

Chromatographie

les méthodes chromatographiques permettent la séparation de différents composés. ce qui unifie l'ensemble de ces méthodes est d'avoir deux phases distinctes :

- la phase stationnaire immobile
- la phase mobile qui bouge dans une direction fixe

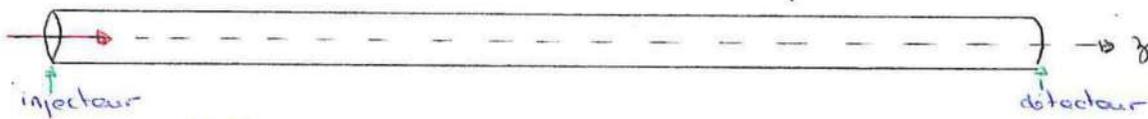


Différentes méthodes de séparation ← mécanismes physiques

adsorption	partage	échange ionique	exclusion stérique	chirale
adsorption des composés sur une phase solide ⇒ <u>séparation</u>	phase stationnaire = liquide et où la séparation est liée à la <u>solubilité</u> de la phase stationnaire.	séparation repose sur une <u>différence d'affinité</u> avec la phase capable d'échange des ions. ⚡ que pour molécules chargées	séparation repose sur des <u>effets de taille</u> ou de <u>forme</u> . 	séparation repose sur une <u>différence d'affinité</u> avec la phase stationnaire <u>chirale</u> . ex: cyclodextrine

Deux objectifs différents :

- chromatographie analytique : séparer et analyser ⇒ CCM, CPV, HPLC ^{pompe}
opti : séparation maximale
- chromatographie séparative : séparer et récolter ⇒ colonne de silice
opti : maximum de récolte

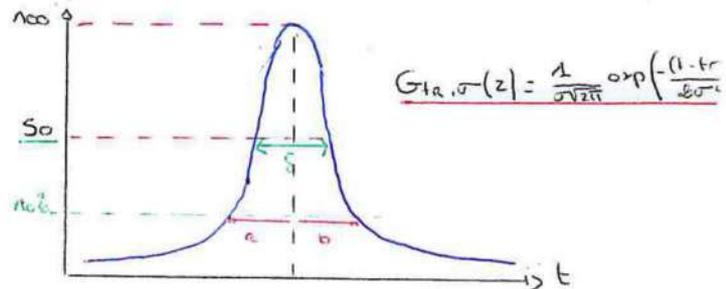
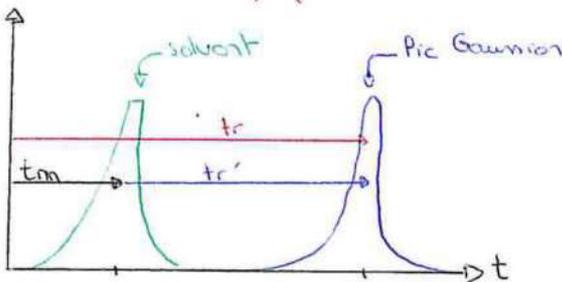


Deux visions parallèles :

- distribution spatiale : $f(z)$ ← difficilement accessible
- chromatogramme : $g(t)$

Le principe de base de la chromatographie étant la différence d'affinité des composés pour la phase stationnaire et la phase mobile, il est utile de différencier

- effets liés au simple mouvement d'ensemble pour aller de début à la fin de la colonne.
- interactions spécifiques des composés avec la phase stationnaire.



temps de rétention t_r ; temps correspondant au maximum des chromatogramme par rapport à une origine temporelle. Soient mal défini car lié au déclenchement manuel donc à l'opérateur.

facteur de rétention :

$$R = \frac{t_r}{t_m}$$

temps mort t_m ; correspond au temps nécessaire pour un composé non-rétenu d'arriver à la fin d'une colonne. Soient associé aux temps de rétention des solvant.

facteur d'asymétrie

$$F_a = b/a$$

temps de rétention réduit ou correcté t_r' ; $t_r' = t_r - t_m$. Ce temps est indépendant des déclenchement.

cause fréquente : solvant de la colonne.

vand il y a plusieurs pics, le best est de quantifier leur séparation. Deux facteurs :

- écartement via facteur de séparation

$$\alpha = \frac{t_{R,B}}{t_{R,A}} = \frac{k_B}{k_A} \quad (> 1 = \text{good})$$

⚠ Ne prend pas en compte le chevauchement.

- largeur des pics.

Résolution : prend en compte les deux facteurs

$$R = 1,18 \frac{t_{R,B} - t_{R,A}}{s_A + s_B}$$

⇒ On dit que deux pics sont résolus si R > 1,5

Equation de Bernoll :
$$R = \frac{1}{4} \sqrt{N b} \frac{\alpha - 1}{\alpha} \times \frac{k_B}{1 + k_B} = \frac{\sqrt{N}}{2} \times \frac{k_B - k_A}{k_A + k_B + 2}$$

Avec N et Nb les nombre de plateaux.

Modèle "statique" : le modèle de Craig

→ approche de la chromatographie. On décrit le plus simplement possible les phénomènes physiques expliquant la chromatographie : mouvement d'ensemble de la phase mobile + la différence d'affinité entre phase mobile et phase stationnaire.

Hypothèses

- la colonne chromatographique est assemblée arbitrairement en N subdivisions chacune appelée plateau.
- Pour chacun des plateaux, il y a un équilibre des molécules entre les deux phases. Il est possible d'écire ses équilibres de partage.

$K_A = \frac{[A]_{\text{mob}}}{[A]_{\text{stat}}}$ $a+b=1 \quad K = \frac{b}{a}$

avant

a									
---	--	--	--	--	--	--	--	--	--

immobile

déplacement

a	b								
---	---	--	--	--	--	--	--	--	--

équilibre

b	a								
---	---	--	--	--	--	--	--	--	--

équilibre

a	b	a	b						
---	---	---	---	--	--	--	--	--	--

Conditions et limites :

- + le temps de rétention est d'autant plus grand que K est petit
- + pour un grand nombre de plateaux et un temps long, les distributions binomiales donnent une courbe gaussienne.
- + α est égal au rapport des constantes d'équilibre pour chacun des composés. Lien entre grandeurs thermodynamique et temps de rétention corrigée.
- + plus le nombre de plateaux est grand, meilleure est la séparation.
- La diffusion est totalement négligée
- La résolution calculée est optimiste par rapport à une vraie colonne.
 - donne les équilibres.
- Relie implicitement débit et nombre de plateaux alors que ce n'est pas forcément le cas.
- Ne décrit pas les pics asymétriques.
- décrit les chromatographies de partage.

Notion de plateaux et hauteur de plateaux

⚠ Il n'est pas possible d'anticiper le nombre de plateaux dans une colonne. On cherche à avoir une estimation. L'idée est de ramener le chromatogramme réel à celui qu'aurait donné une colonne suivant le modèle de Craig avec un nombre de plateaux permettant de reproduire le chromatogramme réel. Lien abusif.

cela permet d'introduire différents concepts qui sont tous liés les uns aux autres :

- Le nombre de plateaux qui est une **indicateur de la performance de la colonne**. Le nombre calculé est une grandeur phénoménologique sans signification concrète sur des pics asymétriques :

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

pour des pics asymétriques :

$$N = 41,7 \frac{\left(\frac{t_R}{\omega_{0.5}}\right)}{\frac{\sigma}{D} + 1,25}$$

- La hauteur équivalente à un plateau théorique H ou HEPT

$$H = \text{HEPT} = \frac{L}{N}$$

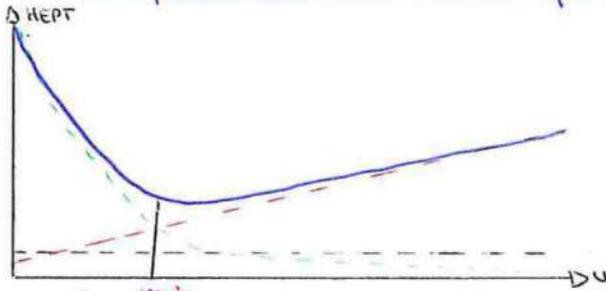
avec L la longueur de colonne
plus c'est petit mieux c'est.

Equations donnant la hauteur de plateaux en fonction de la vitesse moyenne

Equation de Van Deemter

$$\text{HEPT} = A + \frac{B}{u} + Cu$$

u vitesse linéique moyenne de l'éluant.

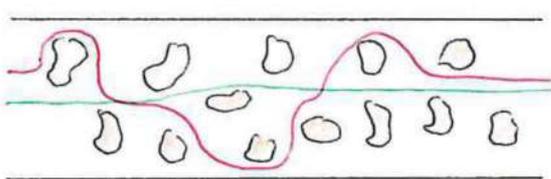


$$u_{\text{opt}} = \sqrt{\frac{B}{C}}$$

$$\text{HEPT}_{\text{min}} = A + 2\sqrt{BC}$$

⚠ Si on va pas assez vite on a la divergence et trop rapidement on a la diffusion.

Constante A: Diffusion turbulente (eddy diffusion)



→ pour une colonne garnie uniquement

$$A = 2\lambda dp$$

dp diamètre moyen des particules dans la colonne.
λ traduit la rugosité de remplissage 0,5 - 1

Constante B: Diffusion longitudinale ou maculaire

⚠ Existe toujours en lien à la diffusion naturelle au sein de la colonne. L'inhomogénéité entraîne forcément de la diffusion.

$$B = 2\gamma D_m$$

Dm coefficient de diffusion des composés
γ facteur d'obstruction 0,5 - 0,8

⚠ Plus important en phase gaz qu'en phase liquide. Proportionnel à u faible.

→ Lorsque u faible :
• temps d'analyse longs.
• pics de plus en plus étalés.

Constante C: coefficient de transfert de masse

le coefficient traduit le fait que la colonne ne soit pas à l'équilibre thermodynamique et qu'il y a donc des problèmes de cinétique d'échange et lié au fait d'avoir un système dynamique d'échange entre phase mobile et phase stationnaire

$$C = C_m + C_s$$

Cs diffusion au sein de la phase stationnaire

de position quel u

Cm répartition des vitesses longitudinales non uniforme au sein de la colonne dans la phase mobile.

facteur de séparation

$$C_m = \frac{C_1 \omega dp^2}{(1+k) D_m}$$

lié au volume total de la phase mobile dans la colonne

$$C_s = C_2 k \frac{df}{(1+k) D_s}$$

épaisseur de la phase stationnaire

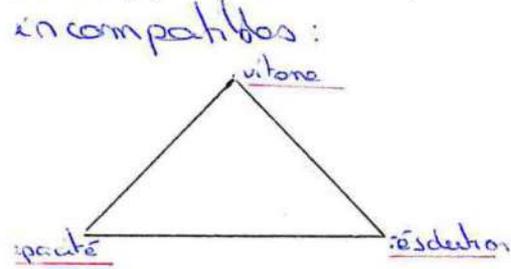
Equation de Edley pour les colonnes capillaires

cas ce cas, la colonne est vide $\rightarrow A=0$. L'equation correspondante est l'equation de Edley $r=1$ donc B et W, C1, C2 peuvent être calculés.

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

Optimisation d'une séparation

Pour optimiser la séparation, il est généralement possible de jouer sur un grand nombre de facteurs. Certains sont plus faciles que d'autres (débit, pression, température). Le but est de combiner les trois contraintes incompatibles :



relation de Purcell : $R = \frac{2}{4} \sqrt{N_b} \left(\frac{\alpha-1}{\alpha} \right) \left(\frac{k_D}{1+k_D} \right)$

- amélioration de α : $\alpha = \frac{t_{R,B}}{t_{R,A}} = \frac{k_B}{k_A}$

facteur lié à la séparation : il faut augmenter la différence d'affinité : $1 \leq \alpha \leq 3$

- amélioration de k_D :

$k_D = \frac{t_{R,S}}{t_H}$

forme liée au facteur de rétention. $5 \leq k_D \leq 20$ optimisation de R temps d'analyse

- amélioration de N_b :

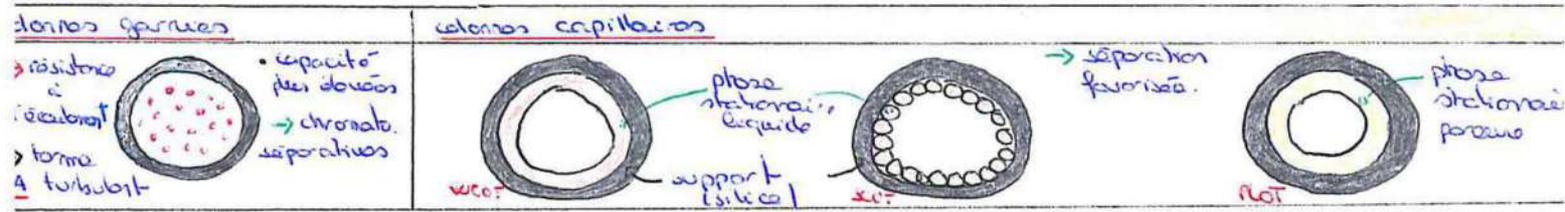
\rightarrow de diminution de l'HETP pour maximiser N_b se fait via un grand nombre de paramètres

- dimensions de la colonne
- gaz vecteur en CPV
- la taille des particules
- débit

épaisseur de colonne : $R \propto \sqrt{N_b} \propto \sqrt{L}$

\rightarrow ordre de la grandeur de colonne CPV : 10-100 m
 Δ Problème de viscosité

Structure de la colonne :



Choix des gaz vecteur : trois gaz courants N_2, He, H_2

\Rightarrow on a différentes équations de Van Deemter.

Diamètre de la colonne : pour une colonne capillaire, la forme C_s est négligeable. Il faut avoir le rayon le plus petit possible. Cependant, il faut augmenter la pression.

Épaisseur des films : les épaisseurs sont de l'ordre de 0,25 μm , avec des films plus épais permet d'augmenter la capacité au détriment de la résolution.

\rightarrow injecteur split : réduit la taille de l'échantillon et évite la saturation.

Choix de la température

équation phénoménologique: $H = A' + \frac{B'}{T} + CT$

- changer la température change les temps d'analyse. Peut réduire l'établissement des pics.
- Affecte la valeur de K , pseudo-constante d'équilibre
- de température affecte le débit des gaz.
- ⚠ limitée par les caractéristiques de la colonne.
- peut être programmée.

Choix de la pression / du débit

On cherche à travailler à u_{opt} pour chacun des composés. C'est la pression qui est contrôlée pour adopter le débit et donc la valeur de u .

Optimisation en phase liquide

Influence de la taille des particules et du garnissage

La taille des particules joue un rôle important sur les termes A et C_m de l'équation de Van Deemter:

$$A = 2\lambda dp$$

$$C_m = \frac{C_1 \omega d_p^2}{D_m}$$

plus les particules sont petites plus l'équilibre est régulier et A faible.

pour composer les colonnes: hauteur de plateau réduite

$$h = \frac{HEPT}{dp}$$

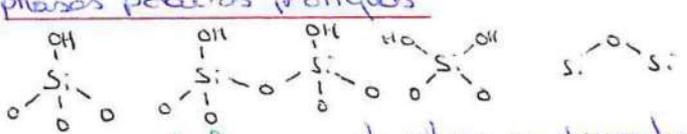
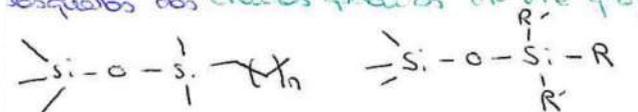
Choix de la pression:

Les colonnes garnies entraînent une résistance à l'écoulement très importante. La loi permettant de relier vitesse d'écoulement et pression:

$$P = f \frac{u \eta L}{\pi r^4 dp^3}$$
 Loi de Darcy

On a une perte de charge au sein de la colonne qui correspond à un chauffement qui peut être significatif entre le centre et les bords de la colonne.

Choix de la phase stationnaire

<u>Phase normale</u>	<u>Phase inverse</u>
<p><u>phases polaires protiques</u></p>  <p>avait pour l'équilibre de silice se dissout en milieu acide et basique. Pour l'alkaline on peut plus fonctionner. → sensible à l'eau</p> <ul style="list-style-type: none"> - temps de rétention affecté par le temps en eau. - il peut y avoir une adsorption préférentielle si l'élément correspond à un mélange. 	<p>→ toujours à base de silice ou alumine mais sur lesquelles des chaînes organiques ont été greffées.</p>  <p>→ alors le nombre de longueurs variable qui est greffé → 18 ≈</p> <p>⚠ On inverse la série électrostatique. des solvants apolaires auront une force électrostatique plus élevée.</p>

Choix de l'éluant :

Le choix de l'éluant se fait vis à vis des composés à analyser. Il y a une compétition entre adsorption des solutés et du solvant sur la phase stationnaire. Il y a une compétition :

$$A_{i,(m)} = A_{i,(s)}$$

↑
composé à analyser

$$S_{(m)} = S_{(s)}$$

↑
solvant

Force élastique d'un solvant ϵ_0 , optimisation vis à vis de la phase stationnaire

On essaye d'avoir un solvant qui a une aff. aff. par la phase stationnaire proche de celle des composés analysés pour avoir une séparation maximale. On peut classer les solvants on ne considère que l'équilibre d'adsorption :

$$\epsilon_0 = \frac{|\Delta_{ads} G(s)|}{k_B(n_0)RT A_{m0}}$$

— enthalpie libre d'adsorption du solvant
— surface occupée par l'éluant.

On peut définir ainsi une série stérique :

hexane / pentane < cyclohexane < dichlorométhane < diéthyl éther < acétate d'éthyle < éthanol < méthanol < eau.

Polarité de Snyder et décomposition, optimisation avec les solutés

On décompose la contribution à la polarité de différents types d'interactions :

- interactions π, δ, D
- acidité / basicité
- interactions électrostatiques

On classe en fonction de trois composés archétypaux :

→ éthanol (donneur de protons)
→ 1,4-dioxane (accepteur de protons)
→ nitrométhane (polarité polarisable)

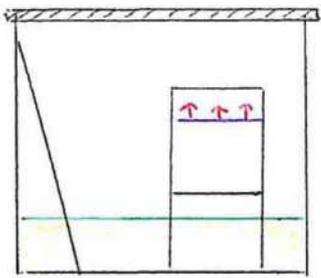
} Triangle de Snyder

Vocabulaire :

si la composition de l'éluant est gardée constante tout au long de l'élution, on parle d'élution isocratique.
→ peut changer.

Méthodes de chromatographie

CCM :



- plaque de silice (ou alumine)

$$R_{F,i} = \frac{d_i}{L}$$

facteur de rétention :

$$k = \frac{1 - R_{F,i}}{R_{F,i}}$$

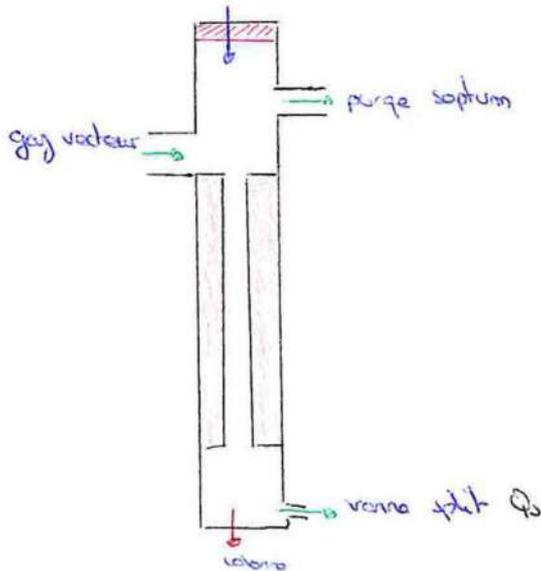
Méthodes de révélation :

- révélation UV à 254 nm : révélation due à la présence d'une molécule fluorescente sur la silice : silicates de zinc. Les composés adsorbés absorbent dans l'UV empêchant la fluorescence.
- révélation avec des indicateurs chimiques : souvent permanganate et acide phosphomolybdique. on a des oxydations.

CPV :

Les colonnes en CPV sont capillaires avec un petit diamètre. Ainsi, même en injectant quelques μL il est possible de saturer la colonne.

→ injecteur split



split ratio : $SR = \frac{Q_s}{Q_c}$

Pour des solutions diluées on peut faire des injections splitless. $Q_s = 0$

Pour faire de l'analyse quantitative : le mieux reste l'injection directe en tête de colonne.

Détecteurs :

- les détecteurs à ionisation de flamme
 - destructif
 - grande sensibilité
- cathodromètres / mesure de conductivité thermique
 - non-destructif
 - moins sensibles et ne marchent qu'avec He , He .
- spectromètre de masse.

HPLC :

il y a de nombreuses méthodes de détecteur : UV-vis, fluo, IR, spectrométrie de masse, conductimétrie, indice de réfraction, électrochimie.

Chromatographie d'échange ionique → séparation des acides aminés et acides nucléiques, utilisés pour la bombe H.

Chromatographie d'adsorption stérique → protéines.

Méthode analytique

de chromatographie permet de faire de l'analyse quantitative. Il y a des spécificités mais la quantité de composé est proportionnelle à l'aire du pic :

$$N_{B_i} = K_{B_i} \cdot A_i$$

aire des pic : connue

⚠ injections split non reproductibles

Méthode de l'étalon interne :

Pour cette méthode, il faut avoir à disposition un composé étalon E :

- soit en dehors de la zone de sortie des composés d'intérêt
- avec une réponse proche de celle des composés à analyser
- ne réagisse ni n'interagisse avec les composés
- de pureté élevée
- initialement absent de la solution à analyser
- totalement soluble dans l'échantillon.

1. Effectuer un chromatogramme de référence avec un mélange parfaitement connu pour avoir accès aux constantes K_{B_i} et K_E ;

2. Effectuer un deuxième chromatogramme sur l'échantillon auquel on a ajouté l'étalon interne de manière à avoir une C connue.

exploitation du chromatogramme

$$K_{B_i} \propto \frac{[B_i]}{A_i} \quad K_E \propto \frac{[E]}{A_E}$$

$$K_i' = \frac{K_{B_i}}{K_E} \leftarrow \text{1er chromatogramme}$$

$$\frac{A_i}{A_E} = \frac{K_{B_i}}{K_E} \frac{N_{B_i}}{N_E} = K_i' \frac{N_{B_i}}{N_E}$$

$$N_{B_i} = N_E \frac{A_i}{A_E} \times \frac{1}{K_i'}$$

Méthode des ajouts dosés :

Pour cette méthode, il est nécessaire d'avoir accès à un échantillon pur du composé. Elle est plus précise avec des détecteurs ayant une réponse linéaire → particulièrement indiqué lorsqu'il y a un effet de matrice.

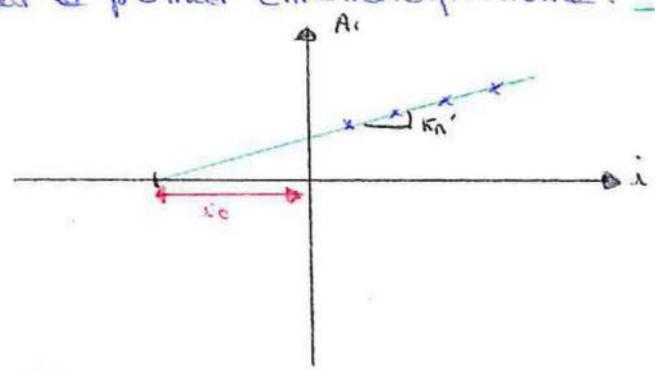
- avoir identifié le composé à analyser
- avoir accès au composé pur
- avoir un pic résolu
- connaître la loi de réponse du détecteur et que celle-ci soit valable sur la gamme

1. un chromatogramme sur l'échantillon brut
2. des chromatogrammes sur l'échantillon brut auquel on ajoute à fois une quantité précise et connue du composé d'intérêt.
3. le tracé de la réponse en fonction du nombre d'ajouts.
4. Extrapolation des données pour connaître la quantité totale initiale.

⚠ on suppose la réponse linéaire (ce qui n'est pas le cas pour un détecteur à ionisation de flamme):

$A_i = K_i n_i$

sur le premier chromatogramme: $A^0 = K n^0$



$A^i = K(n^0 + i \times n')$ quantité ajoutée après chaque ajout. Conna

$$i^0 = \frac{A^0}{K n'} \Rightarrow A^0 = K \underbrace{i^0 \times n'}_{n^0}$$

→ On cherche à avoir des variations ni trop petites ni trop grandes. ≈ 5-10%.

⚠ une espèce avec le même temps de rétention passe complètement l'indépende.