

## 4. CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE

### OBJECTIFS

- Comprendre les principaux mécanismes de la séparation chromatographique
- Savoir les utilisations principales de chaque type de chromatographie liquide
- Comprendre pratiquement comment améliorer la séparation en chromatographie liquide
- Identifier les constituants principaux d'un appareil de chromatographie liquide, y compris leurs caractéristiques importantes

### 4.1 Introduction

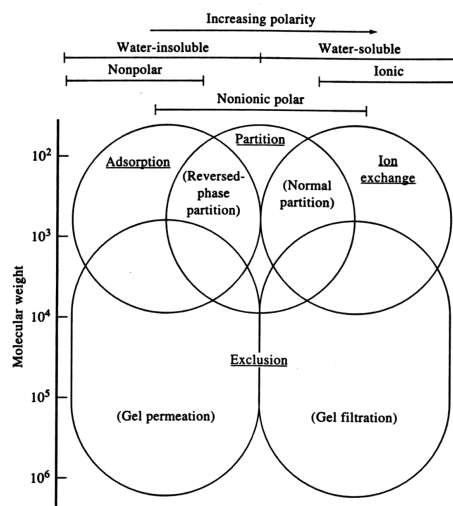
On peut situer à 1958 le début de la chromatographie en phase liquide moderne avec l'introduction de **l'analyse « automatique »** des acides aminés (on parle alors de chromatographie « à grande vitesse », « sous haute pression », ou « à haute résolution », ou de préférence « **de haute performance** » [HPLC]).

Ainsi, jusqu'à ces années 1958-1960, la chromatographie en phase liquide sur colonne (CL), bien qu'étant la plus ancienne des méthodes chromatographiques (TSWETT, 1906) avait été relativement peu utilisée en raison, principalement, de sa lenteur et de l'absence de détecteurs. La lenteur des séparations de la chromatographie en phase liquide **classique** était liée aux faibles vitesses d'élution ( $0.001$  à  $0.01 \text{ cm. s}^{-1}$ ), nécessaires en raison de l'efficacité médiocre des colonnes utilisées. Actuellement, on opère à des vitesses linéaires de la phase mobile de l'ordre de  $0.1$  à  $1 \text{ cm.s}^{-1}$ , vitesses comparables à celles de la chromatographie en phase gazeuse dont elle est maintenant complémentaire.

### 4.2 Mécanismes d'interaction avec la colonne

Selon la nature de la phase stationnaire (c'est-à-dire le phénomène physico-chimique sur lequel est basée la séparation proprement dite) on peut distinguer les **mécanismes** suivants :

- a) chromatographie d'adsorption
- b) chromatographie de partage
- c) chromatographie par échange d'ions
- d) chromatographie par exclusion de taille



**Figure 28-1** Applications of liquid chromatography. (From D. L. Saunders, in *Chromatography*, 3rd ed., E. Heftmann, Ed., p. 81. New York: Van Nostrand Reinhold, 1975. With permission.)

**Tableau IV. – CHOIX DU PROCÉDÉ CHROMATOGRAPHIQUE**

|                             |                                     |                                                                                                                                                                                                                                                   |
|-----------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Substances de<br>PM > 2 000 |                                     | – Chrom. d'exclusion-diffusion                                                                                                                                                                                                                    |
| Substances de<br>PM < 2 000 | a) Molécules non ionisées           | <ul style="list-style-type: none"> <li>– Polarité élevée : Chrom. d'adsorption</li> <li>– Polarité élevée : Chrom. de partage sur phase polaire</li> <li>– Polarité faible ou moyenne : Chrom. de partage à polarité de phase inversée</li> </ul> |
|                             | b) Molécules ionisées ou ionisables | <ul style="list-style-type: none"> <li>– Chrom. par échange d'ions</li> <li>– Chrom. de partage avec appariements d'ions sur phase inverse</li> <li>– Chrom. de partage sur polarité de phase inversée après recul d'ionisation</li> </ul>        |

### 4.3 Chromatographie de partage

La chromatographie de partage convient très bien à la séparation de molécules très polaires de masses moléculaires inférieures à 3000 et aux homologues d'une même série, mal séparés par chromatographie d'adsorption.

Les facteurs la régissant sont ceux intéressant aussi bien la chromatographie par adsorption que la séparation par extraction liquide-liquide, soit :

- la nature du support,
- la nature de la phase liquide stationnaire,
- la nature de l'éluant (phase mobile),
- la vitesse de passage du solvant
- la température.

En bref,

- la chromatographie de partage est la technique de chromatographie liquide, la plus utilisée
- la technique fonctionne par partage de solutés entre deux phases non miscibles
- la silice perd ses propriétés adsorbantes par saturation des sites d'adsorption (support inerte)
- ce mécanisme est surtout utile pour la séparation de molécules très polaires de masses molaires inférieures à 3000 (composés non-ioniques)
- la phase stationnaire liquide est immobilisée par adsorption (possibilité de dissolution / perte dans la phase mobile) ou formation de liaisons covalentes.
- les solides (supports) ont de très grandes surfaces (e.g. terre de diatomées, gel de silice, billes de silice poreuses, cellulose)
- les éluants doivent être immiscibles à la phase stationnaire et compatible avec les détecteurs

Il y a 2 types de chromatographie de partage:

- Chromatographie de partage sur phase inversée
- Chromatographie de partage sur phase normale (classique)

|                           | <b>Phase inversé</b>                                                                          | <b>Phase normale (classique)</b>                                                                 |
|---------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Phase stationnaire</b> | <b>non-polaire</b><br><i>e.g.</i><br>- silice greffée par une chaîne alkyle ou phényle        | <b>polaire</b><br><i>e.g.</i><br>- $C_2H_4CN$<br>- $C_3H_6NH_2$<br>- $C_3H_6N(CH_3)_2$<br>- diol |
| <b>Phase mobile</b>       | <b>polaire</b><br><i>e.g.</i><br>- eau<br>- méthanol<br>- acétonitrile<br>- tétrahydrofuranne | <b>non-polaire</b><br><i>e.g.</i><br>- n-hexane<br>- chloroforme<br>- éther                      |

#### 4.3.1 Les composants de la chromatographie de partage

##### 4.3.1.1 Les supports

Les supports sont inertes vis-à-vis des composés à séparer. Ils ne servent qu'à immobiliser, par adsorption ou formation de liaisons chimiques covalentes, la phase stationnaire liquide. Ce sont des solides très finement divisés qui présentent une très grande surface afin de retenir, sous un petit volume, une grande quantité de phase stationnaire. Il est nécessaire que leur rétention soit énergique et qu'il ne réagissent pas avec le soluté. Leurs propriétés d'adsorption doivent être totalement masquées. Les phases stationnaires décrites en

chromatographie d'adsorption peuvent être utilisées comme support sous forme poreuse ou pelliculaire (couche superficielle poreuse).

#### **4.3.1.2 La phase stationnaire**

En chromatographie liquide classique, les phases stationnaires sont des solvants polaires dans lesquels vont pouvoir se solubiliser les composés polaires à séparer. Le choix de cette phase reste toutefois très empirique, le nombre de possibilités étant relativement grand (systèmes simples ou systèmes à solvants multiples : ternaires, quaternaires). Il peut s'agir d'eau, de méthanol ou d'éthanol, éthers renfermant des groupement hydroxyles ou nitriles (très polaires) : glycols, polyéthylène glycols,  $\beta$ ,  $\beta'$  oxidipropionitrile ( $\text{CN} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{O} - \text{CH}_2\text{CH}_2 - \text{CN}$ ), etc.

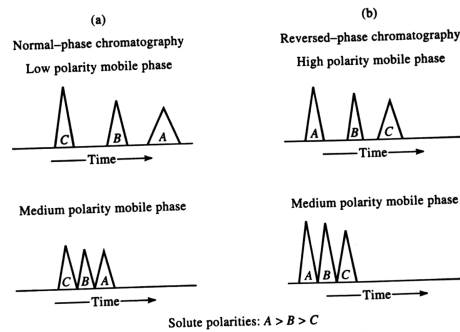
#### **4.3.1.3 La phase stationnaire greffée**

La chromatographie liquide-liquide a ses limites. Puisque la phase mobile solubilise faiblement la phase stationnaire, il faut la pré-saturer. De plus, les forces de friction dues aux colonnes étroites provoquent une perte de phase stationnaire par entraînement mécanique (important en CLHP). Pour surmonter ces inconvénients, on a développé l'usage de remplissages à phases stationnaires chimiquement liées (greffées). C'est ainsi, par exemple, que le groupement silanol des supports est « silanisé » puis on y fixe des groupements (R) de polarité variable. Les remplissages ayant ainsi des « silicones » ( $-\text{SiO}-\text{R}$ ) chimiquement greffés sur leur surface, donnent à la colonne une efficacité et une stabilité excellentes.

#### **4.3.1.4 La phase mobile**

L'éluant doit être immiscible à la phase stationnaire. Actuellement cette immiscibilité ne peut encore être découverte qu'empiriquement. De plus, en raison de l'inévitable miscibilité partielle, le solvant doit être pré-saturé avec la phase stationnaire avant de pénétrer dans la colonne. En d'autres termes, le solvant et la phase stationnaire doivent être en équilibre thermodynamique avant leur rencontre dans la colonne. On doit aussi tenir compte de la compatibilité des solvants avec les détecteurs utilisés. La polarité de la phase mobile a une grande influence sur le coefficient de partage des solutés. On obtient alors des temps de rétention convenables en ajoutant à une solvant donnée, de petites quantités d'un modificateur polaire.

On entend par l'inversion de phase, la modification de la nature du support de la phase stationnaire liquide afin de pouvoir y « fixer » un solvant apolaire. Pour cela, on utilise la terre de diatomées (celite), support polaire, que l'on « silanise », c'est-à-dire que l'on traite par des dérivés organosiliciés tels que le diméthylchlorosilane. Ce traitement permet donc d'adsorber une solution stationnaire moins polaire que le solvant constituant la phase mobile. En effet, ce procédé permet d'utiliser comme éluant l'eau, les alcools, les acides ou d'autres solvants mobiles très polaires qui, normalement, déplaceraient le solvant moins polaire adsorbé sur le support.

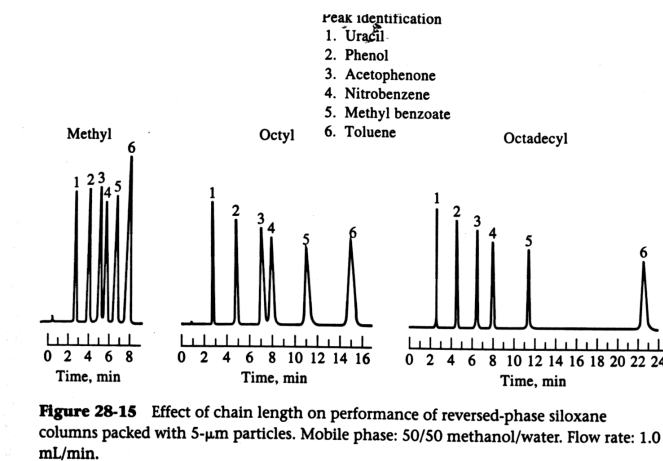


**Figure 28-14** The relationship between polarity and elution times for normal-phase and reversed-phase chromatography.

**Rappel : Polarité des solvants:** hydrocarbures < éthers < esters < cétones < aldéhydes < amides < amines < alcools < H<sub>2</sub>O

#### 4.3.2 Chromatographie de partage sur phase inversée

- environ 80% des séparations chromatographiques en phases liquides sont effectuées par partage sur des phases inversées
- la chromatographie de partage sur phase inversée utilise une phase stationnaire apolaire et une phase mobile polaire



**Figure 28-15** Effect of chain length on performance of reversed-phase siloxane columns packed with 5- $\mu$ m particles. Mobile phase: 50/50 methanol/water. Flow rate: 1.0 mL/min.

##### 4.3.2.1 Exemple d'optimisation d'une séparation de chromatographie en phase inverse

- 4 solvants sont utilisés pour préparer la phase mobile
  - méthanol
  - acétonitrile
  - tetrahydrofuranne
  - H<sub>2</sub>O
- Normalement, on évalue chaque solvant en présence de l'eau afin d'optimiser  $k'$  (selon les temps de rétention)

- Equation empirique:

$$P'_{AB} = \phi_A P'_A + \phi_B P'_B$$

$$\frac{k'_2}{k'_1} = 10^{(P'_2 - P'_1)/2}$$

$P'$  - indice de polarité

$\phi$  - proportion du volume

$k'$  - facteur de rétention du soluté 1, 2, etc.

**TABLE 28-2** Properties of Common Chromatographic Mobile Phases

| Solvent                    | Refractive Index <sup>a</sup> | Viscosity, cP <sup>b</sup> | Boiling Point, °C | Polarity Index, $P'$ | Eluent Strength, $\epsilon^0$ |
|----------------------------|-------------------------------|----------------------------|-------------------|----------------------|-------------------------------|
| Fluoroalkanes <sup>d</sup> | 1.27–1.29                     | 0.4–2.6                    | 50–174            | <–2                  | –0.25                         |
| Cyclohexane                | 1.423                         | 0.90                       | 81                | 0.04                 | –0.2                          |
| <i>n</i> -Hexane           | 1.372                         | 0.30                       | 69                | 0.1                  | 0.01                          |
| 1-Chlorobutane             | 1.400                         | 0.42                       | 78                | 1.0                  | 0.26                          |
| Carbon tetrachloride       | 1.457                         | 0.90                       | 77                | 1.6                  | 0.18                          |
| <i>i</i> -Propyl ether     | 1.365                         | 0.38                       | 68                | 2.4                  | 0.28                          |
| Toluene                    | 1.494                         | 0.55                       | 110               | 2.4                  | 0.29                          |
| Diethyl ether              | 1.350                         | 0.24                       | 35                | 2.8                  | 0.38                          |
| Tetrahydrofuran            | 1.405                         | 0.46                       | 66                | 4.0                  | 0.57                          |
| Chloroform                 | 1.443                         | 0.53                       | 61                | 4.1                  | 0.40                          |
| Ethanol                    | 1.359                         | 1.08                       | 78                | 4.3                  | 0.88                          |
| Ethyl acetate              | 1.370                         | 0.43                       | 77                | 4.4                  | 0.58                          |
| Dioxane                    | 1.420                         | 1.2                        | 101               | 4.8                  | 0.56                          |
| Methanol                   | 1.326                         | 0.54                       | 65                | 5.1                  | 0.95                          |
| Acetonitrile               | 1.341                         | 0.34                       | 82                | 5.8                  | 0.65                          |
| Nitromethane               | 1.380                         | 0.61                       | 101               | 6.0                  | 0.64                          |
| Ethylene glycol            | 1.431                         | 16.5                       | 182               | 6.9                  | 1.11                          |
| Water                      | 1.333                         | 0.89                       | 100               | 10.2                 | Large                         |

<sup>a</sup>At 25°C.

<sup>b</sup>The centipoise is a common unit of viscosity; in SI units, 1 cP = 1 mN · s · m<sup>–2</sup>.

<sup>c</sup>On Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Multiplication by 0.8 gives  $\epsilon^0$  on SiO<sub>2</sub>.

<sup>d</sup>Properties depend upon molecular weight. Range of data given.

#### 4.3.2.2 Exemple

Phase mobile: 30% MeOH / 70% H<sub>2</sub>O

$P'_{\text{MeOH}} = 5.1$

$P'_{\text{H}_2\text{O}} = 10.2$

$t_R = 31.1$  min.

$t_m = 0.48$  min.

Déterminer la composition de la phase mobile afin de fixer  $k'$  à 5

$$k' = \frac{31.3 - 0.48}{0.48} = 64$$

$$P'_{AB} = (0.30 \cdot 5.1) + (0.70 \cdot 10.2) = 8.7$$

$$\frac{k'_2}{k'_1} = 10^{(P'_2 - P'_1)/2}$$

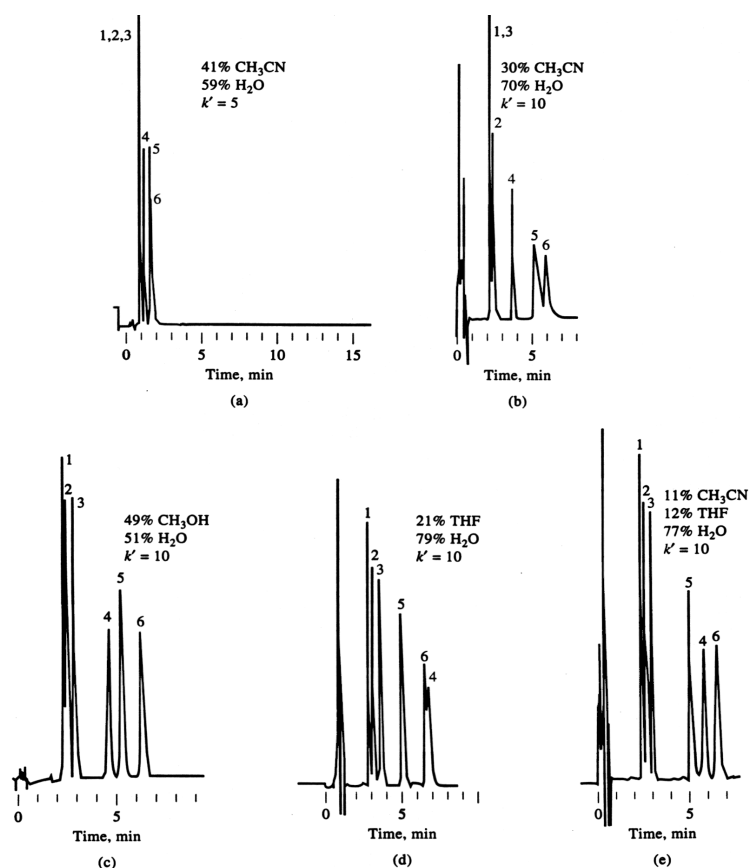
$$\frac{5}{64} = 10^{(P'_2 - 8.7)/2}$$

$$P'_2 = 6.6$$

$$P_2 = 6.6 = (x \cdot 5.1) + (1 - x) \cdot 10.2$$

$$x = 0.71$$

i.e. 71% MeOH / 29% H<sub>2</sub>O



**Figure 28-16** Systematic approach to the separation of six steroids. The use of water to adjust  $k'$  is shown in (a) and (b). The effects of varying  $\alpha$  at constant  $k'$  are shown in (b), (c), (d), and (e). Column:  $0.4 \times 150$  mm packed with  $5 \mu\text{m}$  C<sub>8</sub> bonded, reversed-phase particles. Temperature:  $50^\circ\text{C}$ . Flow rate:  $3.0 \text{ cm}^3/\text{min}$ . Detector: UV 254 nm. THF = tetrahydrofuran. CH<sub>3</sub>CN = acetonitrile. Compounds: (1) prednisone, (2) cortisone, (3) hydrocortisone, (4) dexamethasone, (5) corticosterone; (6) corticoxolone. (Courtesy of DuPont Instrument Systems, Wilmington, DE.)

#### 4.3.3 Chromatographie de partage sur phase normale

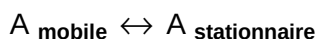
- Comme pour les silices apolaires, le motif polaire est greffé sur la silice au moyen d'une réaction de silanisation.
- L'échange est basé sur des interactions type dipôle-dipôle, liaisons hydrogène, *etc.*
- Les molécules polaires interagissent avec le support dans un solvant apolaire, ainsi le  $k'$  diminue lorsque l'éluant devient plus polaire. De même, plus qu'un composé présente un fort caractère polaire, plus il sera retenu.

On utilise des mélanges de solvants: alcane et un solvant plus polaire tel que  $\text{CHCl}_3$ , THF, EtOH, *etc.*

#### 4.4 Chromatographie d'adsorption

La *chromatographie d'adsorption* est la plus ancienne méthode de chromatographie (TWSETT, 1906). Elle s'applique à la plupart des composés organiques de masses molaires inférieures à 3000 et ceci d'autant mieux que ces masses sont plus élevées. Une modification même minimum dans la structure des composés est susceptible de changer suffisamment les propriétés d'adsorption et rendre ainsi possible la séparation de certains isomères.

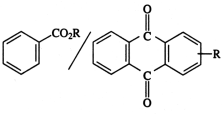
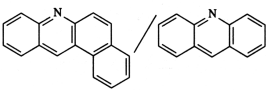
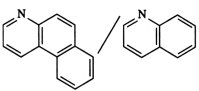
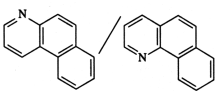
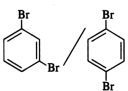
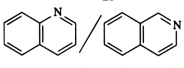
L'adsorption est un phénomène physico-chimique qui consiste en la fixation d'une substance à l'état liquide (ou gaz) sur une surface solide. Ce phénomène fait intervenir des forces complexes entre le soluté et l'adsorbant : forces électrostatiques, forces inductives, forces de dispersion de London, forces de liaisons hydrogènes, forces de transfert de charges et autres. Mais pour que cette **adsorption** soit utilisable à des fins séparatives, il faut que cette fixation soit réversible. La désorption consiste alors à remettre, à l'aide d'un éluant approprié, la substance en solution par rupture des liaisons précédentes. Les molécules du soluté sont alors remplacées sur les sites d'adsorption, par celles de l'éluant. Des relations d'équilibre règlent les interactions réciproques :



- Phase stationnaire: gels de silice poreux mais aussi oxydes, hydroxydes, sels minéraux, l'alumine
- Composés apolaires,  $M_w < 3000$
- Complémentaire à la chromatographie de partage (séparations ressemblent à la chromatographie de partage sur phase normale)
- Très utile pour les isomères
- Une augmentation de 0.05 de la force de l'éluant résulte en une diminution de  $k'$  de 3-4 X
- Les modifications du solvant sont utiles pour modifier  $k'$



TABLE 28-5 Comparison of Selectivities of Adsorption and Reversed-Phase Chromatography\*

| Separation of | Compound                                                                                           | Adsorption $\alpha$ | Reversed-Phase $\alpha$ |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|-------------------------|
| Homologs      |                   |                     |                         |
|               | R = C <sub>1</sub>                                                                                 | 4.8                 | 3.3                     |
|               | C <sub>2</sub>                                                                                     |                     | 6.5                     |
|               | C <sub>4</sub><br>C <sub>10</sub>                                                                  | 4.1<br>3.6          | 17                      |
| Benzologs     |                   | 1.2                 | 1.4                     |
|               |                   | 1.1                 | 1.8                     |
|               |                   | 12.5                | 1.06                    |
| Isomers       |                   | 1.8                 |                         |
|               |                   | 3.4                 |                         |
|               | 1,2,3,4, dibenzanthracene, C <sub>22</sub> H <sub>14</sub> /Picene C <sub>22</sub> H <sub>14</sub> | 20                  |                         |

\*Data from: L. R. Snyder and J. J. Kirkland, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 2nd ed., pp. 357-358, New York: Wiley, 1979.

#### 4.4.1 La phase stationnaire

La **surface spécifique** des adsorbants correspond à leur surface d'adsorption par unité de masse. Elle est liée à leur granulométrie et à leur porosité. Une grande surface spécifique est naturellement souhaitable car elle permet d'obtenir de meilleures séparations tout en diminuant la longueur des colonnes (important en CL). Bien entendu, la nature de l'adsorbant joue un rôle ainsi que la méthode de sa préparation. Par exemple, le charbon actif contient 1000 m<sup>2</sup>/g de sites. En général, le pouvoir adsorbant se situe entre 50 et 500 m<sup>2</sup>/g (adsorbants courants). Les adsorbants pelliculaires (billes de verre de 40 µm d'adsorbant) présente une surface spécifique relativement faible (7 à 14 m<sup>2</sup>/g).

L'adsorbant doit être pratiquement insoluble dans les solvants et éluants utilisés d'une part et présenter, d'autre part, une inertie chimique vis-à-vis des solutés.

L'origine des adsorbants est très diverse. Les **poudres de charbon** végétal ou animal sont parfois utilisées mais elles présentent un trop grand pouvoir adsorbant. C'est parmi les oxydes, les hydroxydes et les sels minéraux insolubles que l'on trouve la plus grande majorité des adsorbants. Ceux que l'on emploie le plus couramment sont :

- la **silice** (SiO<sub>2</sub>). Souvent désignée aussi sous le terme de gel de silice (silice plus ou moins hydratée (4% H<sub>2</sub>O), provenant de la déshydratation de l'acide silicique). Elle se présente sous forme d'une poudre blanche de très fines granulométries.

Le mécanisme de rétention sur cet adsorbant est maintenant admis comme résultant de la présence, à sa surface, de groupes silanols (-OH) et de groupes siloxanes (-O-) qui expliquent sa polarité, son caractère acide et la possibilité de former des liaisons hydrogènes;

- **l'alumine** ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ). Elle s'obtient par déshydratation de l'hydroxyde ( $\text{Al}(\text{OH})_3$ ). Selon sa préparation, elle renfermera un certain nombre de molécules d'eau liées ( $\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ).

A côté de ces adsorbants, on peut encore citer les sels de calcium (phosphates et carbonates), les oxydes de magnésium, les silicates de magnésium (Florisil) ainsi que des adsorbants organiques tels que urée, polyamide, saccharose et dérivés du polystyrène.

#### 4.4.2 La phase mobile

Un éluant très peu adsorbable à la surface n'entrera que très peu en compétition avec le soluté adsorbé; dans ce cas, l'élution sera lente. Le pouvoir éluant relatif des solvants est donnée par la **série éluotrope** (v. section 4.3.2.1). Cette série est établie en considérant l'énergie spécifique d'adsorption du n-pentane vis-à-vis de l'alumine pris comme adsorbant de référence, égale à 0. On obtient alors la force d'élution relative des autres solvants ( $\epsilon_0 \Rightarrow$  énergie de fixation par gramme d'alumine). Cette force d'élution relative ( $\epsilon_0$ ) suit l'augmentation de la polarité des solvants. L'ordre d'élution est approximativement le même d'un adsorbant à l'autre (les valeurs étant bien entendu différentes).

La création d'interactions moléculaires éluants-solutés impliquent que ces derniers soient solubles dans l'éluant, ce qui est possible s'ils ont une structure chimique et une polarité voisine. De plus, les molécules de l'éluant se substituent à celles des solutés sur les sites de l'adsorbant et donnent naissance à des liaisons adsorbant-éluant.

En pratique, pour être déposé en une bande étroite au sommet de la colonne, l'échantillon est dissous dans une quantité minimale de solvant qui ne doit pas former de liaisons trop fortes avec l'adsorbant (solvants à force éluante faible). Les éluants ont, eux, une force éluotrope plus élevée.

#### 4.4.3 Résolution de la séparation

La résolution de la séparation peut être étudiée par l'intermédiaire des divers termes de la relation vue dans le chapitre précédent :

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left( \frac{k'_B}{1 + k'_B} \right)$$

- le nombre de plateaux  $N$  va dépendre de la viscosité des solvants. En effet, dans un tel solvant les phénomènes de diffusion et de transfert de masse sont ralentis, ils augmentent la valeur de  $H$  et de ce fait diminuent  $N$  donc le coefficient de résolution  $R_s$ ;
- le coefficient de sélectivité  $\alpha$  représente les différences de comportement des solutés et nous savons qu'une très faible modification de sa valeur intervient d'une manière importante sur la séparation. Toutefois, aucune règle ne peut être établie en ce qui concerne le choix du solvant ;
- le facteur de capacité joue un rôle important par l'intermédiaire de la polarité du solvant. En effet, nous savons que :

$$k' = K_D \cdot \frac{m_a}{V_M}$$

Lorsque la polarité du solvant est relativement forte, les solutés ne seront que très faiblement retenus ( $D$  petit),  $k'$  sera petit et la séparation mauvaise. Par contre, une faible polarité du

solvant provoquerait une élution trop lente ne permettant pas une bonne séparation des solutés. La vitesse de l'élution dépendra donc de la **force éluotropique** du solvant. Il est nécessaire, pour que les meilleures conditions de l'élution soient réunies, que  $k'$  soit compris entre 1 et 10.

#### 4.5 Chromatographie d'exclusion sur gel (d'exclusion stérique)

Plusieurs appellations différentes sont employées pour la chromatographie d'exclusion sur gel : « chromatographie par filtration sur gel », « par perméation de gel », « chromatographie d'exclusion » ou « chromatographie par filtration sur tamis moléculaires ». Contrairement aux autres méthodes chromatographiques, celle-ci est pratiquement indépendante de la nature du solvant. Le principe est donc simple : la séparation des molécules de tailles différentes est basée sur leur possibilité de pénétrer ou de ne pas pénétrer à l'intérieur de la phase stationnaire.

Le matériel servant de base est un gel, c'est-à-dire un milieu d'aspect homogène formé en fait de deux phases :

- une phase dispersante qui est le solvant,
- une phase dispersée qui est la substance solide constituant le substrat du gel, composé de petites particules très régulières et bien calibrées.

Le substrat du gel (grains, billes ou perles) résulte de la liaison de macromolécules assemblées les unes aux autres de manière à former un ensemble régulièrement réticulé. Mis en présence du solvant (pur) les « grains » gonflent (par pénétration du solvant à l'intérieur du grain). Si dans ce solvant des substances sont dissoutes, celles dont les molécules sont de dimension inférieure au diamètre des mailles du réseau diffusent à l'intérieur des grains de ce gel, alors que les molécules plus volumineuses restent à l'extérieur.

L'application de cette propriété permet de séparer chromatographiquement les molécules en fonction de leur taille. En haut d'une colonne remplie de gel on dépose donc une solution renfermant les molécules de tailles différentes. Les plus petites diffusent et se répartissent entre les phases intra et extra-granulaire, dans des proportions qui ne dépendent que de leur nature et de celle du gel. L'éluant entraîne, en premier lieu, les grosses molécules qui restent dans le liquide extra-granulaire, alors que les petites, qui doivent diffuser, sont ralenties. La poursuite de l'élution accentue leur séparation et l'ordre de sortie de la colonne.

$$D = \frac{(C_A)_S}{(C_A)_M}$$

D représente ici un coefficient de distribution correspondant au rapport de la concentration de la substance (A) dans la phase intragranulaire ;  $(C_A)_S$  considérée comme phase stationnaire avec la concentration de la même substance dans le liquide extra-granulaire  $(C_A)_M$  considéré comme phase mobile.

Dans les conditions idéales, la valeur de cette constante est comprise entre 0 et 1. En effet, lorsque les molécules sont totalement exclues de la phase stationnaire, on a  $(C_A)_S = 0$  et donc  $D = 0$ . Au contraire, lorsque les molécules diffusent parfaitement, elles se répartissent de manière identique entre les deux phases, donc :  $(C_A)_S = (C_A)_M$ , par conséquent :  $D = 1$ .

Entre ces deux valeurs théoriques extrêmes :  $0 \leq D \leq 1$ , on trouve d'autres valeurs correspondant aux substances qui ne sont pas totalement exclues mais qui ne peuvent cependant pas diffuser dans toutes les directions.

D dépend des propriétés physiques de chaque molécule, de leur taille, de leur volume qui, en première approximation et dans certaines limites, est proportionnel à leur masse moléculaire. Pour un gel donné, D peut donc être proportionnel à la masse moléculaire.

- Phase stationnaire: composée d'un gel organique (nouveaux supports à la base de silice ou de gels d'alcools polyvinyliques)
- Taille des pores  $\gg$  taille des espèces à séparer
- La séparation est indépendante de la phase mobile
- Surtout pour la séparation de polymères (e.g. protéines ou sucres)
- Utile pour la détermination de la masse molaire
- Les grosses molécules ne peuvent entrer dans les pores du support et sont donc exclues (elles sont éluées plus rapidement)
- Parfois D est supérieur à 1. Il ne s'agit alors plus seulement d'exclusion-diffusion mais de l'intervention d'un autre phénomène : l'adsorption ou l'échange d'ions (affinité plus grande pour le gel lui-même (support) que pour la phase intra-granulaire (solvant)).

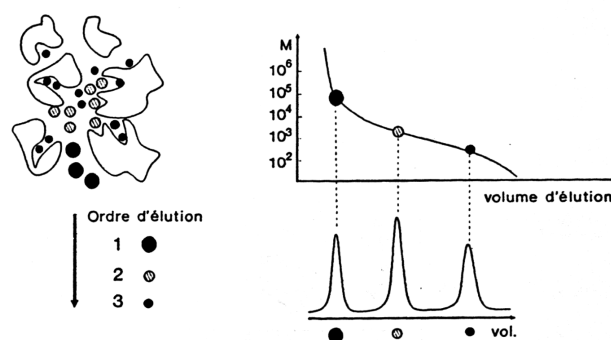


Figure 7.1 – Schéma illustrant de manière simplifiée le mécanisme de migration différentielle dans la colonne. Chromatogramme représentant la séparation de trois polymères de tailles différentes en solution.

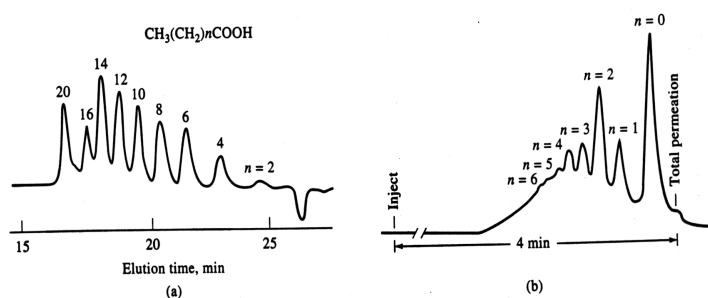


Figure 28-28 Applications of size-exclusion chromatography. (a) Separation of fatty acids. Column: polystyrene based,  $7.5 \times 600$  nm, with exclusion limit of  $1 \times 10^3$ . Mobile phase: tetrahydrofuran. Flow rate: 1.2 mL/min. Detector: refractive index. (b) Analysis of a commercial epoxy resin ( $n$  = number monomeric units in the polymer). Column: porous silica  $6.2 \times 250$  mm. Mobile phase: tetrahydrofuran. Flow rate: 1.3 mL/min. Detector: UV absorption. (Courtesy of DuPont Instrument Systems, Wilmington, DE.)

- Généralement, on choisit une phase stationnaire dont la partie linéaire de la relation  $\log M_w = f(V_R)$  englobe les composés à séparer.

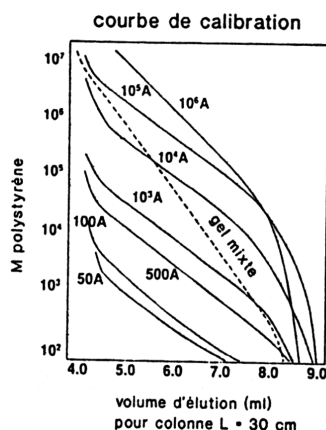


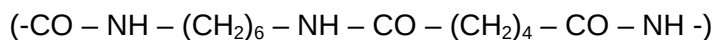
Figure 7.2 – Courbes d'étalonnage d'une série de gels commerciaux. On remarque que les domaines de séparation d'un type de macromolécule sont en rapport direct avec la taille des pores indiquée pour chaque gel utilisé.

#### 4.5.1 La phase stationnaire

Il existe actuellement de nombreux remplissages. Ils se distinguent par leur nature chimique et leur dureté.

**Gels mous** : structures faiblement réticulées et capables d'absorber dans leurs pores de grandes quantités de solvant. Ils gonflent de plusieurs fois leurs volumes secs et leurs porosités augmentent en proportion du volume du solvant absorbé. Ils s'utilisent principalement avec des solutions aqueuses, *i.e.* chromatographie de filtration sur gel.

**Gels de Dextrane** (Sephadex) : sont obtenus à partir du dextrane polyholoside polymérisé obtenu après culture de bactéries dans des solutions de saccharose. Le dextrane est donc formé de molécules de glucose reliées entre elles par des liaisons  $\alpha$  -1 -6 glucosidiques ainsi que par un petit nombre de liaisons 1-3. Afin d'obtenir un substrat réticulé, on fait réagir le dextrane en milieu alcalin avec un réactif bifonctionnel : l'épichlorhydrine du glycérol qui forme avec deux hydroxyles portés par des chaînes différentes des liaisons éthers. Ces molécules sont insolubles dans l'eau, mais la présence de nombreux groupes hydroxyles les rendent particulièrement hydrophiles. Ces gels permettent d'obtenir des séparations de molécules dont les masses vont de 700 à 800000. Du même type : gels d'agar-agar et d'agarose, amidon, gel de polyacrylamide (biogels) :



**Gels de polystyrène** (Styragel) : obtenu par polymérisation des dérivés du vinyl benzène ou styrène en présence d'un agent réticulant le divinyl benzène. Ils sont réticulés à 2 %. Ils ne doivent pas être utilisés avec des solvants polaires mais avec le toluène ou le chloroforme par exemple. Ces molécules sont donc hydrophobes.

**Gels semi-rigides** : sont produits par polymérisation en « perle » des dérivés du vinyl benzène en présence d'agents réticulants comme le divinyl benzène. Ils ont une perméabilité élevée et une capacité moyenne pour un large domaine de taille de pores. Ils ne gonflent que de 1 à 1.8 fois. Ils sont livrés sous forme de perles en suspension dans le divinyl benzène. Ils sont très réticulés. On les utilise principalement avec des solvants organiques. On peut les modifier chimiquement pour les rendre « mouillables » par sulfonation douce. L'utilisation de tels gels est connue sous le nom de chromatographie de perméation sur gel.

**Gels rigides** : les substrats de cette catégorie sont plutôt des verres que des gels. La taille de leurs pores est fixe. Ils peuvent être hydrophiles ou lipophiles. Pour la plupart d'entre eux, le rapport  $V_S/V_M$  est compris entre 0.8 et 12.3. Leur efficacité est comprise entre 300 et 1500 plateaux par mètre la rendant ainsi inférieure à celle des gels semi-rigides (1500 à 6000 plateaux par mètre).

**Aérogels** : ce sont des gels de silice donc des verres (poudre de verre très fine de granulométrie contrôlée et de porosité bien déterminée). Ils ont évidemment des sites d'adsorption (groupements hydroxyles) qui peuvent retarder excessivement les espèces polaires. On modifie alors chimiquement la silice. Diamètre des pores : 10 à 150 nm.

#### 4.5.2 La phase mobile

En chromatographie d'exclusion sur gel, le choix de la phase mobile ne s'effectue plus selon la polarité du solvant comme dans le cas de la chromatographie de partage et celui de la chromatographie d'adsorption. En effet, la phase mobile doit surtout être capable de dissoudre l'échantillon et être suffisamment semblable à la phase stationnaire afin de la mouiller et d'éviter l'adsorption. Lorsque le gel est mou, le solvant doit aussi le gonfler puisque la taille des pores de ce gel dépend de la quantité de solvant imbibée.

Dans le cas idéal, la phase mobile, le solvant piégé et le gel doivent interagir de manière identique avec les molécules du soluté; ainsi, on peut être sûr que son déplacement dans les pores ne se fait que par diffusion. Il faut aussi que le solvant soit compatible avec l'appareillage et le détecteur si l'on en fait usage directement.

Les solvants les plus couramment utilisés sont :

| Solvant                    | Point d'ébullition °C | Densité               | Viscosité    | Indice de réfraction  | Température d'utilisation °C | Utilisation                                                |
|----------------------------|-----------------------|-----------------------|--------------|-----------------------|------------------------------|------------------------------------------------------------|
| Tétrahydrofurane           | 66                    | 0.8892                | 0.51 à 25°C  | 1.4070 <sup>20</sup>  | amb.-45                      | Général, polymères et petites molécules                    |
| Trichloro-1-2-4 benzène    | 213                   | 1.4634 <sup>25</sup>  | 0.50 à 135°C | 1.5524 <sup>25</sup>  | 130-160                      | Polyoléfines                                               |
| Toluène                    | 110.60                | 0.866 <sup>20</sup>   | 0.52 à 25°C  | 1.4893 <sup>24</sup>  | amb.-70                      | Caoutchoucs et élastomères                                 |
| m-Crésol                   | 202                   | 1.034 <sup>20</sup>   | 16.9 à 20°C  | 1.5348 <sup>20</sup>  | 30-135                       | Polyesters et polyamides                                   |
| Diméthyl N-N'formamide     | 153                   | 0.9445 <sup>25</sup>  | 0.90 à 25°C  | 1.42803 <sup>25</sup> | amb.-85                      | Polyuréthanes, acrylates, cellulose, esters, acrylonitrile |
| Chloroforme                | 61.2                  | 1.489 <sup>20</sup>   | ...          | 1.4476 <sup>20</sup>  | Ambiante                     | Epoxy, silicones, polymères vinyliques, petites molécules  |
| Tétrachloro 1-1-2-2 éthane | 146.5                 | 1.58658 <sup>25</sup> | ...          | 1.49419 <sup>20</sup> | amb.-100                     | Composés de bas poids moléculaires                         |
| Trifluoroéthanol           | 73.6                  | 1.3823 <sup>25</sup>  | 0.9 à 38°C   | 1.2907 <sup>20</sup>  | amb.-40                      | Certains polyamides                                        |
| Eau*                       | 100                   | 0.9999 <sup>20</sup>  | 1.0 à 20°C   | 1.3330 <sup>20</sup>  | amb.-65                      | Polyélectrolytes et liqueurs biologiques                   |

\* Des tampons aqueux sont parfois nécessaires pour stabiliser le pH, la composition moléculaire et la taille moléculaire

### 4.5.3 Résolution de la séparation

Dans ce type de chromatographie, les possibilités d'améliorer les séparations par l'intermédiaire des divers facteurs entrant dans la relation de résolution sont relativement restreintes. En effet :

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left( \frac{k'}{1 + k_B} \right)$$

- **Le coefficient de sélectivité  $\alpha$**  est ici lié à la taille des molécules étudiées, à la porosité des gels en phase stationnaire et, surtout, à leur uniformité. En effet, les faibles différences de diffusion de molécules voisines sont pratiquement compensées par la dimension variable des pores. On recherchera donc des phases stationnaires dont les diamètres sont proches de ceux des molécules à séparer et dont la porosité est très homogène. La sélectivité en sera donc d'autant meilleure.
- **Le facteur de capacité  $k'$**  est relativement petit et dans les meilleures conditions il est égal à 1. D'autre part, le rapport  $V_S/V_M$  ne peut pas varier dans de grandes proportions puisqu'il dépend de la porosité de la phase stationnaire qui est, elle-même, fonction de la masse moléculaire des substances à séparer. Alors,  $k'$  sera relativement petit (0.5 à 2) et difficilement améliorable.
- **Le nombre de plateaux ( $N$ )** est modifié par la variation de la longueur de la colonne, ou la variation du débit de la phase mobile. La longueur de cette colonne ne peut pas être trop allongée surtout lorsque la phase stationnaire (gel) est peu réticulée, sous peine de l'écraser. On augmente alors le nombre des échanges en appliquant un procédé par recyclage. Il est possible de prévoir une ou plusieurs nouvelles chromatographies de l'éluant sur la même colonne.

Cette méthode diffère par rapport aux autres du fait de l'égalité de largeur des pics d'élution quelque soit la valeur de  $D$  (le peu de temps passé à l'intérieur du gel par les molécules diffusant mal compense l'élargissement dû à la lenteur de l'établissement des équilibres). C'est donc le contraire de ce qui se passe en chromatographie de désorption (solide-liquide) où les pics s'élargissent avec l'augmentation de  $D$ .

### 4.6 Chromatographie d'échange d'ions

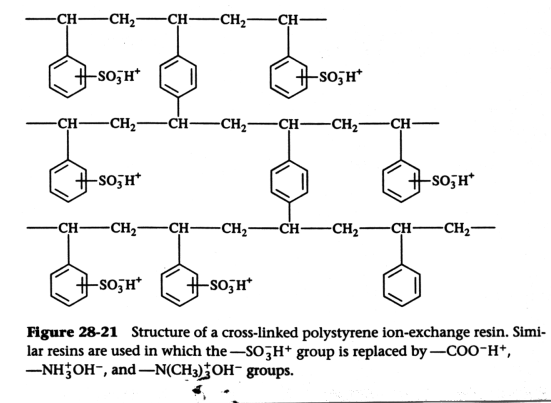
Les échangeurs d'ions sont des substances insolubles dans l'eau, dont les groupements ioniques ont la propriété d'échanger certains de leurs ions au contact des solutions d'électrolytes. L'échangeur, qui doit être inerte et insoluble, peut avoir une origine minérale (zéolithes naturelles, par exemple) mais les substances organiques comme les résines synthétiques sont les plus importantes pour les applications de laboratoire. Le développement de la méthode pour la séparation des terres rares et de divers produits de fission a revêtu une grande importance dans le domaine de l'énergie atomique. Son extension à la biochimie a permis de résoudre de nombreux problèmes extrêmement complexes de structure de protéines et d'acides nucléiques. D'autre part, la chromatographie préparatoire permet de fabriquer des drogues, des produits biochimiques, des transuraniens de synthèse, ..., à l'échelle industrielle.

#### 4.6.1 La phase stationnaire : les supports échangeurs d'ions

La phase stationnaire doit être insoluble et chimiquement stable; la structure doit être stable et ses particules de préférence sphériques et uniformes. On connaît divers types de supports; des produits minéraux et des produits synthétiques (tels que des polymères et des dérivés de la cellulose) qui sont les échangeurs d'ions les plus utilisés.

Les substances minérales sont généralement de faible capacité, relativement instables et souvent solubles en milieu acide ou alcalin. Le plus ancien échangeur est la zéolithe (aluminosilicates naturels :  $((\text{Ca}, \text{Na}) (\text{Si}_4\text{Al}_2\text{O}_{12})(6\text{H}_2\text{O}))$ ). On trouve aussi, dans le commerce une gamme de substances synthétiques ou tamis moléculaires de Linde, analogues aux zéolithes naturelles mais de structure cristalline et de propriétés très régulières. (Ces matériaux peuvent donc être utilisés pour séparer des espèces moléculaires de taille différente si l'une d'elles est trop grande pour passer par les pores). On connaît aussi des échangeurs synthétiques fabriqués à partir des oxydes de métaux du groupe IV (Zn, Th) et des acides des groupes V et VI, le phosphate de zirconium étant l'exemple le plus connu (thermiquement stable et résistant aux radiations nucléaires).

Les substances organiques les plus importantes sont à base de résines synthétiques. On peut les préparer en nombre pratiquement illimité en jouant sur la nature de la résine et des groupements fonctionnels, sur le degré de pontage et par la suite, sur la taille des pores. Les groupements échangeurs anioniques ou cationiques sont greffés sur ces polymères. Pour les échangeurs de cations ce sont essentiellement des dérivés du type : sulfurique, carboxylique, phosphonique, phosphinique, hydroxylique, et aminodiacétique. Ce dernier groupement se comporte, vis-à-vis de certains ions métalliques, de la même manière que l'EDTA. On les nomme : résines chélatantes. On peut donc considérer ces résines comme des acides, des sels ou des complexants insolubles et il convient de les classer selon leurs groupements fonctionnels (type fortement ou faiblement acide, chélatant, etc.). L'ion échangeable est, soit l'ion  $\text{H}^+$  dans le cas des acides, soit un ion métallique dans le cas des sels qui en dérivent.



Pour les échangeurs d'anions, ce sont essentiellement des dérivés d'amines.

Ce sont donc des bases libres, des amines hydroxydes d'ammoniums quaternaires ou leurs sels. Les ions échangeables sont des anions hydroxydes ( $\text{OH}^-$ ) ou des anions des sels correspondants.



Pratiquement, la capacité d'un échangeur d'ions va dépendre de divers facteurs :

- taux de pontage de la résine (soit dimension des pores),
- pH de la solution,
- dimension des grains,
- diffusion des ions à travers le film de liquide au contact du grain,
- diffusion des ions à l'intérieur des pores de la résine (cinétique),
- équilibre de Donnan (diffusion de molécules ou de paires d'ions de la solution à l'intérieur des pores).

#### 4.6.2 La phase mobile

La plupart des séparations utilisant les résines échangeuses d'ions s'effectuent avec une solution aqueuse en raison des propriétés de solubilisation et d'ionisation de l'eau. Toutefois, il peut être nécessaire d'utiliser des mélanges de solvants polaires (méthanol-eau) afin d'optimiser une élution ou faciliter la solubilité de certains solutés.

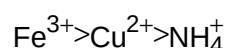
L'élution est assurée par déplacement des équilibres : soit par la présence d'un ion ayant plus d'affinité pour la résine, soit par l'élévation des concentrations en ions  $H^+$  ou  $OH^-$ , soit, dans le cas des échangeurs faibles, par modification du pH qui agit ainsi sur l'ionisation aussi bien des groupements échangeables de la résine que de ceux des solutés.

#### 4.6.3 Résolution de la séparation

##### Règles de sélectivité

Les forces qui s'exercent entre un groupement ionique d'une résine et l'ion mobile (contre-ion) sont, généralement du type électrostatique. L'affinité de la résine vis-à-vis des différents ions définit sa sélectivité. Qualitativement on peut constater que :

- **un échangeur préfère les contre-ions les plus chargés.** C'est un effet électrostatique :



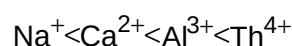
- **un échangeur préfère les contre-ions qui possèdent un volume, à l'état hydraté, relativement petit.** En effet, le gonflement sera d'autant plus petit que le volume de l'ion est petit ; d'autre part, l'ion de faible volume pourra s'approcher plus près de l'ion fixé sur la résine et de ce fait former une liaison électrostatique plus forte. L'ordre des affinités est le suivant :



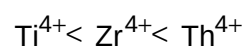
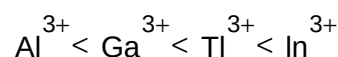
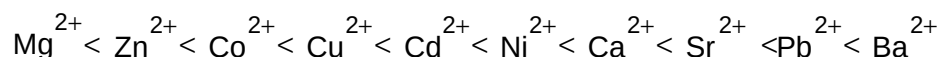
qui est l'ordre dans lequel le rayon de l'ion hydraté augmente ;

- **un échangeur préfère les contre-ions formant les plus fortes liaisons avec le groupement ionique fixe.** Ainsi, une résine cationique avec une fonction carboxylate ( $-COO^-$ ) aura plus d'affinités pour le proton que pour un ion métallique. Une résine chélatante aura, elle aussi, une préférence pour les métaux formant, avec le groupement fixé, des complexes stables.

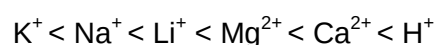
Groupements sulfoniques : l'affinité augmente avec la charge :



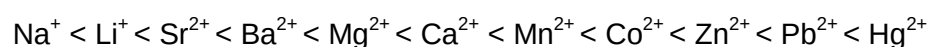
pour une même charge, elle croît avec le numéro atomique mais, en raison de la différence de solvation, on observe des inversions pour  $H^+$  et  $NH_4^+$  :



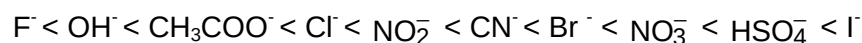
Groupements carboxyliques :



Groupements aminodiacétiques (complexant type EDTA) :



Groupements ammoniums quaternaires :



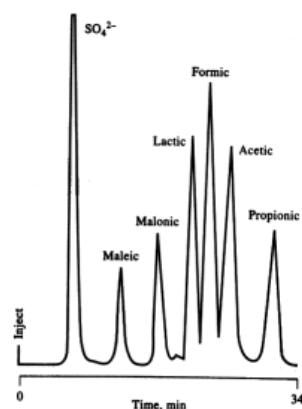
Pour les échangeurs à groupements amines secondaires ou tertiaires, l'ordre est sensiblement le même mais la faible basicité de ces groupements leur confère une très forte affinité pour les ions  $\text{OH}^-$ .

#### 4.6.4 Chromatographie ionique

Une application importante de la chromatographie échangeuse d'ions a été développée qui permet, par conductivité, d'identifier et de doser des anions et des cations avec une très grande sensibilité.



**Figure 28-24** Indirect photometric detection of several anions by elution. Eluent:  $10^{-3}$  M disodium phthalate,  $10^{-3}$  M boric acid, pH 10. Flow rate: 5 mL/min. Sample volume: 0.02 mL. UV detector. Sample ions: (a) 18- $\mu$ g carbonate; (b) 1.4- $\mu$ g chloride; (c) 3.8- $\mu$ g phosphate; (d) 5- $\mu$ g azide; (e) 10- $\mu$ g nitrate. (Reprinted with permission from H. Small, Anal. Chem., 1985, 55, 240A. Copyright 1983 American Chemical Society.)



**Figure 28-26** An ion-exclusion chromatogram for a mixture of six weak acids.

- Dans ce cas, on utilise un conductimètre comme système de détection
- La difficulté majeure est de distinguer l'ion, présent à une faible concentration, de la solution éluante concentrée

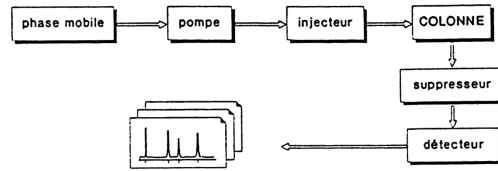


Figure 4.1 – Schéma de principe d'un appareil de chromatographie ionique. Configuration d'un montage à double colonne, avec suppresseur, en vue d'une détection conductimétrique.

#### 4.7 Particularités de H (chromatographie liquide)

- Pas de minima dans les courbes (débit trop lent pour être pratique)
- La taille des particules est très importante

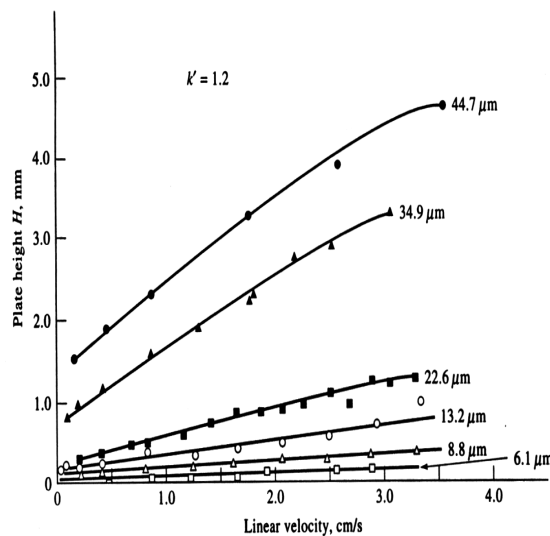
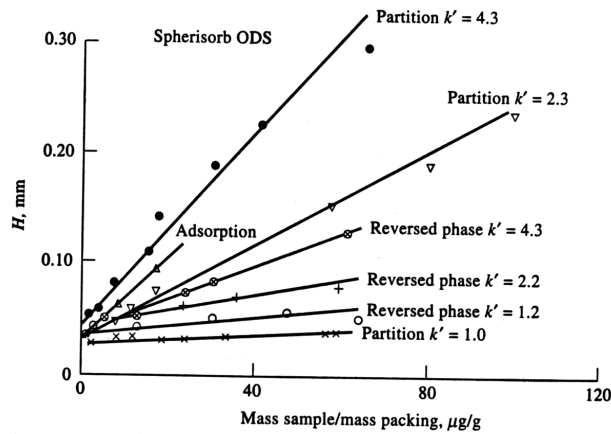


Figure 28-2 Effect of particle size of packing and flow rate upon plate height  $H$  in liquid chromatography. Column dimensions: 30 cm  $\times$  2.4 mm. Solute: N,N-diethyl-n-aminoazobenzene. Mobile phase: mixture of hexane, methylene chloride, isopropyl alcohol. (From R. E. Majors, J. Chromatogr. Sci., 1973, 11, 92. With permission.)

- À l'extérieur de la colonne, l'élargissement des pics peut être important dû à la diffusion (donc il faut réduire le rayon du tuyau et éventuellement  $\bar{u}$ ).

$$H_{\text{ex}} = \frac{\pi r^2 \cdot \bar{u}}{24 \cdot D_m}$$

- $H$  augmente avec la quantité d'échantillon injecté (de façon plus importante si  $k'$  est grande).



- H diminue si l'on diminue  $d_f$  (épaisseur de la phase stationnaire).  
Rappel:  $C_s = f(d_f^2)$  (chapitre précédent)

## 4.8 L'appareillage en chromatographie liquide

L'appareillage classique est composé des modules suivants:

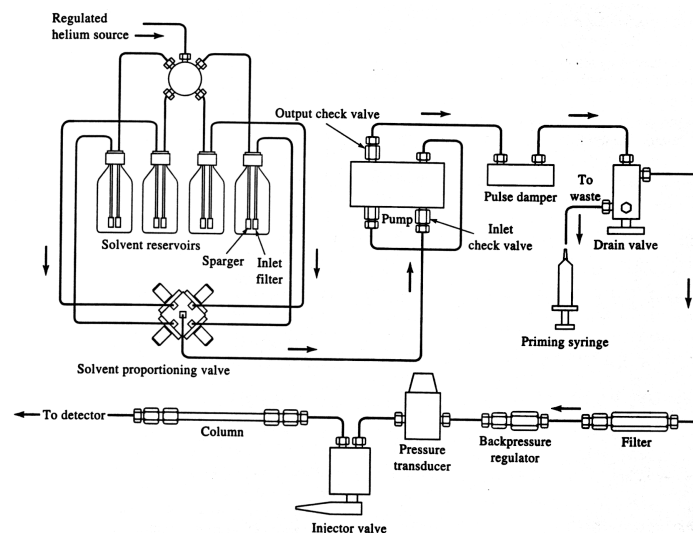


Figure 28-4 Schematic of an apparatus for HPLC. (Courtesy of Perkin-Elmer Corporation, Norwalk, CT.)

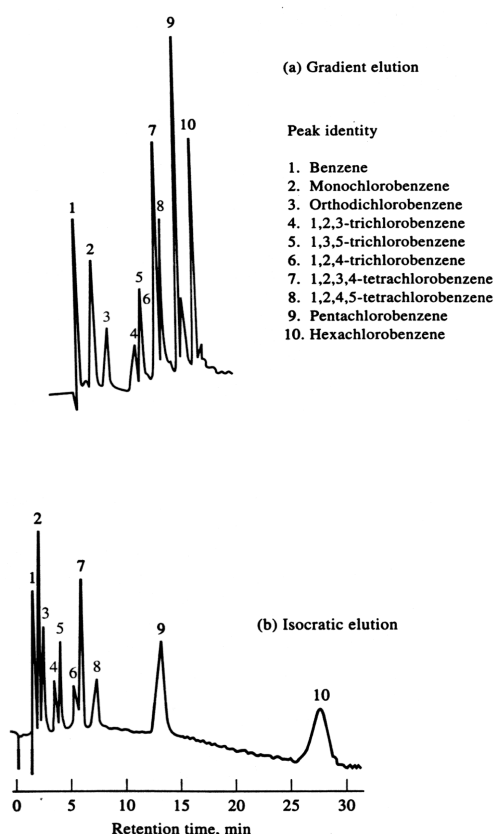
### 4.8.1 Réservoir

- Le réservoir est important afin d'éliminer des gaz qui sont moins stables aux fortes pressions
  - filtrer sous vide
  - chauffage/agitation
  - barbotage avec gaz de faible solubilité

- Pratiquement, le choix de solvants se fait selon :
  - leur miscibilité
  - les interactions chimiques potentielles
  - la viscosité ne doit pas être trop élevée
  - l'absorbance UV
  - la toxicité
  - l'inflammabilité
  - le coût

#### 4.8.2 Pompes

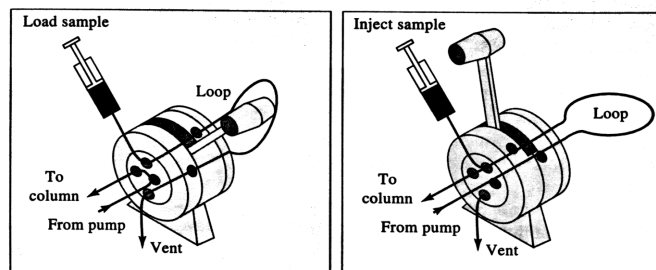
- Dû à l'imposition d'une pression de 50 - 350 bars, il y a toujours une possibilité de fuites
- Il est important d'assurer une pression et un débit qui sont constants (stables) afin de diminuer des pulsations.
- Il est possible de travailler en régime isocratique (1 phase mobile) ou en mode gradient d'élution (deux ou plusieurs phases mobiles)



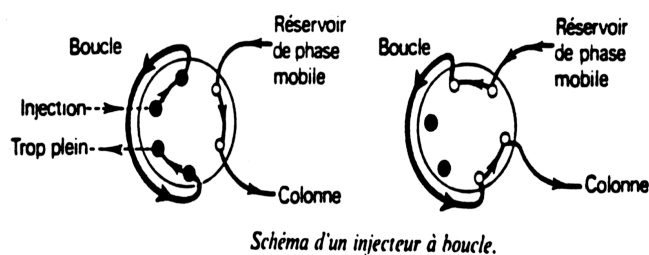
**Figure 28-5** Improvement in separation efficiency by gradient elution. Column: 1 m  $\times$  2.1 mm i.d., precision-bore stainless; packing: 1% Permaphase® ODS. Sample: 5  $\mu$ L of chlorinated benzenes in isopropanol. Detector: UV photometer (254 nm). Conditions: temperature, 60°C, pressure, 1200 psi. (From J. J. Kirkland, *Modern Practice of Liquid Chromatography*, p. 88. New York: Interscience, 1971. Reprinted by permission of John Wiley & Sons, Inc.)

### 4.8.3 Injecteur

- imposition d'une pression élevée
- le volume du boucle est bien défini



**Figure 28-7** A sampling loop for liquid chromatography. (Courtesy of Beckman Instruments, Fullerton, CA.) With the valve handle as shown on the left, the loop is filled from the syringe, and the mobile phase flows from pump to column. When the valve is placed in the position on the right, the loop is inserted between the pump and the column so that the mobile phase sweeps the sample onto the column.



*Schéma d'un injecteur à boucle.*

### 4.8.4 Colonne (et Colonne de garde)

- acier inoxydable (ou titane!)
- particules uniformes et petites

e.g.

| Taille des particules | N     |
|-----------------------|-------|
| 10 $\mu\text{m}$      | 5000  |
| 5 $\mu\text{m}$       | 9000  |
| 3 $\mu\text{m}$       | 15000 |

## 4.8.5 Détecteur(s)

TABLE 20-1  
Performances of LC Detectors

| LC Detector                   | Commercially Available | Mass LOD (commercial detectors) <sup>a</sup> | Mass LOD (state of the art) <sup>b</sup> |
|-------------------------------|------------------------|----------------------------------------------|------------------------------------------|
| Absorbance                    | Yes <sup>c</sup>       | 100 pg–1 ng                                  | 1 pg                                     |
| Fluorescence                  | Yes <sup>c</sup>       | 1–10 pg                                      | 10 fg                                    |
| Electrochemical               | Yes <sup>c</sup>       | 10 pg–1 ng                                   | 100 fg                                   |
| Refractive index              | Yes                    | 100 ng–1 µg                                  | 10 ng                                    |
| Conductivity                  | Yes                    | 500 pg–1 ng                                  | 500 pg                                   |
| Mass spectrometry             | Yes <sup>d</sup>       | 100 pg–1 ng                                  | 1 pg                                     |
| FT-IR                         | Yes <sup>d</sup>       | 1 µg                                         | 100 ng                                   |
| Light scattering <sup>e</sup> | Yes                    | 10 µg                                        | 500 ng                                   |
| Optical activity              | No                     | —                                            | 1 ng                                     |
| Element selective             | No                     | —                                            | 10 ng                                    |
| Photoionization               | No                     | —                                            | 1 pg–1 ng                                |

<sup>a</sup> Mass LOD is calculated for injected mass that yields a signal equal to five times the  $\sigma$  noise, using a mol wt of 200 g/mol, 10 µL injected for conventional or 1 µL injected for microbore LC.  
<sup>b</sup> Same definition as *a*, above, but the injected volume is generally smaller.  
<sup>c</sup> Commercially available for microbore LC also.  
<sup>d</sup> Commercially available, yet costly.  
<sup>e</sup> Including low-angle light scattering and nephelometry.  
 (From E. S. Yeung and R. E. Synovec, *Anal. Chem.*, **1986**, 58, 1238. With permission.)

- UV-visible

- $A = \epsilon lc$
- trajet optique  $\approx 1$  cm
- sensibilité  $\sim 10^{-8}$  M

- Spectrofluorimétrie

- sensibilité  $\sim 10^{-10}$  M
- dérivation des composés

- Electrochimique

- ampèrométrie (surtout)
- sensibilité  $\sim 10^{-10}$  M
- composés oxydables ou réductibles

- Indice de réfraction

- peu sensible  $\sim 10^{-5}$  M
- détecteur universel
- très sensible à T ( $\pm 0.0001$ )
- pas de séparation à gradient

- Spectrométrie de masse

- problème: introduction de l'échantillon dans le spectromètre ( $\nabla \uparrow$ )
- $\therefore$  microcolonnes ( $< 50$  µL/min)
- nébuliseurs /desolvatations
- coût  $\uparrow$

- Exemple: détecteur UV

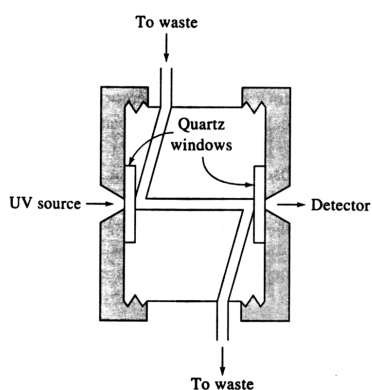


Figure 28-9 Ultraviolet detector cell for HPLC.

- Exemple: Détection par spectrophotomètre à barrette de diodes

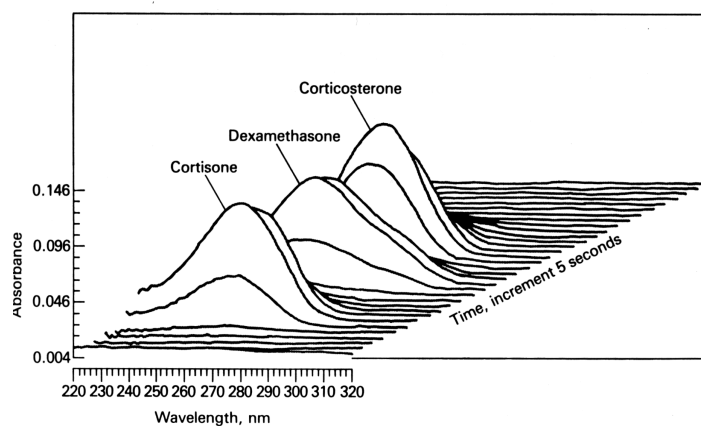
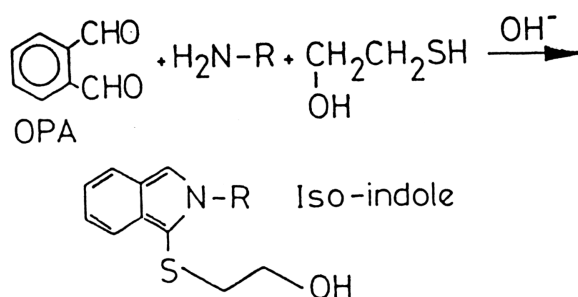


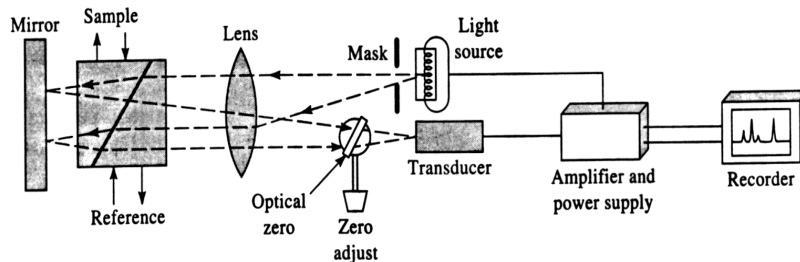
FIGURE 26-10 Absorption spectra of the eluent from a mixture of three steroids taken at 5-second intervals. (Courtesy of Hewlett-Packard Company, Palo Alto, CA.)

- Exemple: Dérivation des acides aminés avec l'orthophtalaldéhyde



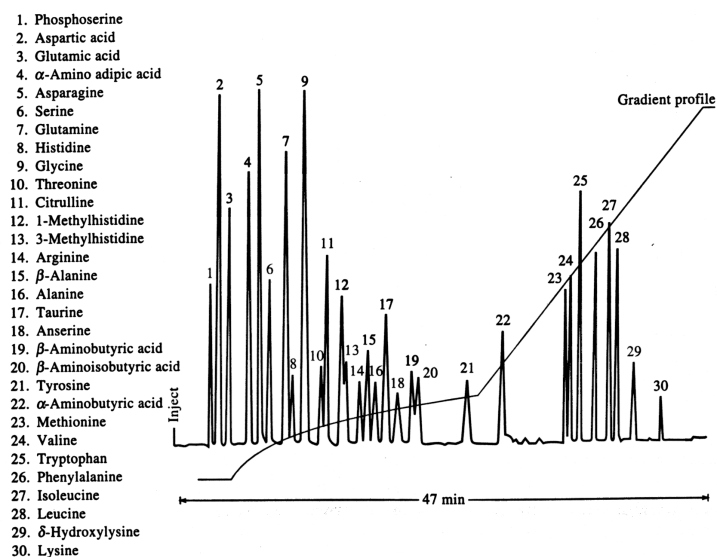


- Exemple: Détecteur de réfractométrie différentielle



**Figure 28-11** Schematic of a differential refractive-index detector. (Courtesy of Waters Associates, Inc., Milford, MA 91757.)

- Exemple: Séparation de 30 acides aminés



**Figure 28-18** Chromatogram of orthophthalaldehyde derivatives of 30 amino acids of physiological importance. Column: 5  $\mu\text{m}$   $\text{C}_{18}$ , reversed-phase. Solvent A: 0.05 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7.4, 96:2:2  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$ . Fluorescence detector: excitation 334 nm; emission 425 nm. (Reprinted with permission from R. Pfeiffer et al., Amer. Lab., 1983, 15(3), 86. Copyright 1983 by International Scientific Communications, Inc.)