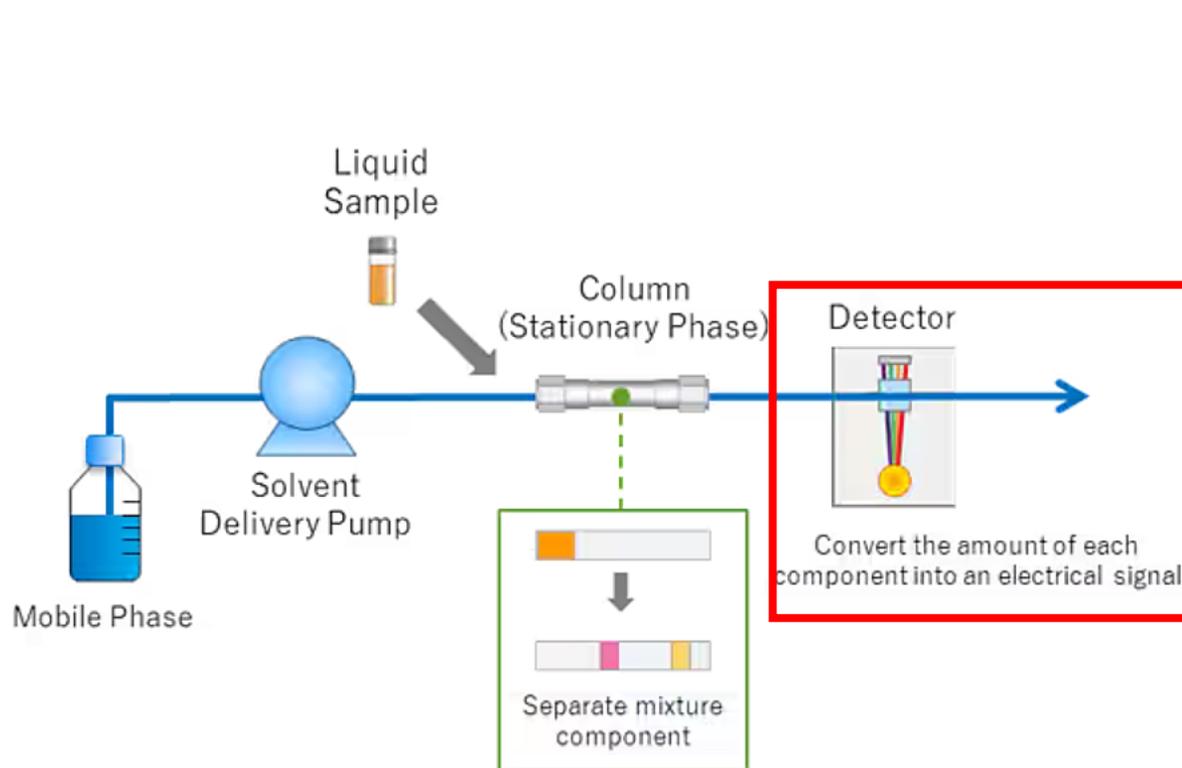
5



6

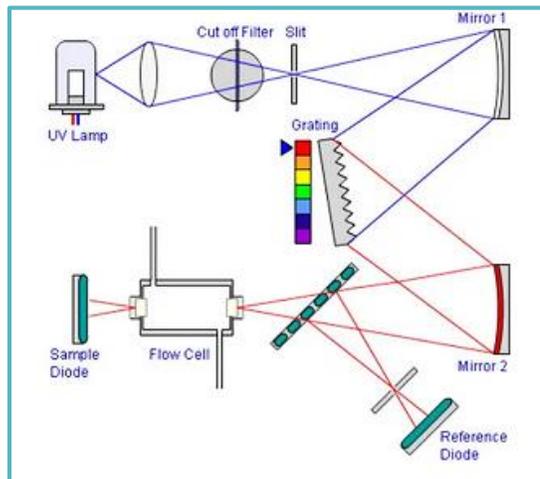


# HPLC Principe général

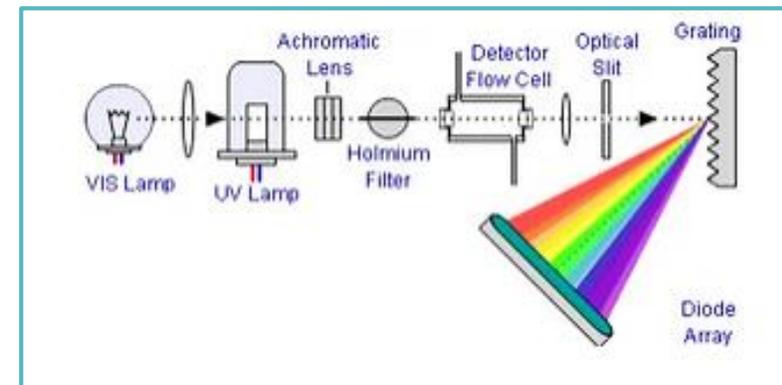


# Le détecteur

- ✗ Le **spectrophotomètre UV-Vis** est probablement un des détecteurs les plus répandus (sensibilité nanogramme)
- ✗ Le fonctionnement est le même que les spectrophotomètres utilisés en TP avec des cuves.
- ✗ Il faut impérativement :
  - Que l'analyte absorbe à une longueur d'onde
  - Connaitre le  $\lambda$  d'absorption
  - Que la phase mobile n'absorbe pas à la même longueur d'onde (HPLC Grade)
- ✗ Certains spectrophotomètres peuvent mesurer simultanément plusieurs longueurs d'onde les DAD (Diode Array Detector)

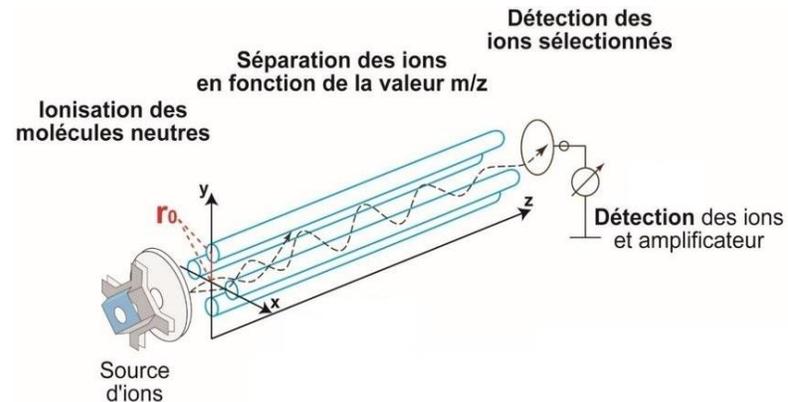


Système optique mono-faisceau



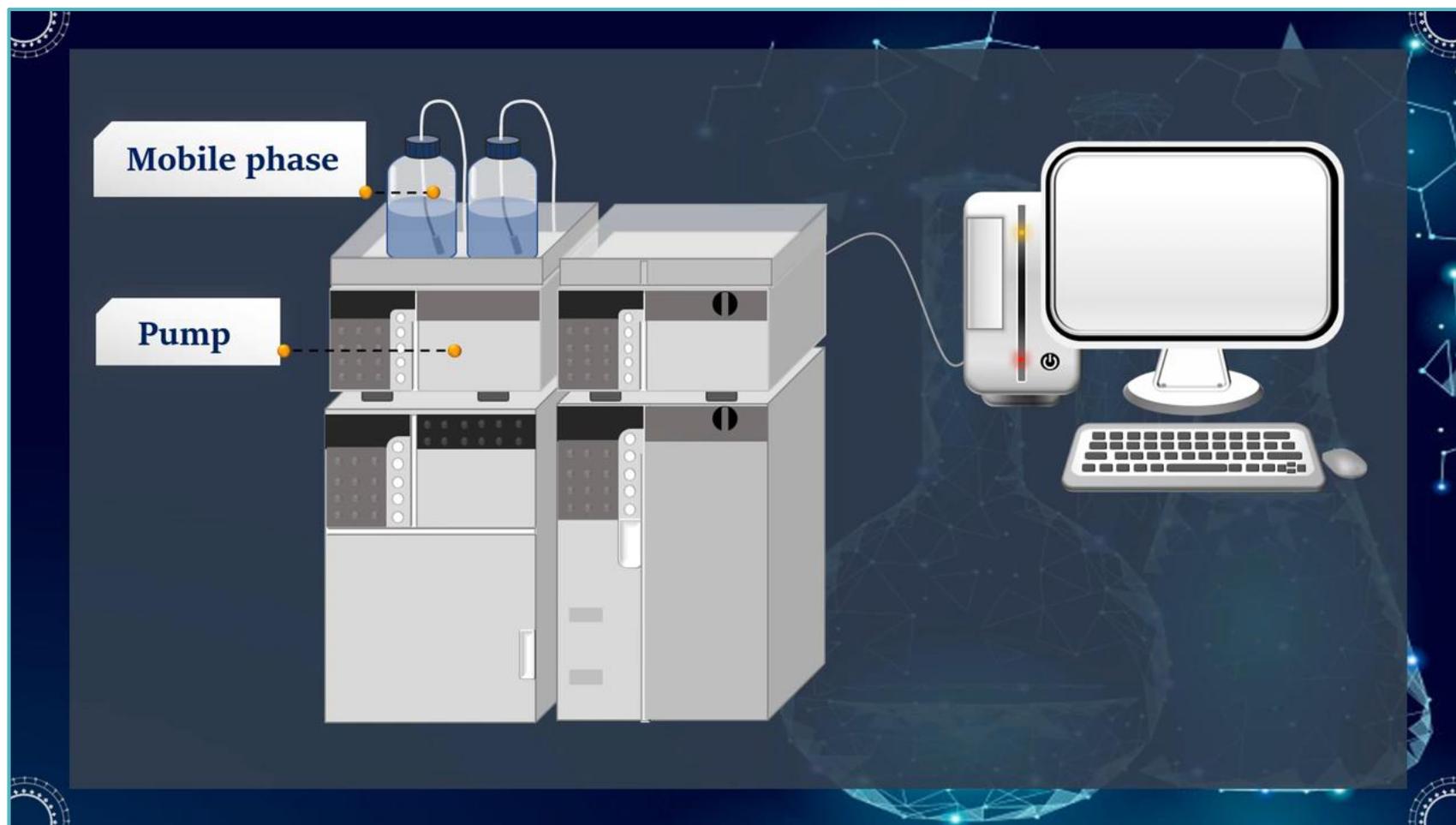
Système optique pluri-longueur d'onde = DAD

- ✘ Il existe d'autre type de détecteur **non structuraux** :
  - Le fluorimètre **FLD** pour les composé fluorescent, extrêmement sensible (femtogrammes).
  - L'indice de réfraction **RID** aucune restriction pour les analytes mais moins sensible (microgramme).
  - L'**ELSD** diffusion de lumière par évaporation. Pour les composés non-volatils (nanogramme)
  - Le **CAD** (Charged Aerosol Detector) soit disant universel et équivalent en terme de sensibilité à l'UV.
  - L'**ECD** détecteur électrochimique, fonctionne avec les molécules pouvant facilement s'oxyder ou se réduire.
  
- ✘ Enfin le fameux détecteur **MS** couplé à l'HPLC. Qui est en plus capable de donner la structure de l'analyte.





# Résumé en vidéo





# Le programme

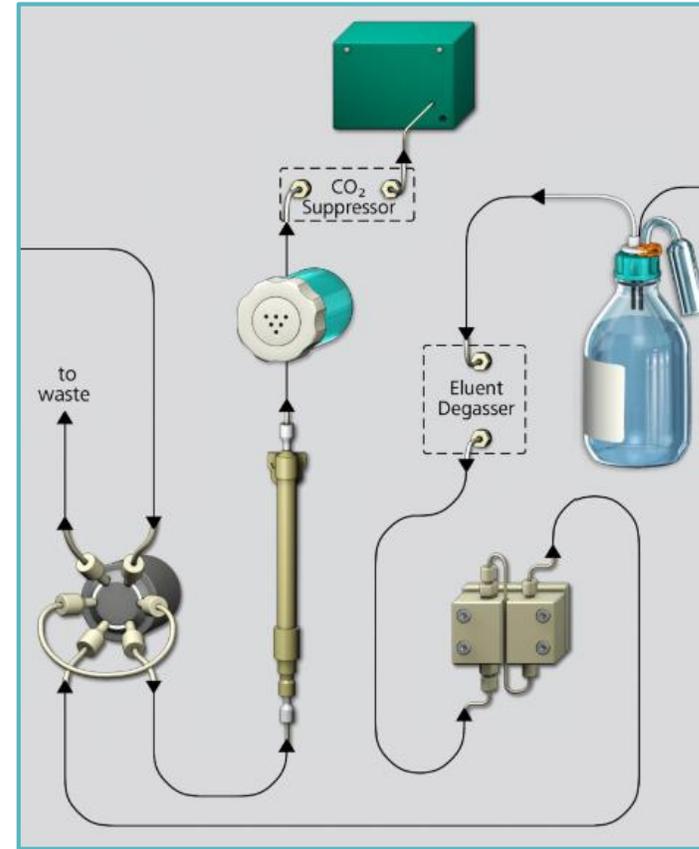
- × **Instrumentation**
- × **La séparation**
  - Phase stationnaire
  - Phase mobile
- × **Principe de séparation**
  - Rôle des contre ions
- × **Ordre de sortie des ions**
  - Cadre général
- × **Rôle du suppresseur**





# Chromatographie Ionique

✕ Instrumentation :

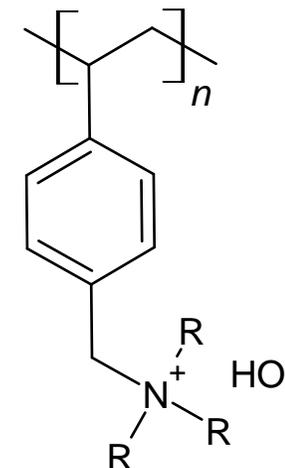
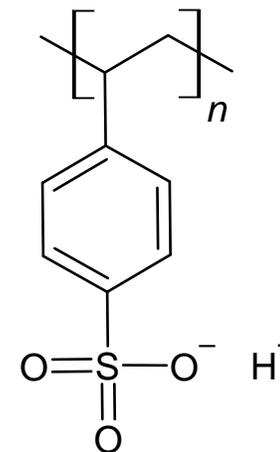




# Chromatographie Ionique

- ✗ Pour séparer des composés **ioniques**
  - **Interactions électrostatique** avec le solvant et la colonne
  - Chromatographie **anionique** ou **cationique**

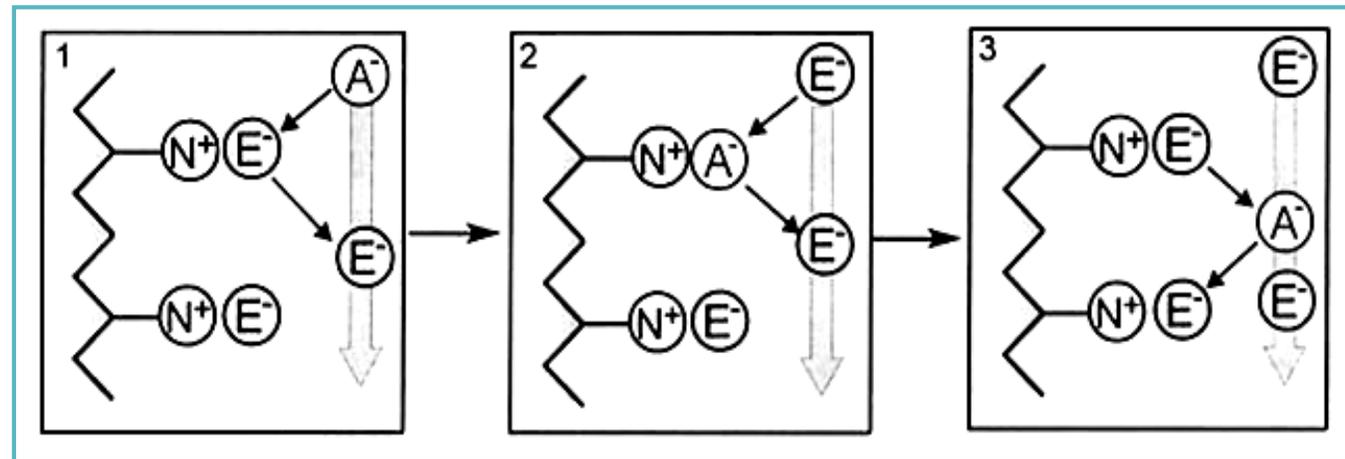
- ✗ Les **phases stationnaires** sont des **polymères** composés
  - De **sulfonates** (pour séparer les cations)
  - D'**ammonium** quaternaire (pour séparer les anions)



- ✗ Les **phases mobiles** sont principalement **aqueuses** acide ou basique suivant le type de séparation souhaité.
  - Basique pour séparer les anions
  - Acide pour séparer les cations
  - La **force ionique** caractérise la concentration en contre-ion disponible :  $f_{ionique} = \frac{1}{2} \sum C_i z_i^2$

# Chromatographie Ionique

- ✕ Principe de séparation dans le sens d'écoulement de la flèche :
  - $A^-$  est l'analyte à séparer (ici anion :  $F^-$ ,  $Cl^-$ ,  $NO_3^-$  etc...)
  - $E^-$  sont les contre ions contenus dans la phase mobile
  - $N^+$  représente les ammonium de la phase stationnaire



- ✕ Paramètres de la phase mobile qui modifie la séparation :
  - Force ionique
  - Nature du contre ion ( $E^-$ ) =  $CO_3^{2-}$  /  $HO^-$  / etc...
  - pH de la phase mobile

# Chromatographie Ionique

✘ Critères de séparation des analytes :

→ Plus l'ion est **volumineux** plus il est retenu

→ Plus l'ion est **chargé** plus il est retenu

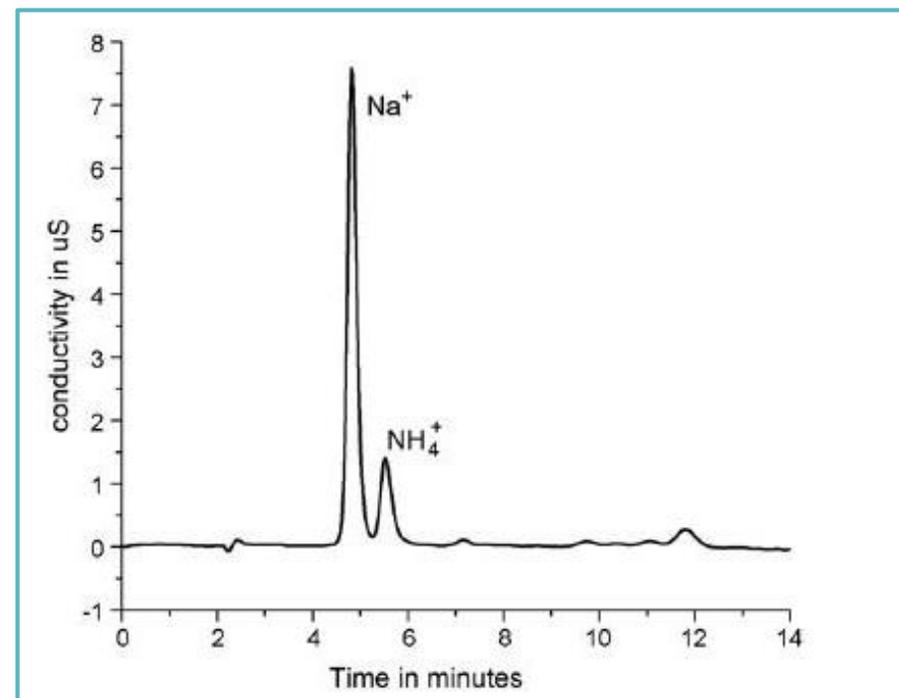
✘ Exemple en cationique :

→  $\text{Li}^+$   $\text{Na}^+$   $\text{NH}_4^+$   $\text{K}^+$   $\text{Rb}^+$   $\text{Cs}^+$   $\text{Ag}^+$

→  $\text{Mg}^{2+}$   $\text{Zn}^{2+}$   $\text{Co}^{2+}$   $\text{Cu}^{2+}$   $\text{Cd}^{2+}$   $\text{Ni}^{2+}$   $\text{Ca}^{2+}$   $\text{Sr}^{2+}$   $\text{Pb}^{2+}$   $\text{Ba}^{2+}$

✘ Identification des ions par double injection

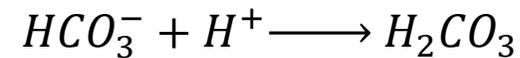
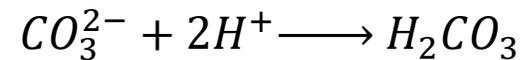
→ Edifice plus complexe : acide organique, acide aminé, ...



# Chromatographie Ionique

✘ Détecteur **conductimétrique** : Problème lié à la présence des contre ion en grande quantité :

✘ Rôle des suppresseurs :



→ **Supprime les contre-ions** pour ne pas parasiter la détection

→ **Améliore la sensibilité** du détecteur

✘ Les suppresseurs sont des résines échangeuses d'ions  $\text{H}^+$ .

→ Trois suppresseurs qui sont utilisés alternativement

→ Régénération des suppresseurs avec une solution d'acide

