

# Chromatographie HPLC

<https://www.lachimie.fr/analytique/chromatographie/HPLC/HPLC.php>

HPLC signifie chromatographie liquide haute pression (le terme haute performance est également employé). Le point commun aux différentes méthodes est la phase mobile qui est toujours liquide et dont la force éluante joue un rôle important.

## Différentes méthodes d'HPLC

L'HPLC est l'une des techniques les plus employées dans les laboratoires d'analyse chimiques. Elle permet l'identification, la séparation et le dosage de composés chimiques dans un mélange. [...] Quatre types sont couramment employés en fonction de la nature de la phase stationnaire.

- chromatographie d'adsorption\*
- chromatographie de partage\*\*
- chromatographie d'échange d'ions\*\*\*
- chromatographie d'exclusion : également appelée à "perméation de gel"\*\*\*\*.

A chacune de ces méthodes, il correspond un type de colonne qui est l'élément vital de la chaîne d'HPLC. Elle met en jeu des forces d'adsorption qui vont varier en fonction de la polarité des produits chimiques et selon des isothermes d'adsorption spécifiques. Le choix du solvant d'HPLC va dépendre de la colonne et des composés à éluer et principalement de leur polarité.

\* La **chromatographie d'adsorption** est caractérisée par une phase stationnaire solide et une phase mobile liquide.

\*\* La **chromatographie de partage** est la méthode la plus employée actuellement en HPLC. La phase stationnaire et la phase mobile sont liquides. Elle est basée sur la différence de solubilité du soluté dans la phase mobile et la phase stationnaire.

\*\*\* Elle consiste à un échange réversible d'ions entre la phase mobile et la phase stationnaire. Cette dernière est porteuse de groupements ionisés fixes et d'ions mobiles assurant l'électroneutralité. La résine doit être préparée suivant la séparation à effectuer et est régénérée en fin d'élution. Ce type de chromatographie permet donc de séparer des molécules selon leurs charges et s'adresse aux produits ioniques ou ionisables.

\*\*\*\* Ce type de chromatographie est utilisé pour la séparation des macromolécules telles que les protéines. Ici seuls la taille de la molécule et son encombrement stérique influent sur la vitesse d'élution. Lorsque la phase stationnaire est hydrophile avec une phase mobile aqueuse, on parle de perméation de gel.

## Guide de choix de la phase mobile

Si la phase stationnaire (colonne) est polaire, on utilise un solvant peu à pas polaire (phase mobile). C'est la chromatographie en phase normale. Si la phase stationnaire (colonne) est apolaire ou peu, on utilise un solvant polaire. C'est la chromatographie en phase inversée. Les solvants d'HPLC sont donc classés suivant leur polarité et leur force éluante. En faisant varier la composition du solvant, on fait varier le coefficient de distribution  $K$  et donc le pouvoir d'élution. Les solvants doivent être miscibles et ne pas gêner la détection (absorption UV par exemple).

## Coefficient de distribution $K$

Le coefficient de distribution est défini par la relation  $K = C_s/C_m$

avec  $C_s$  la concentration du soluté dans la phase stationnaire

avec  $C_m$  la concentration du soluté dans la phase mobile.

## Classement des composés organiques du moins polaire au plus polaire :

- |                         |                          |
|-------------------------|--------------------------|
| 1) hydrocarbures        | 6) phénols               |
| 2) amine tertiaires     | 7) amines secondaires    |
| 3) aldéhydes et cétones | 8) les acides hydroxylés |
| 4) alcools              | 9) amines primaires      |
| 5) acides               |                          |

Noter que les alcools, phénols et acides ont quasiment la même polarité.

(extraits)

### Principe de la chromatographie

La chromatographie est une méthode de séparation des constituants d'un mélange même très complexe.

Il existe trois principaux types de chromatographie:

- la chromatographie en phase gazeuse (CPG)
- la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)
- la chromatographie en couche mince (CCM).

Les deux premières méthodes peuvent être assez largement décrites par des théories communes. Dans les deux cas, un fluide appelé phase mobile parcourt un tube appelé colonne. Cette colonne peut contenir des "granulés" poreux (colonne remplie) ou être recouverte à l'intérieur d'un film mince (colonne capillaire). Dans les deux cas, la colonne est appelée phase stationnaire. A l'instant initial, le mélange à séparer est injecté à l'entrée de la colonne où il se dilue dans la phase mobile qui l'entraîne à travers la colonne.

Si la phase stationnaire a été bien choisie, les constituants du mélange, appelés généralement les solutés, sont inégalement retenus lors de la traversée de la colonne.

De ce phénomène appelé rétention il résulte que les constituants du mélange injecté se déplacent tous moins vite que la phase mobile et que leurs vitesses de déplacement sont différentes. Ils sont ainsi élués de la colonne les uns après les autres et donc séparés.

Un détecteur placé à la sortie de la colonne couplé à un enregistreur permet d'obtenir un tracé appelé chromatogramme. En effet, il dirige sur un enregistreur un signal constant appelé ligne de base en présence du fluide porteur seul ; au passage de chaque soluté séparé il conduit dans le temps à l'enregistrement d'un pic.

Dans des conditions chromatographiques données, le "temps de rétention" (temps au bout duquel un composé est élué de la colonne et détecté), caractérise qualitativement une substance. L'amplitude de ces pics, ou encore l'aire limitée par ces pics et la prolongation de la ligne de base permet de mesurer la concentration de chaque soluté dans le mélange injecté. [...]

