

(6)

Chromatographie Liquide

de Haute Performance

(HPLC)

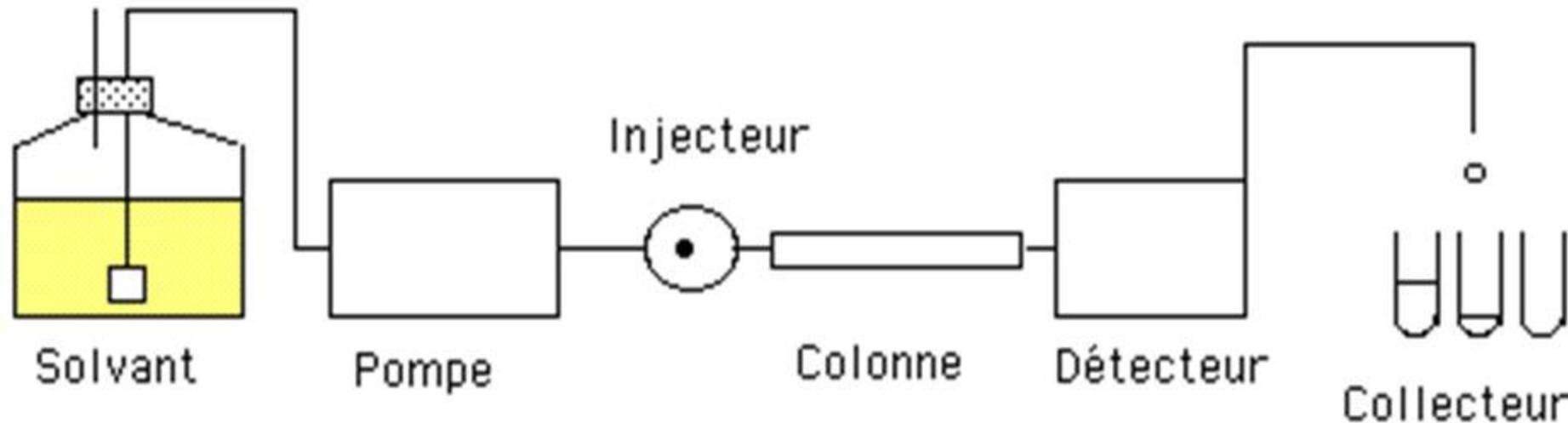
Principe

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 (Partage).

Appareillage

Dr Laib



1. Réservoirs de solvants

- Filtration des solvants
- Dégazages aux ultrasons

2. Dispositif de pompage

Pompes alternative (Débits utilisés : $0,1\text{-}2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$)

3. Dispositif d'injection (HPLC)

Dr Laib

➤ Remplissage de la boucle d'injection (V fixé 5-500 µl)

Comme la pression dans le **circuit pompe-colonne** est très élevée, on utilise un moyen indirect pour introduire l'**échantillon** à l'entrée de la **colonne**. Celui-ci est d'abord introduit à l'aide d'une **seringue** dans un **injecteur à boucle** externe, en **position Load**. On injecte toujours un volume supérieur à celui de la boucle, en prenant soin de ne pas introduire de bulles d'air dans la **boucle**. En tournant la valve en **position Inject**, seul le contenu de la boucle est dirigé en tête de colonne.

Cette méthode d'injection a l'avantage de donner des résultats très reproductibles, d'une injection à l'autre.

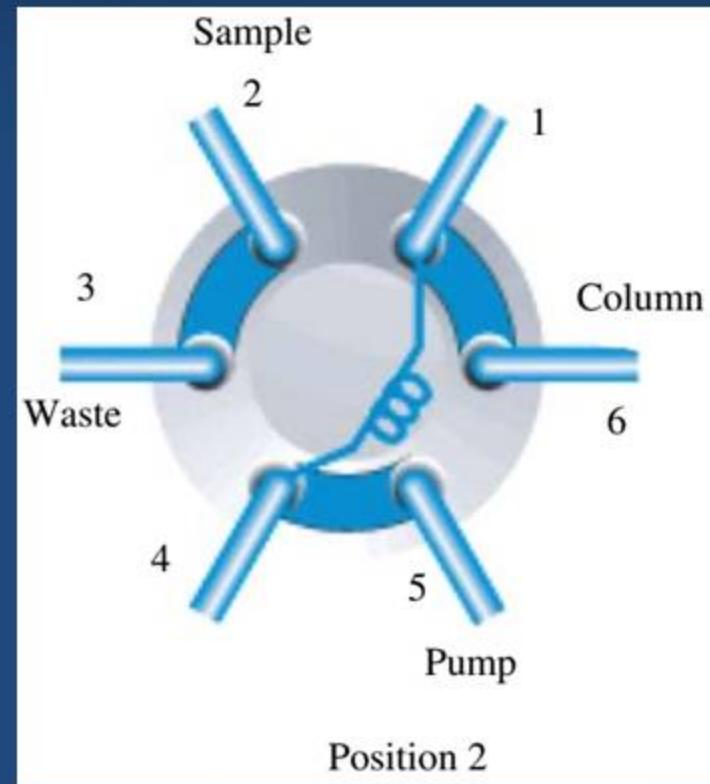
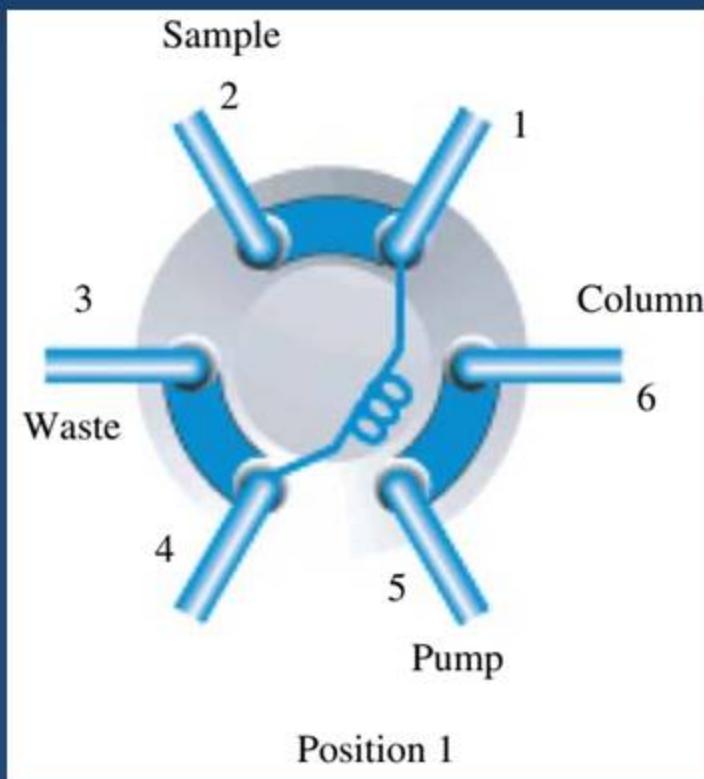


Figure 22.6. Valve switching flow paths through position A “load” and position B “inject.” (Ham & MaHam, 2024)

4. Colonnes :

Tubes en inox de longueur : L = 10 à 25 cm.

Micros colonnes de longueur : L = 3 à 7,5 cm.

On distingue 2 types différents selon la polarité de la phase stationnaire et celle de la phase mobile :

1 . HPLC en phase normale

Dr Laib

La phase stationnaire est polaire = la phase mobile est généralement apolaire (substances éluées en sens inverse de leur polarité propre) :

Les composants apolaires ont une plus grande affinité pour la phase mobile (élution rapide).
Inversement , les solutés polaire ont une plus grande affinité pour la phase stationnaire (élution lente).

2. HPLC en phase inverse

- La phase stationnaire est peu polaire ou apolaire (la phase mobile est généralement polaire) et le solvant polaire, (les substances sont alors élués dans le sens de leur polarité propre) :
- Les composants polaires ont une plus grande affinité pour la phase mobile : (élution rapide).

- Inversement, les solutés peu polaires ont une plus grande affinité pour la phase stationnaire : (élution lente) ;
- Ce sont des gels de silices comportant des greffons alkyles à 8 et à 18 atomes de carbone. (colonnes C₄, C₈ et C₁₈).

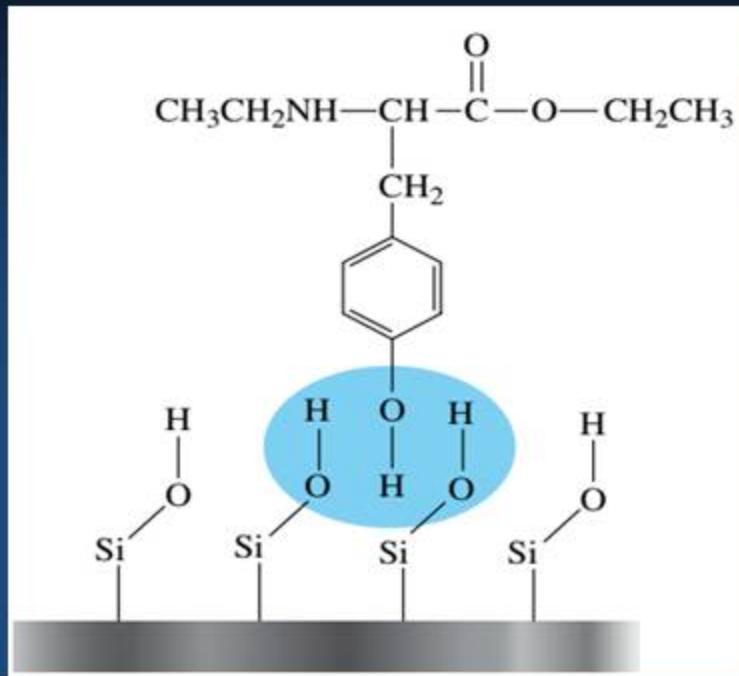


Figure 22.8. Normal phase (NP) silica column stationary phase illustrating the hydrogen bonding interaction (**oval region**) between the **silanol** ($-\text{Si}-\text{OH}$) groups of the stationary phase and the organic compounds **Hydroxyl** ($-\text{OH}$) group. (Ham & MaHam, 2024)

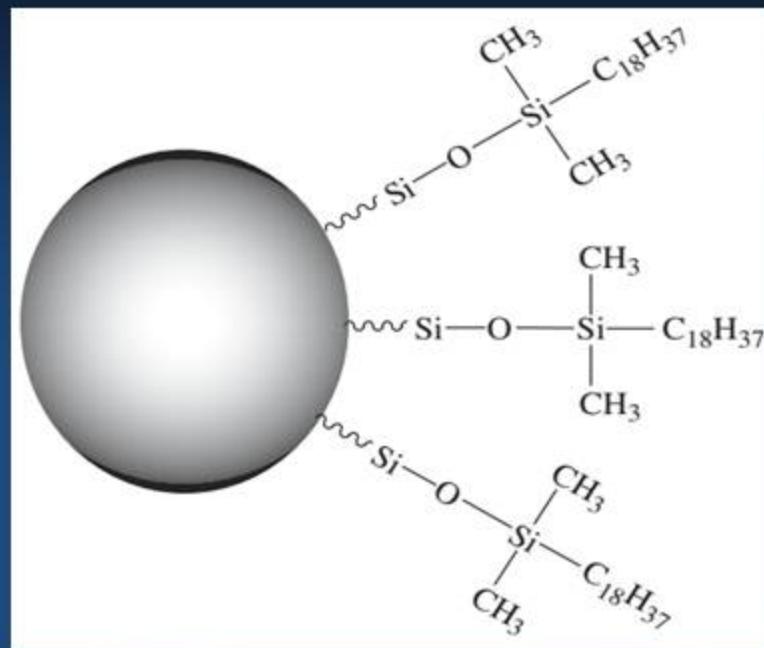
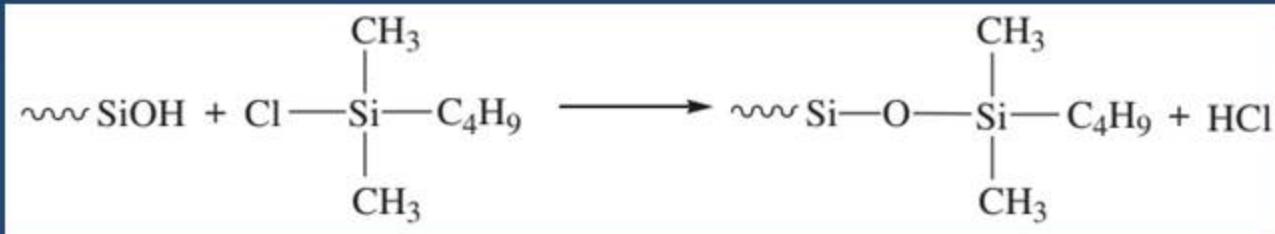


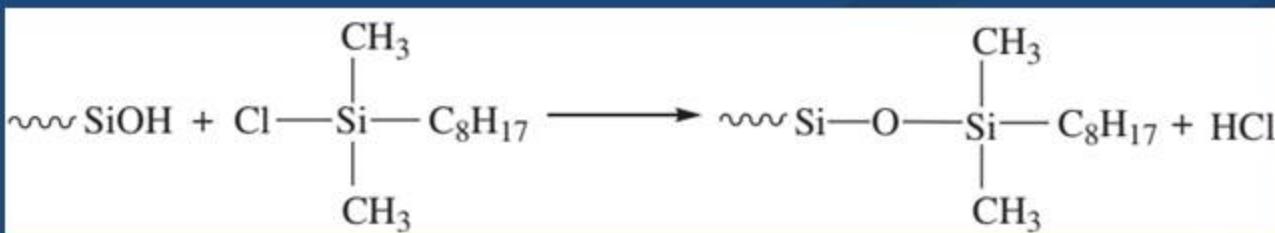
Figure 22.10. Stationary phase silica particle coated with reversed phase hydrophobic phase. The coating would actually be a complete coverage of the sphere in all directions. (Ham & MaHam, 2024)

Phase stationnaire	HPLC en phase normale Polaire	HPLC en phase normale Apolaire
Phase Mobile (Mode Gradient)	Gradient de + en + Polaire	Gradient de + en + Apolaire
Elution des Composés	Les + en + Polaires sont élués en Dernier	Les + en + Apolaires sont élués en Dernier

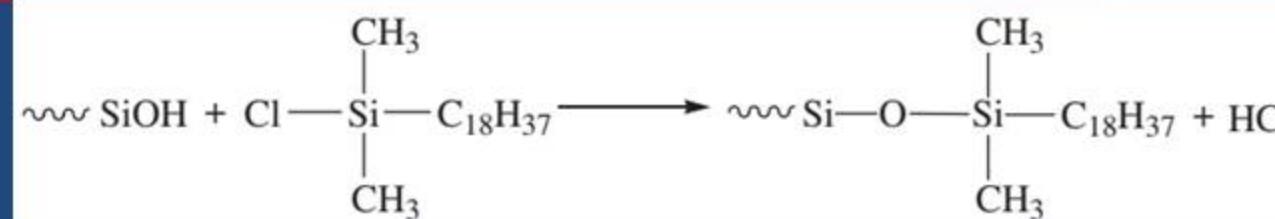
(a) Production of C-4 reversed-phase stationary phase



(b) Production of C-8 reversed-phase stationary phase



(c) Production of C-18 reversed-phase stationary phase



Dr Laib

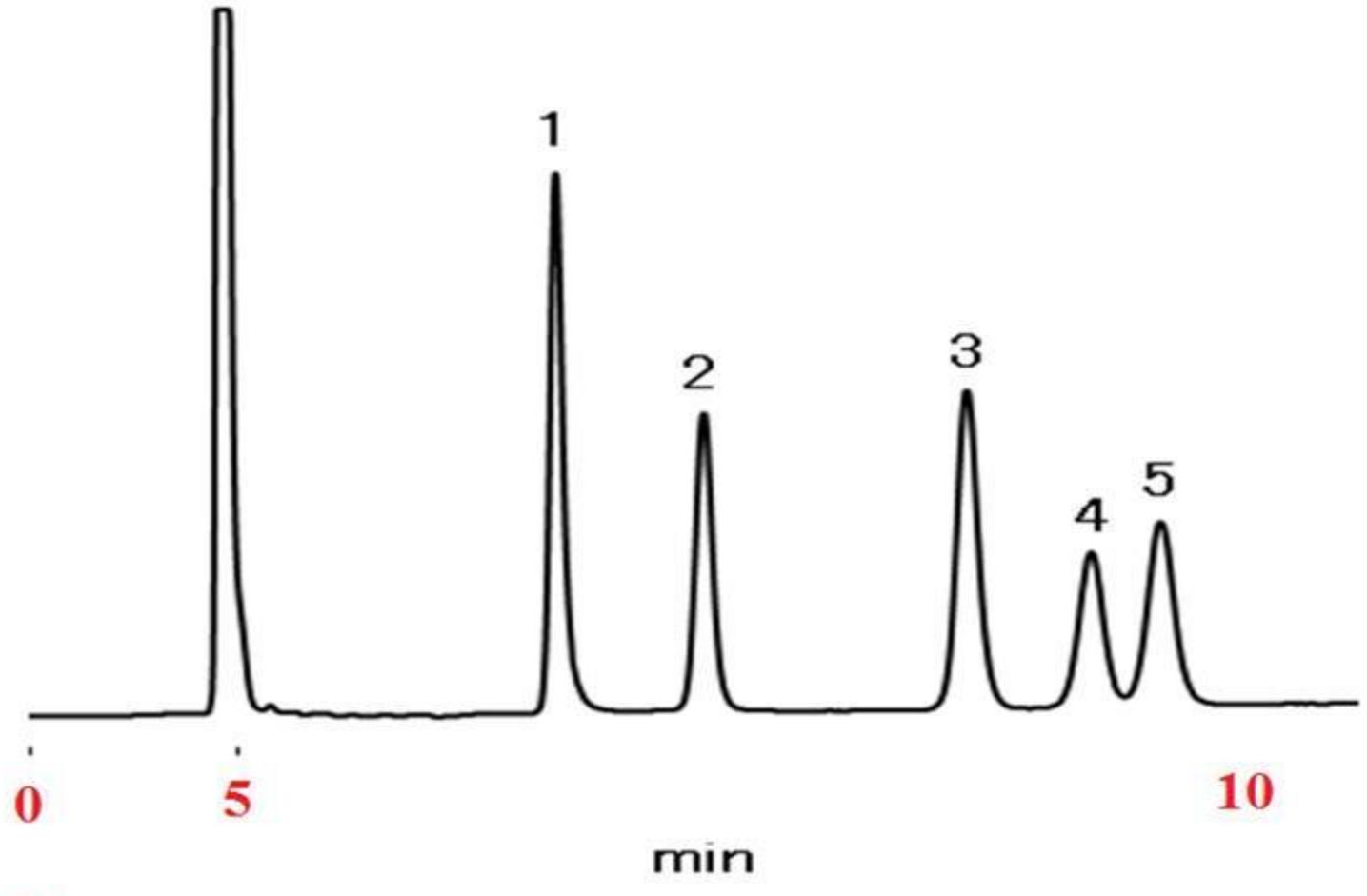
5. DéTECTEURS Mesure l'absorption de la lumière par le produit à la sortie de la colonne :

- ❖ Photomètre ;
- ❖ UV-Visible ;
- ❖ Réfractomètre ;
- ❖ DÉTECTEUR FLUORIMÉTRIQUE ;
- ❖ DÉTECTEUR ELECTROCHIMIQUE ;
- ❖ CONDUCTIMÈTRE ;
- ❖ DIFFUSION DE LUMIÈRE.

5. Exemples : HPLC des Glucides (6) Dr Laib

A column for saccharides analysis

(sahipak NH2P-50 4E)



Sample : 0.5 %
each, 10 μ L
1. Fructose
2. Glucose
3. Sucrose
4. Lactose
5. Maltose

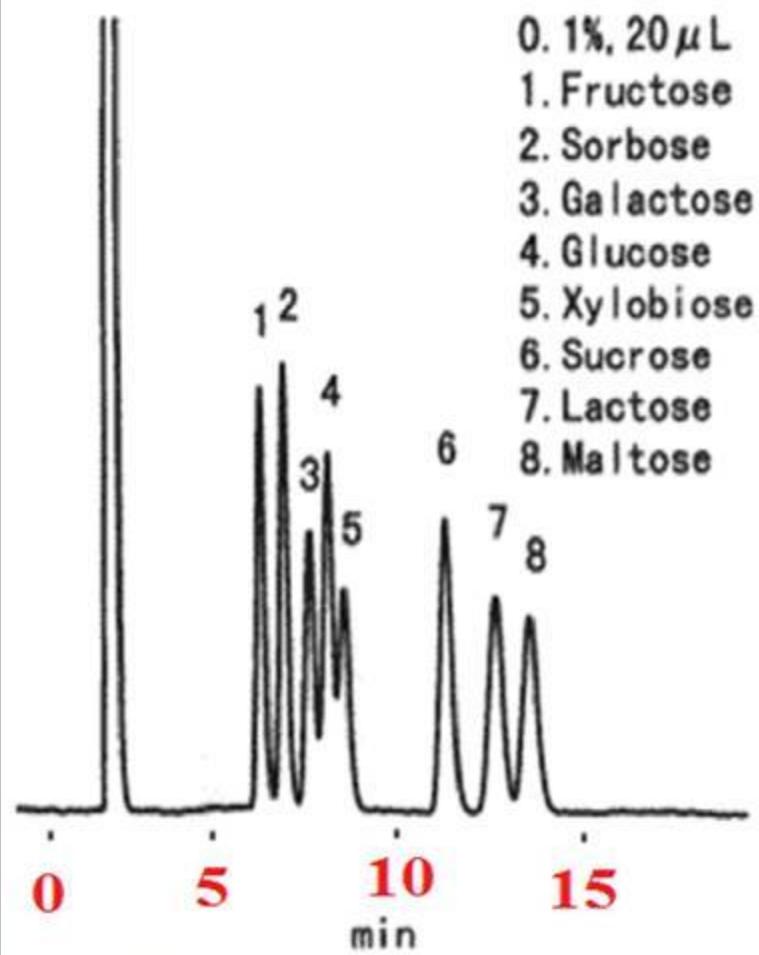
Column : ShodexAsahipak NH2P-50 4E (4.6 mm I.D. x 250 mm)

Eluent: $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}=25/75$

Flow rate: 0.6 mL/min

Detector : UV-Vis

Column temp.: 30 °C



Glucide	Time	Area	Concentration
Fructose	5.78	24715776	43.7669
Glucose	6.25	12.317003	22.6511
Saccharose	7.04	8.0003512	15.0194