

Chromatographie liquide haute performance Principes de base : Théorie

DÉVELOPPER
UNE SCIENCE TOUJOURS
MEILLEURE
AGILENT ET VOUS



Agilent Technologies s'engage auprès du monde de l'enseignement et donne accès à ses propres ressources.

Ce diaporama a été créé par Agilent Technologies.
L'utilisation de ce diaporama est réservée
à des fins pédagogiques uniquement.

Contactez Agilent Technologies au préalable pour toute
autre utilisation des images, schémas ou dessins.

Introduction

La chromatographie liquide haute performance (CLHP ou HPLC (en anglais), appelée auparavant chromatographie en phase liquide haute pression) est une technique de chimie analytique servant à séparer, identifier et quantifier les composants d'un mélange.

La HPLC s'appuie sur l'utilisation de pompes qui font circuler sous pression un solvant liquide contenant l'échantillon à travers une colonne remplie d'un matériau solide adsorbant (également appelé phase stationnaire). Chaque composant de l'échantillon interagit de manière légèrement différente avec l'adsorbant. De ce fait le débit varie selon les composants, ce qui permet de les séparer à leur sortie de la colonne.

Source : Wikipédia

Table des matières

Introduction

- [Que se passe-t-il dans la colonne ?](#)

Paramètres clés

- [Temps de rétention et largeur de pic](#)
- [Résolution : séparation à la ligne de base](#)
- [Résolution : l'équation fondamentale](#)
- [Efficacité ou nombre de plateaux théoriques](#)
- [Facteur de rétention](#)
- [Sélectivité ou facteur de séparation](#)

Comment jouer sur la sélectivité ?

- [Sélectivité : exemple 1](#)
- [Sélectivité : exemple 2](#)
- [Sélectivité : exemple 3](#)
- [Nombre de plateaux](#)

Équation de Van Deemter

- [Diffusion turbulente](#)
- [Diffusion axiale](#)
- [Résistance au transfert de masse](#)
- [Plus d'infos sur l'équation Van Deemter](#)

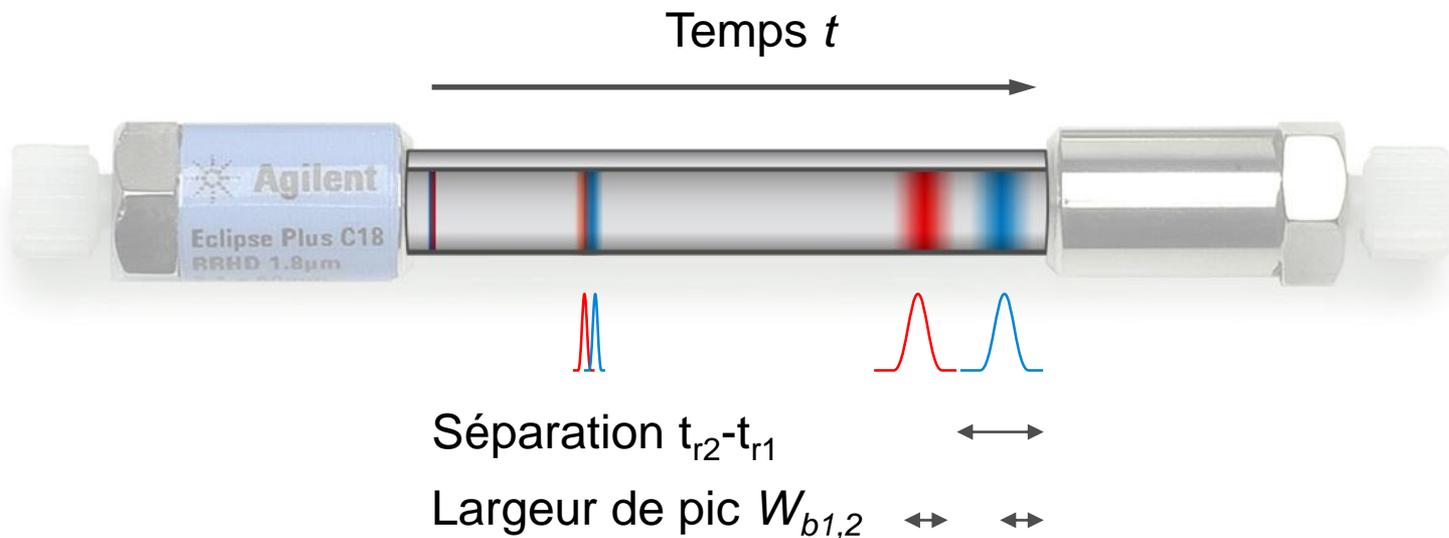
Capacité de pics

- [Analyse en gradient](#)
- [Définition](#)
- [Calcul de la capacité de pics](#)
- [Largeur de pic](#)
- [Exemple](#)



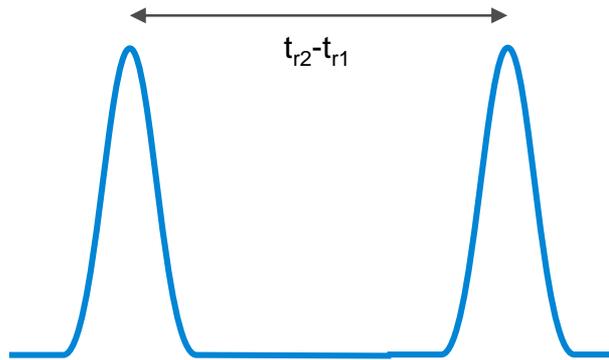
Introduction

Que se passe-t-il dans la colonne ?



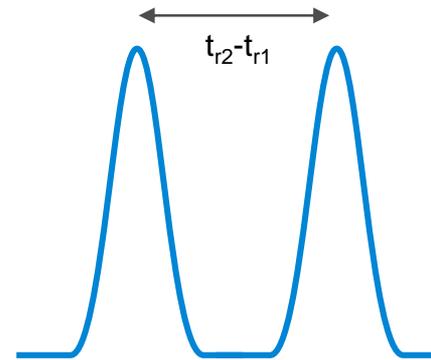
Introduction

Que se passe-t-il dans la colonne ?

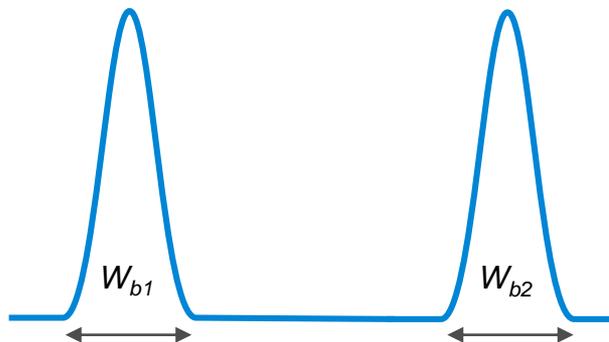


Séparation correcte

vs.

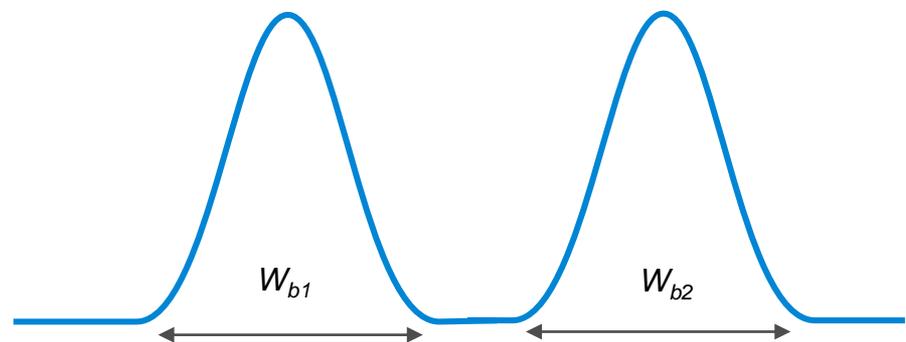


Séparation moyenne



Séparation correcte

vs.



Séparation moyenne

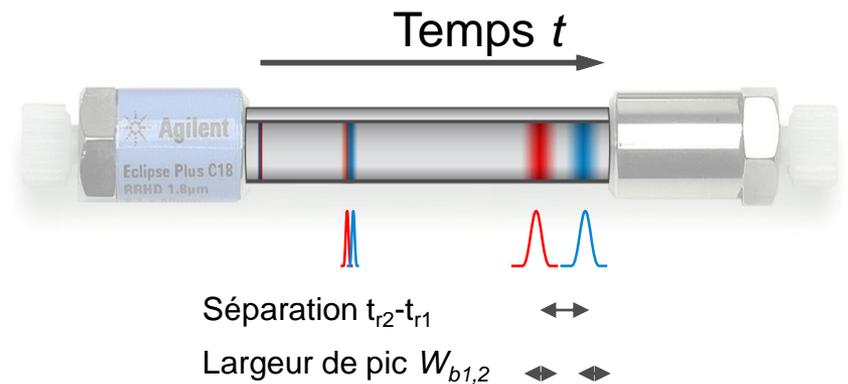
Introduction

Que se passe-t-il dans la colonne ?

$$R_s = \frac{t_{r2} - t_{r1}}{1/2 \cdot (W_{b2} + W_{b1})}$$

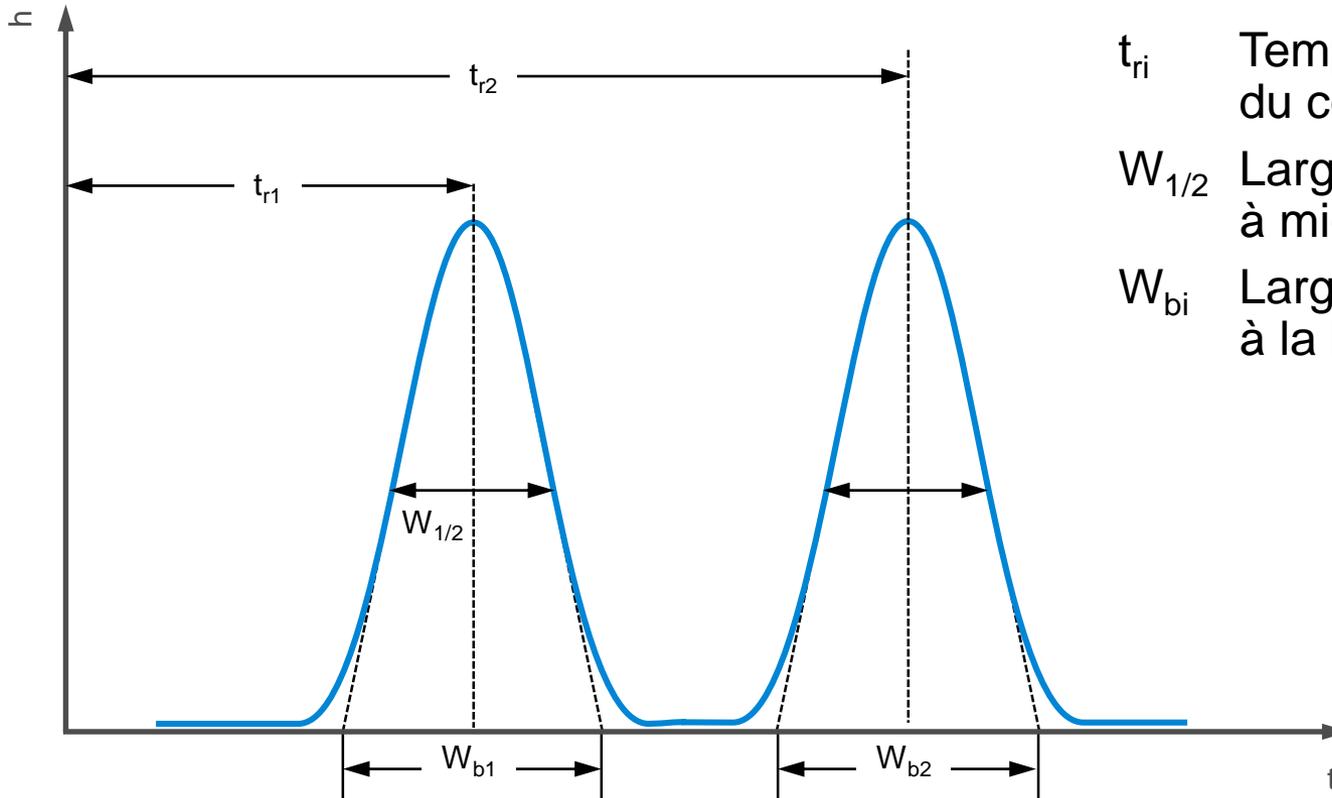
La résolution décrit la capacité de la colonne à séparer les pics d'intérêt.

La résolution indique s'il y a eu séparation à la ligne de base ou non.



Paramètres clés

Temps de rétention et largeur de pic



- t_{ri} Temps de rétention du composé i
- $W_{1/2}$ Largeur de pic à mi-hauteur
- W_{bi} Largeur du pic à la ligne de base

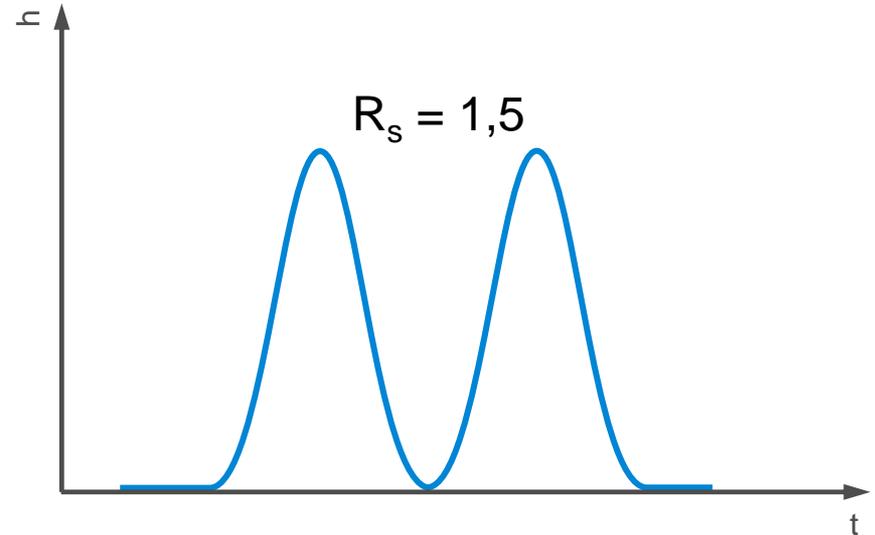
Paramètres clés

Résolution : séparation à la ligne de base

La résolution décrit la capacité de la colonne à séparer les pics d'intérêt.

La résolution intègre l'efficacité (N), la sélectivité (α) et la rétention (k).

- Une valeur minimum de 1 est nécessaire pour permettre une séparation mesurable et une quantification adéquate.
- Une valeur de 0,6 est nécessaire pour distinguer une vallée entre deux pics de hauteur égale.
- Des valeurs égales ou supérieures à 1,7 sont souhaitables pour des méthodes robustes.
- Une valeur de 1,6 est considérée comme permettant la séparation de la ligne de base et garantit les résultats quantitatifs les plus précis.



Paramètres clés

Résolution : l'équation fondamentale de l'(U)HPLC

$$R_s = \underbrace{\frac{1}{4} \sqrt{N}}_{\text{Efficacité}} \cdot \underbrace{\left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right)}_{\text{Sélectivité}} \cdot \underbrace{\left(\frac{k}{1 + k} \right)}_{\text{Rétention}}$$

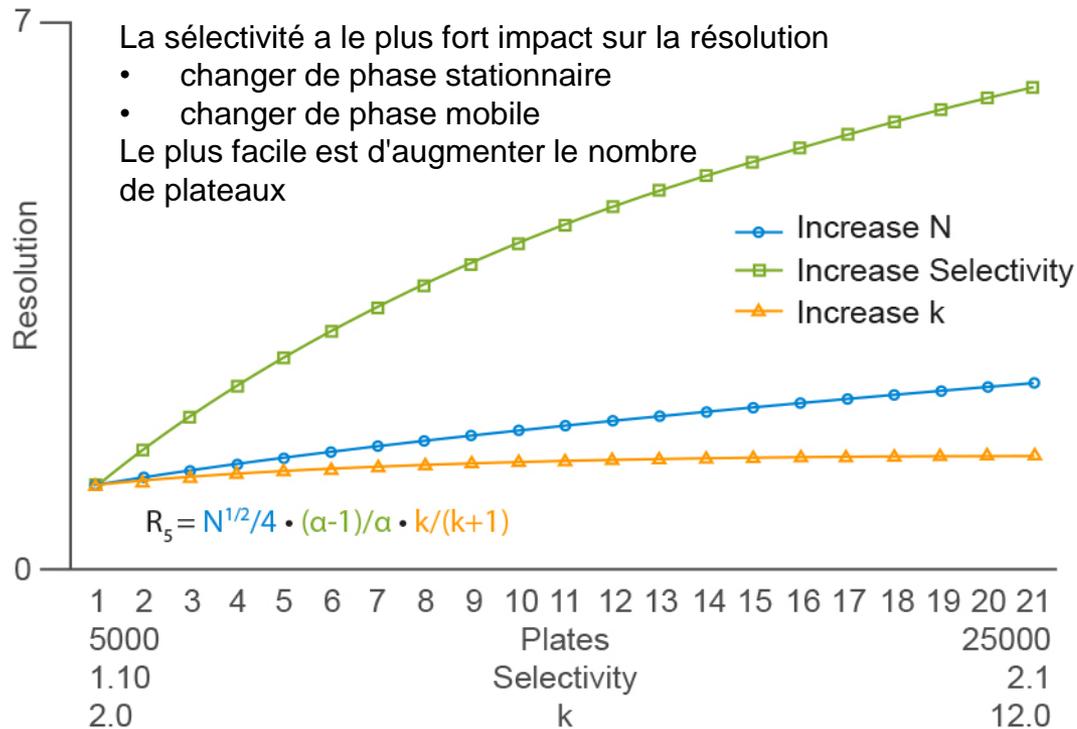
Efficacité **Sélectivité** **Rétention**

La résolution peut être améliorée en optimisant l'un de ces paramètres :

- Le paramètre qui a la plus grande influence sur la résolution est la sélectivité. De petites variations de la sélectivité ont un gros impact sur la résolution.
- L'influence de la rétention n'est significative qu'à des valeurs k faibles.
- L'efficacité décrit le pouvoir de séparation de la colonne.

Paramètres clés

Résolution : l'équation fondamentale de l'(U)HPLC



Cette figure démontre comme la résolution est fonction de la sélectivité, de l'efficacité de la colonne ou de la rétention.

Paramètres clés

Efficacité ou nombre de plateaux théoriques (N)

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_r}{W_b} \right)^2 \qquad N = 5,54 \cdot \left(\frac{t_r}{W_{1/2}} \right)^2$$

L'efficacité de la colonne est utilisée pour comparer la performance de différentes colonnes. Elle s'exprime en nombre de plateaux théoriques, N.

Les colonnes ayant un nombre élevé de plateaux sont plus efficaces. Une colonne ayant un nombre N élevé a un pic plus étroit à un temps de rétention donné qu'une colonne ayant un nombre N inférieur.

Paramètres ayant un effet sur l'efficacité de la colonne :

- Longueur de colonne (une colonne plus longue est plus efficace)
- Granulométrie (une baisse de la granulométrie accroît l'efficacité)

Paramètres clés

Facteur de rétention (k)

$$k = \left(\frac{t_r - t_0}{t_0} \right)$$

Le facteur de rétention mesure le temps qu'un composant de l'échantillon passe dans la phase stationnaire par rapport au temps qu'il passe dans la phase mobile. Il est calculé en divisant le temps de rétention par le temps d'un pic non retenu (t_0).

Paramètres ayant un effet sur le facteur de rétention :

- Phase stationnaire
- Phase mobile
- Pente du gradient*
- Volume résident du système*

*gradient d'élution uniquement

Paramètres clés

Facteur de rétention (k) : gradients d'élution

$$k' = \frac{t_G \cdot F}{S \cdot \Delta\Phi \cdot V_m}$$

L'équation montre l'influence du débit (F), de la durée du gradient (t_G), de la plage de gradient ($\Delta\Phi$) et du volume de la colonne (V_m) sur le facteur de rétention.

Rappel : pour que le facteur de rétention reste constant, des modifications apportées au dénominateur doivent être compensées par des modifications proportionnelles du numérateur, et inversement.

Paramètres clés

Sélectivité ou facteur de séparation (α)

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$$

α Sélectivité

k_1 Facteur de rétention du 1^{er} pic

k_{2i} Facteur de rétention du 2^{ème} pic

La sélectivité correspond à une mesure du temps ou de la distance entre les maxima de deux pics. Si $\alpha = 1$, les deux pics ont le même temps de rétention et co-éluent. Elle se définit comme le rapport entre facteurs de capacité.

Paramètres ayant un effet sur le facteur de rétention :

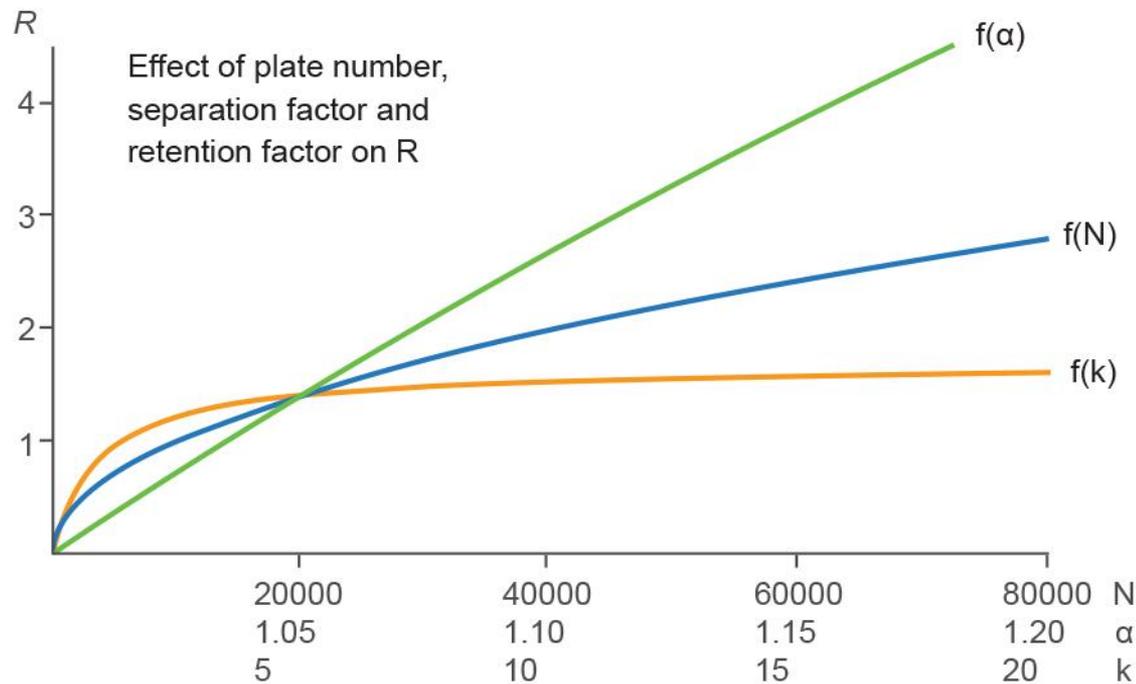
- Phase stationnaire
- Phase mobile
- Température



Paramètres clés

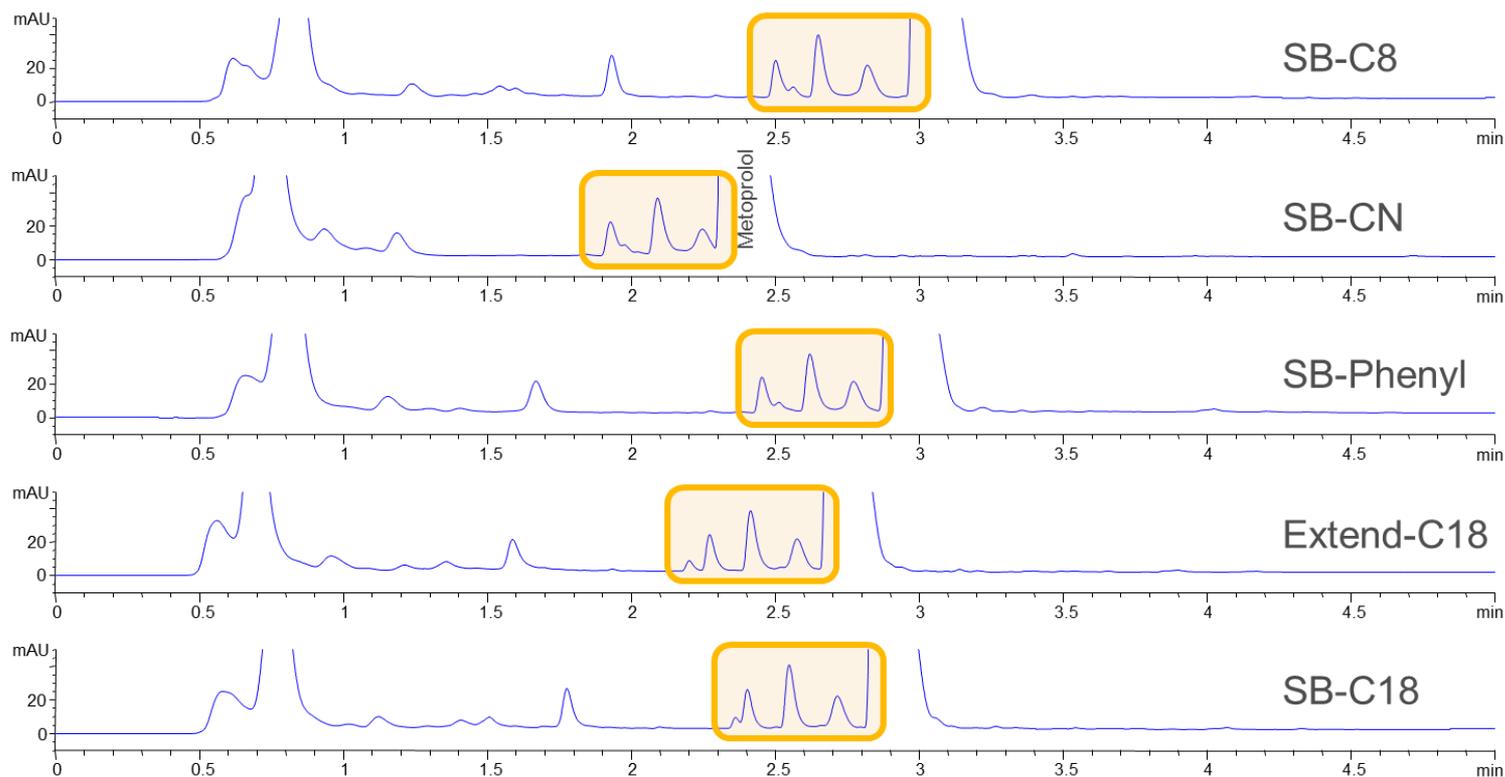
Effet de N, α et k sur la résolution

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



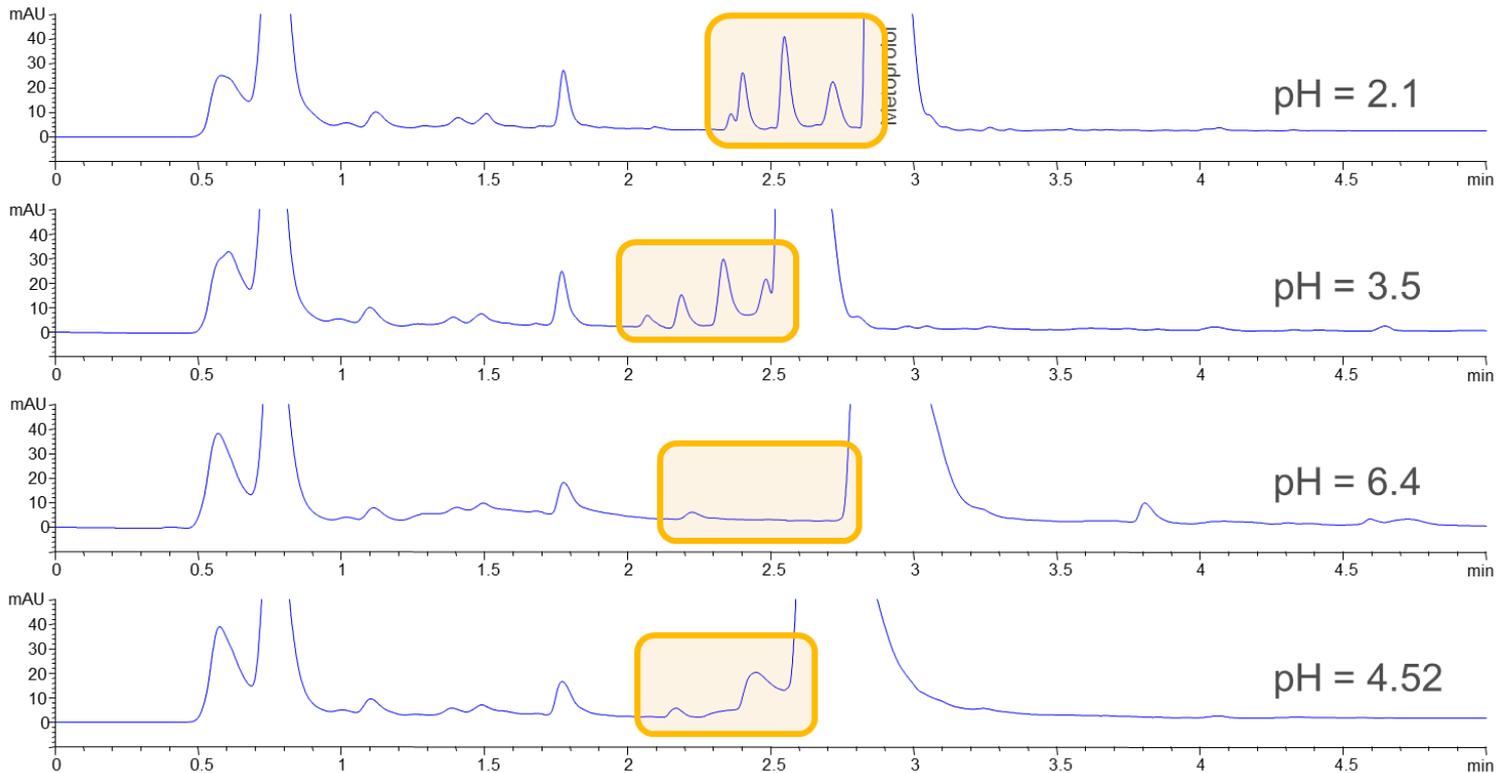
Comment jouer sur la séparation ?

Même échantillon, dans des conditions de température, phase mobile et gradient constantes, analysé avec différentes phases stationnaires.



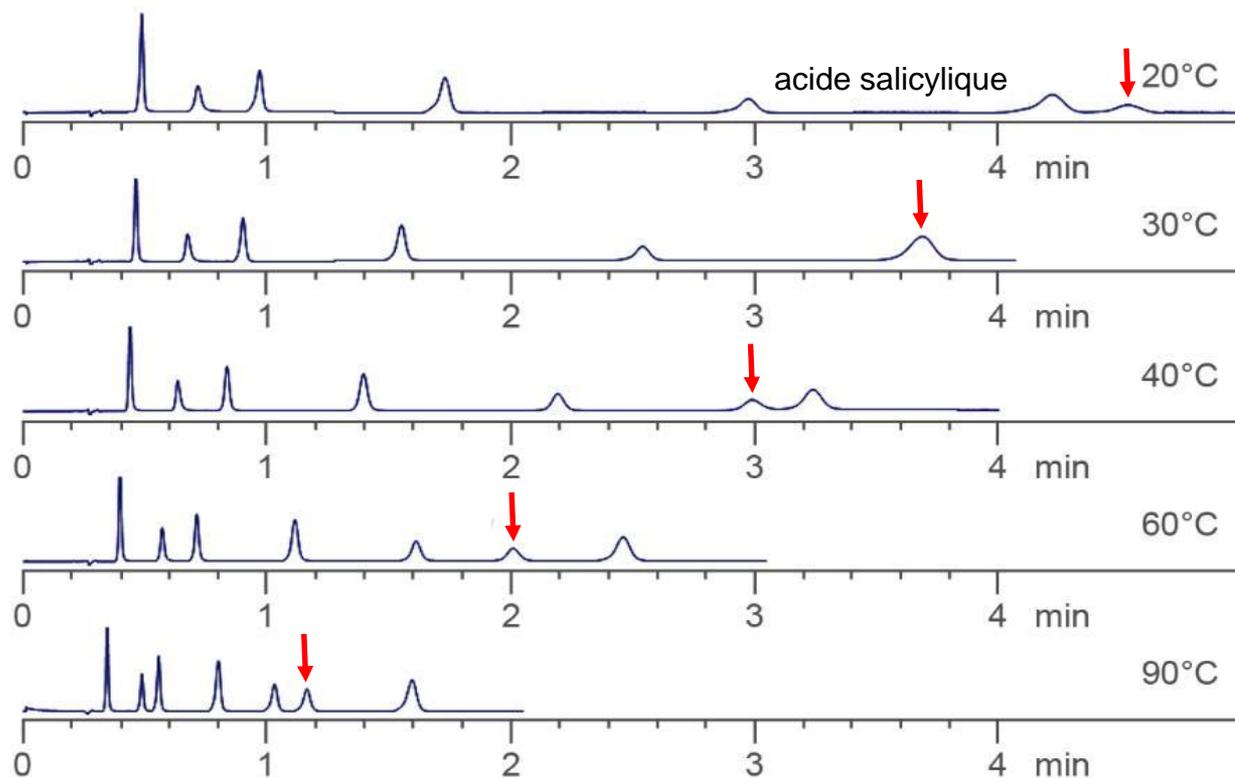
Comment jouer sur la séparation ?

Même échantillon dans des conditions de température, phase stationnaire et gradient constantes, analysé à différents pH.



Comment jouer sur la séparation ?

Même échantillon analysé avec la même phase mobile, phase stationnaire et le même gradient, à différentes températures.



Comment jouer sur la séparation ?

Qu'est-ce qu'un « plateau » en HPLC ?

$$R_s \sim \frac{1}{4} \sqrt{N} \qquad R_s \sim \frac{1}{4} \sqrt{\frac{L_c}{H}} \sim \frac{1}{4} \sqrt{\frac{L_c}{h \cdot d_p}}$$

L_c Longueur de colonne

d_p Granulométrie

h Hauteur réduite d'un plateau théorique

Un plateau théorique est un stade hypothétique pendant lequel les deux phases d'une substance (phases liquide et vapeur) sont en équilibre.

Comment jouer sur la séparation ?

Un nombre de plateaux (N) élevé offre :

- Des pics étroits et pointus
- Une meilleure détection
- Une capacité de pics pour séparer des échantillons complexes

Toutefois, l'augmentation de la résolution est proportionnelle seulement à la racine carrée du nombre de plateaux.

- $R_S \sim \sqrt{N}$

L'augmentation du nombre de plateaux est limitée par les conditions expérimentales

- Temps d'analyse, pression



Comment jouer sur la séparation ?

Rapprochement des paramètres : largeur de pic et hauteur réduite d'un plateau théorique

$$R_s = \frac{t_{r1} - t_{r2}}{1/2 \cdot (W_{b2} + W_{b1})} \qquad R_s \sim \frac{1}{4} \sqrt{\frac{L_c}{h \cdot d_p}}$$

Diagram showing arrows from the denominators of the two equations above pointing towards the central equation $h = f(w)$.

$$h = f(w)$$

Diagram showing a downward arrow from the central equation to the expanded equation below.

$$h = f(w_{eddy} + w_{ax} + w_C)$$

h : hauteur réduite d'un plateau théorique

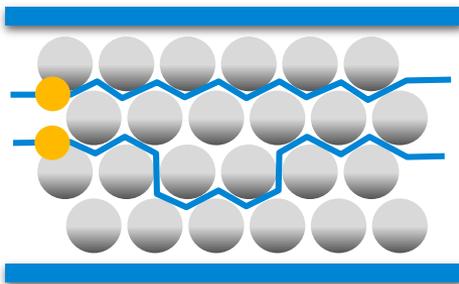
Équation de Van Deemter

Diffusion turbulente

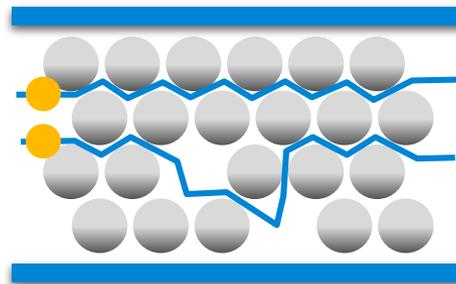
$$W_{turb} \sim \lambda d_p$$

λ : Qualité du remplissage de colonne

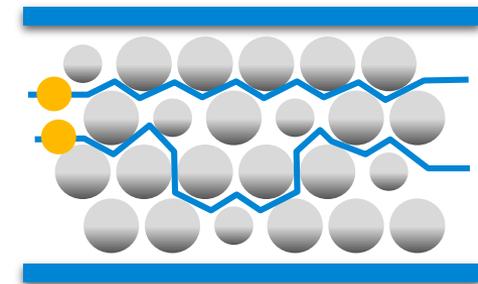
Variation des trajectoires de diffusion due à :



Trajectoires différentes



Mauvais remplissage
de la colonne



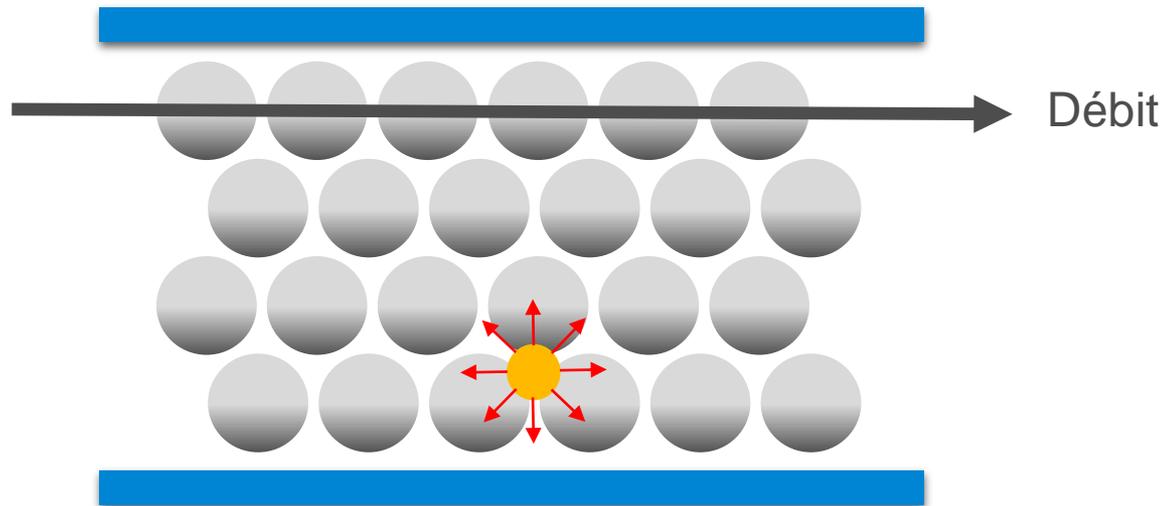
Distribution large de la
taille des particules

Équation de Van Deemter

Diffusion axiale ou longitudinale

Augmentation de la largeur de pic due à l'auto-diffusion de l'analyte
À un débit faible, la durée de séjour de l'analyte dans la phase mobile est longue

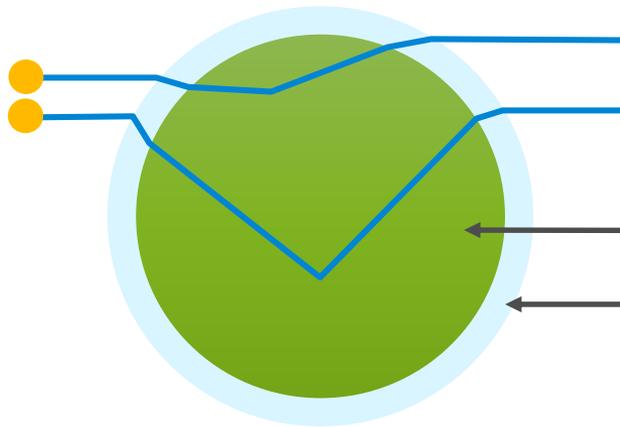
- Augmentation forte de la largeur de pic
- Hauteur accrue d'un plateau théorique



Équation de Van Deemter

« Résistance au transfert de masse »

$$W_C \sim d_p^2$$



Trajectoires de diffusion différentes

Particule poreuse

Couche stationnaire de la phase mobile

Équation de Van Deemter

L'équation de Van Deemter établit la relation entre les variances par unité de longueur d'une colonne de séparation et la vitesse linéaire de la phase mobile en prenant en compte les propriétés physiques, cinétiques et thermodynamiques d'une séparation (Wikipédia).

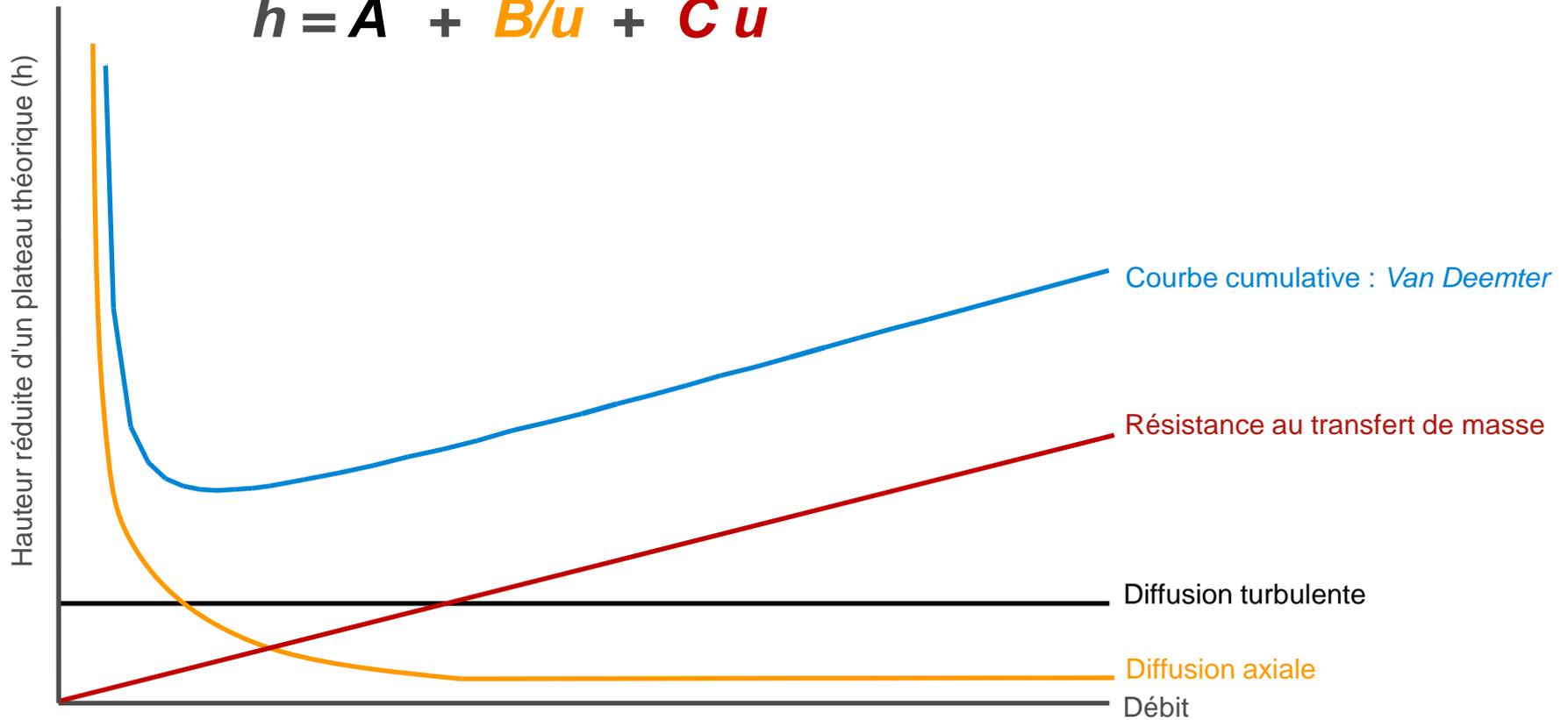
$$h = f (W_{turb} + W_{ax} + W_C)$$

$$h = A + B/u + C u$$

- Diffusion turbulente
- Coefficient de diffusion
- Résistance au transfert de masse

Équation de Van Deemter

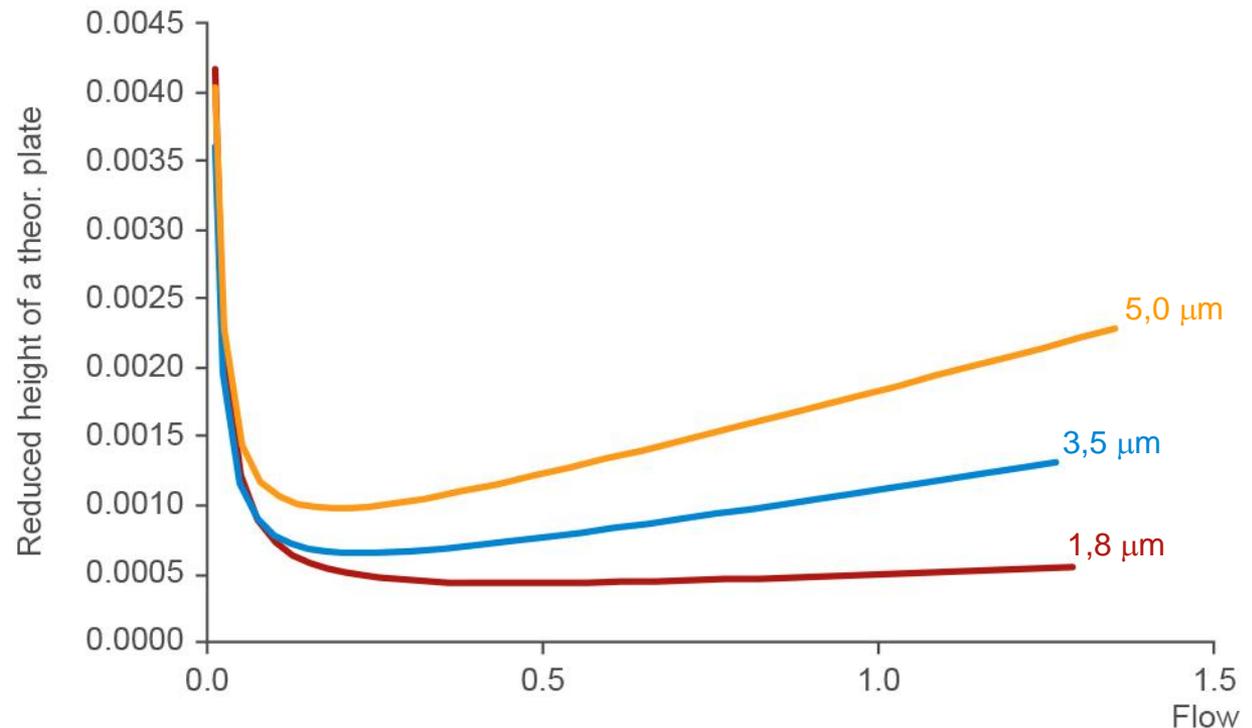
$$h = A + B/u + C u$$



Équation de Van Deemter

Mesurée avec des granulométries différentes

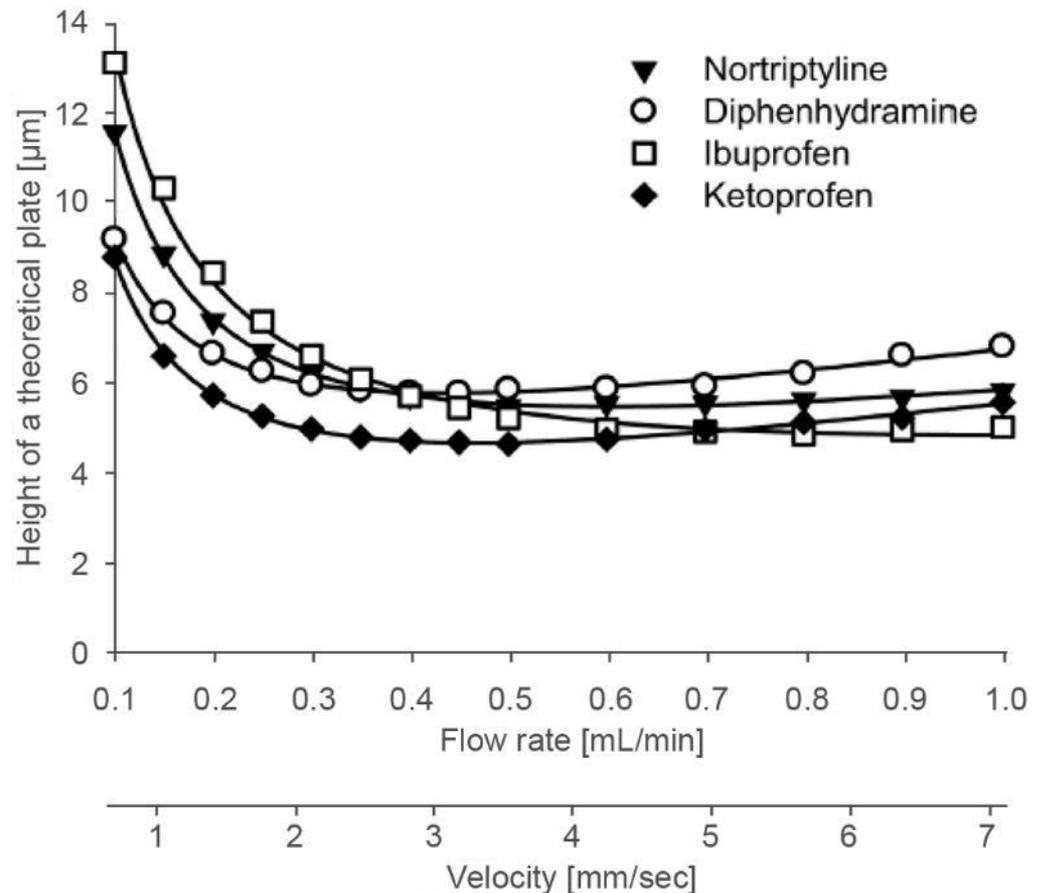
- De petites particules permettent des plateaux théoriques de hauteur inférieure et donc une meilleure efficacité de séparation
- Avec de petites particules, l'effet de l'augmentation du débit sur l'efficacité de séparation est moindre



Équation de Van Deemter

Courbes réelles pour différents analytes

- Équation de Van Deemter pour analyses isocratiques uniquement
- Dépend du composé et de l'instrument
- Non horizontal même pour les particules sub-2 μm
- Débit optimal dépend du composé



P. Petersson et al. (AZ), *J.Sep.Sci*, 31, 2346-2357, 2008

Capacité de pics

Analyses en gradient

$h = f(w^2)$ La hauteur réduite d'un plateau théorique
comme facteur de la largeur de pic

Analyse isocratique :

La largeur de pic dépend uniquement des processus de diffusion.

Analyse avec gradient :

La largeur de pic dépend des processus de diffusion *et* de la focalisation du gradient à la tête de la colonne.

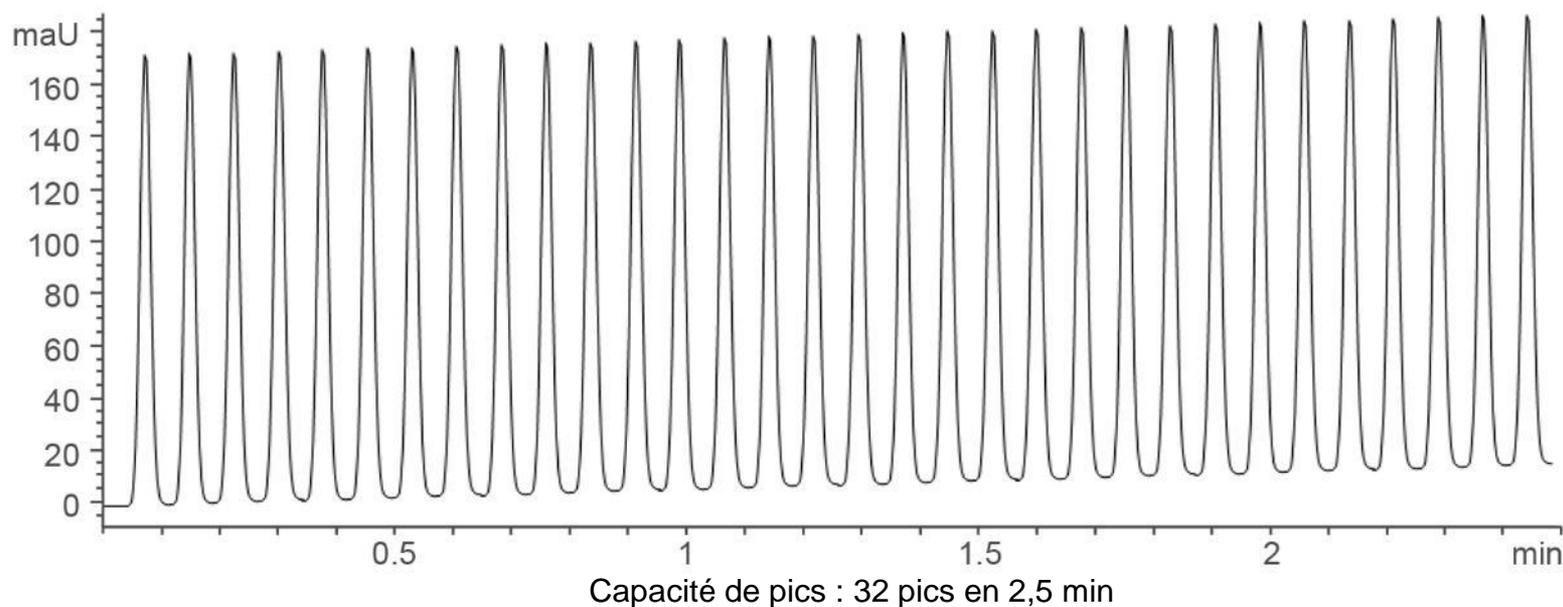


Capacité de pics

Définition

La capacité de pics correspond au nombre de pics (n) pouvant être séparés dans un temps donné avec une résolution donnée.

La capacité de pics dépend de différents facteurs tels que la longueur de colonne et la granulométrie.



Capacité de pics

Définition

« ...à l'aide de la théorie statistique de la superposition des pics... »

« ...la résolution du pic est sévèrement compromise lorsque le nombre de composants présents dans un échantillon dépasse 1/3 de la capacité de pics. »

J.M. DAVIS, J.C. GIDDINGS, ANAL. CHEM. 55 (1983) 418

« ...pour séparer 98 % des composants, la capacité de pics doit être au moins 100 fois supérieure au nombre de composants. »

J.C. GIDDINGS, J. CHROMATOGR. A 703 (1995) 3

Capacité de pics

Calcul de la capacité de pics

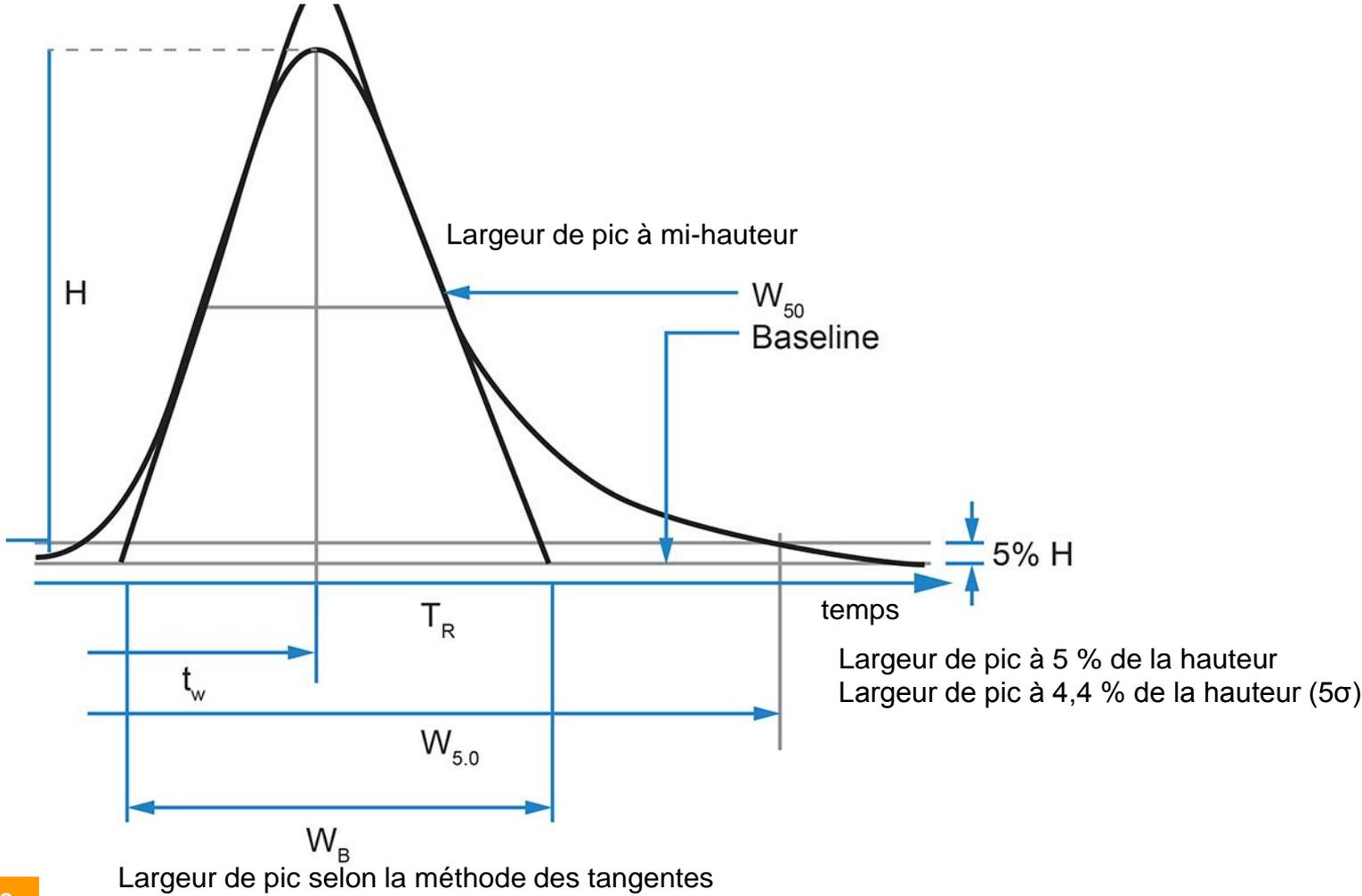
$$P = 1 + \frac{t_G}{\frac{1}{n} \sum_1^n w} = 1 + \frac{t_G}{w_{av}}$$

Forme simplifiée : $P = 1 + \frac{t_G}{W}$

- w_{moy} Largeur de pic moyenne
- n Nombre de pics
- t_G Durée du gradient
- w Largeur de pic du pic sélectionné

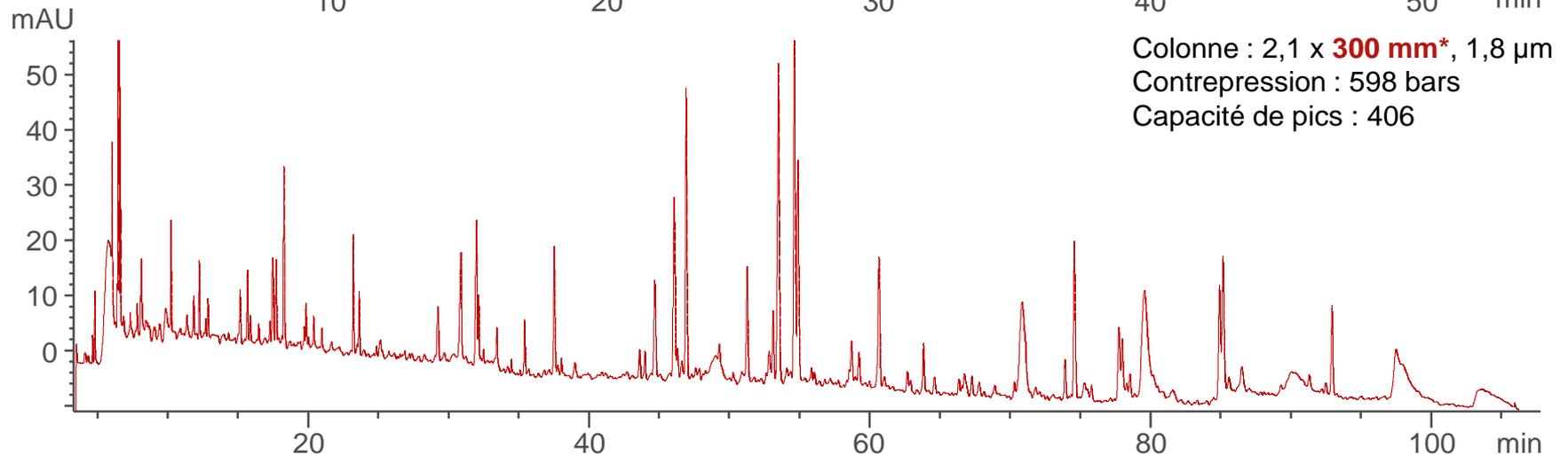
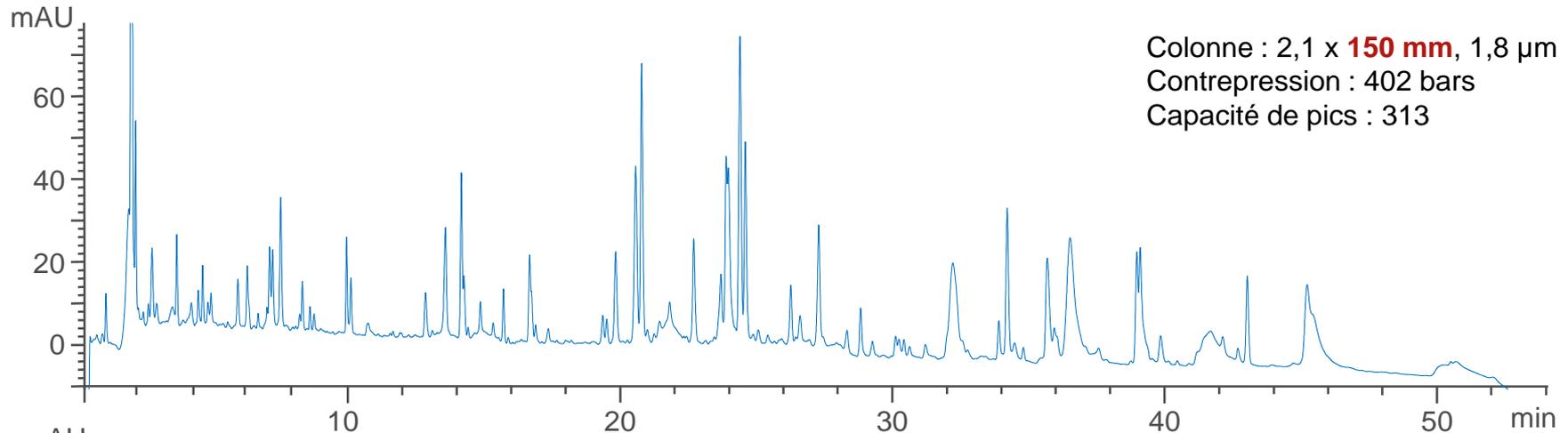
Capacité de pics

Largeur de pic



Capacité de pics

Exemple



*colonne de 300 mm par assemblage de deux colonnes de 150 mm

Table des matières

Informations complémentaires

Pour des informations complémentaires sur les produits Agilent, consulter www.agilent.com ou www.agilent.com/chem/academia

Pour nous soumettre des questions ou remarques concernant cette présentation : contacter andrea_zenker@agilent.com

Publication	Titre	N° de Pub.
Brochure	The LC Handbook	5990-7595EN
Note d'application	The influence of silica pore size on efficiency, resolution and loading in Reversed-Phase HPLC	5990-8298EN
Note d'application	Increasing resolution using longer columns while maintaining analysis time	5991-0513EN
Réimpression d'article	A simple approach to performance optimization in HPLC and its application in ultrafast separation development	
Poster	Study of physical properties of superficially porous silica on its superior chromatographic performance	
Note d'application	Maximizing chromatographic peak capacity with the Agilent 1290 Infinity LC system using gradient parameters	5990-6933EN
Note d'application	Maximizing chromatographic peak capacity with the Agilent 1290 Infinity LC	5990-6932EN
Note d'application	Increased peak capacity for peptide analysis with the Agilent 1290 Infinity LC system	5990-6313EN
Internet	CHROMacademy – accès libre aux formations en ligne pour les étudiants et le personnel universitaire	

Table des matières



MERCI

◀ Table des matières

5991-5411FR

À des fins pédagogiques uniquement
8 janvier 2015

 Agilent Technologies

ACADEMIC
& INSTITUTIONAL
RESEARCH

Abréviations

Abréviation	Définition
α	Sélectivité
d_p	Granulométrie
$\Delta\Phi$	Plage de gradient
F	Débit
h	Hauteur réduite d'un plateau théorique une mesure du pouvoir de résolution d'une colonne
k	Facteur de rétention (appelé auparavant k' - facteur de capacité)
L_c	Longueur de colonne
λ	Qualité du remplissage de colonne
N	Efficacité ou nombre de plateaux de la colonne
P	Capacité de pics
R	Résolution

Abréviation	Définition
t	Temps
t_r	Temps de rétention
t_0	Temps mort de la colonne
t_G	Durée du gradient
V_m	Volume de la colonne
w	Largeur de pic
$W_{1/2}$	Largeur de pic à mi-hauteur
W_{bi}	Largeur du pic à la ligne de base
W_{turb}	Diffusion turbulente
W_{ax}	Diffusion axiale ou longitudinale
W_C	Résistance au transfert de masse
W_{moy}	Largeur de pic moyenne