

Fiche : HPLC

Annabelle Peyronnet

13 juin 2022

Biblio

- TI P1455 V2 Chromatographie en phase liquide - Théorie et méthodes de séparation
- TI P1456 V1 Chromatographie en phase liquide - Appareillage et applications
- BUP 908 Simulation des gradients de solvant en chromatographie liquide https://bupdoc.udppc.asso.fr/consultation/article-bup.php?ID_fiche=20293
- Cours de martin vérot sur agregationchimie.free http://agregationchimie.free.fr/fichiers/cours_chromatographie.pdf
- TI P1470 V1 Séparations chirales par chromatographies en phases liquide, supercritique et gazeuse
- Analyse chimique Méthodes et techniques instrumentales 7e édition Rouessac (chapitre 3 dessus)
- Chimie analytique Skoog p.973 et plus
- https://www4.ac-nancy-metz.fr/physique/ancien_site/CHIM/Jumber/pdf_chimie/HPLC.pdf Site pour résumer les bases

Introduction

La chromatographie en phase liquide est une technique analytique qui permet de séparer et quantifier. Elle est basée sur la différence de distribution des composés entre deux phases non miscibles : une phase mobile constituée d'un solvant et une phase stationnaire contenue dans une colonne.

Les interactions mises en jeu dans ce type de chromatographie sont des interaction d'adsorption, de partage ou d'échange d'ion. Les deux détecteurs les plus répandus aujourd'hui sont le spectrophotomètre UV-visible et le spectromètre de masse.

Depuis les années 2000, l'introduction de système de pompes permet de délivrer la phase mobile jusqu'à des pressions de 1500 bar, ce qui permet des séparations très rapides. On connaît cette technique sous le nom de HPLC : chromatographie liquide à haute performance.

1 Chromatographie en phase liquide - base

1.1 Principe

Les fondements de la chromatographie en phase liquide ont été établis par Martin et Synge en 1941.

1.1.1 Phase stationnaire et colonne

colonnes remplies de particules de diamètre inférieur à 2 μm pour HPLC (pressions supérieures à 400 bar). *Cf cours de martin sur les différents types de colonne* : Réduction des temps d'analyse et augmentation de la résolution + réduit la consommation de solvants.

Autres phases stationnaire : distinction normale et inverse (martin) + Skoog p.978, p.983

1.1.2 Phase mobile

Source : Cours Martin, analyse chimique p.80

1.1.3 Elution

1.2 Grandeurs fondamentales et équations

Source : Cours chromato Martin vérot, TI P1455 V2,

2 Appareillage

Source : Skoog p.975

2.1 Pompe, Intérêt de la pression

Source : Cours de Martin, TI P1456 v1, analyse chimique p.71

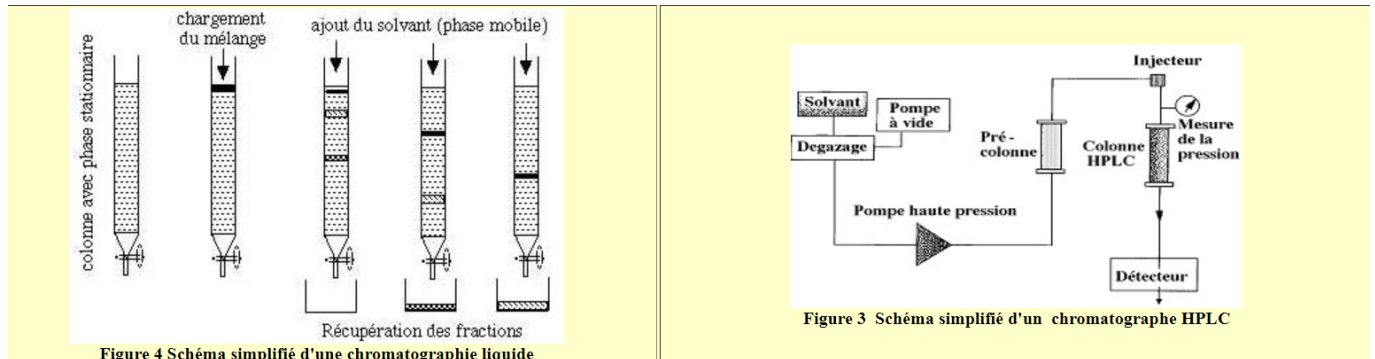


FIGURE 1 – site internet, chromato liquide à HPLC

La Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP ou HPLC en anglais) est une amélioration de la chromatographie en phase liquide, dans laquelle la phase mobile est utilisée sous haute pression. L'utilisation de la haute pression améliore l'efficacité des séparations et réduit fortement les temps d'analyse.

2.2 Injecteur

Source : TI P1456 V1, cours chromato martin vérot, analyse chimique p.71, Skoog p.977

2.3 Détecteur

Source : TI P1456 V1, cours chromato martin vérot, analyse chimique p.84, Skoog p.979

3 Optimisation

3.1 Elution isocratique et gradient d'éluant

Source : BUP 908, cours de Martin, Skoog p.976

3.2 Séparation chirale

Source : TI P1470 V1, Analyse chimique p.79, Skoog p.991

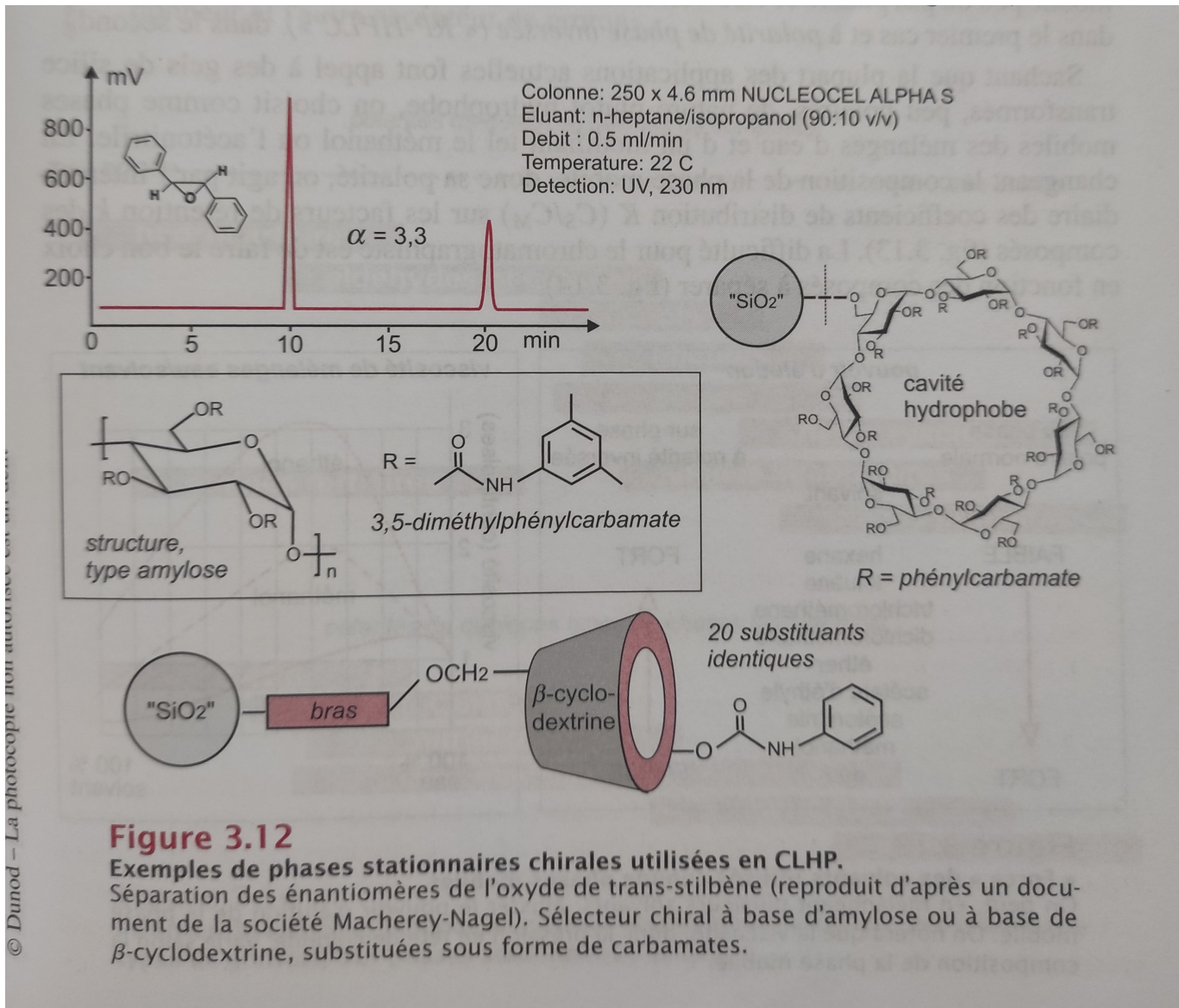


Figure 3.12

Exemples de phases stationnaires chirales utilisées en CLHP.

Séparation des énantiomères de l'oxyde de trans-stilbène (reproduit d'après un document de la société Macherey-Nagel). Sélecteur chiral à base d'amylose ou à base de β -cyclodextrine, substituées sous forme de carbamates.

FIGURE 2 – Analyse chimique p.79

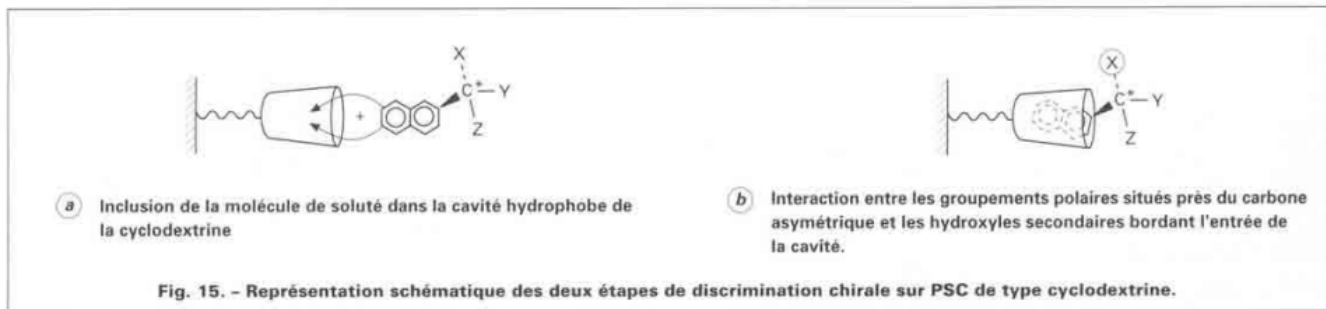


FIGURE 3 – TI P1470 V1

4,242 Mécanisme de reconnaissance chirale.

La figure 15 représente, de façon schématique, les deux étapes essentielles des séparations avec les cyclodextrines non modifiées :

- (a) inclusion par effet hydrophobe de la molécule de soluté ou d'une partie seulement de celle-ci dans la cavité chirale de façon à restreindre ses orientations possibles dans la cage ;
- (b) interactions par formation de liaisons hydrogène entre les groupements se situant au voisinage du centre d'asymétrie et les hydroxyles secondaires de la cyclodextrine.

La reconnaissance chirale fait intervenir principalement l'adéquation de la taille de la cavité avec le motif hydrophobe du soluté (*tight fit*). La β -cyclodextrine permet l'inclusion d'un cycle benzénique ou naphthyle ou de taille équivalente ; les racémates résolus comportent souvent deux cycles dont l'un au moins est aromatique, le centre d'asymétrie étant généralement situé entre les deux ou entre un cycle et une fonction carbonyle. Des changements minimes dans la structure des solutés peuvent entraîner des variations importantes de la rétention et de la sélectivité [88].

Pour les éthers-couronnes, la discrimination chirale repose sur la différence de stabilité des complexes diastéréoisomères d'inclusion formés avec l'éther-couronne (molécule hôte).

FIGURE 4 – (Explication du mécanisme au dessus) TI P1470 V1

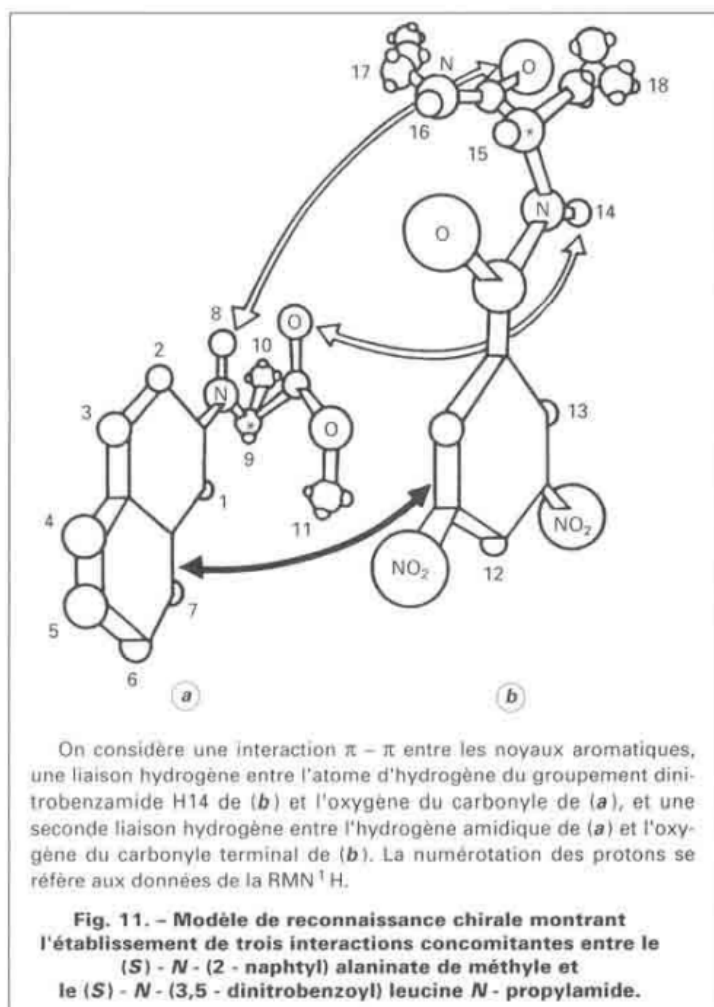


FIGURE 5 – Reconnaissance moléculaire (à gauche l'un des énantiomères à séparer, à droite une partie de la phase chirale) TI P1470 V1

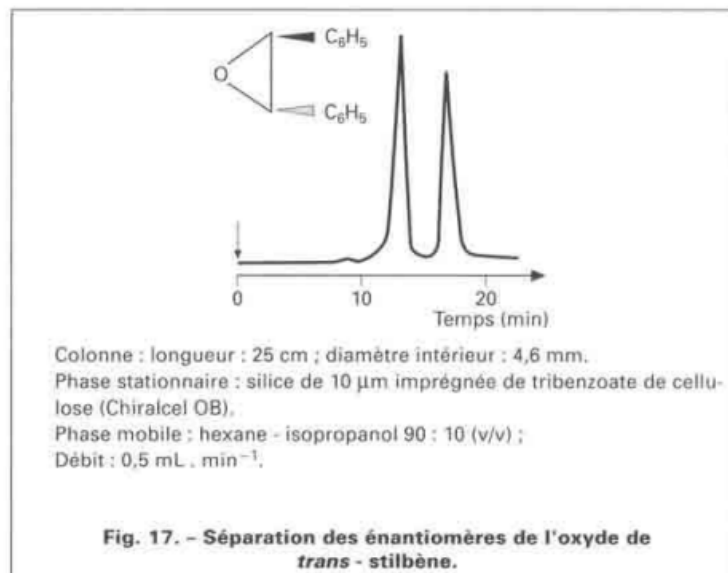


FIGURE 6 – Séparation de deux énantiomère par hplc chirale TI P1470 V1