



Master Formation à l'Enseignement, Agrégation et Développement Professionnel (FEADéP)
Préparation à l'agrégation externe de Physique-Chimie option Chimie

CHROMATOGRAPHIE

2023-2024

Louise PINET
louise.pinet@ens-lyon.fr

Je remercie grandement Martin Vérot et Margaux Roux, dont les cours ont très largement inspiré celui-ci.

Version du 14 novembre 2023

Table des matières

1	Les différentes méthodes de chromatographie	7
1.1	Classification par interactions impliquées	7
1.2	Classification par état physique de la phase mobile et dispositif expérimental	8
1.3	En pratique : les chromatographies courantes	8
1.3.1	Chromatographie en phase vapeur	8
1.3.2	Chromatographie d'adsorption planaire (CCM) et en colonne (gel de silice)	11
1.3.3	Chromatographie liquide haute performance (CLHP ou HPLC pour <i>High performance liquid chromatography</i>)	11
1.3.4	Chromatographie d'échange ionique	13
1.3.5	Chromatographie d'exclusion stérique	13
1.4	A retenir de ce chapitre	14
2	Caractérisation d'un chromatogramme et modèles théoriques	15
2.1	Description expérimentale d'un chromatogramme	15
2.1.1	Temps et facteur de rétention	16
2.1.2	Largeur de pic, asymétrie	17
2.2	Séparation et résolution	17
2.2.1	Facteur de séparation ou de sélectivité	18
2.2.2	Résolution	18
2.3	Notion de plateaux - modèle de Craig (semi-statique)	19
2.3.1	Modèle de Craig	19
2.3.2	Efficacité de colonne : nombre de plateaux et hauteur de plateau théoriques	19
2.3.3	Utilité et limites du modèle	20
2.4	Modèles dynamiques	21
2.4.1	Équation de van Deemter	21
2.4.2	Terme de diffusion turbulente	22
2.4.3	Terme de diffusion longitudinale	22
2.4.4	Terme de résistance au transfert de masse	23

2.4.5	Autres équations et cas particuliers d'application (pas à retenir)	23
2.4.6	Conclusion	24
2.5	A retenir de ce chapitre	24
3	Optimisation	25
3.1	Concepts généraux	25
3.2	Influence de la structure de la colonne	26
3.2.1	Longueur de colonne L	26
3.2.2	Largeur de colonne r	27
3.2.3	Remplissage (ou garnissage) de la colonne	27
3.2.4	Conclusion : à retenir	28
3.3	Influence de la phase stationnaire	28
3.4	Influence de la phase mobile	30
3.4.1	En CPV	30
3.4.2	En CPL	31
3.5	Influence de facteurs physiques	36
3.5.1	Température	36
3.5.2	Pression	36
3.6	A retenir de ce chapitre	37
4	Méthodes analytiques	41
4.1	Identification en CPV : indice de rétention de Kovats	41
4.2	Méthodes quantitatives	41
4.2.1	Étalon interne	42
4.2.2	Ajouts dosés	42
4.3	A retenir de ce chapitre	43
5	Pour aller plus loin : références utiles	45

Introduction et vocabulaire de base

La chromatographie a été inventée au tout début du XX^{ème} siècle par Mikhaïl Tswett, botaniste qui a ainsi séparé la chlorophylle et les caroténoïdes. Il s'agissait de chromatographie en phase liquide ; la chromatographie en phase gaz a été développée au milieu du siècle. En 1952 le Prix Nobel de Chimie a récompensé Martin et Synge pour leur invention de la chromatographie de partage en 1941. Plus de détails historiques peuvent être trouvés dans le chapitre 1 de FANALI et al., 2018.

La chromatographie peut être définie comme une technique de séparation de composés utilisant deux phases :

- **Une phase stationnaire**, immobile, retenant plus ou moins les composés ;
- **Une phase mobile**, permettant la mobilité des composés dans/le long de la phase stationnaire dans une direction définie. On parle de gaz vecteur en chromatographie en phase gaz et d'éluant en chromatographie en phase liquide.

La séparation des composés se base sur une différence de comportement des composés vis-à-vis de la phase stationnaire et/ou de la phase mobile.

Le but peut être purement **analytique**, permettant d'identifier/de quantifier les différents composés d'un mélange ; ou **préparatif**, pour séparer puis récolter un ou des composés particuliers purifiés.

La chromatographie peut être effectuée **en phase gaz ou en phase liquide** (ou encore en phase supercritique, ce qui ne sera pas développé ici), et selon **différents types d'interactions** impliquées. Ces détails seront donnés dans le chapitre 1. Il existe différents paramètres permettant de caractériser une méthode chromatographique et un **chromatogramme**, avec des **modèles théoriques** permettant de les ajuster ou de les prédire ; ils seront présentés dans le chapitre 2. Ces paramètres peuvent être **optimisés**, rationnellement ou empiriquement comme nous le verrons au chapitre 3. Enfin, nous verrons comment la chromatographie est utilisée pour parfois identifier, mais surtout **quantifier** des composés dans le chapitre 4. Quelques références vous permettant d'approfondir certains points sont donnés en chapitre 5.

Chapitre 1

Les différentes méthodes de chromatographie

1.1 Classification par interactions impliquées

- La **chromatographie d'adsorption** (*adsorption chromatography*) se base sur la différence d'adsorption des différents composés sur la phase stationnaire solide.
- La **chromatographie de partage** (*partition chromatography*) se base sur la différence de solubilité des composés dans la phase stationnaire (liquide) et la phase mobile. On définit alors le **coefficient de partage (ou de distribution)** K_i comme le ratio des concentrations du composé i dans la phase stationnaire et dans la phase mobile, $K_i = \frac{[i]_S}{[i]_M}$.
- La **chromatographie d'exclusion stérique** (*size exclusion chromatography* ou SEC) se base sur des effets de taille ou de forme. Elle est parfois appelée chromatographie sur gel perméable (*gel permeation chromatography*) ou filtration sur gel (*gel filtration chromatography*). Les interactions impliquées ne sont pas spécifiques chimiquement parlant.
- La **chromatographie par échange ionique** (*ion exchange chromatography*) se base sur une différence d'affinité électrostatique avec une phase stationnaire capable d'échanger des ions. Les composés à séparer doivent donc avoir des charges différentes.
- La **chromatographie chirale** (*chiral chromatography*) se base sur une différence d'affinité des différents composés chiraux avec la phase stationnaire qui est elle-même chirale. Notez que pour séparer deux énantiomères, une méthode indirecte, alternative à la chromatographie chirale, est de transformer les énantiomères en diastéréoisomères puis d'utiliser un autre type de chromatographie moins onéreux.
- La chromatographie d'affinité (*affinity chromatography*) est une technique biochimique se basant sur une différence d'affinité entre biomolécules. Par exemple, des anticorps sont purifiés grâce à une phase stationnaire présentant leur antigène (substrat reconnu spécifiquement). La nature physico-chimique des interactions impliquées peut varier. Nous ne décrirons pas ce type de chromatographie en détails ici.

Les chromatographies par échange ionique, chirale et d'affinité sont en fait des types particuliers de chromatographie de partage ou d'adsorption (selon l'état de la phase stationnaire), mais sont souvent présentées séparément car faisant intervenir un type bien identifié d'interactions. Il existe potentiellement un très grand nombre de types de chromatographies, ceux-ci sont les principaux.

1.2 Classification par état physique de la phase mobile et dispositif expérimental

On distingue :

- **La chromatographie en phase liquide** (CPL ou *liquid chromatography* LC). Cette chromatographie peut être :
 - planaire : la phase mobile (éluant) migre par capillarité sur une surface.
 - sur colonne : la phase mobile migre alors
 - par gravité
 - par application de pression dans un système injecteur/pompe/colonne/détecteur. Le plus courant est l'HPLC (*High Performance Liquid Chromatography* aussi appelée *High Pressure Liquid Chromatography*) présenté en 1.3.3 mais il existe aussi des variantes comme la FPLC (*Fast Performance Liquid Chromatography* aussi appelée *Fast Protein Liquid Chromatography*)
- **La chromatographie en phase vapeur** (CPV, ou chromatographie en phase gaz CPG ou *gas chromatography* GC). L'état gaz implique plus de contraintes et donc en principe il n'existe qu'un type de dispositif de CPV, présenté en 1.3.1.
- **La chromatographie en phase supercritique** (CPS) que l'on ne développera pas ici.

1.3 En pratique : les chromatographies courantes

En pratique seules certaines combinaisons (type de séparation + type de dispositif) sont typiquement utilisées.

1.3.1 Chromatographie en phase vapeur

La chromatographie en phase vapeur (CPV ou CPG pour chromatographie en phase gaz ou GC pour *gas chromatography*) est un type de chromatographie très sensible et de haute résolution, mais réservé aux composés volatils et thermostables. Elle nécessite un système d'injection suivi d'une colonne et d'un détecteur. La phase mobile est un gaz vecteur (inerte, souvent He, N₂ ou Ar) et la phase stationnaire est déposée sur la colonne. Le plus souvent la CPV est utilisée pour la chromatographie de partage, donc la phase stationnaire est liquide. On peut aussi faire de la chromatographie d'adsorption par CPV ; la phase stationnaire est alors solide. Un schéma d'un instrument de CPV est donné en figure 1.1.

Injection *split/splitless/on column*

L'injecteur d'une CPV sert à introduire l'échantillon, via une microseringue, dans la colonne. C'est aussi là qu'a lieu la volatilisation par chauffage : la température doit être idéalement 20°C au-dessus du point d'ébullition du composé le moins volatil. La capacité des colonnes étant petite, si l'échantillon n'est pas dilué il y a un risque de saturation, même avec quelques μL . Cela se remarquera par des pics asymétriques et faussera la quantification. Pour éviter cette saturation, il est possible de n'injecter dans la colonne qu'une fraction de l'échantillon injecté par seringue (mode *split*) comme décrit dans la figure 1.2. Il existe trois modes :

- **mode *split* (avec *division*)** : seule une partie de l'échantillon est injectée dans la colonne. Le volume réellement injecté dans la colonne est égal à V_0/SR où V_0 est le volume injecté par la

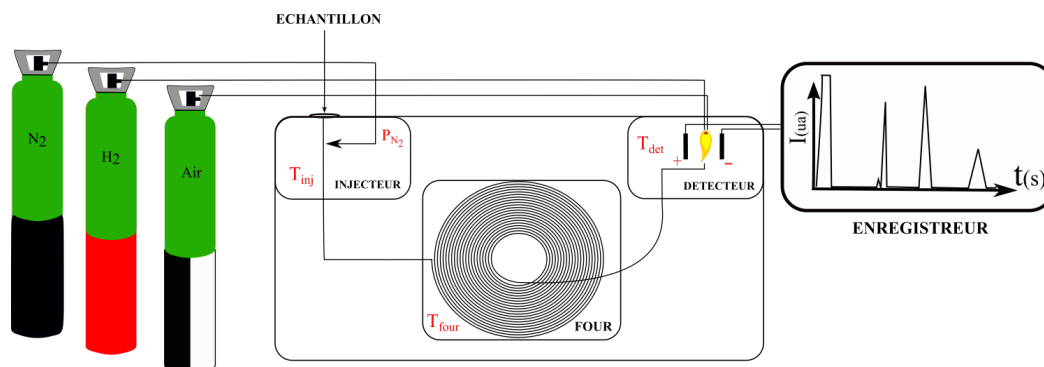


FIGURE 1.1 – Schéma général d'un instrument de CPV, avec l'exemple de N_2 comme gaz vecteur et d'une détection par ionisation de flamme. Figure venant des *Fiches techniques pour l'épreuve de montage de l'agrégation en chimie organique*, ENS de Lyon, par DE RYCKE Nicolas et WIECZNY Vincent.

seringue et SR est le *split ratio* $SR = Q_S/Q_C$. Q_S et Q_C sont les débits sortant par la vanne split et entrant dans la colonne, respectivement. Le *split ratio* n'est pas une valeur précise et reproductible, les volumes ne sont donc que des valeurs indicatives. La quantification n'est donc pas possible dans ce mode. Ce mode est utilisé quand l'échantillon est concentré et/ou quand une haute résolution est nécessaire.

- **mode *splitless* (sans division)** : Q_S est simplement réglé sur 0. Ce mode est utilisé si l'échantillon est déjà suffisamment dilué. L'inconvénient est que le temps d'entrée dans la colonne est plus long qu'il y a un risque de saturation de la colonne avec le solvant.
- **mode *on column* (en tête de colonne)** : on injecte directement dans la colonne. Le risque de saturation et de perte de résolution est alors grand, mais la quantification est précise.

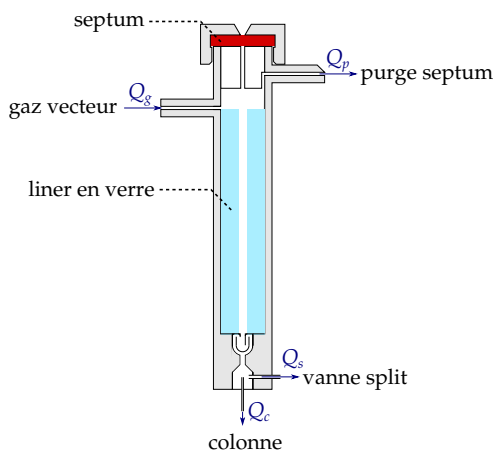


FIGURE 1.2 – Schéma d'un injecteur *split/splitless*. Les différents débits sont représentés par la lettre Q . La vanne de purge permet d'éliminer toutes les impuretés qui proviendraient du septum. La vanne *split* est fermée en mode *splitless* et ouverte en mode *split*. (Figure : M. Vérot)

Colonne

La phase stationnaire doit être inerte vis-à-vis des composés injectés. Les colonnes de CPV sont en grande majorité des capillaires de petit diamètre (diamètre < 1 mm) et donc de petite capacité même si longues (dizaines de mètres). Il existe aussi cependant des colonnes de CPV remplies (diamètre de quelques mm et longueur de quelques m). La CPV est bien plus souvent analytique que préparative.

Four

De température inférieure (de quelques dizaines de degrés) à celle de l'injecteur, il sert à contrôler la température dans la colonne. La température est réglée afin d'obtenir la meilleure résolution possible et la plus grande rapidité d'analyse, tout en préservant la stabilité de la colonne (selon la phase stationnaire). Pour l'optimisation de cette température, voir 3.5.1.

Détecteurs et couplage

En sortie de la colonne de CPV, les composés sont soit simplement détectés, soit détectés et envoyés dans un autre instrument auquel la CPV est couplée.

Les deux types de détecteurs CPV classiques sont :

- **Les détecteurs à ionisation de flamme** (*Flame ionization detector* ou FID) : sensibles mais non-universels et destructifs. Ce sont les détecteurs les plus utilisés, mais ils ne sont adaptés qu'aux molécules organiques et ne peuvent être utilisés en cas de couplage avec une autre technique. Les composés en sortie de colonne sont introduits dans un brûleur alimenté en mélange H₂/air. Leur combustion produit des ions et des radicaux. Les ions sont détectés par des électrodes entre lesquelles est appliquée une différence de potentiel (typiquement 100 à 300 V). Ce type de détecteur quantifie la masse et non directement la quantité de matière.
- **Les détecteurs à conductivité thermique** (*Thermal conductivity detector* ou TCD) ou catharomètres : universels, non-destructifs mais peu sensibles. Des détecteurs comparent la conductivité thermique du gaz vecteur seul et celle du gaz vecteur contenant les analytes. La présence de l'analyte mène à une baisse de conductivité thermique et donc une augmentation de la température modifiant la résistance dans la partie du catharomètre le contenant (voir figure 1.3).

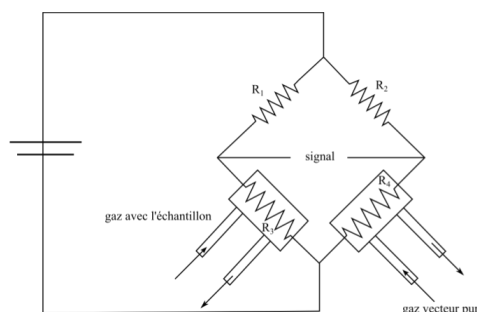


FIGURE 1.3 – Catharomètre basé sur le principe du pont de Wheatstone utilisé comme détecteur en CPV. Figure venant des *Fiches techniques pour l'épreuve de montage de l'agrégation en chimie organique*, ENS de Lyon, par DE RYCKE Nicolas et WIECZNY Vincent.

Depuis les années 60 il est courant de coupler CPV et spectrométrie de masse, une autre technique d'analyse en phase gaz. Cela permet l'analyse de mélanges complexes. Ce couplage est souvent abrégé GC-MS. La détection non-destructive en sortie de CPV (par TCD) est suivie de l'introduction dans la source d'ionisation du spectromètre de masse. Cela demande un raccordement spécifique permettant une baisse de pression, la spectrométrie de masse se faisant dans le vide. Le spectromètre sépare et détecte ensuite les ions, permettant d'avoir la double information pour chaque pic : le temps de rétention et la masse.

1.3.2 Chromatographie d'adsorption planaire (CCM) et en colonne (gel de silice)

En chromatographie liquide d'adsorption la phase stationnaire est un solide (généralement silice ou alumine) et la phase mobile un liquide. La migration s'effectue selon deux facteurs

- par compétition entre l'adsorption sur la phase stationnaire et l'entraînement par la phase mobile dans laquelle ils sont dissous.
- par compétition entre l'adsorption du composé et celle du solvant sur la phase stationnaire (effet de remplacement) : en migrant le solvant va « laver » le composé adsorbé, le remplaçant sur la phase stationnaire.

L'adsorption met en jeu les liaisons hydrogènes et les interactions de Van der Waals et l'élution se fait donc selon les principes suivants :

- Les composés étant capables de donner ou recevoir des liaisons hydrogènes migrent le moins (ou, de façon équivalente, sont les plus adsorbés). C'est le facteur dominant.
- Les composés les plus polaires migrent moins (sont le plus adsorbés).
- Augmenter la polarité de la phase mobile augmentera la migration de tous les composés (tant qu'ils y sont solubles, par effet de remplacement), mais encore plus de ceux étant polaires (qui auront en plus l'effet d'une meilleure affinité pour le solvant). Attention cependant, une phase mobile trop polaire empêchera l'adsorption de tous les composés et il n'y aura plus de séparation.

La chromatographie se fait en planaire (dépôt de la phase stationnaire sur une plaque de verre ou aluminium) sous forme de CCM (**chromatographie sur couche mince** ou TLC pour *Thin Layer Chromatography*) ou en colonne sous la forme de **colonne de gel de silice**.

La CCM est en règle générale analytique (même si l'on peut gratter la phase stationnaire pour récupérer le produit). La détection devant se faire directement sur la plaque, il n'y a pas de chromatogramme en sortie de CCM mais une révélation (UV, iode, permanganate de potassium, acide phosphomolibdique...) permet de calculer des rapports frontaux (R_f) pour les différents composés séparés. Attention ! La révélation n'étant pas quantitative (par exemple à cause de coefficients d'extinction molaires différents en révélation par UV) tout comme la taille des tâches, une CCM ne l'est pas.

La CCM est aussi utilisée pour déterminer les conditions optimales d'élution avant de faire une colonne de gel de silice préparative, et après pour détecter les composés présents dans chaque fraction.

En chromatographie sur colonne de gel de silice, les composés ne doivent pas nécessairement être totalement solubles dans l'éluant. Une faible solubilité suffit à les entraîner. Si un composé du mélange est peu soluble dans l'éluant, il est possible

- d'effectuer un dépôt très fin dans un solvant un peu plus polaire. Cela décalera légèrement la ligne de dépôt
- de faire un dépôt solide en mélange le brut réactionnel concentré avec de la silice ou de la célite puis en évaporant le solvant.

1.3.3 Chromatographie liquide haute performance (CLHP ou HPLC pour *High performance liquid chromatography*)

Principe

L'HPLC est un type d'instrumentation de chromatographie défini historiquement par la haute pression (100-300 bar) de la phase mobile appliquée sur la colonne, nécessaire à cause de la faible granulométrie (ordre du μm) de la phase stationnaire. Le P de HPLC signifie aujourd'hui « performance » car cette faible granulométrie permet de hautes résolutions.

Parler d'HPLC ne définit donc *a priori* quel principe de séparation est utilisé. En pratique, l'HPLC est souvent utilisée en chromatographie de partage en phase inverse. On trouve cependant aujourd'hui des colonnes d'HPLC de presque tous les types (échange ionique, exclusion stérique etc).

Dispositif expérimental

Instrument Les instruments HPLC sont en général modulaires et peuvent donc être adaptés à l'application. Cependant, un certain nombre de modules sont communs.

L'échantillon (de volume compris entre quelques μL et environ 1 mL) est injecté manuellement ou automatiquement via une seringue et un **injecteur**. Il entre dans une boucle qui est ensuite reliée (grâce à une valve) au système de pompe à haute pression pour le pousser dans la colonne. Ces **pompes** doivent être capables de monter à 400 - 600 bars pour des débits de 0,1 à 10 mL/min environ, de façon continue (pas de pulsation). La phase mobile, qui doit être **filtrée** pour être exempte de toute particule qui boucherait le système de tuyaux très fins et la colonne, est aussi passée dans un **dégazeur** (ou dégazée manuellement avant introduction dans le système par barbotage ou sous vide). Elle ne doit pas être trop visqueuse pour limiter la pression. L'échantillon, entraîné par la phase mobile, entre ensuite dans la **colonne**, qui doit résister à la pression et a un volume de quelques mL à plusieurs dizaines de mL (diamètre de quelques mm à quelques cm et longueur de 5 à 30 cm environ), selon qu'elle est analytique ou préparative. La nature de ce qui élué est analysé en sortie de colonne grâce à différents types de **détecteurs**, qui peuvent si nécessaire être montés en série. Les détecteurs HPLC classiques sont :

- Les détecteurs spectrophotométriques UV-visibles sont les plus courants. Ils ne sont malgré tout pas universels, certains composés n'absorbant pas dans ces longueurs d'onde. Il faut aussi vérifier l'absorption de la phase mobile.
- Les détecteurs spectrofluorimétriques détectent la fluorescence des composés. Les longueurs d'onde d'excitation et/ou d'émission peuvent être réglées. Ces détecteurs ne sont pas non plus universels.
- Les détecteurs réfractométriques et de diffusion de la lumière sont universels mais moins sensibles que les précédents.
- Les détecteurs conductimétriques ne sont utilisables que pour les ions.
- Les détecteurs de masse (HPLC-MS) forment un couplage courant. Ils sont globalement plus chers que les autres et destructifs. Seuls certaines sources d'ionisation sont compatibles avec la solution diluée sortant de l'HPLC (sources ESI et APCI).

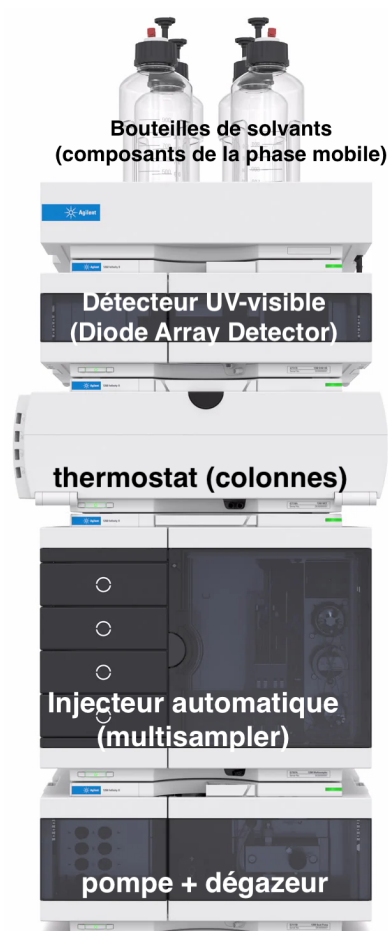


FIGURE 1.4 – Exemple d'un instrument modulaire HPLC (Agilent, modèle 1260 Infinity II)

Phases mobile et stationnaire pour la chromatographie HPLC

de partage La phase stationnaire est en général un gel constitué de particules de silice. En phase normale le gel est non modifié (la phase stationnaire est alors hydrophile, et les phénomènes d'adsorption dominant).

En phase inverse (application la plus courante, abrégée RP-HPLC pour *Reverse Phase HPLC*) le gel de silice est recouvert d'un polymère hydrophobe, la plupart du temps un polysiloxane (silicone) greffé avec des chaînes alkyles. La phase stationnaire est alors assimilable à un liquide immobilisé ; c'est donc une chromatographie de partage. La phase stationnaire la plus courante est la « C18 », c'est-à-dire des chaînes de 18 carbones greffées sur la silice. La phase mobile, polaire contrairement à la phase stationnaire, est souvent un mélange eau/acétonitrile ou eau/méthanol, dans des proportions qui peuvent varier au cours de la chromatographie (gradients d'élution). Pour plus d'informations sur l'optimisation des deux phases, voir 3.

1.3.4 Chromatographie d'échange ionique

Elle permet de séparer des ions par échange, en se basant sur les interactions électrostatiques. La phase stationnaire est souvent une résine polymère fonctionnalisée de manière covalente par des chaînes ioniques. Pour séparer des espèces cationiques (respectivement anioniques), on choisit une colonne cationique (resp. anionique) dont la phase stationnaire comporte des sites anioniques (resp. cationiques) capables de retenir ces cations (resp. anions). Selon le type d'ions greffés, on parle d'échangeurs forts (charge permanente, capacité d'échange indépendante du pH) ou faibles (chargés ou non selon le pH). Quelques exemples de phases stationnaires sont données dans la partie 3.3. Globalement, plus les ions sont chargés, de faible rayon hydrodynamique et de forte polarisabilité, plus ils vont être retenus sur la colonne.

Les grandes étapes d'une chromatographie d'échange ionique sont :

1. L'équilibration de la colonne : on sature les ions de la phase stationnaire par des ions de la phase mobile seule (par exemple H^+ , OH^- , Na^+ , Cl^- etc)
2. La fixation : on fait passer les analytes dans la phase mobile sur la phase stationnaire (dans la colonne). Certains analytes ioniques vont alors remplacer les ions qui avaient saturé la phase stationnaire.
3. L'élution : On change le pH ou la force ionique de la phase mobile, pour introduire de nouveaux ions qui vont à leur tour remplacer les analytes ioniques et les décrocher de la colonne.

L'élution est en général suivie par conductimétrie. L'instrumentation est en général similaire à l'H-PLC, mais peut être faite à plus basse pression si la résolution nécessaire n'est pas trop haute.

La chromatographie d'échange ionique est utilisée pour la purification d'ions métalliques, de protéines fortement chargées ou d'acides nucléiques, ainsi que pour la déionisation de l'eau.

1.3.5 Chromatographie d'exclusion stérique

La phase stationnaire en chromatographie d'exclusion stérique (SEC pour *Size Exclusion Chromatography*) est poreuse, et la séparation se fait sur les différences de capacité des composés à pénétrer dans ces pores. La séparation dépend donc du volume occupé par les molécules comparé au volume des pores. **Les molécules les plus petites sont les plus retenues.** La phase stationnaire peut être composée de billes de polymères (dextran, polyacrylamide, agarose) ou de silice mésoporeuse. Les pores ont des tailles de l'ordre de 10^2 à 10^6 Å. Pour une colonne donnée on peut définir un domaine de perméation sélective donnant la taille des molécules qui seront séparées : les molécules plus grosses ne seront pas retenues du tout (elles seront éluées dans ce que l'on appelle le volume d'exclusion totale), et les molécules plus petites auront des temps de rétention augmentant très fortement. La taille des molécules appartenant au domaine de perméation peut être estimée grâce à une courbe d'étalonnage, comme schématisé en figure 1.5.

Ce type de chromatographie est surtout utilisé pour les macromolécules, notamment les protéines ou d'autres polymères. Comme il n'est pas basé sur des interactions spécifiques, il y a peu d'influence de

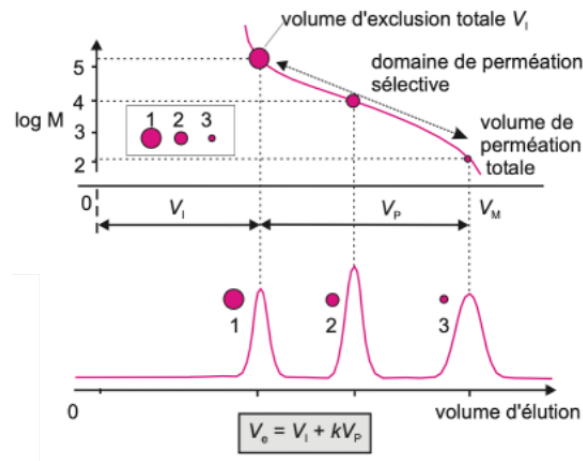


FIGURE 1.5 – Chromatogramme d'exclusion stérique (bas) et courbe d'étalonnage (haut) montrant le domaine de perméation sélective et le volume d'exclusion totale de la colonne. (Figure de ROUESSAC *et al.*, 2019)

la phase mobile tant que les composés y sont solubles et qu'elle ne perturbe pas la phase stationnaire. Là encore, le dispositif expérimental est similaire à celui de l'HPLC, mais la haute pression n'est pas forcément nécessaire.

1.4 A retenir de ce chapitre

- ♡ Le principe physique de chacun des principaux types de chromatographie : de partage, d'adsorption, d'exclusion stérique, chirale, d'échange ionique
- ♡ Les grandes lignes de l'instrumentation en CPV (injection avec ou division et dans quels cas utiliser l'une ou l'autre, les deux types de détecteurs) et HPLC (différents modules et particulièrement différents détecteurs)

Chapitre 2

Caractérisation d'un chromatogramme et modèles théoriques

2.1 Description expérimentale d'un chromatogramme

Une chromatogramme est la mesure d'une grandeur en sortie de colonne au cours du temps. Cela suppose donc une sortie des composés de la phase stationnaire (et ne s'applique donc pas à la CCM) et l'existence d'un détecteur et d'un système d'enregistrement de cette grandeur au cours du temps. C'est une « photo finish » où la ligne d'arrivée est le point de sortie de colonne. Le chromatogramme ne renseigne donc que de manière indirecte sur ce qu'il s'est passé tout le long de la colonne, auquel nous n'avons pas accès. Ceci est illustré en figure 2.1.

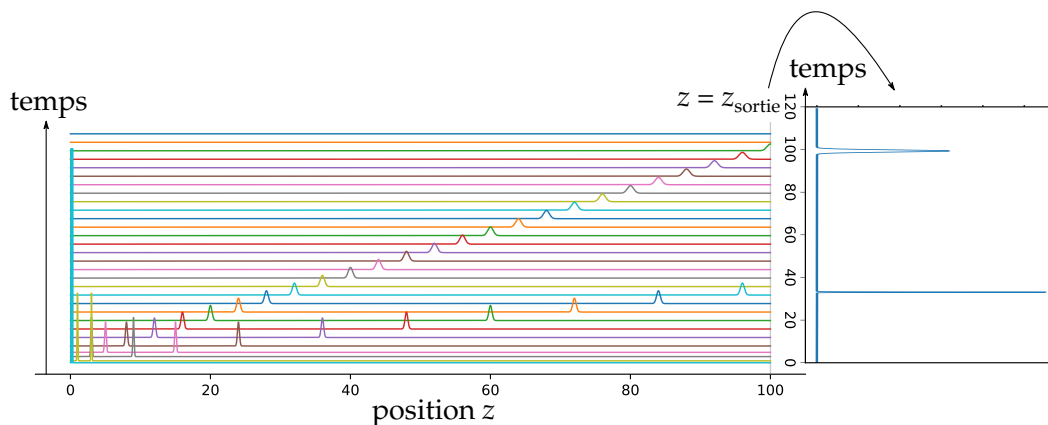


FIGURE 2.1 – Lien entre distribution spatiale des composés selon z (axe de la colonne) au cours du temps et chromatogramme. Le chromatogramme final est la courbe en haut à droite. (Figure : M. Vérot)

Pour chaque pic, deux caractéristiques peuvent être extraites du chromatogramme : sa position sur l'axe temporel (temps de rétention t_R) et sa largeur (étalement du pic dans le temps défini de différentes façons).

2.1.1 Temps et facteur de rétention

Le **temps de rétention** t_R d'un composé est défini comme le temps écoulé entre l'injection et le maximum du pic d'élution correspondant à ce composé. On peut aussi définir le volume de rétention V_R défini comme le volume de phase mobile qui a été nécessaire pour arriver au maximum du pic d'élution. Pour un débit D constant $V_R = D \times t_R$. Ces définitions absolues des temps et volume de rétention sont en pratique difficiles à définir sans système d'injection très précis permettant de définir et mesurer précisément le moment de l'injection. Il est donc intéressant de définir un autre temps de référence plus facile à mesurer.

Le **temps mort** t_M d'une colonne est le temps nécessaire pour qu'un composé non retenu (typiquement, la phase mobile ou le solvant d'injection) traverse la colonne. On définit le **volume mort** V_M en conséquence : c'est le volume de phase mobile dans la colonne. En chromatographie d'exclusion stérique on utilisera plutôt comme référence le volume d'exclusion total, défini comme le volume de phase mobile nécessaire pour éluer une molécule suffisamment volumineuse pour ne pas pénétrer dans les pores de la phase stationnaire (il est alors inférieur au volume mort, la phase mobile pouvant pénétrer dans les pores).

On peut donc définir un **temps de rétention réduit (ou corrigé)** t'_R , mesurable de façon plus reproductible, défini comme $t'_R = t_R - t_M$. Les définitions de ces différents temps (de rétention, mort et de rétention réduit) sont récapitulés en figure 2.2.

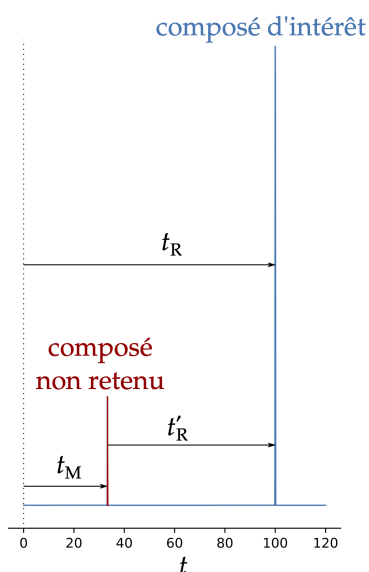


FIGURE 2.2 – Définitions graphiques des temps de rétention, mort et de rétention réduit pour un pic chromatographique. (Figure : Martin Vérot)

Afin de normaliser ces valeurs pour différentes longueurs de colonne et différents débits, on peut aussi définir un **facteur de rétention** k , avec $k = t'_R/t_M$. En supposant un état de pseudo-équilibre en tout point de la colonne ainsi qu'un coefficient de partage uniforme (voir 2.3.1), $k = \frac{n_S}{n_M} = K \frac{V_S}{V_M}$ avec n_S et n_M les quantités de matière du composé dans la phase stationnaire ou mobile, respectivement, et V_S le volume occupé par la phase stationnaire dans la colonne. En pratique, on cherche à optimiser la chromatographie (voir chapitre 3) pour que $k \approx 5$.

Remarque : en CCM, on définit en général $k = \frac{1-R_f}{R_f}$.

2.1.2 Largeur de pic, asymétrie

Un pic idéal est de forme gaussienne et est donc symétrique. Si la grandeur mesurée est notée G , alors

$$G_{t_R, \sigma} = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{(t-t_R)^2}{2\sigma^2}\right)$$

et le pic a l'allure donnée en figure 2.3 (à gauche).

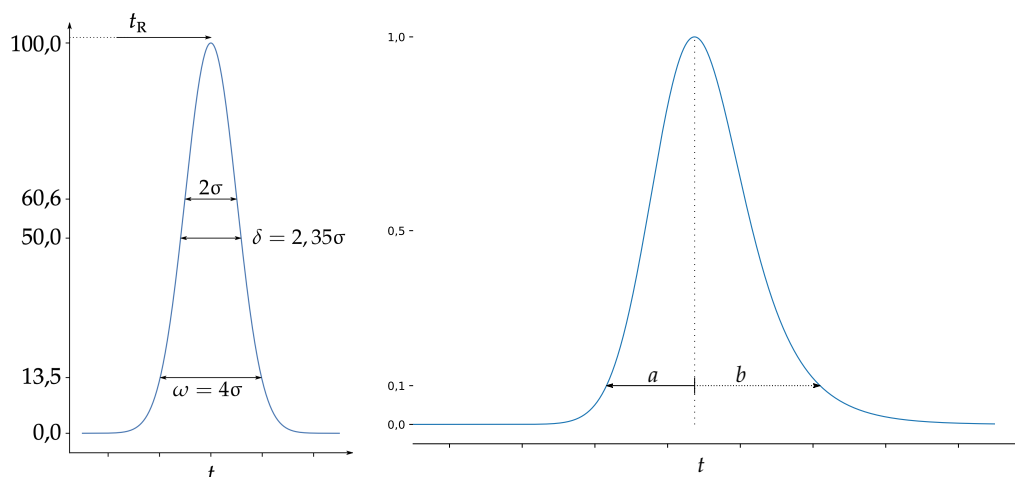


FIGURE 2.3 – Largeur de pic et asymétrie. Caractéristiques d'un pic de chromatographie idéal (gaussien) à gauche, et définition des paramètres a et b permettant de définir le facteur d'asymétrie F_a à droite. (Figure : M. Vérot)

On peut caractériser son étalement par son écart-type σ , sa largeur à mi-hauteur $\delta = 2,35\sigma$, et sa largeur à la base (à 13,5% de la hauteur) $\omega = 4\sigma$.

Expérimentalement, les pics ne sont pas parfaitement gaussiens et sont plus ou moins fortement asymétriques. Cette asymétrie peut être quantifiée par un facteur d'asymétrie F_a défini par le rapport des largeurs à droite et à gauche à 10% de la hauteur du pic comme schématisé en figure 2.3 :

$$F_a = \frac{b}{a}$$

Un pic est généralement considéré comme symétrique pour $0,8 < F_a < 1,2$ environ. Un pic asymétrique vient d'un coefficient de partage qui change selon la concentration du composé. Cela signifie souvent que la colonne a été saturée (il faut injecter une plus petite quantité d'analyte). Si $F_a > 1,2$, le pic « traîne », cela peut aussi signifier que le composé n'est pas bien élué. Il faut alors changer certaines conditions expérimentales (voir la chapitre 3).

2.2 Séparation et résolution

Si un composé est pur, la chromatographie n'a que peu d'intérêt. Il est donc essentiel de quantifier la capacité d'une expérience de chromatographie à séparer deux composés d'un mélange.

2.2.1 Facteur de séparation ou de sélectivité

Le premier paramètre à prendre en compte pour savoir si deux composés peuvent être distingués est de savoir s'ils sont « loin » l'un de l'autre. On définit alors le facteur de séparation ou de sélectivité α comme

$$\alpha = \frac{t'_{R,B}}{t'_{R,A}} = \frac{k_B}{k_A}$$

Pour une colonne donnée dans des conditions expérimentales données, α dépend seulement des coefficients de partage des deux composés.

2.2.2 Résolution

Cependant, la distance entre deux pics n'est pas suffisante pour déterminer s'ils sont distinguables. En effet, deux pics très larges vont se superposer et potentiellement devenir inséparables. On doit donc définir la résolution R prenant en compte ces deux facteurs : distance entre pics et largeur des pics. On note les pics A et B, avec B le pic du composé le plus retenu ($t_{R,B} > t_{R,A}$). Il existe différentes définitions de la résolution, liés à différentes définitions de la largeur des pics et différentes limites au-delà desquelles on considère que les pics sont trop proches pour être résolus. Elles donnent des valeurs relativement proches, et on choisit ici de retenir une des plus courantes :

$$R = 2 \frac{t_{R,B} - t_{R,A}}{\omega_B + \omega_A}$$

On admet communément que **deux pics sont résolus si $R \geq 1,5$** . Une représentation visuelle est donnée en figure 2.4. On voit que pour $R \geq 1,5$, l'aire sous chaque pic est quasiment égale à l'aire du pic gaussien correspondant (pas de « contamination » du pic voisin).

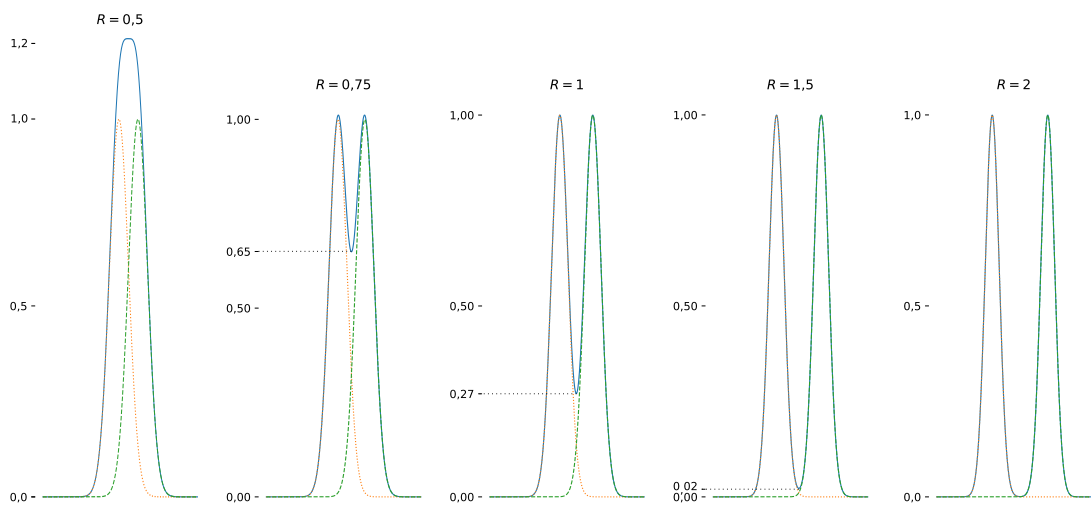


FIGURE 2.4 – Deux pics gaussiens de plus en plus proches et valeurs de résolution associées. (Figure : M. Vérot)

Avec cette approche, on peut calculer la résolution d'une expérience de chromatographie. Grâce à des modèles théoriques, il est possible de relier cette résolution à une caractéristique de la colonne utilisée : son nombre de plateaux N_B . Cela donne **l'équation de Purnell** donnant la résolution :

$$R = \frac{1}{4} \sqrt{N_B} \frac{\alpha - 1}{\alpha} \frac{k_B}{1 + k_B}$$

On voit ainsi clairement les contributions respectives de l'efficacité de la colonne, de la sélectivité, et de la rétention. Voyons maintenant les modèles définissant cette notion de nombre de plateaux.

2.3 Notion de plateaux - modèle de Craig (semi-statique)

2.3.1 Modèle de Craig

Le modèle de Craig est un modèle simpliste découpant une colonne en N « tranches » appelées plateaux, et considérant trois phénomènes :

- Le mouvement de la phase mobile entraînant les composés d'un plateau à l'autre
- L'affinité des composés pour la phase mobile
- L'affinité des composés pour la phase stationnaire

L'hypothèse principale du modèle est que dans chaque plateau s'instaure un équilibre des composés entre les phases mobile et stationnaire, régit par le coefficient de partage de chaque composé i : $K_i = \frac{[i]_S}{[i]_M}$. Il s'instaure ainsi un cycle de déplacements-équilibres successifs¹ :

1. Déplacement de la phase mobile du plateau j au plateau $j+1$, sans modification du contenu de la phase stationnaire
2. Établissement de l'équilibre entre phases mobile et stationnaire selon le coefficient de partage
3. Nouveau déplacement
4. ...

On peut calculer pour chaque étape de déplacement+équilibre une nouvelle concentration d'un composé donné, en utilisant simplement la conservation de la matière et le coefficient de partage. Cela aboutit à des concentrations suivant une loi binominale. Dans le modèle de Craig (équilibre atteint en tout point de la colonne et coefficient de partage uniforme), le facteur de rétention $k = t'_R/t_M$ devient $k = \frac{n_S}{n_M} = K \frac{V_S}{V_M}$ avec n_S et n_M les quantités de matière du composé dans la phase stationnaire ou mobile, respectivement, et V_S le volume occupé par la phase stationnaire dans la colonne.

2.3.2 Efficacité de colonne : nombre de plateaux et hauteur de plateau théoriques

Une façon de quantifier l'efficacité d'une colonne est de comparer ses performances à celles qu'aurait une colonne dans le modèle de Craig. On appelle **nombre de plateaux théoriques** N et **hauteur équivalente à un plateau théorique** H (ou **HEPT**) les caractéristiques d'une colonne du modèle de Craig qui aurait les mêmes performances que la colonne réelle que l'on caractérise. Ces grandeurs doivent respecter $L = N \times H$, où L est la longueur totale (réelle !) de la colonne. Pour un L donné, plus N est grand, meilleure sera la résolution de la colonne. Notez que pour aller plus vite on parle souvent de « nombre de plateaux » au lieu de « nombre de plateaux théoriques » et de « hauteur de plateaux » au lieu de « hauteur équivalente à un plateau théorique ».

Les définitions de N et H sont phénoménologiques et n'ont pas de signification concrète absolue. Leurs valeurs sont donc indicatives, et l'important est leur comparaison. On définit :

$$H = \frac{\sigma_L^2}{L}$$

1. Le modèle de Craig vient initialement d'un dispositif fonctionnant vraiment pas déplacements-équilibres successifs, voir [Craig Applet](#)

où σ_L est l'écart type de l'étalement **spatial** du pic dans la colonne, soit la vitesse d'éluion du composé fois l'écart type de l'étalement temporel du pic chromatographique défini en 2.1.2 : $\sigma_L = v \times \sigma$. Avec cette définition on a donc

$$N = \frac{L}{H} = \left(\frac{L}{\sigma_L} \right)^2 = \left(\frac{t_R}{\sigma} \right)^2 = 16 \left(\frac{t_R}{\omega} \right)^2 = 5,54 \left(\frac{t_R}{\delta} \right)^2$$

Pour des pics asymétriques (non gaussiens), une relation empirique est :

$$N = 41,7 \frac{\left(\frac{t_R}{\omega_{0,1}} \right)}{\frac{1}{F_a} + 1,25}$$

où $\omega_{0,1}$ est la largeur du pic à 10% de sa hauteur.

Une variante de ces calculs est d'utiliser le temps de rétention réduit t'_R au lieu du temps de rétention t_R . On parle alors de nombre de plateaux effectif $N_{eff} = \left(\frac{t'_R}{\sigma} \right)^2$.

Le tableau 2.1 donne des exemples de valeurs de N et H.

Méthode	Longueur de colonne	N	HEPT (mm)
CPG (colonne remplie)	2 m	2 000	1
CPG (colonne capillaire)	25 m	100 000	0,25
CPL	50 cm	100	5
HPLC	10 cm	5 000	0.02

TABLE 2.1 – Efficacité de colonnes chromatographiques (*Cours Master 1 de Chimie de l'Université Paris Saclay*)

2.3.3 Utilité et limites du modèle

Ce modèle permet d'obtenir différents résultats théoriques vérifiés expérimentalement :

- ✓ Le temps de rétention est d'autant plus grand que K est grand (plus grande affinité pour la phase stationnaire).
- ✓ Les distributions suivent une loi binomiale qui, pour un grand nombre de plateau et après un temps suffisamment long, donne une courbe gaussienne – forme idéale d'un pic chromatographique.
- ✓ Le facteur de séparation α est égal au rapport des constantes d'équilibre pour chacun des composés. Ce modèle permet donc de faire le lien entre grandeurs thermodynamique et temps de rétention corrigés.
- ✓ Si l'on fait le calcul pour plusieurs composés, on obtient que plus le nombre de plateaux est grand, meilleure est la séparation.

Mais le modèle a de nombreuses limites, notamment :

- × La diffusion est totalement négligée : il manque la possibilité de se déplacer d'un plateau à l'autre au sein d'une phase.
- × La résolution calculée est surestimée. En effet, le modèle fait des hypothèse de successions d'état d'équilibre alors que la colonne est globalement dans un état hors-équilibre dû au déplacement continu (et pas par plateaux) de la phase mobile.
- × Implicitement, le débit et le nombre de plateau est relié alors que ce n'est pas forcément le cas.
- × Il décrit plutôt les chromatographies de partage que les chromatographies d'adsorption.
- × Ils ne décrit pas l'asymétrie de pics liée à d'autres effets que la saturation.

2.4 Modèles dynamiques

Pour pallier une partie des limites du modèle de Craig, on peut prendre en compte les effets de la vitesse moyenne de la phase mobile sur la hauteur des plateaux. Cette prise en compte permet une meilleure représentation de l'élargissement des pics liés à d'autres effets que la saturation de la colonne.

2.4.1 Équation de van Deemter

L'équation de van Deemter est l'équation la plus courante pour prendre en compte la vitesse moyenne $u = L/t_M$ de la phase mobile :

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu$$

- A est le coefficient de diffusion turbulente
- B est le coefficient de diffusion longitudinale
- C est le coefficient de résistance au transfert de masse

Ces trois coefficients sont des constantes. l'allure de H en fonction de u est donnée en figure 2.5.

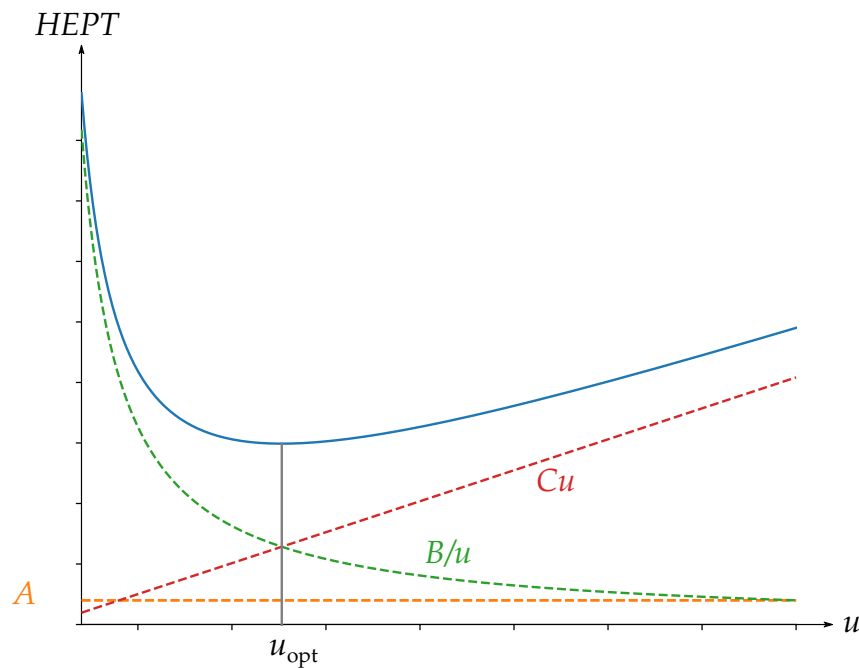


FIGURE 2.5 – Allure de la courbe de H en fonction de u selon l'équation de van Deemter. (Figure : M. Vérot)

Elle permet de voir qu'il existe une vitesse moyenne optimale de la phase mobile pour diminuer la hauteur des plateaux (soit augmenter le nombre de plateaux) :

$$u_{opt} = \sqrt{\frac{B}{C}}$$

$$H_{min} = A + 2\sqrt{BC}$$

En pratique il faut trouver un compromis entre u_{opt} , généralement faible, et des temps d'analyse raisonnablement court, souvent en testant différents u , et si possible en calculant H pour différents u et observant la tendance.

Nous allons maintenant nous pencher sur chacun des trois termes de l'équation, un-à-un. Les phénomènes physiques auxquels ils correspondent sont schématisés en figure 2.6.

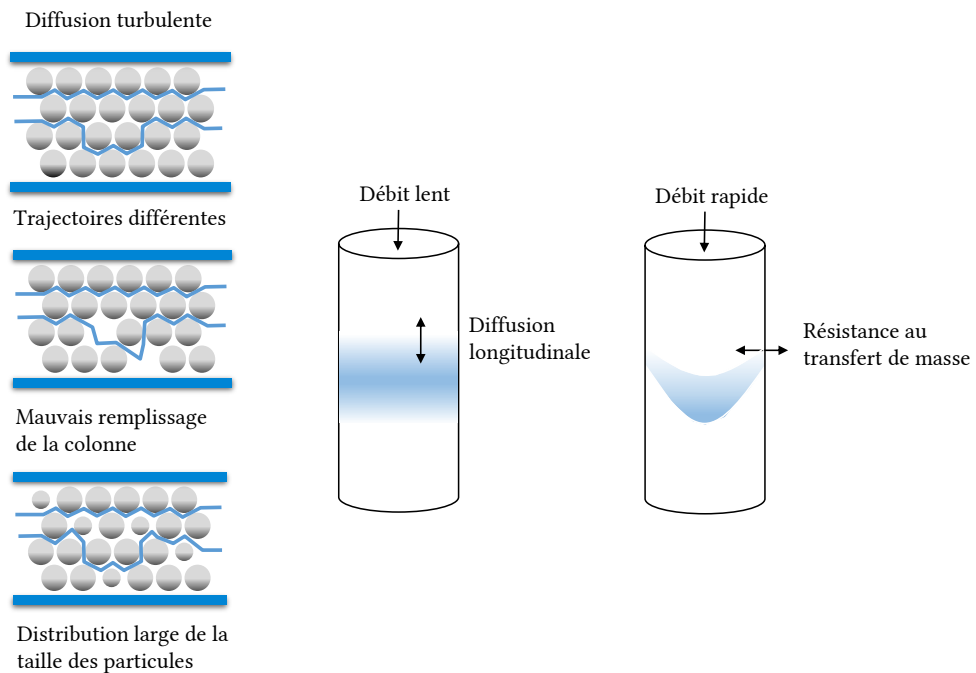


FIGURE 2.6 – Représentation des différents termes de l'équation de Van Deemter (A, B et C de gauche à droite). (Figure adaptée de ROUESSAC *et al.*, 2019 par M. Roux)

2.4.2 Terme de diffusion turbulente

Le terme de diffusion turbulente (ou *eddy diffusion*) A est aussi appelé terme de remplissage. En effet, il vient du fait que deux molécules du même composé peuvent emprunter des chemins de longueurs différentes dans une colonne remplie, ce qui est exacerbé par un remplissage irrégulier ou une hétérogénéité en taille et forme des particules de la phase stationnaire. A peut ainsi être exprimée en fonction d'un facteur de régularité de remplissage λ (généralement compris entre 0,8 et 1) et du diamètre moyen des particules de la colonne d_p :

$$A = 2\lambda d_p$$

En première approximation, λ ne dépend pas de u . Pour une colonne capillaire, $A = 0$. L'équation de van Deemter est alors appelée équation de Golay.

2.4.3 Terme de diffusion longitudinale

La terme B/u reflète la diffusion des composés dans la phase mobile dans la direction d'écoulement (axe de la colonne). La diffusion est particulièrement importante au niveau du front d'élution, puisqu'il y a à ce niveau un fort gradient de concentration du composé. B dépend du coefficient de diffusion du composé dans la colonne, qui peut être décrit comme le produit

- Du coefficient de diffusion du composé dans la phase mobile D_m
- d'un coefficient γ appelé facteur d'obstruction dépendant de la structure de la colonne. Il est de l'ordre de 0,6 à 0,8 et est plus grand pour une colonne remplie que capillaire.

Le composé diffuse moins dans un environnement géométriquement contraint (la colonne) que dans la phase mobile libre.

$$B = 2\gamma D_m$$

B est plus grand en phase gaz qu'en phase liquide, **ce terme est donc important surtout en chromatographie en phase gaz**. C'est aussi la raison pour laquelle il faut toujours éviter de faire des pauses du débit de phase mobile au milieu d'une expérience de chromatographie.

La dépendance de ce terme en $1/u$ vient du fait qu'une vitesse faible entraîne des temps d'analyse longs laissant beaucoup de temps pour que les composés diffusent et donc que les pics s'élargissent. La résolution, mais donc aussi le rapport signal-sur-bruit, se détériorent, en plus des inconvénients humains et économiques associés à des expériences plus longues.

2.4.4 Terme de résistance au transfert de masse

Ce terme vient de la nature hors-équilibre (thermodynamique) du système, due au mouvement continu de la phase mobile. Il est donc proportionnel à u : plus l'élution est lente, plus la hauteur de plateau est faible, car plus l'équilibre thermodynamique a du temps pour s'établir entre la phase mobile et la phase stationnaire. La direction de diffusion importante ici est latérale (entre les phases mobile et stationnaire en un même point le long de la colonne). Le terme C est inversement proportionnel à la diffusion des composés : si la diffusion est rapide l'équilibre n'a pas le temps de s'établir. Cela se traduit dans deux composantes du coefficient $C = C_m + C_s$:

- C_m , lié à la diffusion dans la phase mobile. Cette contribution vient du fait que là où la phase mobile a une grande vitesse (au centre d'une colonne capillaire ou entre les particules d'une colonne remplie), la diffusion n'a pas le temps d'avoir un grand effet et l'équilibre ne s'effectue pas. Là où la vitesse est moindre (sur les bords d'une colonne capillaire ou proche des particules d'une colonne remplie), on se rapproche de l'équilibre. Pour une colonne remplie on a donc

$$C_m \propto \frac{d_p^2}{D_m}$$

- C_s , lié à la diffusion dans la phase stationnaire, de coefficient de diffusion D_s . Plus la phase mobile est rapide, moins les composés qu'elle entraîne auront le temps de pénétrer dans la phase stationnaire. Ce terme est aussi proportionnel au carré de l'épaisseur de la phase stationnaire d_f et est dépendant du facteur de rétention

$$C_s \propto \frac{k}{(k+1)^2} \frac{d_f^2}{D_s}$$

Remarquons que les facteurs en $\frac{d}{D}$ correspondent à des temps caractéristiques de diffusion.

2.4.5 Autres équations et cas particuliers d'application (pas à retenir)

- Pour une colonne capillaire (comme souvent en CPV) $A = 0$, donnant l'équation de Golay $H = B/u + Cu$. De plus, $\gamma = 0$ et les coefficients C_m et C_s peuvent être définis, donnant :

$$H = \frac{2D_m}{u} + \frac{1+6k+11k^2}{24(1+k)^2} \frac{r^2}{D_m} u + \frac{2k}{3(1+k)^2} \frac{d_f^2}{D_s} u$$

où r est le diamètre interne de la colonne.

- Pour la chromatographie en phase liquide, il existe l'équation de Knox, similaire à celle de van Deemter mais utilisant la hauteur de plateau réduite $h = H/d_p$ et la vitesse moyenne réduite $v = ud_p/D_m$:

$$h = Av^{1/3} + \frac{B}{v} + Cv$$

2.4.6 Conclusion

Ces équations dérivent de modèles complexes (mais encore bien loin de la réalité des phénomènes). L'utilisation de u , la vitesse moyenne, est déjà une approximation importante, dans sa définition et son utilisation. Bien souvent, le modèle choisi est surtout celui qui reproduit les données expérimentales...

2.5 A retenir de ce chapitre

- ♡ Comprendre le lien entre chromatogramme et distribution spatiale
- ♡ Les définitions et formules pour le temps de rétention, le temps mort, le facteur de rétention, le facteur de séparation, la résolution
- ♡ savoir que des pics sont résolus si la résolution est supérieure à 1,5
- ♡ La formule de Purnell
- ♡ Le modèle de Craig
- ♡ La notion de plateau théorique et de hauteur de plateau
- ♡ L'équation de van Deemter/Golay et la signification physique de ses différents termes en lien avec la vitesse de la phase mobile et la diffusion notamment

Chapitre 3

Optimisation

3.1 Concepts généraux

Le but premier d'une expérience de chromatographie est de séparer des composés - que ce soit avec une visée analytique ou préparative. La résolution est donc le facteur principal à optimiser. Cependant, deux autres facteurs sont cruciaux en pratique : le temps d'analyse, qui doit être le plus court possible, et la capacité, qui permet d'analyser de gros échantillons ou de préparer de grandes quantités. Optimiser l'un de ces paramètres se fait souvent au détriment des autres. Il faut donc trouver un compromis, comme illustré par le triangle de la figure 3.1.

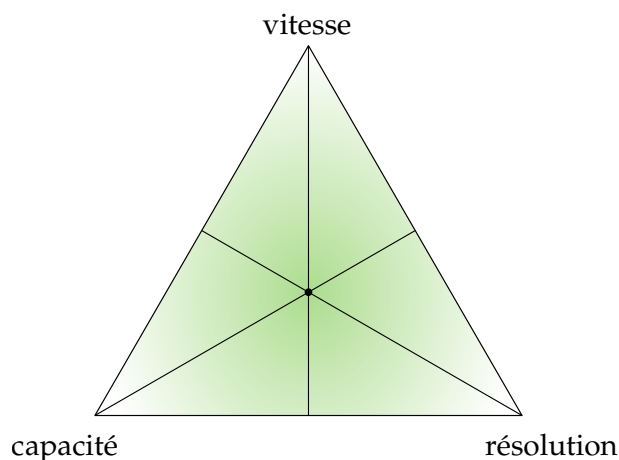


FIGURE 3.1 – Les trois facteurs à optimiser dans un expérience de chromatographie représentés sur un triangle. Une chromatographie optimisée se trouve près du centre, c'est-à-dire trouve un compromis entre ces trois facteurs. (Figure : M. Vérot)

Ces paramètres sont d'abord déterminés par l'instrumentation et le matériel disponibles (injecteur, colonne, détecteur etc), puis un réglage plus fin est possible en ajustant des paramètres physico-chimiques (nature des phases, débit, température, pression).

Alors quels sont précisément les facteurs influençant ces trois paramètres ? Pour le savoir nous pouvons revenir à l'équation de Purnell (vue en 2.2.2) donnant les facteurs influençant la résolution :

$$R = \frac{1}{4} \sqrt{N_B} \frac{\alpha - 1}{\alpha} \frac{k_B}{1 + k_B}$$

— $N = L/H$ peut être augmenté en utilisant des colonnes plus longues (L augmente) ou en diminuant

la hauteur de plateau H (qui dépend de nombreux facteurs caractéristiques de la colonne, du facteur de rétention k et de la vitesse moyenne de la phase mobile u). Une valeur de N de quelques milliers donne déjà de bonnes facultés de séparation.

- Le facteur de sélectivité en $(\alpha - 1)/\alpha$ où $\alpha = t'_{R,B}/t'_{R,A} = k_B/k_A$ (par définition). Grâce au modèle de Craig, on sait que α est aussi égal au rapport des coefficients de partage des composés. Il peut donc être modifié en changeant les caractéristiques des deux phases (mobile et stationnaire). Cependant, il est inutile d'augmenter trop α , puisque son influence sur R (en $(\alpha - 1)/\alpha$) est de moins en moins forte comme montré en figure 3.2. Ainsi on optimise en général jusqu'à $1,5 \leq \alpha \leq 3$.
- Le facteur de rétention en $k_B/(1 + k_B)$ où $k = t'_R/t_M$. Le gain en résolution en augmentant k_B est aussi asymptotique (voir figure 3.2), et donc $5 \leq k_B \leq 20$ est généralement suffisant. Si k_B est trop grand, c'est souvent au détriment du temps d'analyse. On optimise k_B aussi en jouant sur les phases mobile et stationnaire.

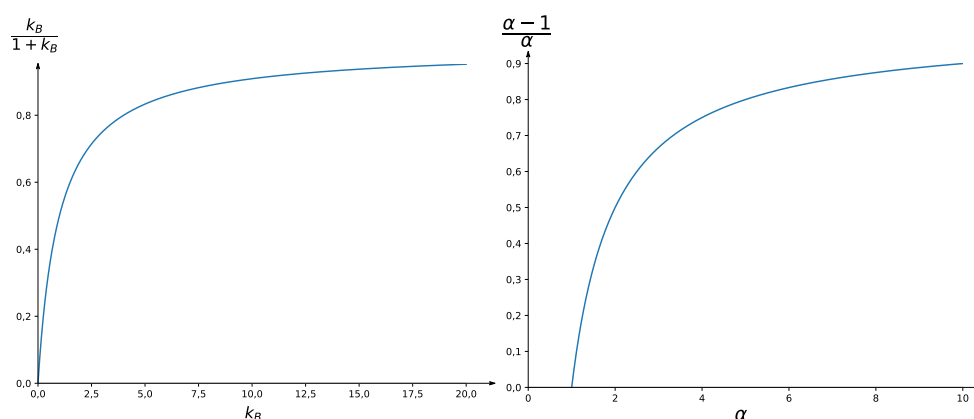


FIGURE 3.2 – Comportement asymptotique de l'influence de α et de k_b sur la résolution. (Figure : M. Vérot)

La suite de ce chapitre se penche sur les paramètres pouvant être modifiés lors de l'optimisation et de leur influence sur les trois facteurs à optimiser.

3.2 Influence de la structure de la colonne

Indépendamment de la nature de la phase stationnaire dans la colonne, ses facteurs géométriques globaux (longueur et largeur) et internes (remplissage) ont une grande influence sur la performance de la chromatographie.

3.2.1 Longueur de colonne L

D'après l'équation de Purnell, $R \propto \sqrt{N_B}$. Hors, toutes choses égales par ailleurs, la longueur de colonne est directement proportionnelle au nombre de plateaux, donc $R \propto \sqrt{L}$, ce qui se retrouve expérimentalement : en doublant la longueur de colonne on augmente la résolution d'un facteur 1,41 ($\sqrt{2}$). On peut aussi approcher le problème dans l'autre sens : pour une résolution fixée, c'est-à-dire pour $N_B = L/H$ fixé, on peut déterminer H_{min} et donc avoir la longueur minimale de colonne requise.

Cependant, et en gardant en tête notre triangle d'optimisation, l'augmentation de longueur de colonne entraîne aussi l'augmentation du temps d'analyse.

3.2.2 Largeur de colonne r

Pour une colonne capillaire, l'équation de Golay nous donne que $H_{min} = 2\sqrt{BC}$, et en négligeant la diffusion dans la phase stationnaire on arrive à $H_{min} \propto r$. Il faut donc avoir une colonne capillaire de plus petit diamètre possible afin d'optimiser la résolution. La capacité de la colonne souffrira, mais en CPV, souvent utilisée en mode analytique et où il existe les injecteurs *split*, ce n'est pas forcément un problème.

En phase liquide, le compromis est plus difficile à trouver, surtout en mode préparatif où il faut que le dépôt reste fin (on a donc besoin d'un grand diamètre) et la capacité grande. En mode analytique on a des colonnes plus fines (moins d'un cm de rayon).

3.2.3 Remplissage (ou garnissage) de la colonne

On distingue plusieurs types de remplissages de colonne, présentés en figure 3.3.

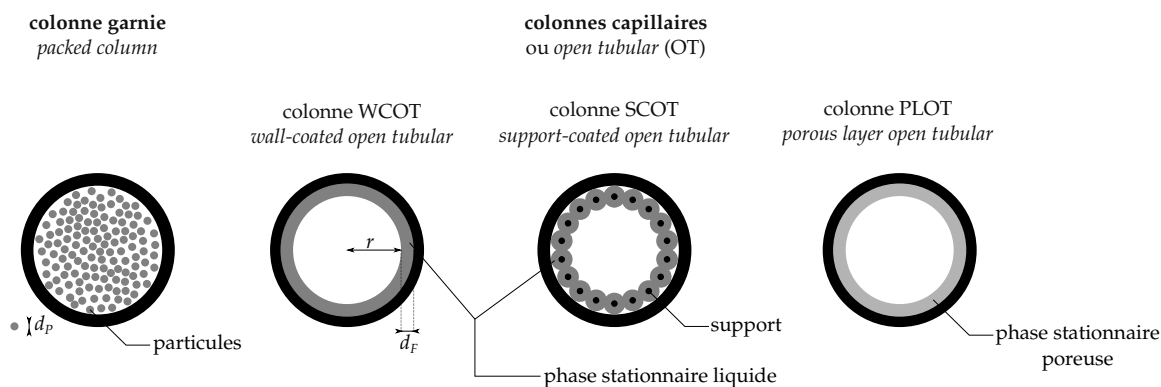


FIGURE 3.3 – Différents types de colonnes. (Figure : M. Vérot)

- **Colonnes garnies (ou remplies)** : Elles ont une capacité élevée et limitent la diffusion longitudinale (terme B de l'équation de van Deemter), mais favorisent la diffusion turbulente (terme A) et la résistance au transfert de masse (terme C , et particulièrement C_m). Ces deux derniers termes dépendent de d_p : **plus les particules sont petites, plus H sera petit et donc meilleure sera la résolution**. C'est le principe de l'HPLC, qui utilise des colonnes faites de particules petites mais doit donc compenser par une forte pression pour garder un débit correct. Les colonnes garnies sont utilisées principalement en CPL.
- **Colonnes capillaires (ou à tube ouvert)** : elles ont une capacité limitée mais une très bonne résolution car elles réduisent la diffusion turbulente (A) et la résistance au transfert de masse (C) dans l'équation de van Deemter. Les temps d'analyse sont aussi plus faibles qu'avec des colonnes garnies.

Les colonnes capillaires sont obtenues par greffage de la phase stationnaire de manière covalente ou non à une surface de silice. L'épaisseur de la couche de phase stationnaire se situe entre 0,05 et 5 μm . Cette épaisseur influence la résolution en modifiant la résistance au transfert de masse et le temps de rétention. **Ainsi, plus le film est fin, meilleure est la résolution, mais plus la capacité et le temps de rétention sont faibles.**

3.2.4 Conclusion : à retenir

- En CPV : On préfère des colonnes capillaires très longues (quelques dizaines à centaine de m) et fines (< mm).
- En CPL : On préfère les colonnes garnies, de longueur relativement faible (quelques dizaines de cm) et de largeur dépendant de la quantité de produit à analyser/préparer (ordre du cm).

3.3 Influence de la phase stationnaire

Selon la phase stationnaire, les composés auront des affinités différentes pour celle-ci ainsi que des coefficients de diffusion différents en son sein. La phase stationnaire va donc modifier sa rétention et sa sélectivité, ainsi que la hauteur de plateau. Ce sont donc tous les paramètres de l'équation de Purnell qui peuvent être modifiés. Les caractéristiques des phases stationnaires qu'il faut considérer sont

- Leur polarité
- Leur charge (en échange ionique)
- Leur stabilité (notamment en fonction de la température et du pH)
- Leur phase : liquide (on est alors en chromatographie de partage) ou solide (on est alors en chromatographie d'adsorption ou d'exclusion stérique)

On distingue deux types de phases stationnaires (pour les chromatographies de partage et d'adsorption) :

- Les phases normales : elles sont polaires, et l'élution des composés se fait donc des plus apolaires et apolaires aux composés polaires protiques (qui sont les plus retenus sur la colonne). Des phases normales classiques sont la silice et l'alumine (non greffées ou greffées avec des groupes silanols ou aluminols) et le polyéthylène glycol (PEG). Les éluants utilisés avec ces phases stationnaires sont majoritairement apolaires, avec des gradients d'élution qui augmentent la polarité progressivement.
- Les phases inverses : Elles sont apolaires, et éluent donc d'abord les composés polaire protiques. Ces phases sont utilisées pour séparer des composés plutôt polaire protiques, qui seraient tous complètement retenus sur phase normale. Les phases stationnaires inverses classiques sont des colonnes recouvertes d'un polymère polysiloxane greffé par des chaînes alkyl plus ou moins longues selon le niveau d'apolarité souhaité (la plus utilisée possède 18 carbones (C18)). Cette dernière phase est considérée comme un liquide, ce qui classe son utilisation comme une chromatographie de partage. Les éluants utilisés sont plutôt polaires, avec des gradients diminuant la polarité progressivement.

Le tableau 3.1 donne des phases stationnaires courantes pour différents types de chromatographie.

De manière générale, **la phase stationnaire est choisie selon les propriétés des composés (notamment la polarité, la charge et la stabilité) à séparer.**

On peut ainsi donner les généralités suivantes :

- **En CPV** : c'est la polarité des composés qui guide le choix, pour des composés polaires (respectivement apolaires) on utilise une phase stationnaire polaire (resp. apolaire). Si la polarité des composés est similaire à celle de la phase stationnaire, la séparation sera guidée par la température d'ébullition des composés.
- **En chromatographie d'adsorption** : on utilise en générale soit de la silice soit de l'alumine. Le choix se fait alors sur deux critères : 1) si les composés sont trop polaires ou ont de fortes tendances à faire des liaisons hydrogènes (amines, acides carboxyliques), préférez l'alumine ; 2) si les composés sont sensibles à un milieu acide, préférez l'alumine ; 3) dans la plupart des autres cas, la silice est utilisée.

Phase	Greffage	Formule	Propriété	Utilisation
Polysiloxane	Silanol		polaire, acide ($pK_a \sim 10$), se décompose en milieu trop acide ou basique	chromatographie d'adsorption
	Chaîne alkyl (nombre de carbone variable)		apolaire, polarité et hydrophobicité dépend du nombre de carbone, les groupements méthyle peuvent être substitués par des phényle, cyano, noprpylyle ou trifluoropropyle pour moduler la polarité	CPV en colonne apolaire (pour les courtes chaînes), HPLC en phase inverse, CCM en phase inverse
	β -cyclodextrines		chirale, polaire, cavité hydrophobe	chromatographie CPV ou CPL chirale
Alumine	Aluminol		polaire, utilisable en milieu basique, polarité variable en fonction du pourcentage d'eau (activité)	chromatographie d'adsorption
Polyéthylène glycol (PEG)			polaire, moins stable que les polysiloxanes	CPV en colonne polaire
Polysiloxane, polysaccharides	chaîne alkylammonium		colonne anionique forte, polaire, version -N(CH ₃) ₂ pour phase anionique faible	chromatographie échangeuse d'anion
	chaîne sulfonate ou carboxylate		colonne cationique forte, polaire, version -COO ⁻ pour phase cationique faible	chromatographie échangeuse de cation
Polymères macroporeux Silice polyhydroxylées, polysaccharides			souvent monomère styrène ou divinylbenzène, adaptée aux solvants organiques	on parle de perméation de gel, utilisée notamment pour les polymères
			adaptée aux solvants aqueux, plus grand domaine de pression possible, grande stabilité chimique	on parle de filtration sur gel, utilisée notamment pour les macromolécules

TABLE 3.1 – Principaux types de phase stationnaire fréquemment utilisés en chromatographie. NB : Selon la longueur des chaînes greffées, ces phases stationnaires peuvent être considérées comme liquide ou solide et avoir un impact sur le type de chromatographie (adsorption ou partage). (Tableau créé par M. Roux)

- **En HPLC** : La grande majorité des séparations par HPLC a lieu en phase inverse sur colonne de silice greffée avec des chaînes alkyles allant de 8 à 18 carbones.
- **En chromatographie échangeuse d'ions** : c'est la charge des composés à séparer qui guide le choix : phase stationnaire anionique pour retenir des cations ou cationique pour retenir des anions.
- **En chromatographie d'exclusion stérique** : c'est la taille des composés qui va guider le choix de la phase stationnaire (une taille limite est souvent indiquée en daltons) et sa solubilité (en milieu organique ou aqueux).

3.4 Influence de la phase mobile

C'est le paramètre le plus facile et le moins onéreux à modifier pour optimiser une chromatographie. La nature de la phase mobile joue sur les mêmes paramètres que la nature de la phase stationnaire.

3.4.1 En CPV

En phase gaz, les interactions analyte-phase mobile sont très faibles, quel que soit le gaz vecteur. Son influence sur la rétention est donc très faible. Le principe critère de sélection est alors la hauteur de plateau. La figure 3.4 présente les courbes de van Deemter pour trois gaz vecteur courants : le diazote, le dihydrogène et l'hélium. Le diazote présente une valeur de u_{opt} plus faible, et nécessite donc des temps d'analyse plus long pour optimiser la résolution. De plus, le puits autour de u_{opt} est plus étroit : il faudra une optimisation plus précise que pour le dihydrogène et l'hélium. Cependant, le puits est plus bas, ce qui signifie que le diazote permet de diminuer la hauteur de plateau (et donc d'augmenter la résolution) plus significativement que pour les deux autres gaz.

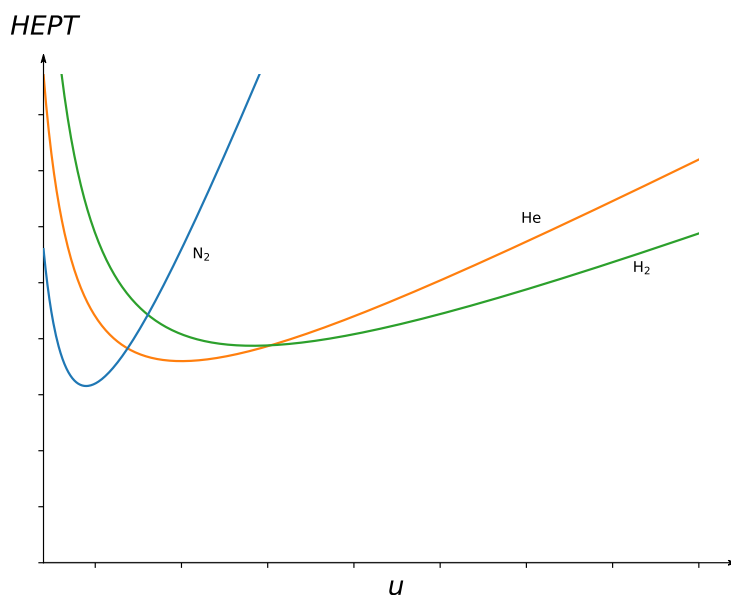


FIGURE 3.4 – Allure typique d'une courbe de Van Deemter pour le diazote, l'hélium et le dihydrogène. (Figure : M. Vérot)

D'autres critères doivent être pris en compte dans le choix du gaz vecteur : accessibilité et prix, ainsi que dangerosité par exemple. Ces critères sont résumés dans le tableau 3.2.

D'autres gaz vecteur peuvent être utilisés : argon ou dioxyde de carbone par exemple.

Critère	N ₂	He	H ₂	Commentaires
Coût	\$	\$\$\$	\$	H ₂ peut être généré facilement sur place
Dangerosité			+++	H ₂ est explosif
Inerte	++	+++	-	
Résolution	+	++	++	
Viscosité à 100°C (10 ⁻⁵ Pa · s)	2,12	2,32	1,04	Conditionne la perte de charge au sein de la colonne et le temps d'analyse
Temps d'analyse	-	+	++	

TABLE 3.2 – Quelques critères de choix pour le gaz vecteur. « + » veut dire favorable et « - » défavorable. La perte de charge ΔP est la différence de pression entre l'entrée et la sortie de la colonne. (Tableau : M. Vérot)

3.4.2 En CPL

Contrairement à la CPV, la phase mobile en CPL (éluant) influence tous les paramètres : rétention, sélectivité, nombre de plateaux. En effet le choix de l'éluant intervient dans la compétition qui se crée entre les interactions éluant-analyte, éluant-phase stationnaire et analyte-phase stationnaire. On va donc choisir l'éluant en fonction à la fois des analytes à séparer et de la phase stationnaire. Souvent, au lieu de faire une élution **isocratique** (éluant constant), on effectue une élution par **gradient** (typiquement l'éluant est un mélange de deux solutions ou solvants dont les proportions varient progressivement au cours de l'élution).

Effet de remplacement (chromatographie d'adsorption) : force éluante

Pour quantifier l'adsorption de l'éluant sur la phase stationnaire (et donc sa compétition avec l'adsorption des analytes par l'effet de remplacement mentionné en 1.3.2), on définit sa force éluante ϵ_0 en fonction de l'enthalpie libre d'adsorption de l'éluant sur la phase stationnaire $\Delta_{ads}G_S$, de la surface occupée par l'éluant sur la phase stationnaire une fois adsorbé A_M :

$$\epsilon^0 = \frac{|\Delta_{ads}G_S|}{\ln(10)RTA_M}$$

Notons que la force éluante d'un solvant sur silice est égale à 80 % de la force éluante de ce même solvant sur alumine. Autrement dit, pour un éluant donné, les produits seront moins retenus sur alumine que sur silice. Cependant la **série éluotropique**, qui est le classement de différents solvants par force éluante croissante, est la même pour l'alumine et la silice : hexane/pentane < cyclohexane < dichlorométhane/diethyl ether < acétate d'éthyle < acétonitrile < éthanol < eau. Quelques valeurs, ainsi que des valeurs de polarité, sont données en table 3.3.

Solvant	Force éluante (sur Al_2O_3) ϵ^0	Indice de polarité P'
Cyclohexane	-0,2	0,04
Toluène	0,29	2,4
Diéthyléther	0,38	2,8
Tétrahydrofurane (THF)	0,57	4,0
Chloroforme	0,40	4,1
Ethanol	0,88	4,3
Acétate d'éthyl	0,58	4,4
Méthanol	0,95	5,1
Acétonitrile	0,65	5,8
Eau	élevée	10,2

TABLE 3.3 – Force éluante sur alumine et indice de polarité de quelques solvants utilisés classiquement en chromatographie en phase liquide. (Données tirées de SKOOG et al., 2018, mises en forme par M. Roux)

La force éluante peut aussi être modulée en faisant des mélanges. Pour cela, on prend deux solvants qui doivent être miscibles (voir figure 3.5 pour la miscibilité de solvants courants en chromatographie), et généralement de force éluante significativement différente. Quelques exemples de mélanges sont donnés en figure 3.7.

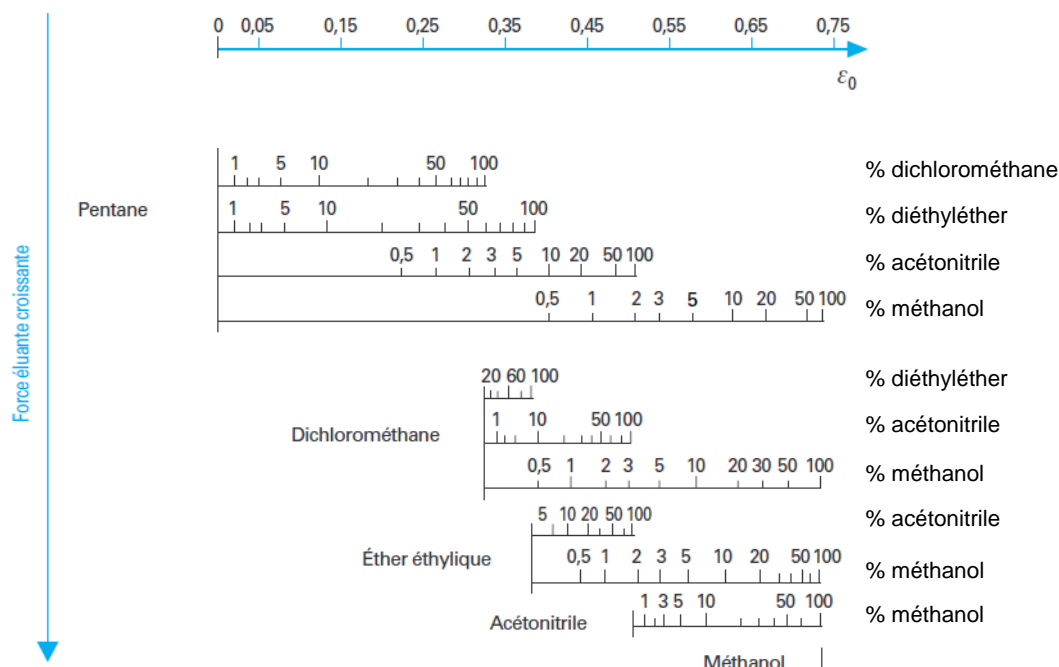


FIGURE 3.6 – Force éluante de plusieurs mélanges de solvant sur silice (Figure adaptée de Techniques de l'ingénieur - Chromatographie en phase liquide, Théorie et méthodes de séparation)

	iso-Octane	n-Hexane	n-Heptane	di-Ethyl ether	Cyclohexane	Ethyl acetate	Toluene	Chloroform	Tetrahydrofuran	Benzene	Acetone	Dichloromethane	Dioxane	n-Propanol	Ethanol	Dimethylformamide	Acetonitrile	Acetic acid	Dimethyl sulfoxide	Methanol	Water		
iso-Octane																							
n-Hexane	✓																						
n-Heptane	✓	✓																					
di-Ethyl ether	✓	✓	✓																				
Cyclohexane	✓	✓	✓	✓																			
Ethyl acetate	✓	✓	✓	✓	✓																		
Toluene	✓	✓	✓	✓	✓	✓																	
Chloroform	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓																
Tetrahydrofuran	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓															
Benzene	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓														
Acetone	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓													
Dichloromethane	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓												
Dioxane	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓											
n-Propanol	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓										
Ethanol	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓									
Dimethylformamide	X	X	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓								
Acetonitrile	X	X	X	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓							
Acetic acid	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓						
Dimethyl sulfoxide	X	X	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓					
Methanol	X	X	X	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓				
Water	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

FIGURE 3.5 – Tableau des miscibilités des solvants (Figure de “Les méthodes d’extraction - Chimie Analytique”, 2020)

Polarité et rétention (chromatographie de partage et d’asorption)

Les valeurs d’indice de polarité données dans le tableau 3.6, appelé **indice de polarité de Snyder P'**, donne une idée de la « force » du solvant, c’est-à-dire de la force des interactions soluté-solvant : plus un solvant est « fort » ou « bon », plus le soluté y est soluble. Plus le solvant est bon, plus il sera en compétition avec les interaction soluté-phase stationnaire, et donc moins le composé sera retenu.

L’indice de polarité de Snyder P' décompose la polarité d’un solvant en 3 contributions :

- La capacité du solvant à donner des protons, x_e . Le solvant pris comme archétype de ce type d’interactions est l’éthanol.
- La capacité du solvant à accepter des protons, x_d . Le solvant pris comme archétype de ce type d’interactions est le 1,4-dioxane.
- Le caractère polaire et polarisable du solvant, x_n , regroupant toutes les interactions de van der Waals. Le solvant pris comme archétype de ce type d’interactions est le nitrométhane.

Ainsi

$$P' = P'(x_e + x_n + x_d)$$

tel que

$$x_e + x_n + x_d = 1$$

Le triangle de Snyder en figure 3.8 donne la contribution des trois paramètres pour différents solvants, ce qui permet des définir 8 groupes de solvants de propriétés similaires.

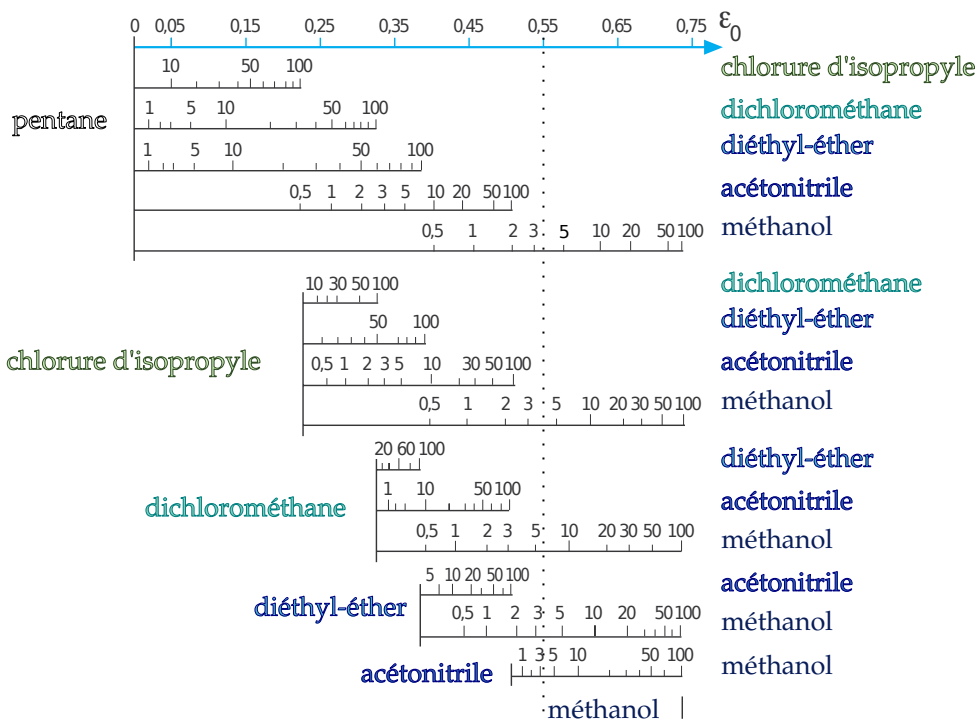


FIGURE 3.7 – Force d’élution sur silice pour des mélanges de solvant courants. Pour avoir une force éluante donnée, on peut choisir le mélange souhaité. Par exemple, pour une force éluante de 0,55; il est possible de choisir un mélange dichlorométhane/méthanol 95 :5 v :v (ou un mélange acétonitrile/méthanol 97 :3) (Figure : M. Vérot, adaptée de CAUDE et JARDY, 1994)

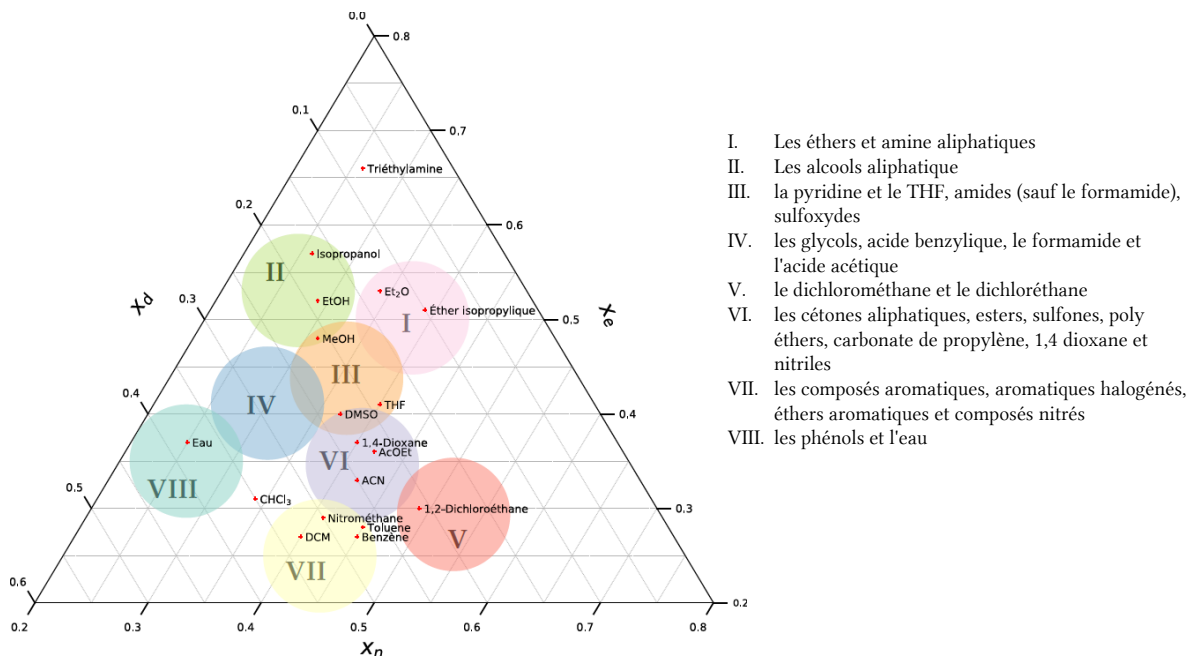


FIGURE 3.8 – Triangle de Snyder et familles d’éluateurs. Quelques solvants usuels y sont placés. (Figure : M. Roux)

Pour un mélange la polarité P'_{AB} est la moyenne pondérée par les fractions molaires de P'_A et P'_B . Ainsi, comme pour la force éluante, on peut choisir un mélange de solvants pour atteindre la valeur de P' souhaitée. Un exemple courant en HPLC en phase inverse est le mélange eau+(acétonitrile, méthanol et/ou THF), que où l'on teste d'abord eau+acétonitrile, eau+méthanol et eau+THF, puis en mélange pour affiner l'optimisation. Changer l'éluant d'un éluant 1 à un éluant 2 fait changer le facteur de rétention de la manière approximative suivante (en phase inverse, il faut inverser 1 et 2 en phase normale) :

$$k_2 = k_1 10^{(P'_2 - P'_1)/2}$$

Selon ce modèle, la rétention de tous les composés change du même facteur, donc la sélectivité est inchangée par changement de solvant, ce qui est en réalité faux. En général changer l'éluant fait changer le facteur de rétention de tous les composés sans changer leur ordre d'éluion ($\alpha - 1$ garde le même signe), mais parfois cela peut en inverser ($\alpha - 1$ change de signe). On parle alors d'échantillon **irrégulier**, plus compliqué à optimiser puisqu'il faut éviter les zones de croisement où les pics se superposent.

Exemple : séparation de 6 stéroïdes (SKOOG et al., 2018), adapté par M. Roux Prenons un mélange de 6 stéroïdes. On décide d'effectuer la séparation par HPLC sur phase inverse (C_8). Les résultats sont présentés sur la figure 3.9.

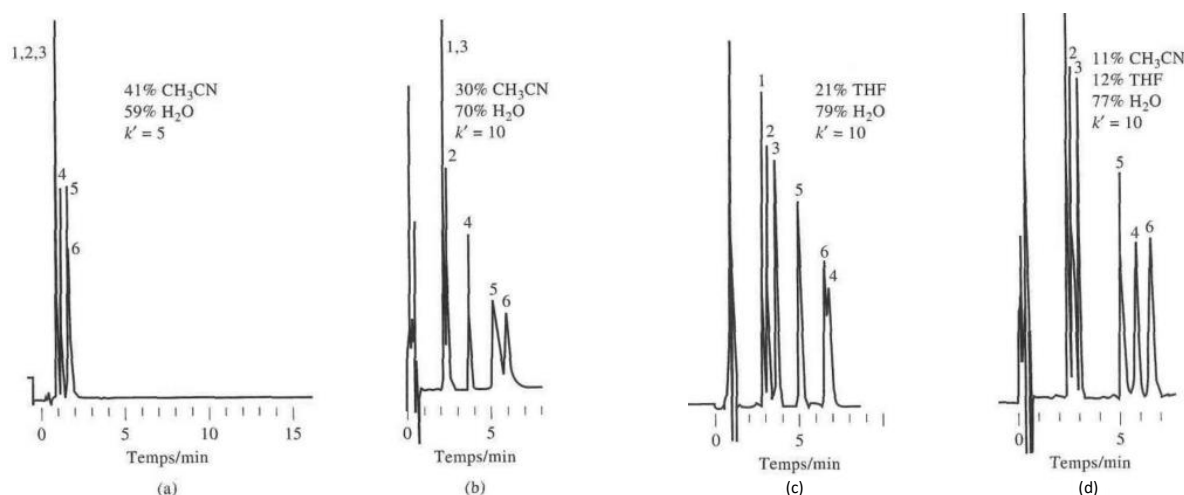


FIGURE 3.9 – Optimisation d'une séparation de 6 stéroïdes (prednisone, cortisone, hydrocortisone, dex-méthasone, corticostérone, corticoxolone) par HPLC sur colonne $0,4 \times 150$ mm remplie de particules $5 \mu\text{m}$ greffée de chaînes C_8 , température 50°C , débit $3,0 \text{ cm}^3/\text{min}$ (Figure : SKOOG et al., 2018)

On effectue une première séparation avec un mélange acétonitrile/eau 41/59 (Chromatogramme (a)). L'indice de polarité de l'éluant est ici $P'_1 = 0,41 \times 5,8 + 0,59 \times 10,2 = 8,4$. Ce mélange correspond à un facteur de rétention de 5. Cette méthode ne permet pas de séparer les composés 1, 2 et 3 et les pics 4, 5 et 6 sont très rapprochés.

On souhaite améliorer la séparation en doublant le facteur de rétention en gardant le même système de solvant. On peut montrer que cela correspond à un mélange acétonitrile/eau de 30/70. La séparation s'est nettement améliorée (Chromatogramme (b)).

Pour autant, les pics 1 et 3 sont toujours superposés. On souhaite les séparer en changeant d'éluant mais en maintenant le facteur de rétention à une valeur de 10, ce qui est équivalent à maintenir un indice de polarité de l'éluant constant (ici de 8,9). On joue ainsi sur la valeur de α pour affiner les interactions entre le soluté et l'éluant. On obtient ainsi les trois chromatogrammes (c), et (d) permettant de nettement améliorer la séparation (la meilleure étant le mélange des trois solvants (d)).

3.5 Influence de facteurs physiques

3.5.1 Température

La température a une grande influence surtout en CPV. Globalement :

- Plus la température augmente, plus l'analyse est rapide et les pics fins
- Quand la température diminue, la résolution augmente
- On choisit la température dans l'intervalle entre la température d'ébullition du composé le moins volatil et la température de dégradation de la colonne (environ 250 °C)

Il faut aussi prendre en compte les effets de la température sur la viscosité du gaz vecteur et donc sur le débit. Il existe deux types d'expériences concernant la température :

- Les expériences isothermes, durant lesquelles la température est constante pendant l'analyse, et généralement choisie juste au-dessus de la température d'ébullition du composé le moins volatil.
- Les gradients de température, où la température augmente au cours de l'analyse (continuellement ou avec des plateaux intermédiaires). Ils sont utilisés notamment quand les composés de l'échantillon ont des températures d'ébullition très différentes. Ainsi les composés de faible facteur de rétention sont séparés à faible température, puis la température est augmentée pour éluer ceux de rétention plus forte et diminuer le temps total d'analyse.

Un exemple d'utilisation de gradient de température est donné en figure 3.10. A 45 °C, les composés fortement retenus ne sont jamais élués ; à 145 °C, la résolution est très mauvaise pour les composés de faible rétention ; le gradient permet une rétention et une séparation optimales pour tous les composés.

3.5.2 Pression

La pression est principalement variée pour :

- Varier le débit et donc la vitesse moyenne u , pour essayer de trouver u_{opt} . Étant donné que u_{opt} est différent pour chaque composé d'un mélange, cette optimisation n'est pas triviale.
- Limiter le temps d'analyse en augmentant la pression et donc le débit
- S'assurer de l'intégrité du matériel, qui a une pression maximale supportée. En phase liquide particulièrement, la pression peut atteindre des valeurs extrêmes (éluants plus visqueux et colonnes garnies).

Des valeurs de pression pour différentes caractéristiques de colonnes garnies sont données en tableau 3.4.

d_p (μm)	Temps de rétention (min)	Nombre de plateaux	Pression (bar)
5,0	30	25000	19
3,0	18	42000	87
1,5	9	83000	700
1,0	6	125000	2300

TABLE 3.4 – Effet de la taille des particules et de la pression pour une colonne théorique de 33 μm de diamètre et 25 cm de long, pour un composé avec un facteur de rétention de 2, et un coefficient de diffusion de $6,7 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ dans un mélange eau acétonitrile. (Données : M. Vérot)

Comme pour la température, il est possible de travailler à pression constante (expérience **isobare**) ou avec des **gradients**.

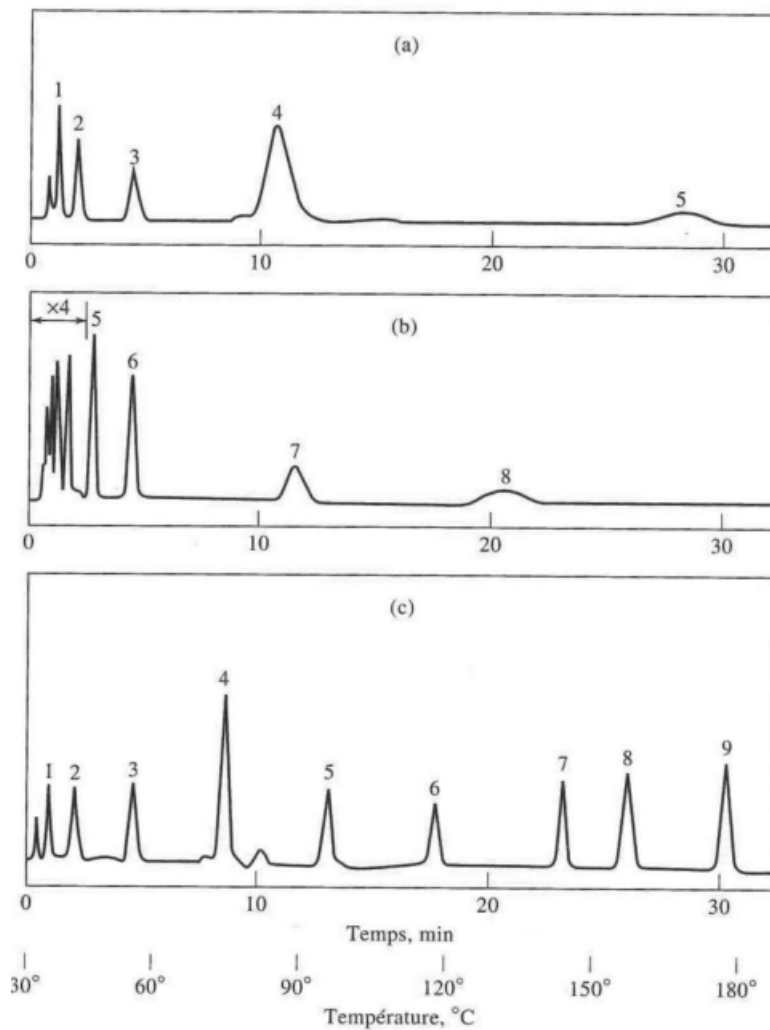


FIGURE 3.10 – Influence de la température sur un chromatogramme en phase vapeur (a) Mode isotherme à 45 °C (b) Mode isotherme à 145 °C (c) Gradient de température entre 30 et 180 °C (Figure : SKOOG *et al.*, 2018)

3.6 A retenir de ce chapitre

- ♡ Les différents termes de l'équation de Purnell à optimiser : avoir N le plus grand possible, $1,5 \leq \alpha \leq 3$ et $5 \leq k \leq 20$
- ♡ En CPV :
 - les avantages et inconvénients pour les différents gaz vecteurs
 - qu'il faut un diamètre de colonne le plus petit possible pour augmenter la résolution : utilisation surtout de colonnes capillaires fines mais longues
 - l'importance de la température et la possibilité de faire des gradients de pression et/ou température
- ♡ En CPL :
 - l'utilisation principalement de colonnes garnies relativement courtes et larges, et l'influence de la taille des particules sur la hauteur de plateau

- la notion de phase normale et phase inverse avec des exemples classiques
- les paramètres de choix d'un éluant : force éluotrope, triangle de Snyder
- la notion d'élution isocratique (éluant constant) ou non

Le tableau 3.5 donne un résumé de caractéristiques cruciales pour chaque type de chromatographie.

Chromatographie	Facteur d'influence				Température
	Phase stationnaire	Phase mobile	Dimension colonne	Débit	
CPV	colonne capillaire polaire ou apolaire	influence du gaz vecteur sur le débit optimal (et HEPT)	colonne longue et fine pour favoriser la résolution	Van Deemter dépend surtout de l'épaisseur et du gaz vecteur	température basse = meilleure résolution, température élevée = analyse rapide
CPL (HPLC)	colonne garnie en phase normale ou inverse	variation de la force éluante et indice de polarité pour jouer sur k' et α , éluant peu visqueux	colonne courte et large pour favoriser la capacité	Van Deemter dépend surtout de la taille des particules, débit limité par surpression	Peu d'influence
	Phase stationnaire				
Echange d'ions	Phase mobile				
	éluant contenant des ions compétitifs, modulation essentiellement par changement de pH				
Exclusion stérique	taille des pores				
	aucune influence, permet juste l'entraînement				

TABLE 3.5 – Résumé des caractéristiques générales et facteurs d'influence des différentes techniques de chromatographie. (M. Roux)

Chapitre 4

Méthodes analytiques

4.1 Identification en CPV : indice de rétention de Kovats

La chromatographie ne donne pas directement d'information sur la nature des composés analysés, en dehors d'une idée de la polarité (partage, adsorption), charge (échange ionique), taille (exclusion stérique) ou chiralité (chromatographie chirale) relative des composés. Certains détecteurs donnent d'autres informations (absorption UV-visible, fluorescence, masse etc). Les facteurs de rétention sont tout de même des paramètres reproductibles dans des conditions identiques.

L'indice de rétention de Kovats permet de comparer les facteurs de rétention des composés à ceux de composés connus (alcanes). On cherche à déterminer la longueur (n , nombre entier) de l'alcane linéaire qui aurait le même temps de rétention que le composé analysé. Cela ne marche tel quel que dans des conditions isobares et isothermes. Pour un alcane linéaire de longueur $n \geq 5$:

$$\log(t'_{R,n}) = a \times n + b$$

où $t'_{R,n}$ est le temps de rétention réduit de l'alcane, et a et b sont des constantes déterminées dans les mêmes conditions expérimentales par regression linéaire avec plusieurs longueurs d'alcanes. Pour un composé quelconque de temps de rétention réduit t'_R on peut alors déterminer n' (pas forcément entier) tel que $t'_R = a \times n' + b$ et en déduire l'indice de rétention de Kovats

$$I = 100n'$$

. Cette technique permet aussi de déterminer l'alcane de n le plus proche de n' , afin de pouvoir l'utiliser comme étalon interne dans une expérience de quantification.

4.2 Méthodes quantitatives

Sur le principe, la chromatographie est une méthode quantitative, dans le sens où l'aire d'un pic est proportionnelle à la quantité du composé correspondant (si le pic est résolu et les conditions expérimentales fixées) :

$$n_i = K_i A_i$$

où n_i est la quantité de matière du composé i , A_i l'aire sous son pic et K_i la constante de proportionnalité entre ces deux grandeurs. Cependant, et malgré le développement d'injecteurs automatiques assez précis, l'injection reste encore trop variable pour que la quantité injectée reste vraiment fiable. Il est donc imprécis d'utiliser les méthodes dites d'étalon externe, c'est-à-dire une droite d'étalonnage. On utilise

donc en général les méthodes de l'étalon interne ou des ajouts dosés, présentées ci-dessous. Attention ! Pour une méthode de quantification, bien garder les mêmes paramètres d'acquisition (donnant une bonne résolution) entre les différentes mesures !

4.2.1 Étalon interne

Il faut disposer d'échantillons purs des composés à quantifier, et d'un échantillon autre servant d'étalon interne.

Étape 0 : choisir l'étalon interne

L'étalon interne doit :

- Avoir un pic ne se superposant pas aux composés de l'échantillon, mais être tout-de-même relativement proche
- avoir une réponse (aire) proche de celles des composés à quantifier
- ne pas réagir ou interagir avec les composés de l'échantillon
- être de grande pureté
- ne pas être présent initialement dans l'échantillon
- être soluble dans l'échantillon

Étape 1 : chromatogramme de référence

On réalise un chromatogramme de référence d'un mélange parfaitement connu contenant les composés à quantifier et l'étalon interne, en concentrations connues. En connaissant les concentrations injectées et en mesurant l'aire des pics correspondants, on déduit la constante de réponse relative K'_i de chaque composé i :

$$K'_i = \frac{K_i}{K_E}$$

Cette étape est cruciale, et il est nécessaire que le mélange soit préparé juste avant l'injection, pour éviter des phénomènes d'évaporation des composés les plus volatils et donc de biaiser les concentrations relatives et K'_i .

Étape 2 : chromatogramme de l'échantillon + étalon interne

On injecte notre échantillon auquel on a ajouté une concentration connue d'étalon interne. On peut déduire la quantité de chaque composé i n_i grâce à la relation :

$$\frac{A_i}{A_E} = K'_i \frac{n_i}{n_E}$$

4.2.2 Ajouts dosés

Si l'échantillon contient des espèces autres que les composés à quantifier et qui viennent perturber leur signal en influant sur la réponse du détecteur, la méthode de l'étalon interne ne fonctionnera pas. On appelle cela un effet de matrice.¹ Cet effet peut être corrigé par la méthode des ajouts dosés.

1. Attention on ne parle pas ici d'effets additifs de la matrice (existence d'une ligne de base), qui ne peuvent être corrigés par aucune des deux méthodes présentées.

Le principe est l'ajout successif de quantités connues du (des) composé(s) à doser purs à l'échantillon analysé, de préférence avec une dilution négligeable. Pour chaque ajout (et pour l'échantillon sans ajout) on mesure l'aire sous le pic d'intérêt. Cette méthode suppose :

- d'avoir identifié le composé à analyser ;
- d'avoir accès au composé à analyser pur ;
- d'avoir un pic résolu (c'est crucial, cela doit donc être testé en changeant les conditions opératoires) ;
- de n'avoir aucun autre produit au même rétention que le produit à analyser ;
- de connaître la loi de réponse du détecteur (linéaire pour un détecteur à ionisation de flamme) ;
- que la loi de réponse soit valable sur l'ensemble de la gamme d'étude (pas de saturation notamment).

On part de la solution à analyser, qui contient n_i^0 moles du composé i . On y ajoute successivement j volumes contenant chacun n_i' moles du composé i pur. Pour une réponse de détecteur linéaire, l'aire sous le pic au bout de j ajouts s'exprime :

$$A_i^j = K(n_i^0 + j \times n_i')$$

On trace les valeurs de A_i^j en fonction de la quantité ajoutée $j \times n_i'$ (Figure 4.1). Une façon de remonter à n_i^0 est de déterminer K , par la pente de cette courbe et de calculer $n_i^0 = A_i^0 / K$. Par extrapolation de la courbe, il est également possible de lire directement la valeur de la quantité inconnue n_i^0 (en $y = 0$, $x = -n_i^0$).

En pratique, les variations ne doivent être ni trop petites (largement au dessus du rapport signal sur bruit), ni trop grandes (pour rester dans le domaine de linéarité). Usuellement, une variation du signal de l'ordre de 5 à 10% permet de vérifier ces deux conditions.

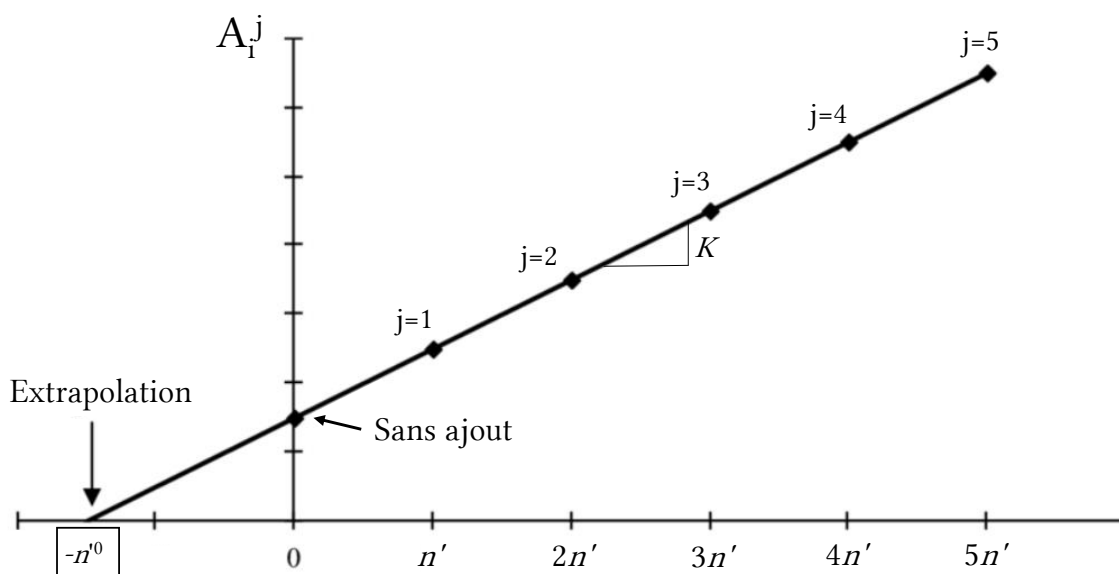


FIGURE 4.1 – Principe de la méthode des ajouts dosés. (Figure : M. Roux)

4.3 A retenir de ce chapitre

- ♡ La méthode de l'étalon interne (principe et mise en oeuvre)
- ♡ La méthode des ajouts dosés (principe et mise en oeuvre)

Chapitre 5

Pour aller plus loin : références utiles

- ROUESSAC et al., 2019 pour une présentation générale assez complète, en français
- SKOOG et al., 2018 ; HARRIS et LUCY, 2020 pour une être encore plus complet, en anglais.
- CAZES et SCOTT, 2002 pour plus de théorie
- MCNAIR et al., 2019 pour la CPV
- CAUDE et JARDY, 1994 ; FANALI et al., 2018 pour l'HPLC

Bibliographie

- CAUDE, M., & JARDY, A. (1994). Chromatographie en phase liquide - Théorie et méthodes de séparation. *Techniques d'analyse*. <https://doi.org/10.51257/a-v2-p1455>
- CAZES, J., & SCOTT, R. P. W. (2002). *Chromatography theory* [OCLC: 924410274]. Marcel Dekker.
- FANALI, S., HADDAD, P. R., POOLE, C. F., & RIEKKOLA, M.-L. (2018). *Liquid chromatography* (Second edition) [OCLC: 1078445005]. Elsevier.
- SKOOG, D. A., HOLLER, F. J., & CROUCH, S. R. (2018). *Principles of instrumental analysis* (Seventh edition) [OCLC: 974275271]. Cengage Learning.
- McNAIR, H. M., MILLER, J. M., & SNOW, N. H. (2019, août 26). *Basic gas chromatography* (1^{re} éd.). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119450795>
- ROUESSAC, F., ROUESSAC, A., CRUCHÉ, D., & MARTEL, A. (2019). *Analyse chimique: méthodes et techniques instrumentales* (9e édition) [OCLC: 1108657484]. Dunod.
- HARRIS, D. C., & LUCY, C. A. (2020). *Quantitative chemical analysis* (Tenth edition) [OCLC: 1202775736]. Macmillan International Higher Education.
- Les méthodes d'extraction - Chimie Analytique*. (2020, septembre 10). Récupérée novembre 12, 2023, à partir de <https://chimieanalytique.com/les-methodes-extraction/>