

UE Analyses Spectroscopiques et Chromatographiques

Chromatographie

Federico Cisnetti,
federico.cisnetti@uca.fr

Objectifs du cours (3 séances) et des TD (3 séances)

- 1) Connaître les principes physico-chimiques fondant la chromatographie*
- 2) Connaître les principales variantes des analyses chromatographiques et la portée et les limitations de ces méthodes*
- 3) Comprendre, analyser et décrire les données chromatographiques*
- 4) Savoir proposer une technique chromatographique adaptée à répondre à un problème donné en analyse chimique*

Bibliographie et sitographie :

Skoog, West, Holler, Crouch, *Chimie Analytique*, 9^{ème} édition, de Boeck, 2014

Site web de Thierry Brière : <http://www.chimie-briere.com/>

Rouessac et. al., *Analyse Chimique*, 8^{ème} édition, de Boeck. 2016

I. Séparations chromatographiques : aspects généraux

I. 1 Définitions

La **chromatographie** est un ensemble de méthodes de séparation des constituants d'un mélange.

Ses applications :

Identification : prouver la présence ou l'absence d'un analyte en solution

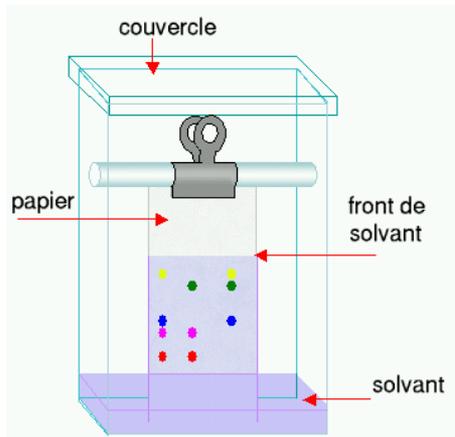
Dosage (quantification) : déterminer la concentration de l'analyte en présence d'autres espèces

Purification : isoler une espèce à partir d'un mélange, soit du point de vue préparatif (cf. TP tech. expé.), soit en amont d'une autre technique d'analyse.

Définition rigoureuse de la chromatographie ? Difficile à formuler (raisons historiques). Toutes les techniques chromatographiques ont en commun l'utilisation simultanée d'une **phase stationnaire** (solide, liquide) et d'une **phase mobile** (liquide, gaz).

Les constituants d'un mélange sont entraînés à des **vitesse**s différentes à travers un dispositif, ce qui cause la séparation

1.2 Chromatographie non instrumentale



Chromatographie sur couche mince (CCM) :

Phase stationnaire : papier, silice (SiO_2) sur support, alumine (Al_2O_3) sur support

Phase mobile : solvant ou mélange de solvants

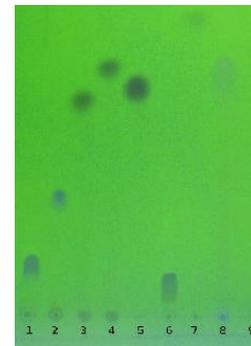
Aspect cinétique : l'éluant monte sur le support par capillarité, il faut un certain temps (minutes) pour réaliser la séparation. cf. TP tech. expé... : $R_f = d_{\text{analyte}} / d_{\text{éluant}}$

Détection : visuelle (espèces colorées), irradiation UV (espèces incolores, mais absorbant à $\lambda = 256 \text{ nm}$), réaction chimique (destructif).

Avant



Après



(irradiation UV)

Informations obtenues :
-identification d'espèces
par comparaison avec
des échantillons purs
-indication sur la pureté
d'un échantillon : un ou
plusieurs constituants

La chromatographie planaire peut également être abordée d'une façon plus avancée, y compris automatisée.

Chromatographie sur colonne

Phase stationnaire : silice (SiO_2), alumine (Al_2O_3) cellulose.

Phase mobile : solvant ou mélange de solvants.

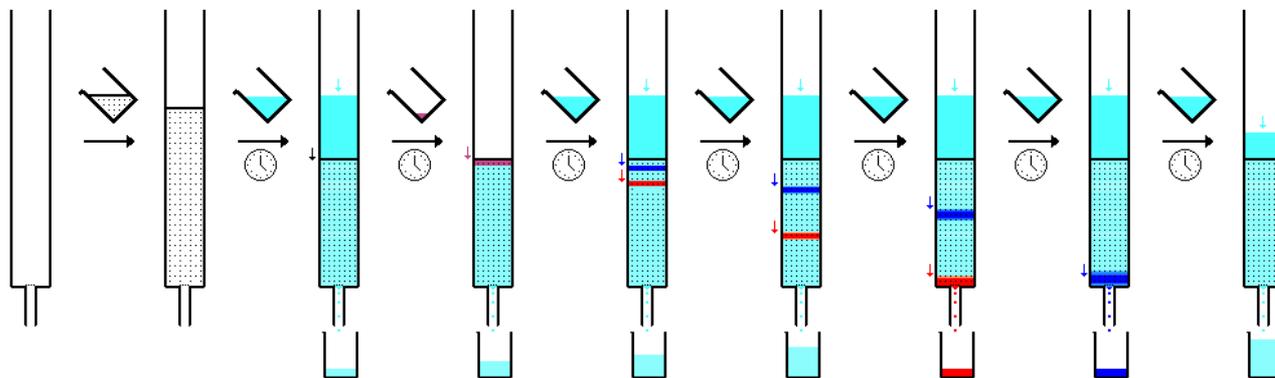
Aspect cinétique : le solvant parcourt la colonne par gravité ou à l'aide d'une pompe, il faut un certain *temps* (dizaines de minutes-heures) pour réaliser la séparation.

Détection : visuelle (espèces colorées) et/ou suivi CCM de la séparation (TP tech. expé...)

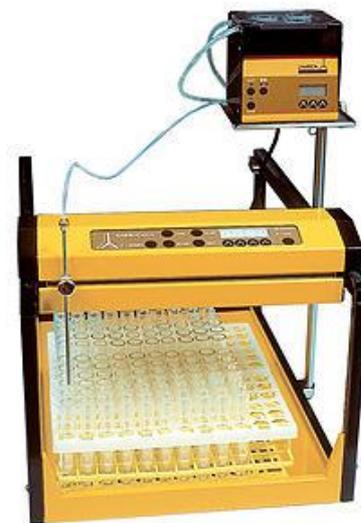


Tswett 1903, séparation de pigments de plantes sur CaCO_3

Déroulement de l'expérience

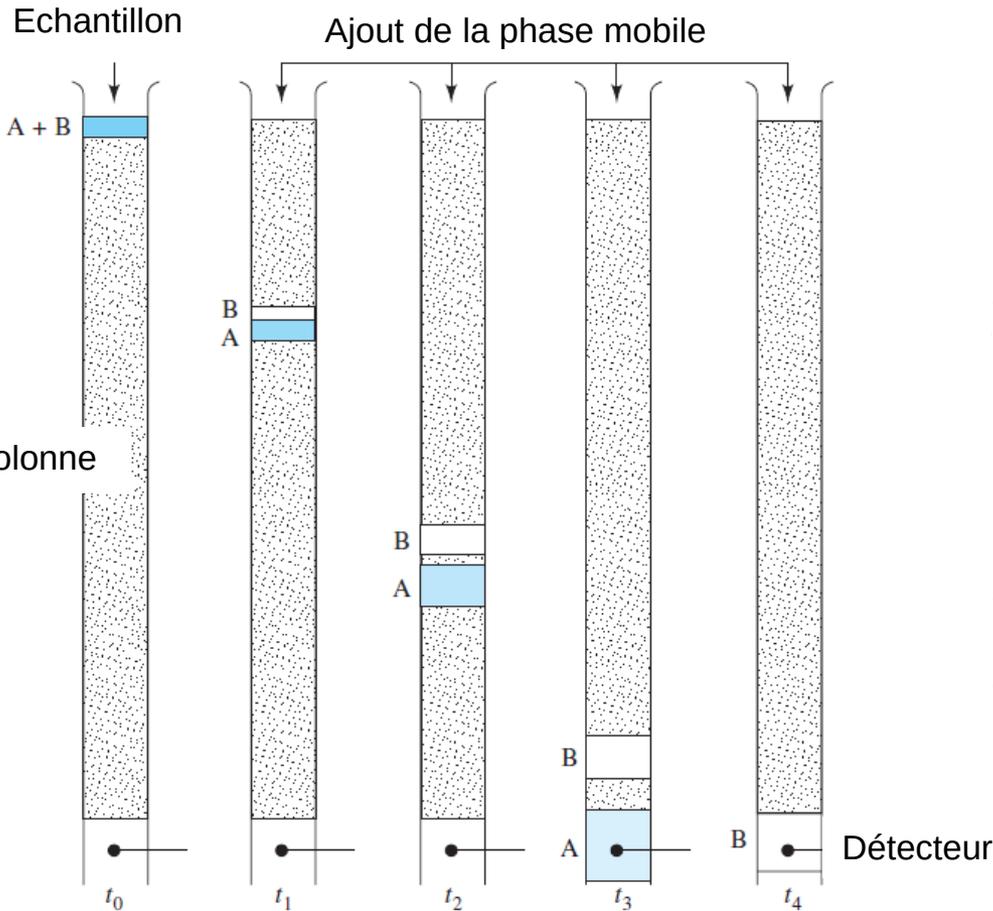


Automatisation possible : pompe, collecteur de fractions (ci-contre), détecteur.



Très utilisée comme technique de purification en chimie organique

1.3 Chromatographie analytique : de la séparation au chromatogramme



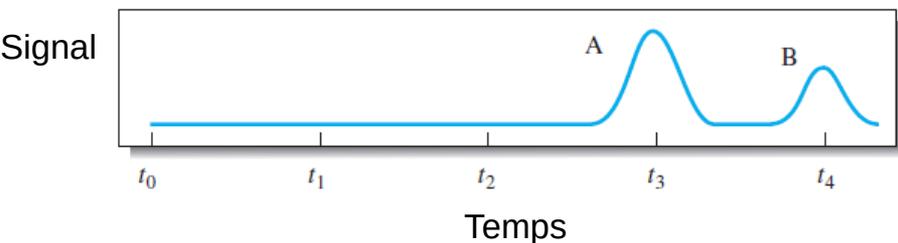
En chromatographie analytique, on obtient un **chromatogramme**

Chromatogramme : signal en fonction du temps. (NB : \neq spectre)

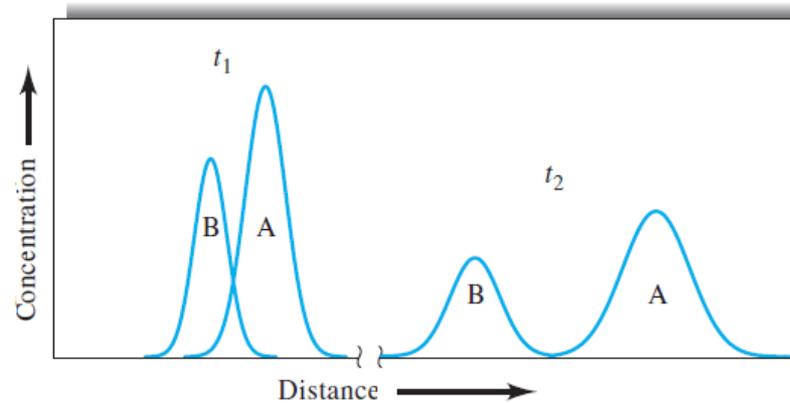
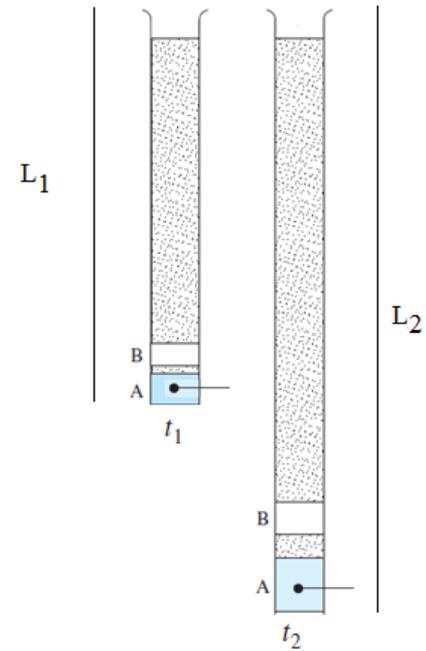
Figure : passage de l'élution sur colonne au chromatogramme.

A est moins retenu que B, donc il est associé à un *temps de rétention* plus faible.

Le chromatogramme dépend du type de détecteur utilisé. Exemple : un détecteur fondé sur l'absorption à λ donnée ne détectera que les espèces absorbant à cette longueur d'onde.



Au cours de l'éluion...



Plus la colonne est longue, plus les maxima de concentration de A et B sont espacés

Mais :

- la durée de l'analyse est augmentée

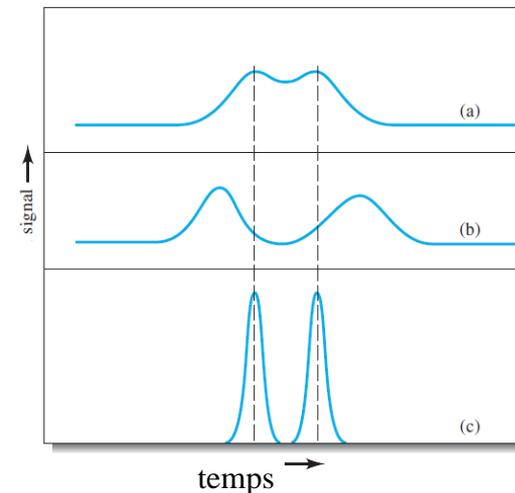
- les pics sont élargis de façon inévitable.

→ une analyse chromatographique correctement mise au point est résulte d'un compromis entre plusieurs facteurs définis par l'expérimentateur

Chromatogramme initial insatisfaisant : recouvrement de pics

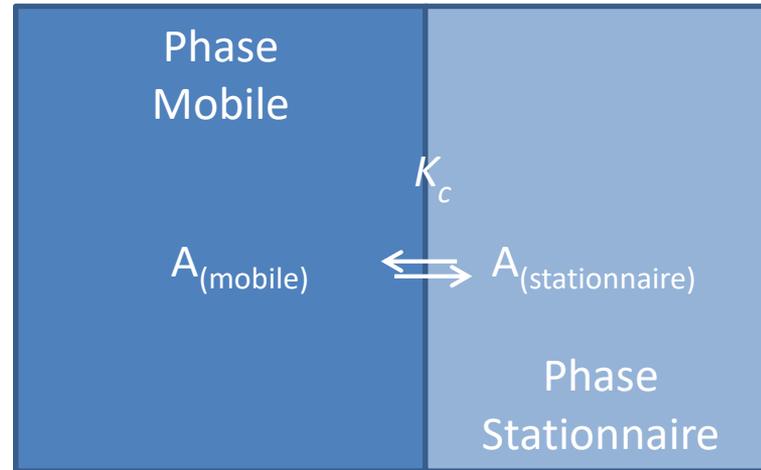
Amélioration par augmentation de la séparation des pics

Amélioration par réduction de la largeur des pics



1.4 Équilibres chimiques mis en jeu

Flux de la phase mobile



Toutes les séparations chromatographiques reposent sur un équilibre chimique pour chaque analyte. Celui-ci se *partage* entre la phase mobile et la phase stationnaire (ou s'adsorbe sur la phase stationnaire)

Pour le partage, la constante d'équilibre K_c est appelée *coefficient de partage*.

$$K_c = \frac{c_S}{c_M}$$

RQ : cet équilibre est *analogue* à celui régissant une technique chimique simple : l'*extraction par solvant*. (cf. TP tech. expé.)

Mais la phase mobile se déplace... donc plus le flux de la phase mobile est important, moins les équilibres auront le temps de s'établir.

Principaux types de méthodes chromatographiques

En fonction de la nature des équilibres impliqués

Nature de la phase mobile → grande famille de méthodes	Phases stationnaires possibles	Type d'équilibre (ou interaction)
Chromatographie en phase gazeuse (CPG)	a) Liquide adsorbé ou greffé à une surface solide b) Solide	a) Partage gaz/liquide b) Adsorption
Chromatographie en phase liquide (CPL)	a) Liquide adsorbé ou lié à une surface solide b) Solide c) Résine échangeuse d'ions d) Liquide dans les interstices d'un polymère	a) Partage liquide/liquide b) Adsorption c) Echange d'ions d) Partage (et tamisage)

I.5 Techniques d'analyse : choix et enjeux

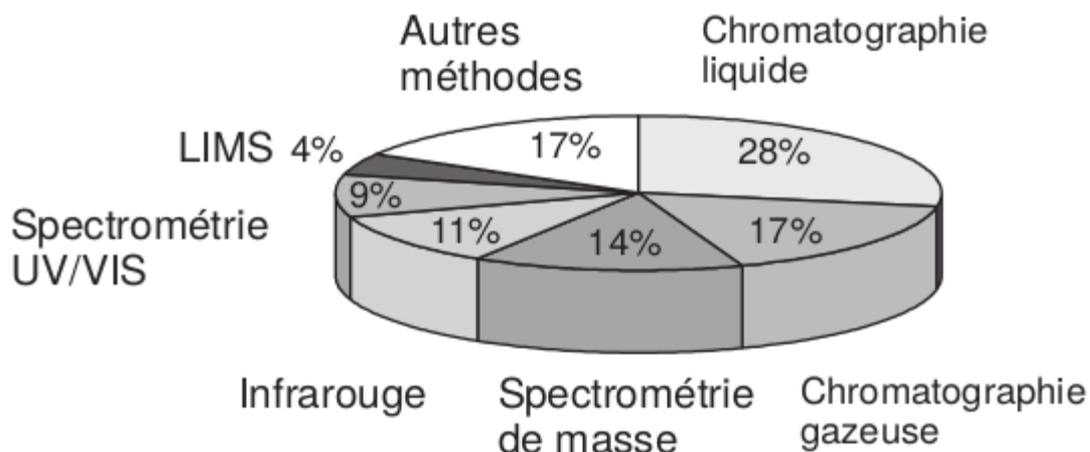
Les différentes techniques sont complémentaires

Le **choix** de l'une ou l'autre dépend :

- de la nature du mélange d'espèces à analyser : gaz, liquide volatil, liquide peu volatil, solide, macromolécule, espèce organique, polaire, ionique,...
- du but de l'expérience : identification de composants d'un mélange, quantification, couplage avec une méthode spectroscopique ou avec la spectrométrie de masse, contrôle de pureté, purification de produits (chromatographies préparatives), suivi de réaction en continu...
- *et pour les techniques instrumentales*
de la disponibilité des appareils (et leur prix) ainsi que leur simplicité d'utilisation

Enjeux économiques :

Marché mondial
20 G€ (2003)



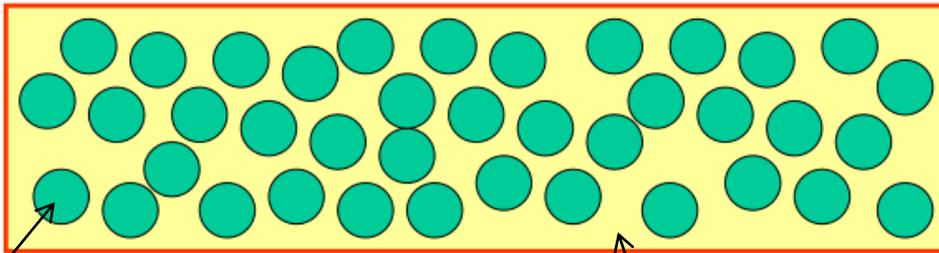
I.6 Rétention des analytes par la colonne

Volume mort lié à la colonne

Les colonnes chromatographiques, (cylindres : longueur L , rayon r), contiennent des particules de phases stationnaires occupant une partie de leur volume interne V_{int} .

Le volume qui n'est pas occupé par la phase stationnaire contient déjà de la phase mobile au début de l'analyse.

Section d'une colonne



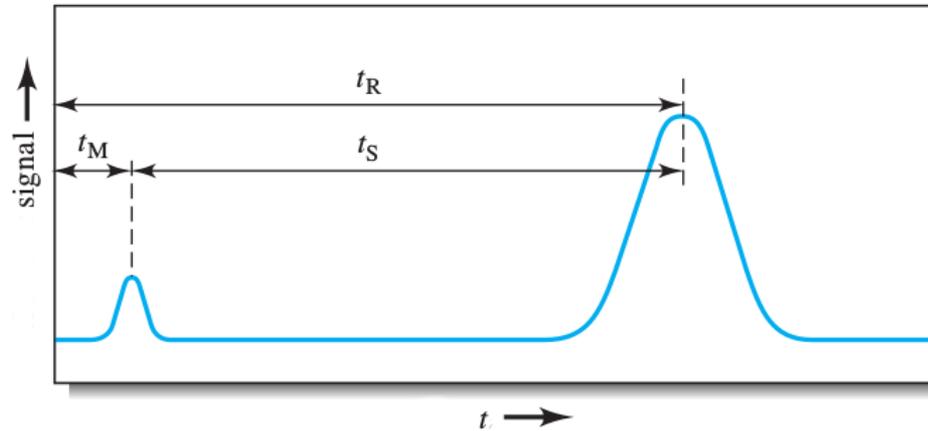
$$V_{int} = L \pi r^2 = V_S + V_M$$

Phase stationnaire (Volume V_S)

Volume occupé par la phase mobile

On appelle *volume mort* V_M le volume de phase mobile présent dans la colonne au moment de l'injection de l'échantillon.

Temps mort et temps de rétention



Une espèce qui n'est pas retenue par la phase stationnaire ($K_c \rightarrow 0$) parcourt la colonne non pas en un temps nul, mais à la même vitesse que l'éluant.

Le temps correspondant est le *temps mort* t_m .

Les espèces qui sont retenues par la phase stationnaire passent un temps t_s sur celle-ci

→ temps de rétention total : $t_R = t_M + t_S$.

Le temps mort et le temps de rétention des analytes permettent de calculer des vitesses linéaires moyennes de déplacement :

$$\bar{v} = \frac{L}{t_R} \quad \text{analyte}$$

$$u = \frac{L}{t_M} \quad \text{molécules de la phase mobile}$$

où L est la longueur de la colonne

RQ : c'est le débit D qui est accessible à l'expérimentateur : $D = \pi r^2 \times u \times \varepsilon$

Où ε est la porosité : $\varepsilon = V_M / V_{tot}$

Extraire du chromatogramme les paramètres liés à l'équilibre

On montre que :

$$\bar{v} = u \times \frac{1}{1 + K_A V_S / V_M}$$

Dans cette équation, seul u correspond à un paramètre facilement ajustable. V_S et V_M dépendent de la colonne. K_A^* dépend de l'analyte et de la colonne. On regroupe ces trois termes en un *facteur de rétention* k_A qui est très utile pour comparer le comportement des analytes dans les colonnes.

$$k_A = \frac{K_A V_S}{V_M}$$

On montre que :

$$k_A = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

Si $k_A \rightarrow 0$ le soluté n'est pas retenu.

Séparations optimales pour $1 < k_A < 5-10$

Si k_A est trop grand, l'analyse est trop longue.

* K_A : (notation allégée de $K_C(A)$)

Facteur de séparation

Application de la chromatographie : mélanges complexes, nombreuses espèces.

Facteur de séparation d'une colonne pour deux solutés A et B :

$$\alpha = \frac{K_B}{K_A} = \frac{k_B}{k_A}$$

Avec B l'espèce la plus retenue sur la colonne (donc $\alpha > 1$)

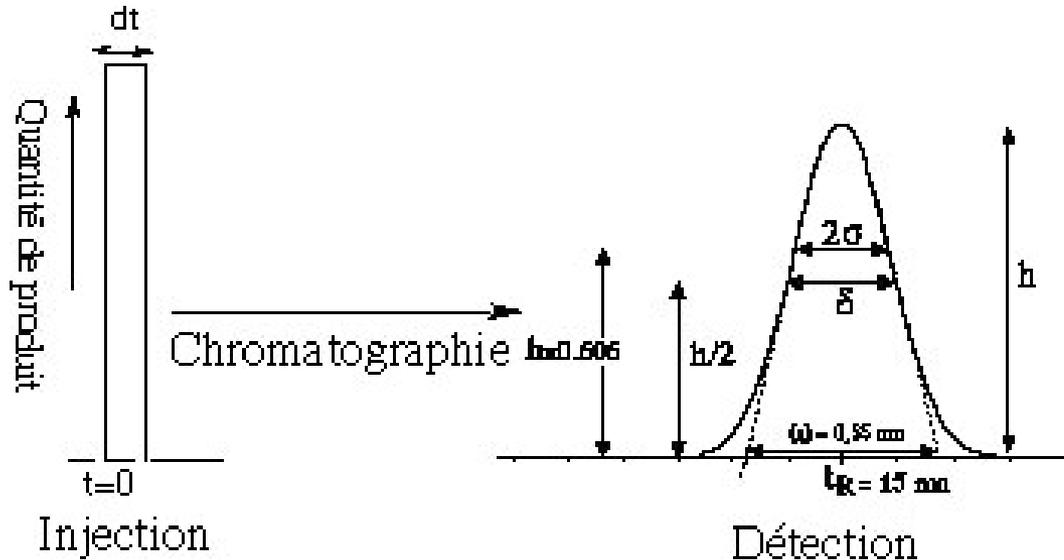
En combinant la formule ci-dessus avec celle reliant les facteurs de rétention aux temps de rétention et temps morts :

$$\alpha = \frac{(t_R)_B - t_M}{(t_R)_A - t_M}$$

Facteur de séparation : estimation de l'efficacité d'une colonne donnée pour séparer deux analytes.

I.7 Élargissement des pics et efficacité des colonnes

Dans les raisonnements précédents, le comportement moyen des molécules de l'analyte a été considéré, cependant :

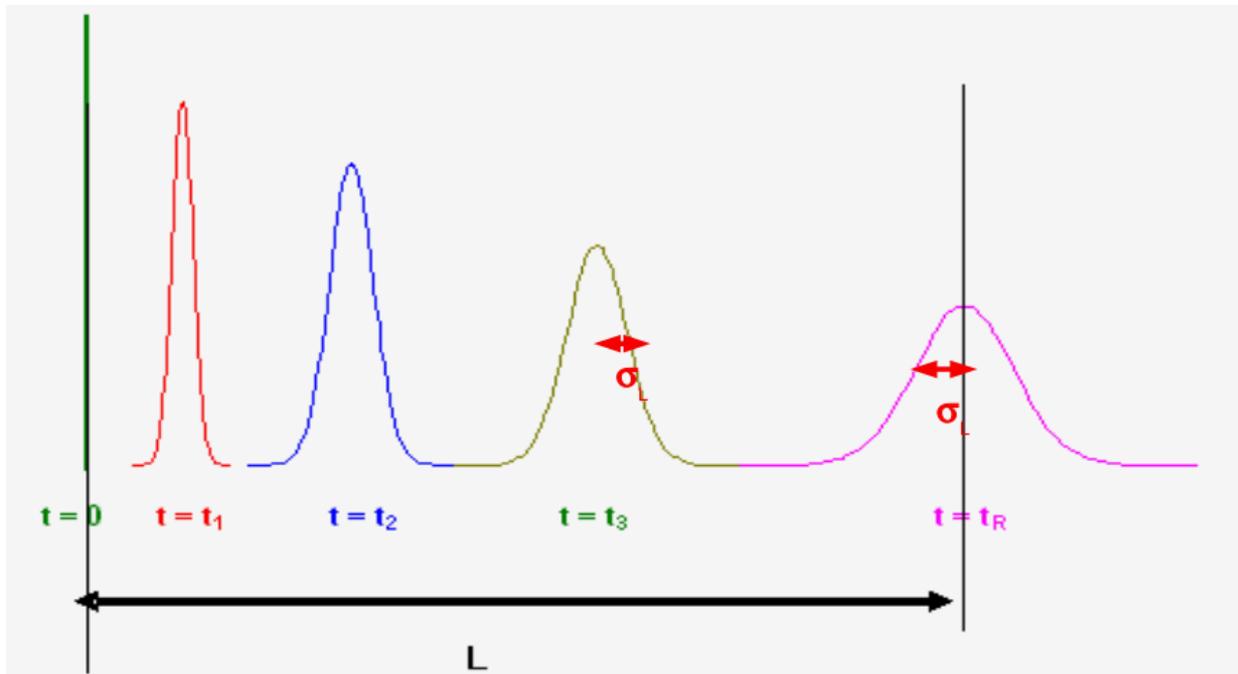


L'allure des pics est celle d'une fonction gaussienne.
$$f(x) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(x - \mu)^2}{2\sigma^2}}$$

Raisons principales : diffusion des molécules dans la phase mobile.
Irrégularité des temps de séjour dans la phase stationnaire.

Plus l'analyse est longue, plus l'étalement des pics augmente.

S'il était possible de suivre la concentration de l'analyse en fonction du temps en tout lieu de la colonne...



A l'intérieur de la colonne on observerait une distribution quasi-gaussienne. Au cours de l'élution, le pic s'élargit et sa hauteur diminue, l'écart-type σ_L augmente lors de la traversée de la colonne.

Mais ces profils théoriques en fonction de la distance *ne sont pas accessibles expérimentalement...*

...seul le chromatogramme final (en fonction du temps) est accessible.

Evaluation quantitative de l'efficacité d'une colonne

On relie l'efficacité de la colonne à deux paramètres :
Le nombre de plateaux théoriques N , et la hauteur équivalente à un plateau théorique H .

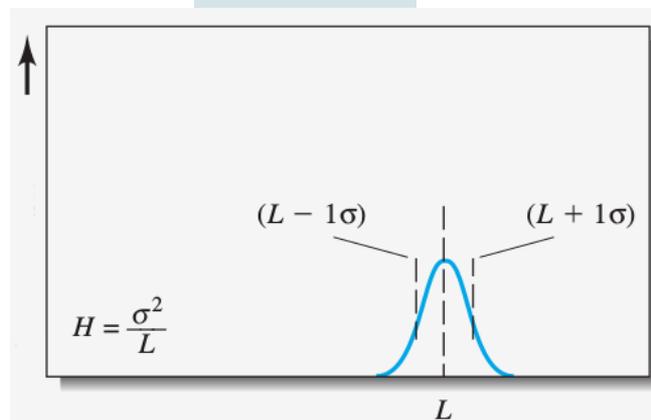
Ces deux termes n'ont pas de sens physique direct et dérivent d'une analogie avec la distillation (cf. TP tech. expé.). La colonne est vue comme une succession de plateaux, dans lesquels l'équilibre s'établit successivement.

Plus H est petit, plus la colonne est efficace pour une longueur donnée.

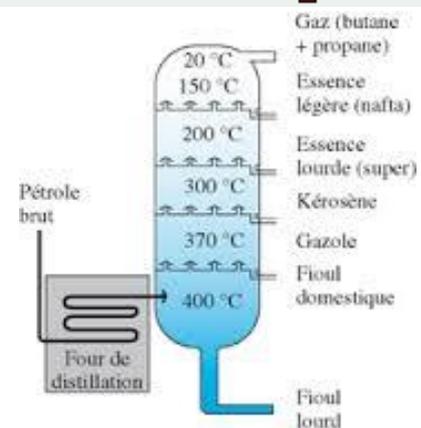
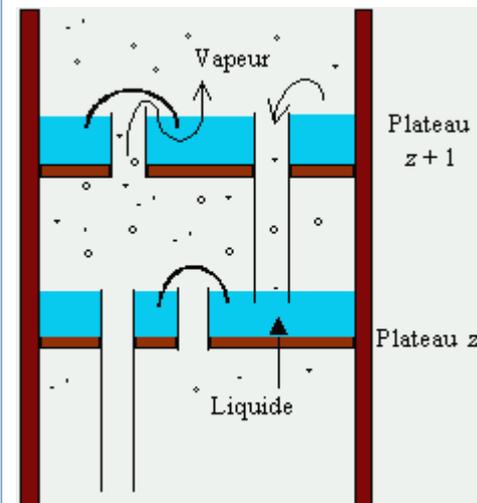
Une colonne de longueur L contient

$$N = \frac{L}{H} \text{ plateaux théoriques}$$

Si la distribution de la concentration en fonction de la distance était connue, H serait directement mesurable.



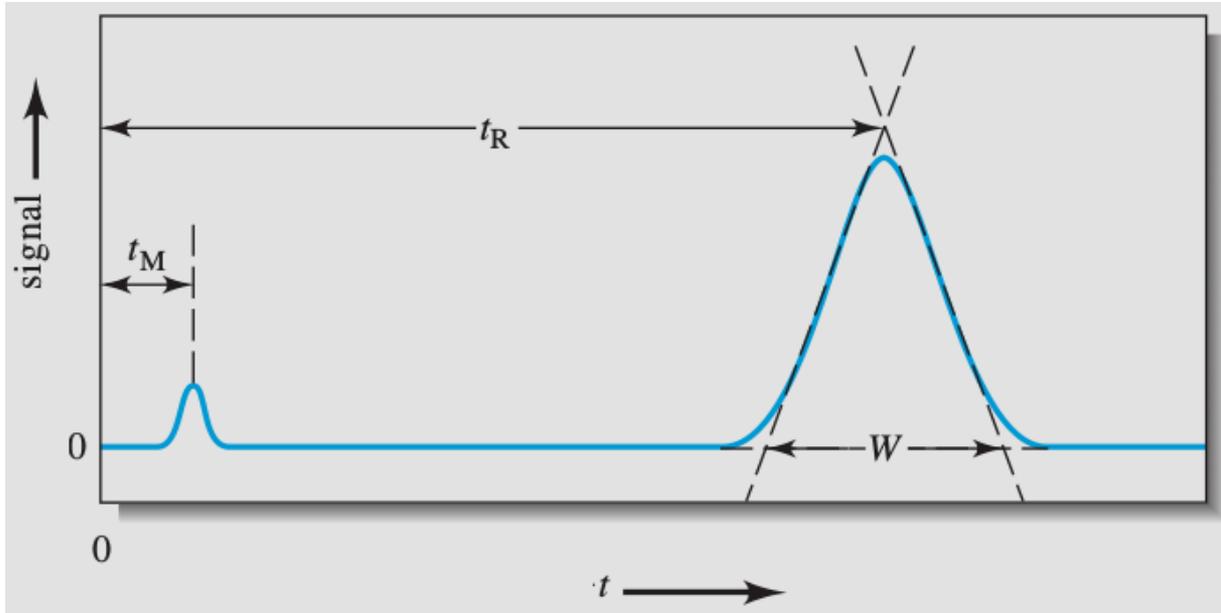
Analogie avec la distillation



Evaluation quantitative de l'efficacité d'une colonne

A partir du chromatogramme, on peut montrer que :

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$$



on peut aussi utiliser :

$$N = 5.54 (t_R / W_{1/2})^2$$

où $W_{1/2}$ est la largeur à mi-hauteur
(préférable si les pics ne sont pas bien séparés)

Pourquoi c'est important ? Les performances d'une colonne sont décrites par les fabricants en utilisant N et H .

Analyse de chromatogrammes → vérification des spécifications

Exemple d'exploitation de données expérimentales

(avec des valeurs courantes)

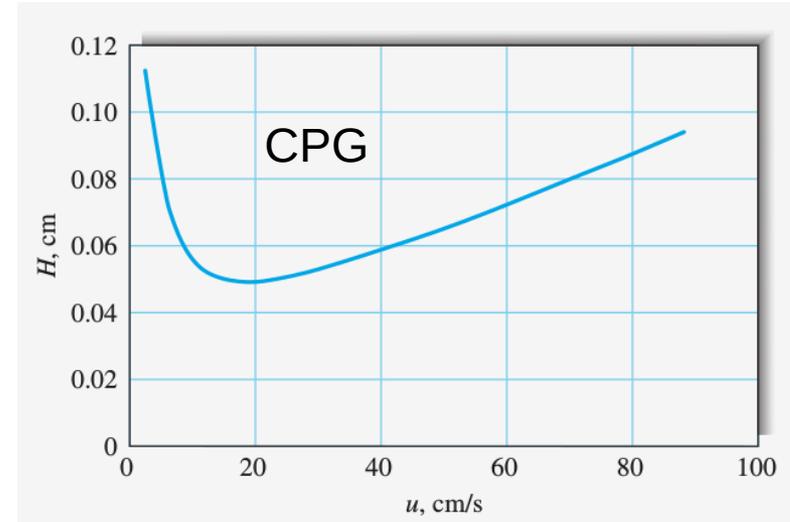
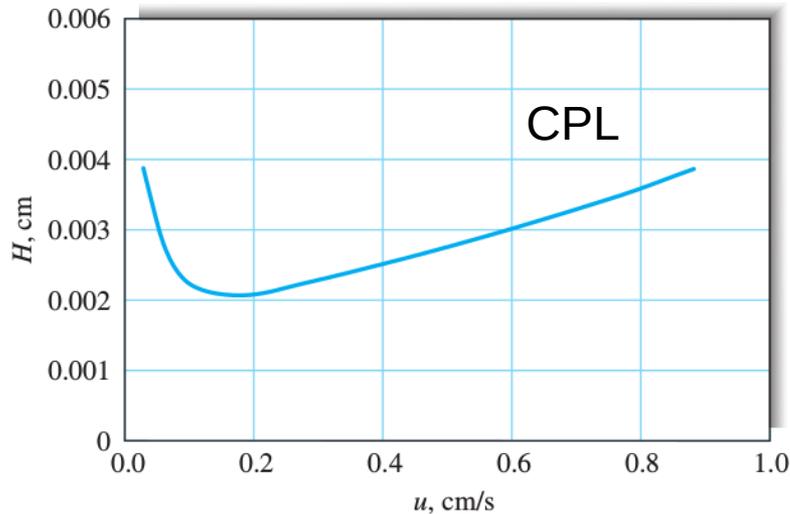
Calculez la hauteur équivalente à un plateau théorique (en mm) pour un composé traversant une colonne de CPG de 15 m en 2,42 minutes avec une largeur de pic à la base de 0,07 min.

Quel est le nombre de plateaux associés à cette séparation ?

Effet de la vitesse d'écoulement de la phase mobile

Ce paramètre est facilement ajustable par l'opérateur.

On utilise des graphiques de H en fonction de u (vitesse d'écoulement de la phase mobile).



minimum → vitesse optimale d'utilisation de la colonne

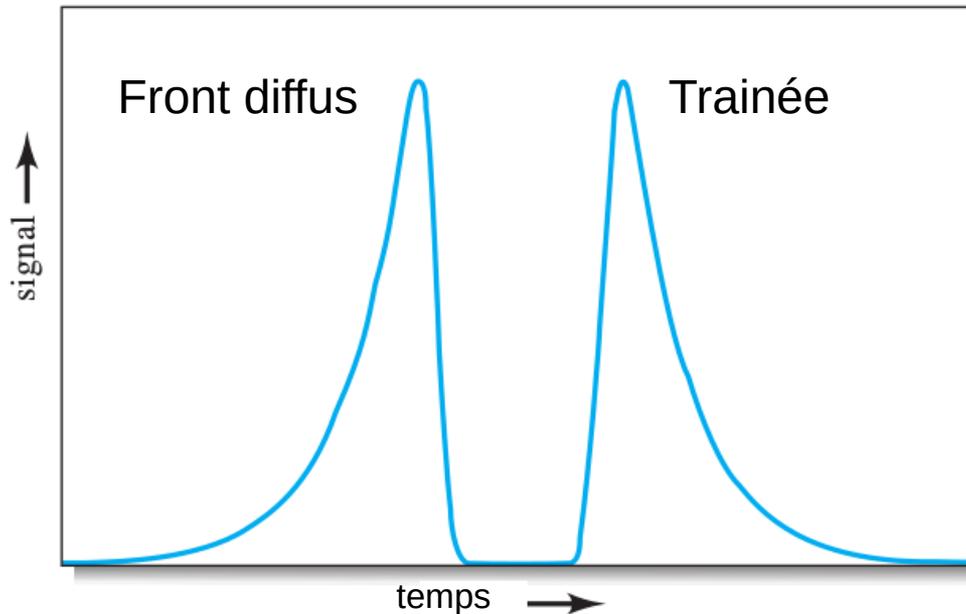
En CPL, le minimum à des vitesses très faibles (en dehors des conditions opératoires normales)

En CPG, H est plus grand qu'en CPL. Cependant les colonnes sont beaucoup plus longues (CPL : 25-50 cm, CPG : 50 m). N est donc habituellement plus grand en CPG.

Modélisation de $H = f(u)$

$$H = \frac{B}{u} + C_S u + C_M u$$

Asymétrie des pics



(négligés dans la discussion précédente)

Cause possibles de ces écarts à l'idéalité :

- Quantité trop importante d'analyte injecté → phase stationnaire saturée → front diffus (*fronting*)
- Evolution de K_c avec la concentration → front diffus ou trainée (*tailing*)

L'asymétrie des pics peut être décrite avec des indicateurs numériques.

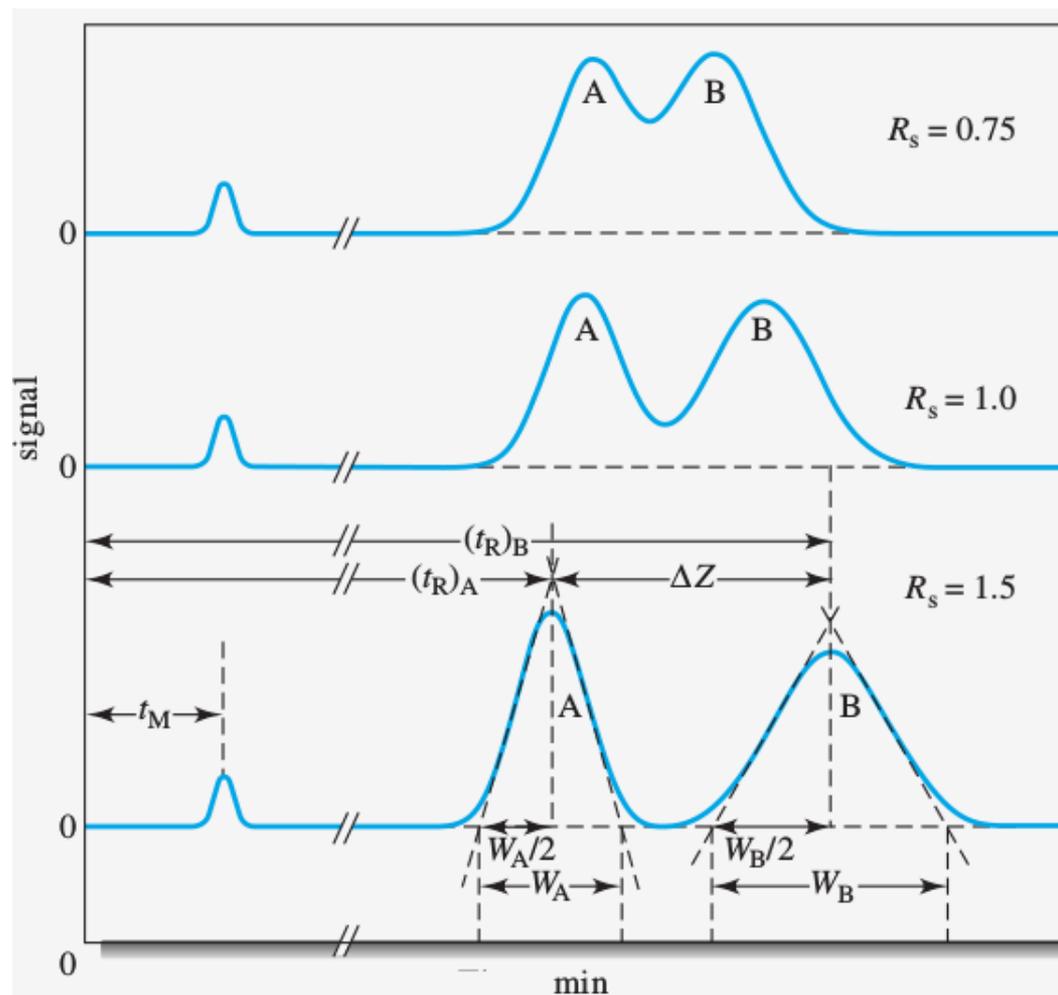
I.8 Résolution d'une séparation

La résolution d'une séparation chromatographique est une évaluation quantitative de l'aptitude d'une colonne à séparer les analytes A et B en tenant compte de la largeur des pics.

Pics trop proches et/ou trop larges → recouvrement → analyse non quantitative et au pire des cas non concluante.

$$R_s = \frac{\Delta Z}{\frac{W_A}{2} + \frac{W_B}{2}}$$
$$= \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_A + W_B}$$

Plus une analyse résulte en l'obtention de pics fins (N élevé), plus la résolution sera élevée pour un temps d'analyse donné.



Amélioration de la résolution d'une séparation chromatographique

On peut montrer que :

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k_B}{1 + k_B} \right) \quad \text{et donc} \quad N = 16R_s^2 \left(\frac{\alpha}{\alpha - 1} \right)^2 \left(\frac{1 + k_B}{k_B} \right)^2$$

(B : espèce la plus lente)

Comme le temps d'une séparation est souvent un facteur limitant, il peut être utile d'utiliser la relation suivante :

$$(t_R)_B = \frac{16R_s^2 H}{u} \left(\frac{\alpha}{\alpha - 1} \right)^2 \frac{(1 + k_B)^3}{(k_B)^2}$$

Dans ces équations, on a un produit de 3 termes

- 1) terme en N ou H : efficacité de la colonne
- 2) terme en α : dépend de la différence des propriétés d'une paire d'analytes
- 3) terme en k_B : dépend à la fois des propriétés de l'analyte et de la colonne

Amélioration de la résolution d'une séparation chromatographique

1) Augmentation du nombre de plateaux :

↑ longueur de la colonne (chronophage)

↓ hauteur équivalente à un plateau théorique (nature de la colonne, débit phase mobile)

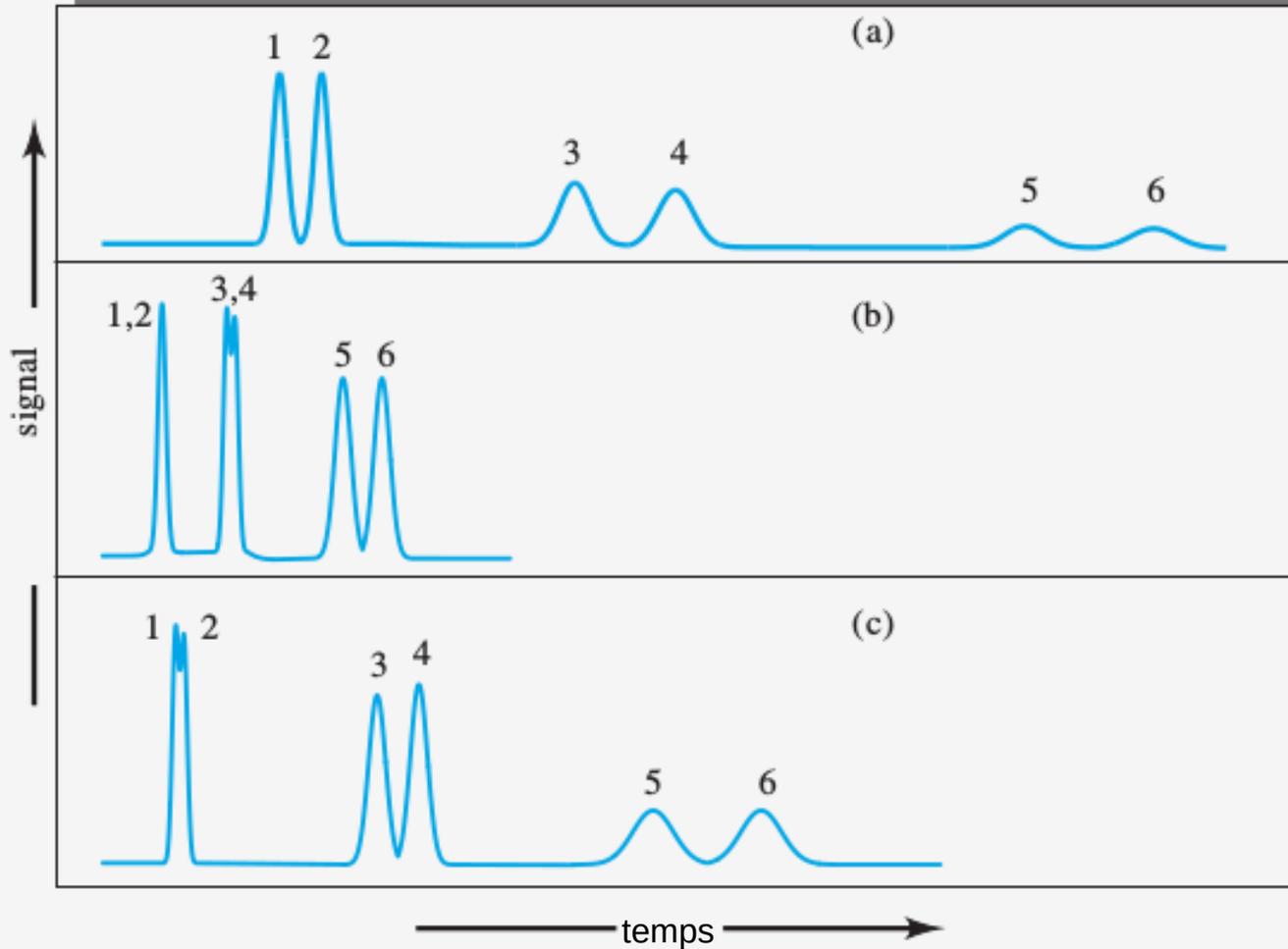
2) Optimisation du facteur de rétention tout en évitant les hauts k_B

3) Optimisation du facteur de sélectivité. Objectif : augmenter α tout en gardant k entre 1 et 10.

Moyens de varier k_B et α : différents entre CPG et CPL.

Le problème de l'analyse de mélanges complexes

Si les caractéristiques physico-chimiques de la séparation sont constantes lors de celle-ci....



Analyse trop longue

1,2 et 3,4 non résolus

1,2 non résolus

Solution : changer des paramètres *en cours d'analyse*
(différent selon la nature de la phase mobile)

II. Chromatographie en phase liquide haute performance

II. 1 Caractéristiques générales



La **chromatographie en phase liquide** est définie par l'utilisation d'une phase mobile liquide.

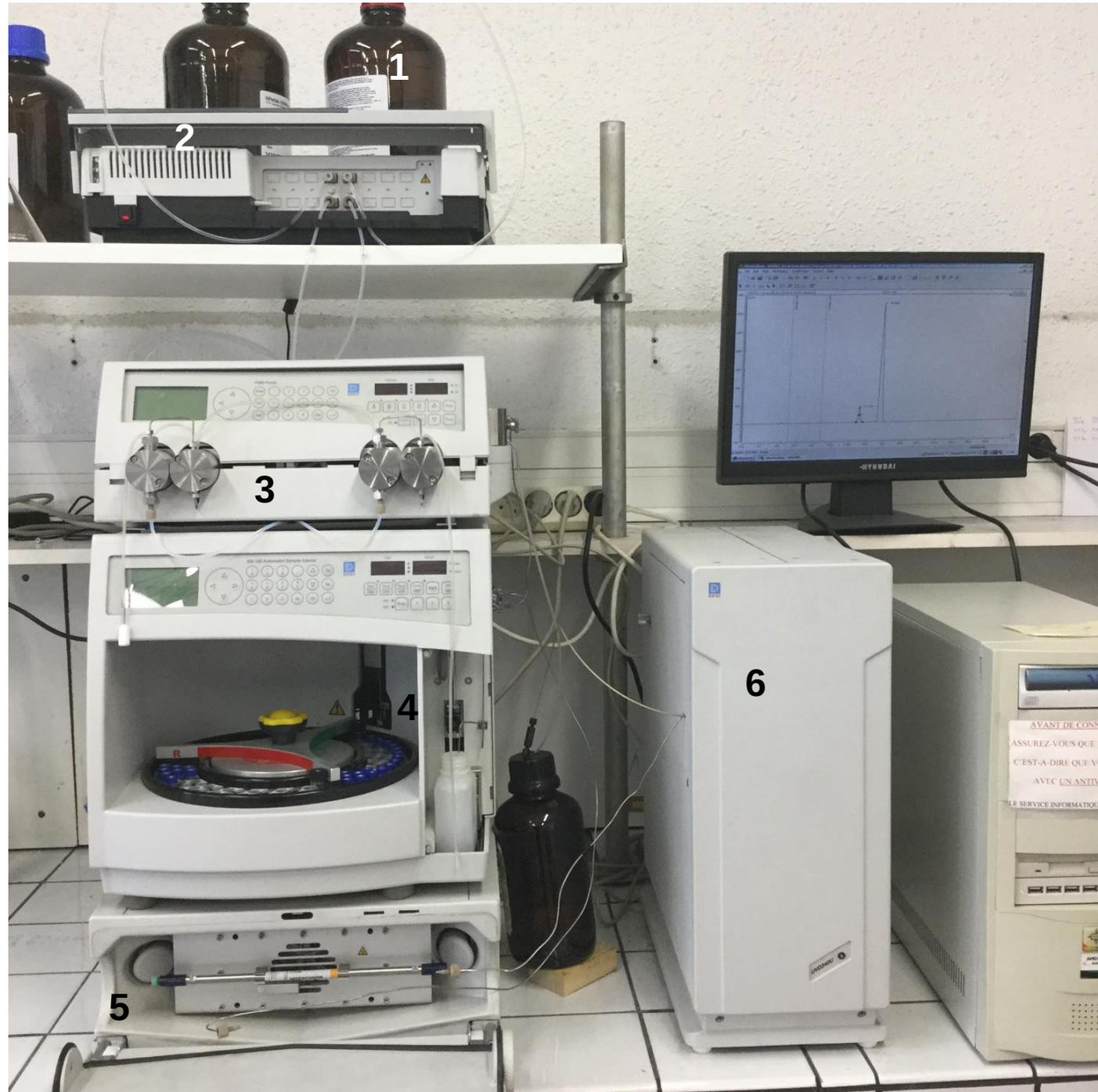
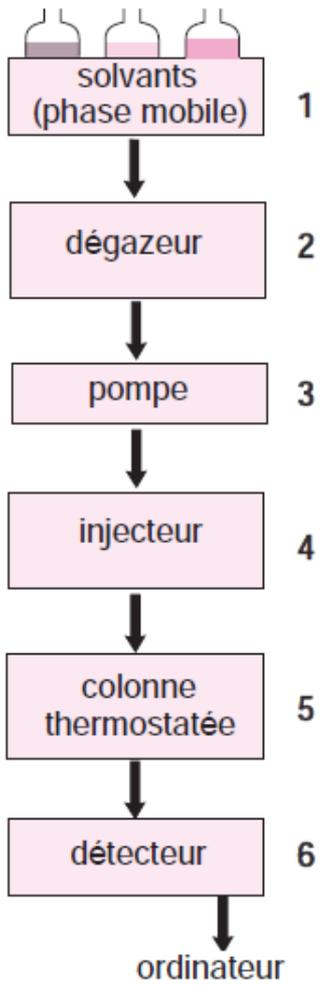
Les phases mobile et stationnaire *interagissent* (forces intermoléculaires) avec les analytes.

Tout mélange de composés dissous peut être analysé (à comparer avec la CPG pour laquelle seuls les composés gazeux ou vaporisables sont analysables).

La chromatographie liquide est la plus similaire aux techniques non instrumentales de séparations chromatographiques

Les versions instrumentales de la chromatographie liquide sont donc connues comme CLHP « chromatographie liquide haute performance » ou, plus couramment, HPLC « high performance liquid chromatography ».

II.2 Haute performance ?



HPLC depuis les années 1970

Chromatographie liquide « traditionnelle »



HPLC

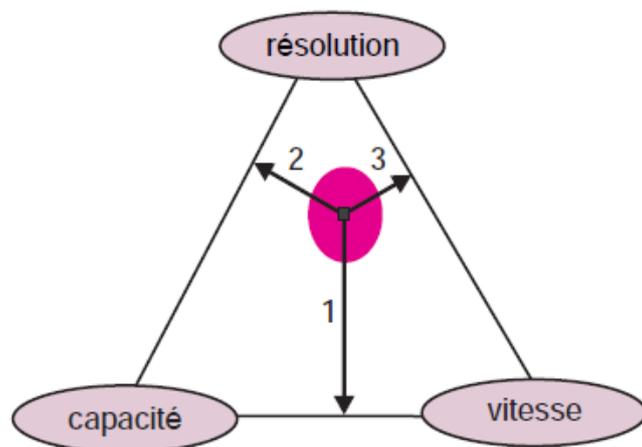


UHPLC

Évolution technologique toujours en cours

- 1) Miniaturisation
- 2) Contrôle informatique de tout le processus
- 3) Amélioration des performances de la phase stationnaire

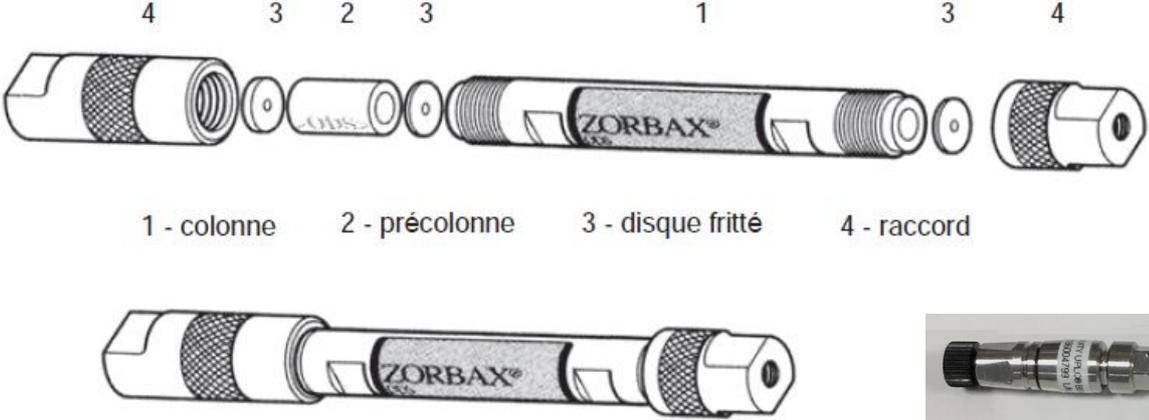
1) et 3) sont liés et impliquent → utilisation de pompes haute pression (débit suffisant malgré de très importantes pertes de charge)



Le « triangle des chromatographistes » :
on ne peut pas améliorer simultanément la résolution,
la capacité et la vitesse de l'analyse.

La résolution est habituellement le paramètre le plus important,
zone mise en évidence : chromatographie analytique
(valable aussi en CPG)

II.3 La colonne et la phase stationnaire



Colonne : pièce centrale de l'appareil de chromatographie.
 La colonne contient une phase stationnaire adaptée à une séparation donnée.
 Avant l'analyse, la colonne doit être conditionnée et équilibrée avec la phase mobile voulue.

Tendance actuelle : miniaturisation de la colonne



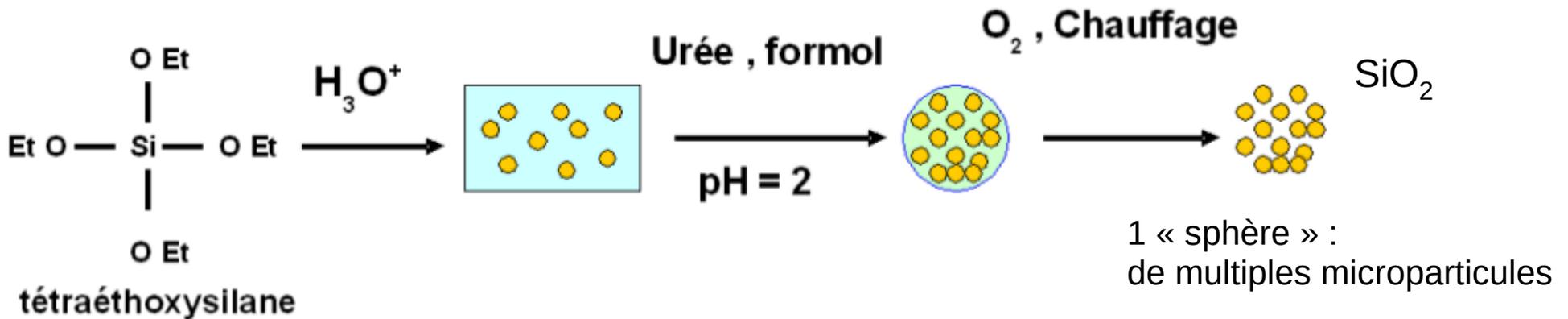
La phase stationnaire

Gel de silice : la phase stationnaire la plus utilisée en chromatographie (et notamment en HPLC, mais sous forme modifiée... cf. suite)

Le gel de silice : microsphères, diamètre constant dans une phase donnée, pouvant varier de 1 à 12 μm .

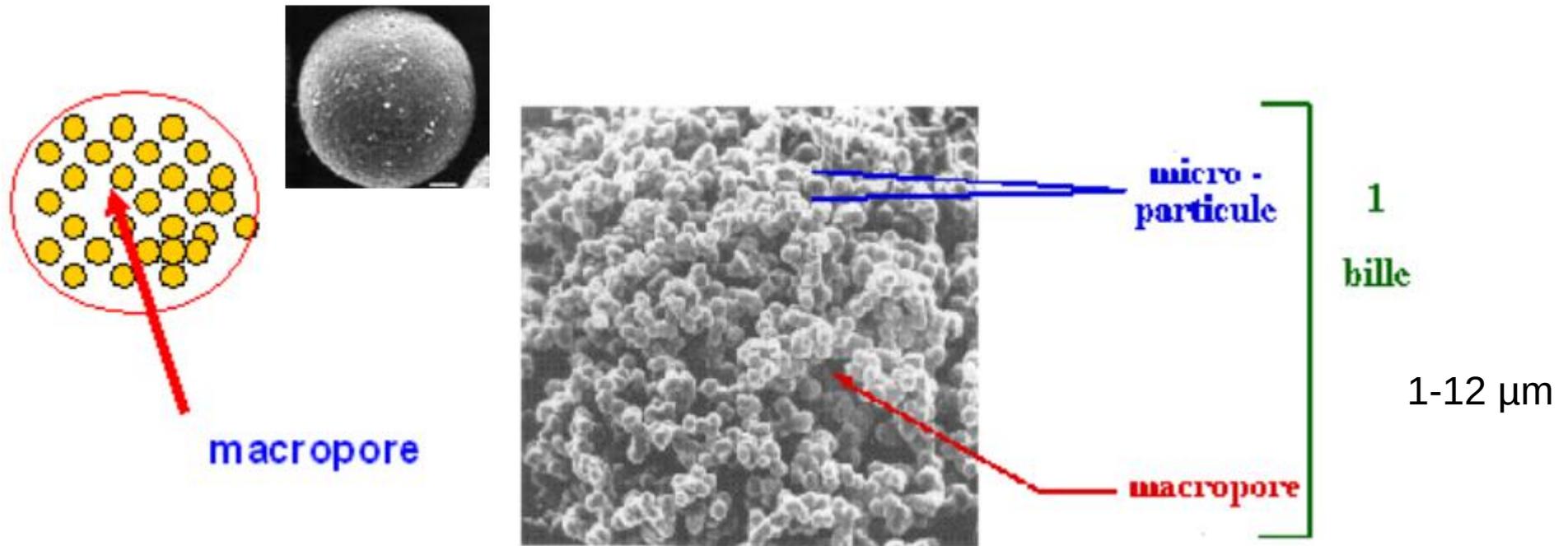
Obtention des microsphères :

- 1) polymérisation et hydrolyse contrôlée du tétraéthoxysilane ($\text{Si}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_4$).
- 2) agglutination en présence d'un liant organique urée/formol de microparticules (procédé sol-gel)
- 3) pyrolyse qui conduit aux microsphères



SiO_2 : matériau inerte chimiquement vis-à-vis des solvants, de l'eau (sauf en milieu très acide et surtout très basique, cf. verre)

Sphères inhomogènes et irrégulières, présence de pores.
Pores = zones d'adsorption préférentielles.

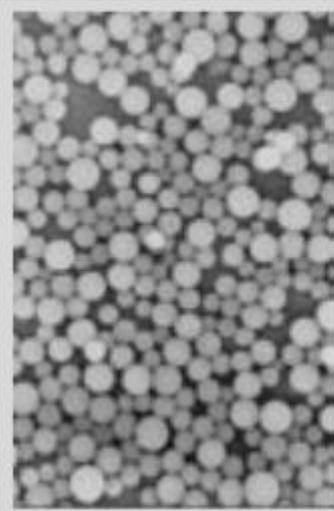


Alternative : colonnes avec une phase monolithique (phase continue et poreuse directement formée dans la colonne).

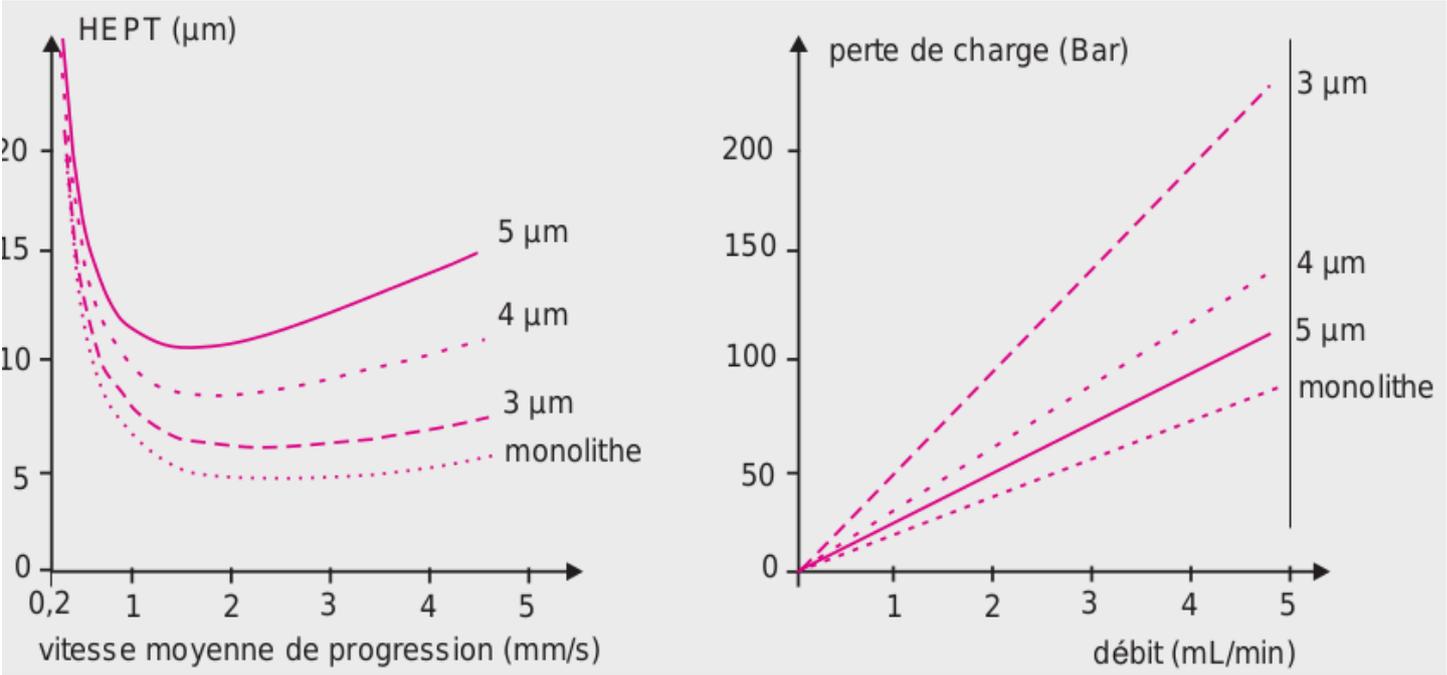
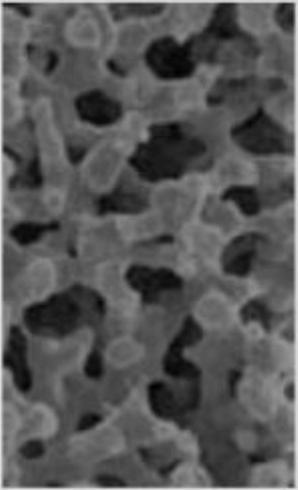
Qualité d'un gel : taille des grains, porosité ouverte (dimensions et répartition des pores), résistance à l'écrasement, surface spécifique... *secret industriel de chaque fabricant*

Effet de la granulométrie sur les caractéristiques de la séparation

Microsphères



Monolithe



Microsphères : $H \downarrow$ si $d_{particules} \downarrow$, mais la perte de charge augmente \rightarrow pression augmente, limite liée à l'appareil. Porosité totale 30-70 %.

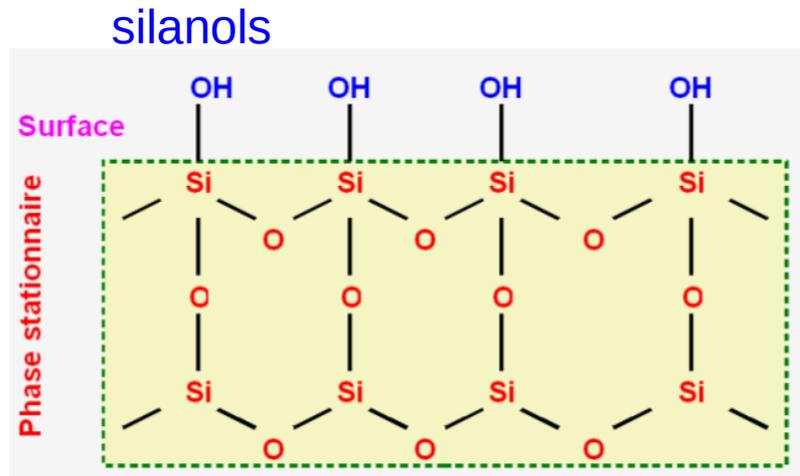
Monolithe : porosité \approx 80 %

Caractéristiques chimiques de la silice

Silice : formule brute approximative SiO_2 → réseau polymérique en 3D.

Mais... une petite minorité d'atomes d'oxygène, à la surface, est sous la forme de groupes *silanols* (OH issu du processus de polymérisation en phase aqueuse).

→ Formule réelle : $(\text{SiO}_2)_n(\text{H}_2\text{O})_x$ avec $n \gg x$.



Silanol :

- peut former des liaisons hydrogène
- légèrement acide : $\text{pK}_a (\text{SiOH}/\text{SiO}^-) \approx 10$

La surface interagit fortement (adsorption) avec les composés polaires et/ou formant des liaisons hydrogène

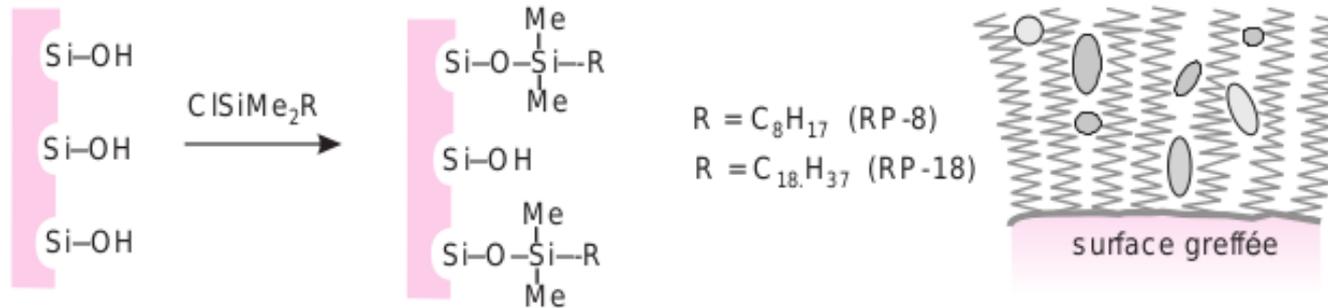
- caractéristiques évoluant au cours du temps
- manque de reproductibilité des séparations.

La silice non modifiée est utilisée couramment en chromatographie non instrumentale.

Elle n'est plus utilisée telle quelle en HPLC, mais les supports modifiés qui ont des propriétés similaires à celles de la silice d'origine sont dits : **phase normale**.

Surface spécifique de la silice utilisée en chromatographie $> 350 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$

Modification de la surface : phase *inverse*



Autres supports possibles :
Alumine Al_2O_3
Oxyde de zirconium ZrO_2

On traite la surface de la silice par des chlorosilanes.

Greffage covalent de groupements voulus sur 40-60 % des silanols (max 5 % en masse de carbone dans le solide final).

Cas le plus fréquent : greffage de **chaîne à 8 ou 18 atomes de C** : phase *inverse*

Aussi : greffage de groupements aromatiques pour des applications spécifiques

Propriétés de la surface obtenue :

1) surface hydrophobe → **inversion** des propriétés de la surface (initialement hydrophile)

2) chaînes carbonées ≈ phase liquide greffée

→ équilibre de **partage** entre la phase mobile et la phase stationnaire (adsorption).

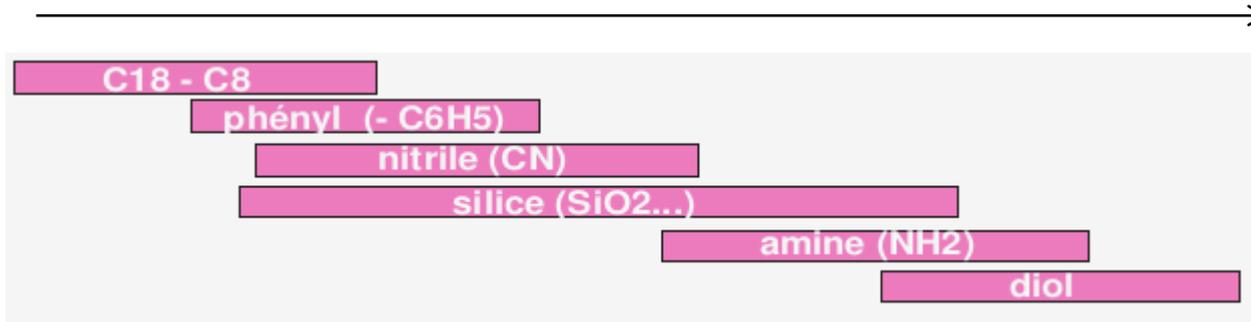
>80 % des séparations en HPLC ont lieu avec des colonnes à phase inverse avec des chaînes alkyle.

RP-HPLC *reversed phase - high performance liquid chromatography*

Modification de la surface : phase normale

- Nitrile : $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CN}$
- Amine $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$
- Diol : $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2\text{OH}$

Polarité croissante



En phase normale et en phase inverse, les propriétés de la surface peuvent être encore améliorées par *endcapping* (greffage $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ sur les silanols restant après le greffage de la chaîne portant le groupe voulu°.

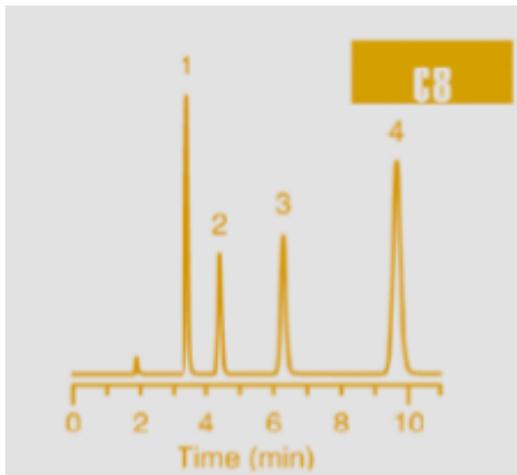
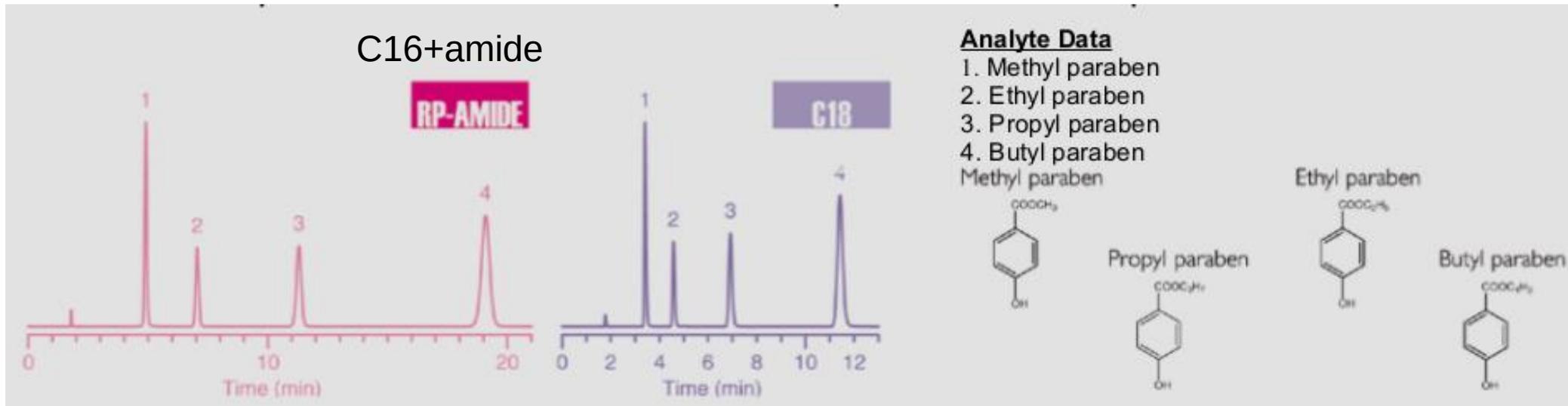
Résumé

En phase normale les analytes chargés, polaires et/ou formant des liaisons hydrogène seront très retenus (t_R élevé).

En phase inverse, c'est le contraire, les analytes polaires seront peu retenus.

Généralement, on choisit la phase stationnaire en fonction des analytes, ensuite la phase mobile est ajustée pour optimiser la séparation

Exemple : effet de la variation de la phase stationnaire sur une séparation (phase mobile constante)



-C18 retient plus les composés que C8 (interaction hydrophobe)

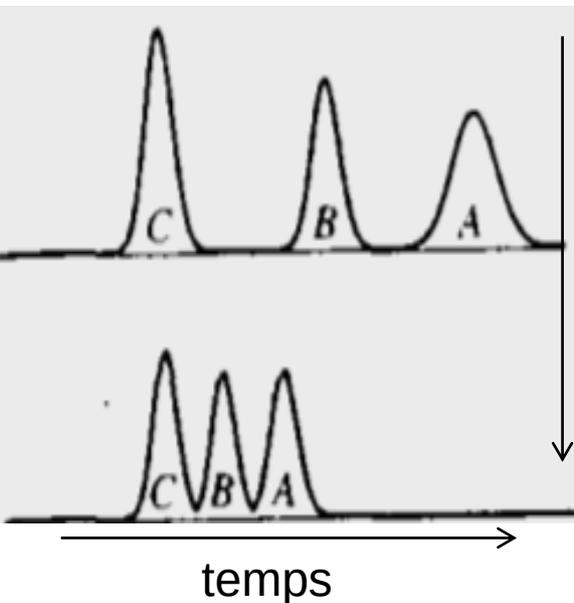
-La phase stationnaire amide peut, en plus de l'interaction hydrophobe, former des liaisons hydrogène et donc retient beaucoup plus l'ensemble des composés.

NB : la démarche habituelle est de modifier plutôt la phase mobile, changer la phase stationnaire nécessite une grande disponibilité en termes de matériel

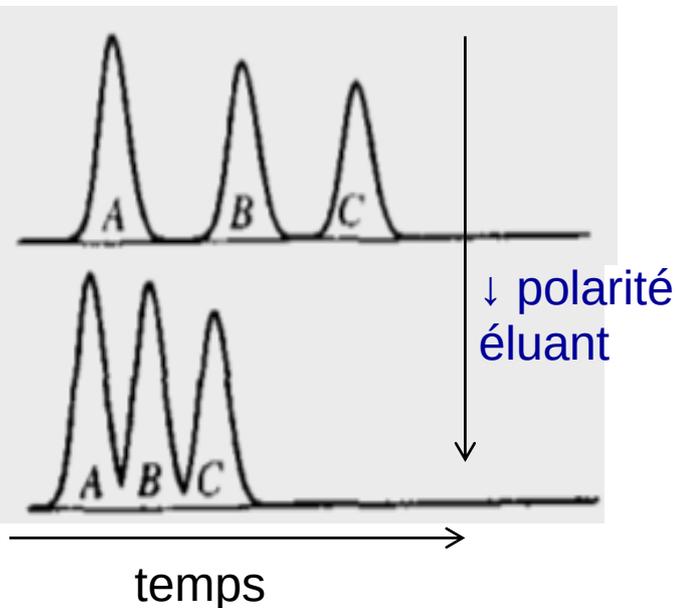
II.4 Le choix de la phase mobile

On désire séparer un mélange de 3 composés A, B et C.
polarités : $A > B > C$

HPLC phase normale



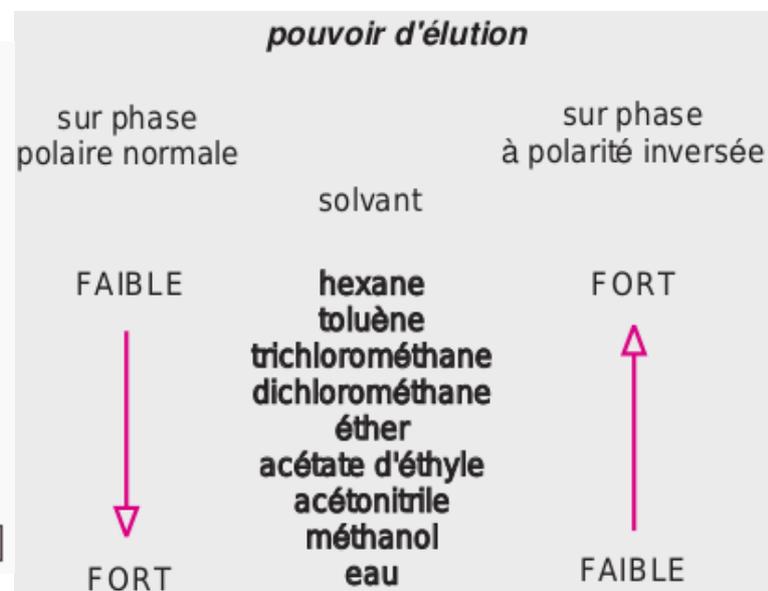
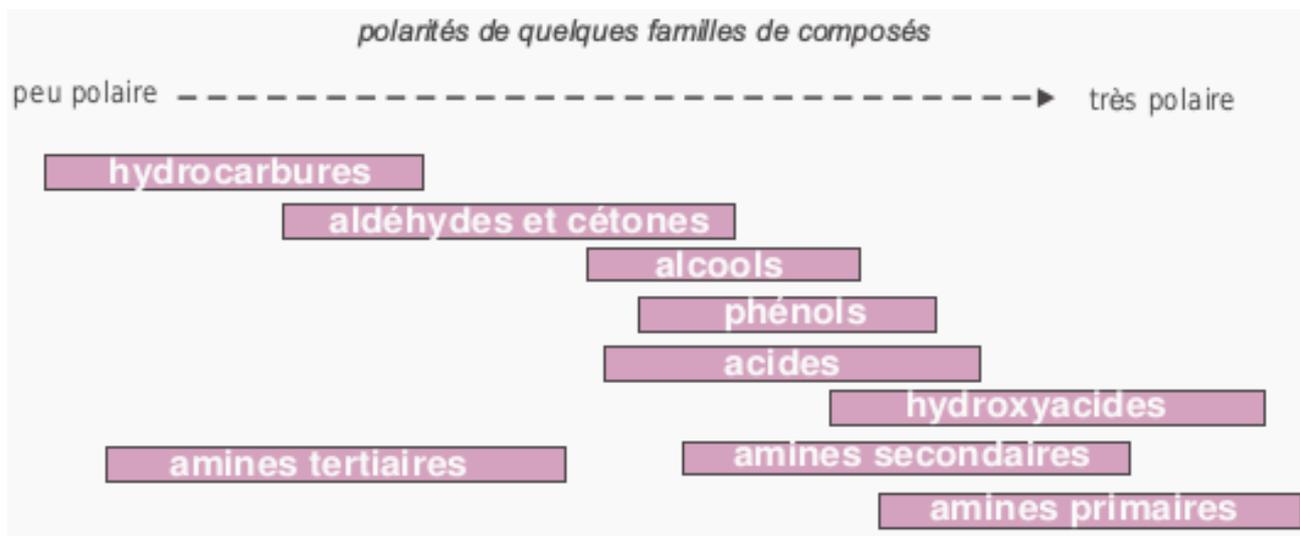
HPLC phase inverse



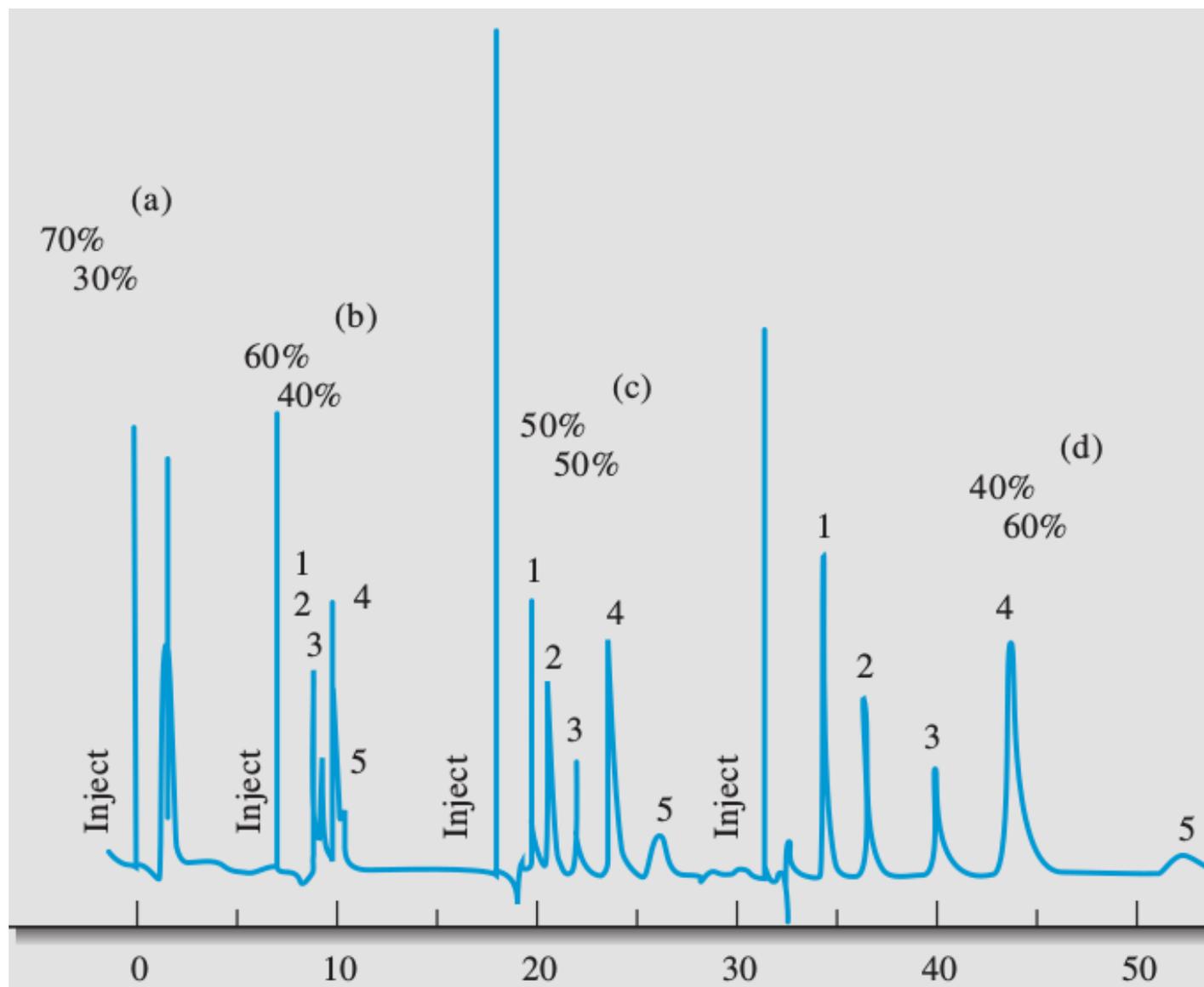
Dans le contexte de la chromatographie le terme polarité est souvent utilisé improprement

En général :

éluant
=
mélange de solvants



Effet de la composition de l'éluant sur la séparation



Phase inverse

Pourcentage volumique de méthanol et d'eau dans la phase mobile :

De 70 : 30 → éluant trop fort, pics non résolus.

....

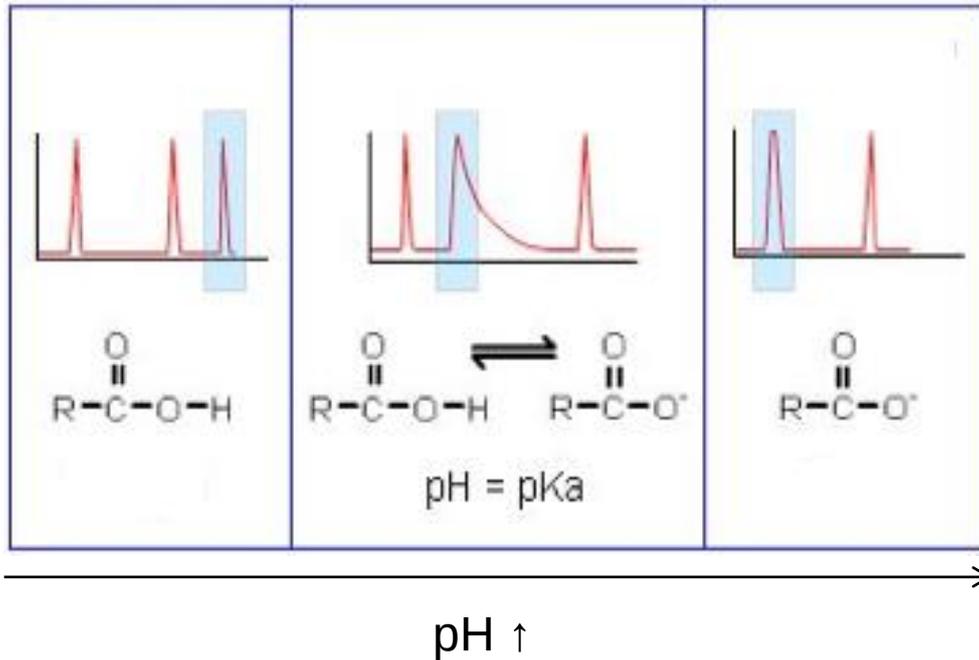
À 40 : 60 → éluant trop faible, séparation trop longue, pics élargis

Dans cet exemple, les proportions 50:50 sont acceptables.

Mais il n'est pas toujours possible de trouver un mélange de solvants unique qui permette une bonne séparation.

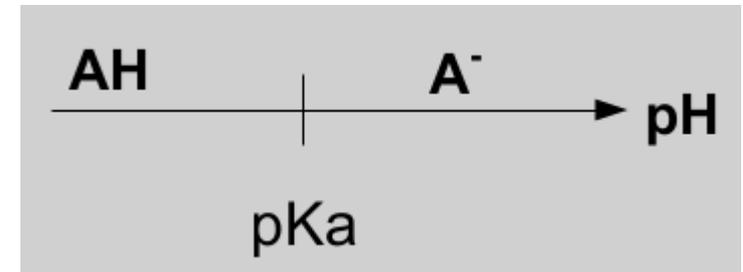
Cas particulier : composés ionisables

Cas d'un acide carboxylique en RP-HPLC



Fortement retenu

Peu retenu



Analogie avec l'extraction

Les bases (ex : amines) ont un comportement contraire (fortement retenu à pH acide, peu retenu à pH basique)

Si les composés sont ionisables, la rétention du composé dépend fortement du pH de la phase mobile.

Si ce pH n'est pas contrôlé, l'élution de ce type de composé peut ne pas être reproductible et présenter des pics déformés.

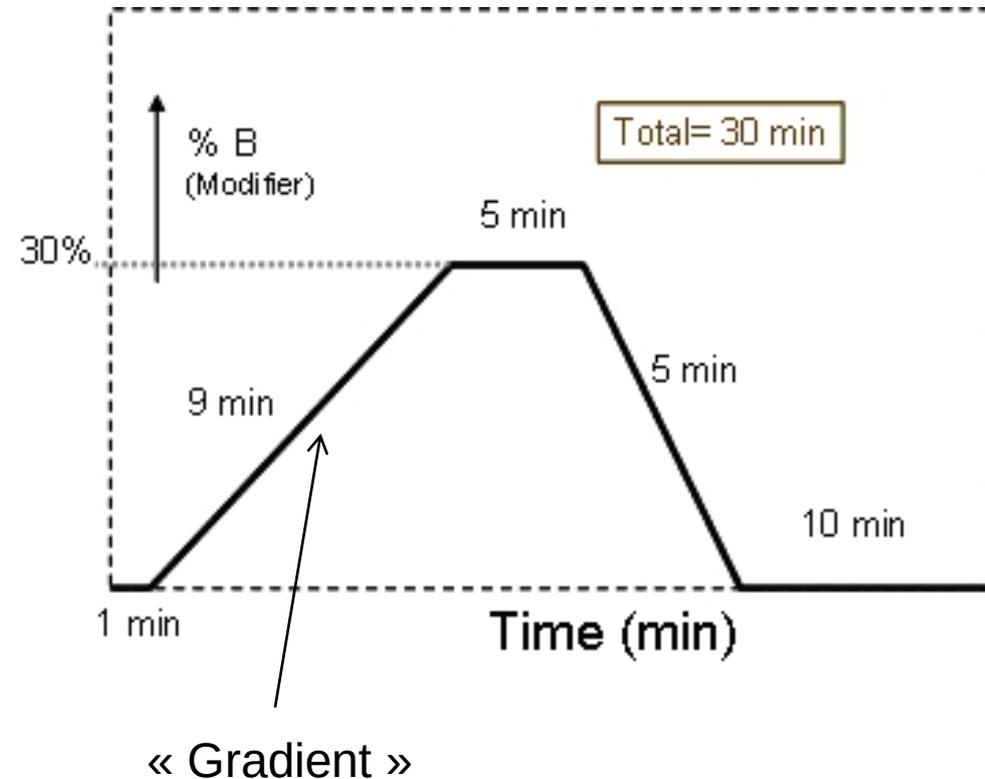
Gradient d'élution

Pour résoudre les problèmes de séparation, en chromatographie liquide on utilise un « gradient d'élution » :
programmation de la composition de la phase mobile injectée en fonction du temps.

Une programmation typique de solvant comporte une phase dans laquelle le % de B (éluant le plus fort) augmente.

Les composés doivent être élués facilement avec la composition maximale en B.

La fin de la programmation est un retour aux conditions initiales et un temps d'équilibrage de la colonne ($\approx 10 \times t_M$).



En pratique :

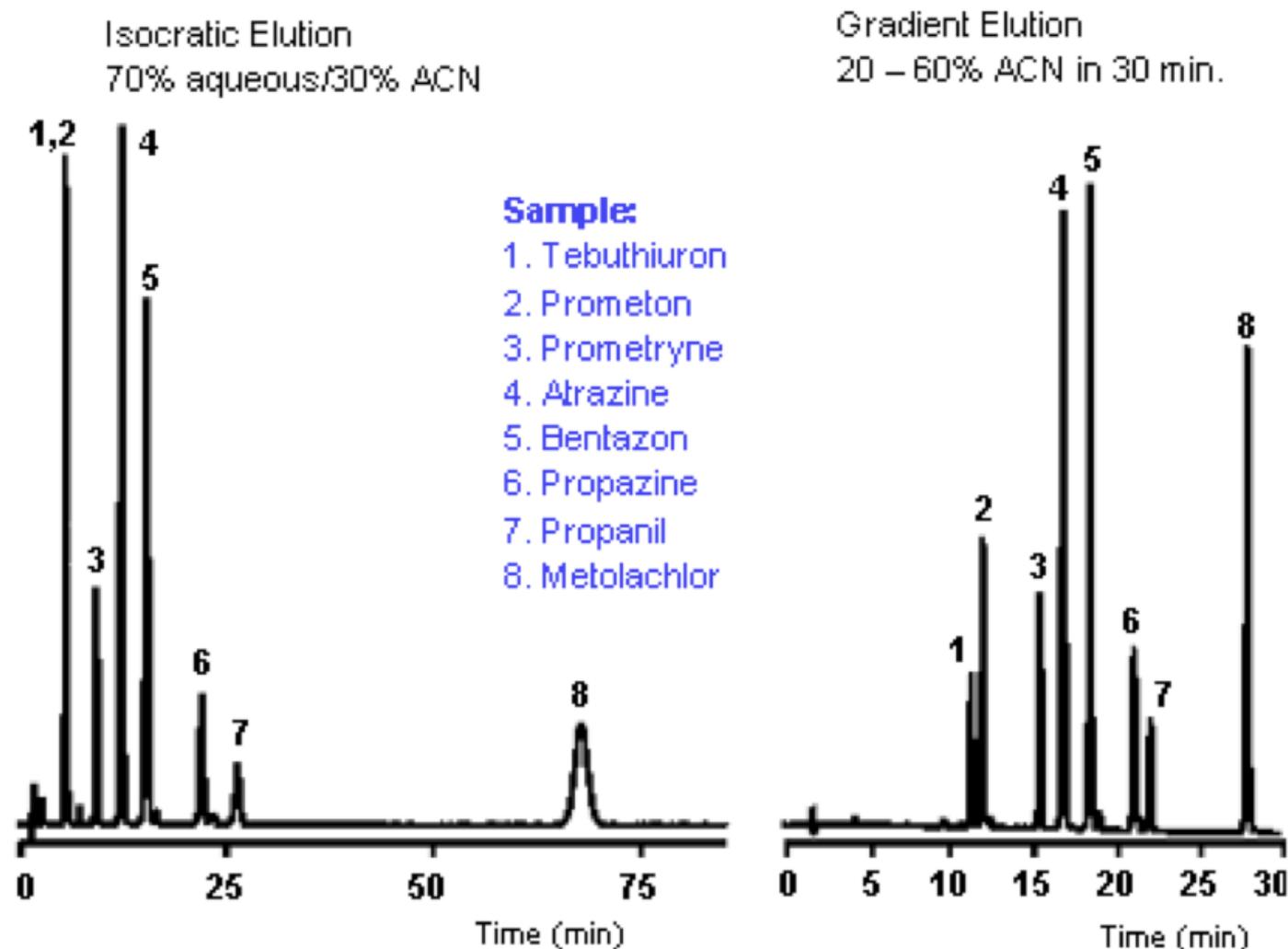
En HPLC phase normale on augmente la proportion de solvant polaire.
En HPLC phase inverse on augmente la proportion de solvant apolaire.

Separation of Herbicides on Zorbax C 18 column

Exemple :

Séparation insatisfaisante en **mode isocratique**
« même pouvoir » =
éluant constant

Le **gradient d'éluion**
améliore la séparation de
certains pics et réduit le
temps de l'analyse.



Column: ZORBAX C18 ; 4.6 x 150 mm , 5 µm

Mobile Phase A: H₂O with 0.1% TFA, pH 2

B: Acetonitrile

Flow Rate: 1.0 mL/min

Temperature: 35°C

II.5 Instrumentation.

Injection de l'échantillon

Préparation de l'échantillon :

Dissolution dans un solvant, de préférence l'éluant utilisé

Filtration pour enlever toute particule non dissoute

Injection de l'échantillon :

-pas de bulles

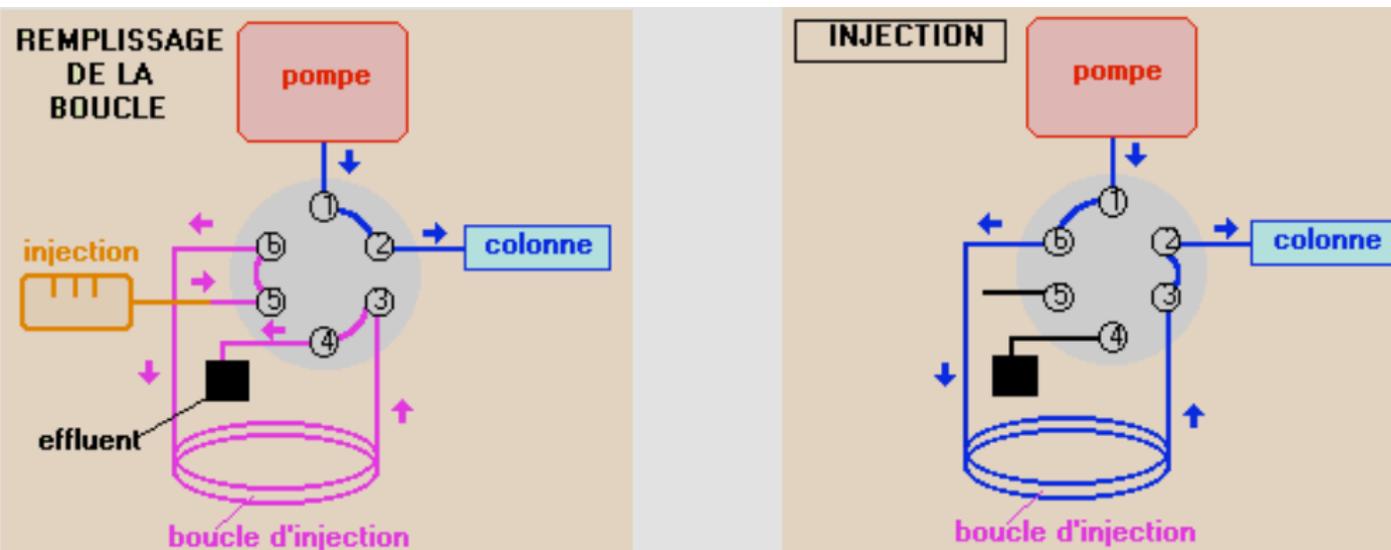
-volume précis en tête de colonne

-ne pas perturber la circulation de la phase mobile

→ Dispositif d'injection à boucle manuel ou automatique



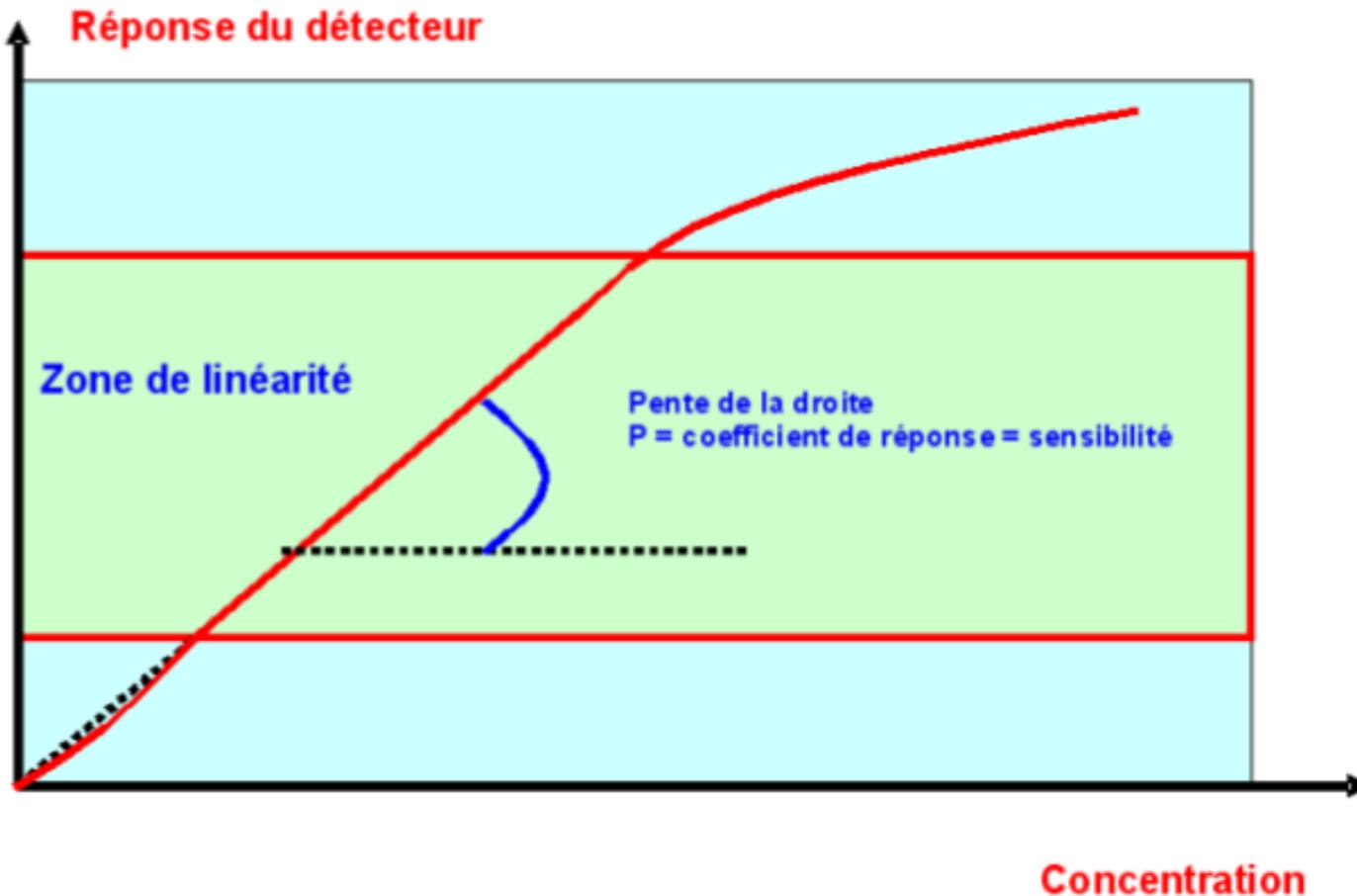
Exemple :



Les détecteurs

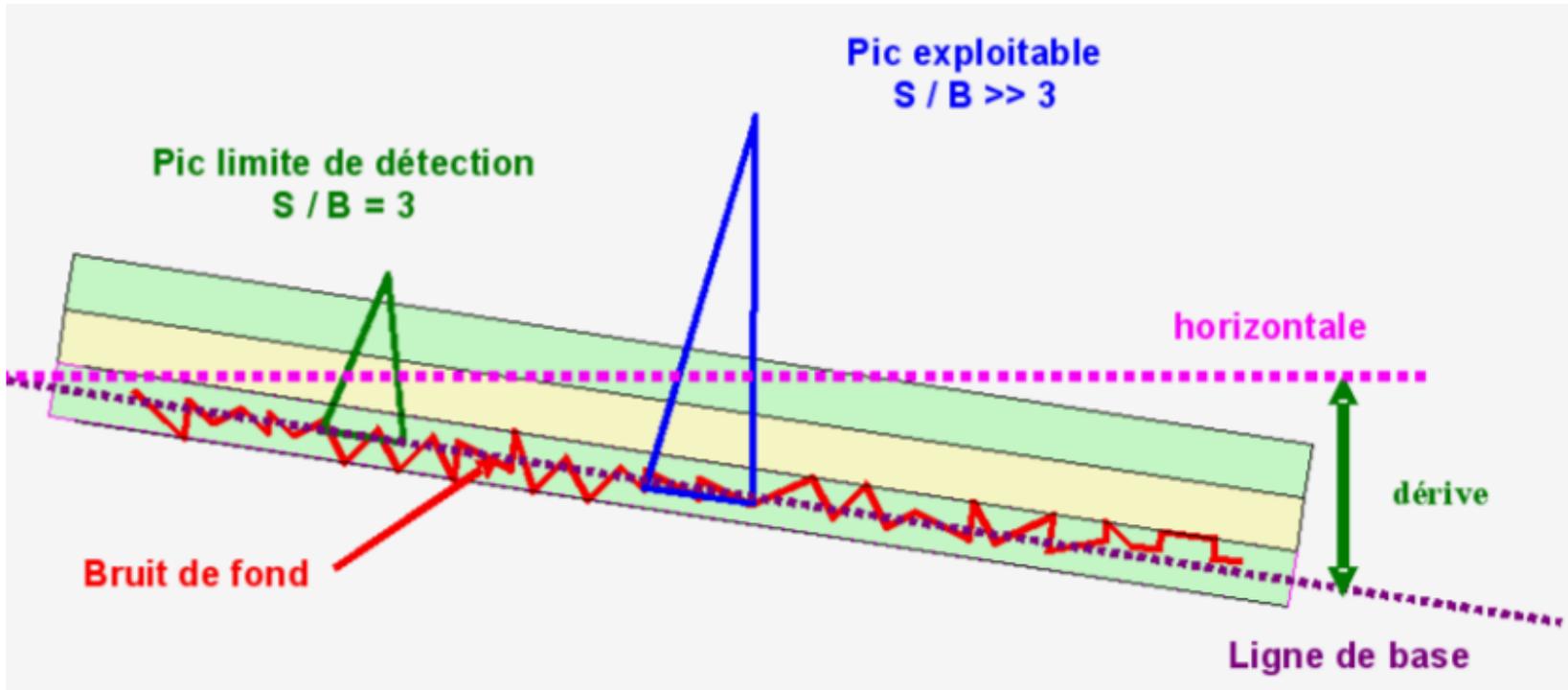
Il existe de nombreux types de détecteurs mais tous doivent avoir les caractéristiques suivantes pour être utilisables :

- 1) Détection adaptée à la substance étudiée (éventuellement : sélectivité par rapport à d'autres espèces)
- 2) Réponse proportionnelle à la concentration de la substance détectée
- 3) Sensibilité élevée : pente de la droite : réponse = f (concentration). Plus cette pente sera élevée et plus le détecteur sera sensible à de faibles variations de concentration.



- 4) réponse immédiate
- 5) stabilité du signal, le moins de bruit possible

Qualité du signal obtenu et exploitation des données



Le rapport signal/bruit dépend de l'analyte et du détecteur.

Tout détecteur possède un bruit de fond intrinsèque.

La dérive de la ligne de base est parfois observée en mode gradient lorsque les modifications de la composition du solvant sont détectables.

Détecteur par spectrophotométrie UV-Visible

Absorbance absolue solvant + soluté *ou* différence d'absorbance solvant/solvant + soluté (en présence d'une cellule de référence).

Détection U.V. : la plus répandue. Nombreux avantages :

Très forte sensibilité : détection d'analytes jusqu'à $c = 10^{-5}$ à 10^{-8} mol.L⁻¹.

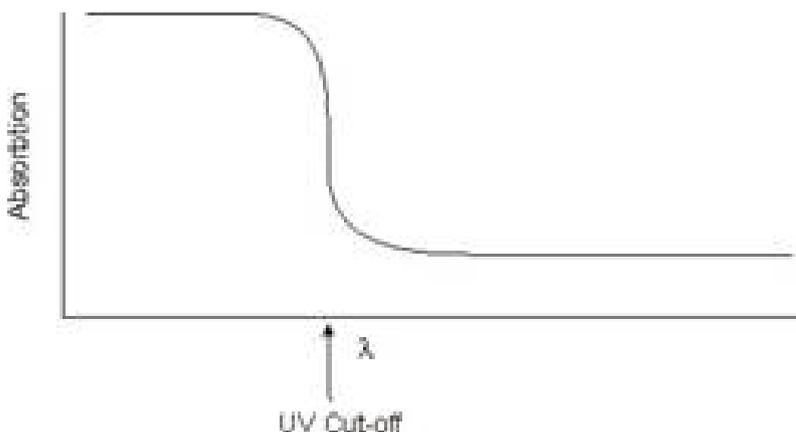
Dépend de la loi de Beer-Lambert $A = \varepsilon_{\lambda} \times c \times l$

→ choix de λ important

→ détection à longueur d'onde unique, à plusieurs longueurs d'onde ou enregistrant un spectre entier (détecteurs à barrette de diodes)

→ peut être utilisé en mode gradient d'élution (solvants très purs : qualité gradient)

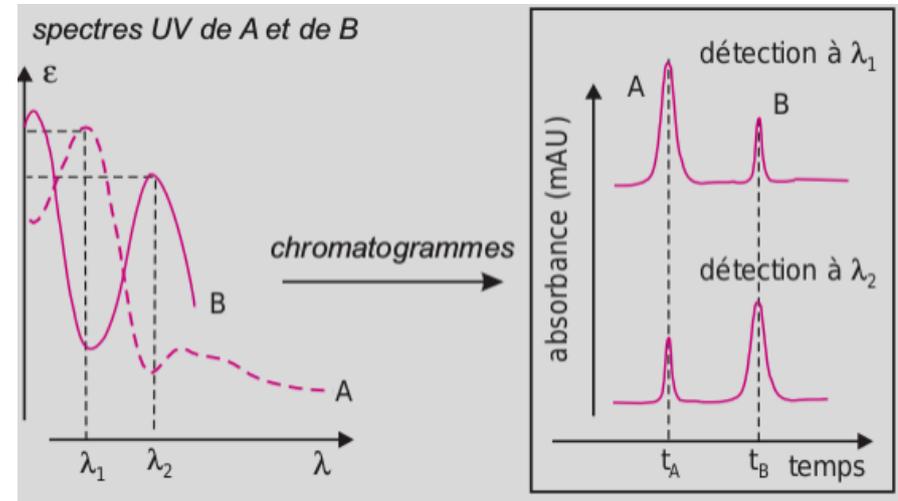
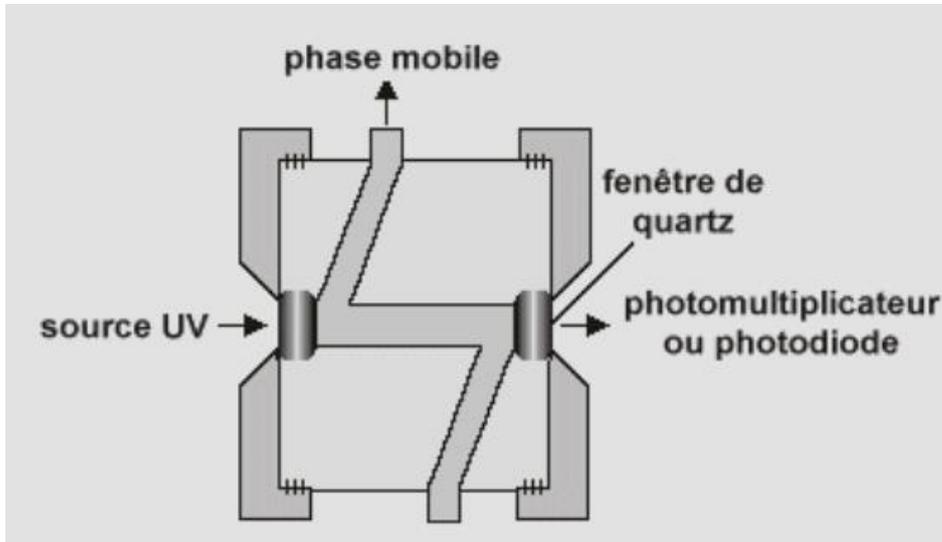
Si une substance ne possède pas de chromophore, elle n'est pas détectable.



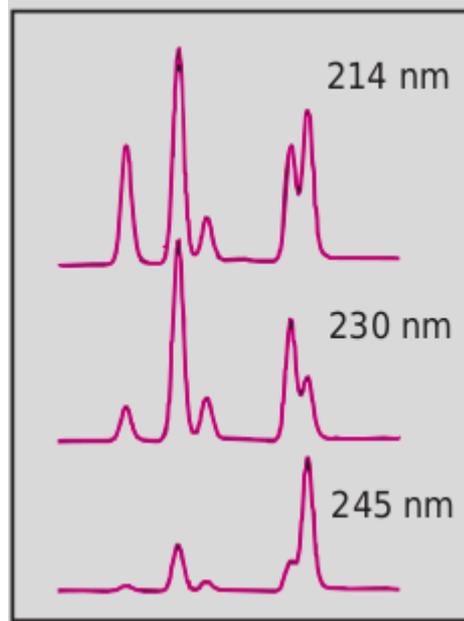
Limite : *cut-off* = absorption UV par le solvant

Pour $A = 1$, eau : 195 nm, méthanol : 205 nm,
Acétonitrile 190 nm
(qualités spéciales HPLC/gradient)

Détection à une ou a plusieurs longueurs d'onde ?



Exemple réel :
Chromatogramme de pesticides à plusieurs longueurs d'onde



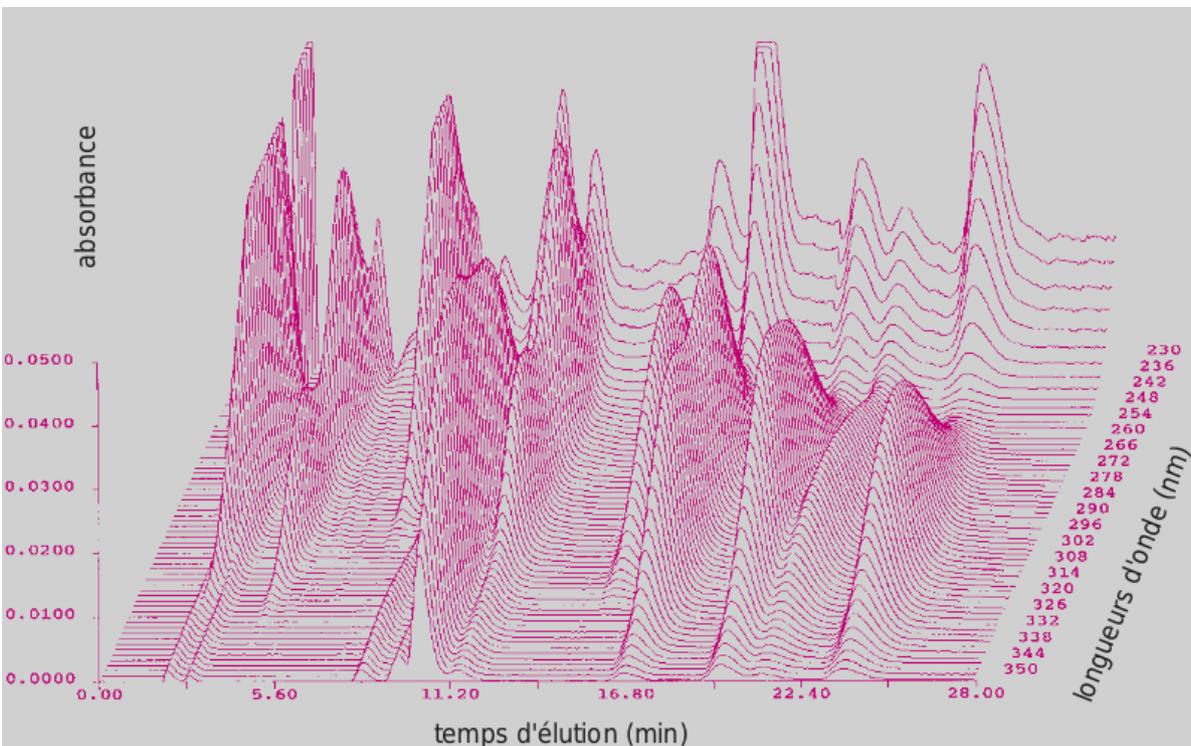
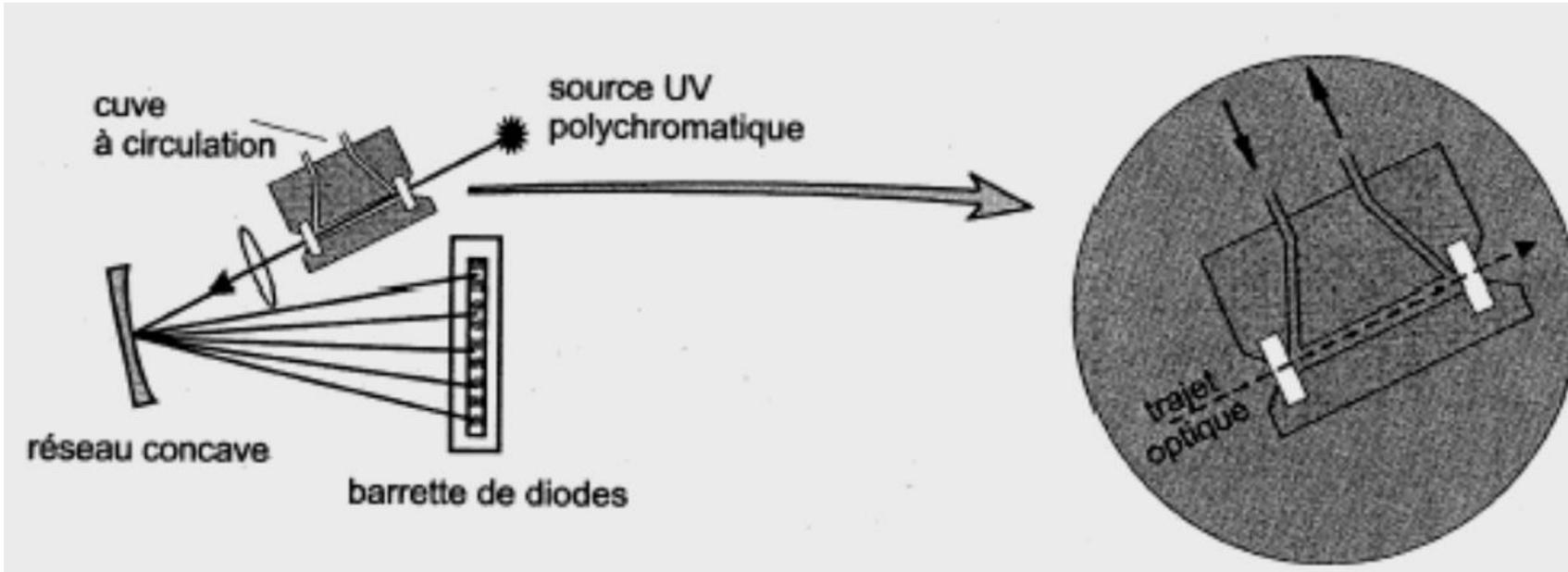
L'intégration du chromatogramme à une longueur d'onde donnée ne donne pas directement les concentrations des analytes.

→ en analyse quantitative, il faut déterminer, pour les conditions expérimentales utilisées le **facteur de réponse** f_i de chaque composé i : proportionnalité entre la concentration c_i et l'aire du pic A_i :

$$c_i = f_i A_i$$

(en concentration massique OU molaire)

Détecteur polychromatique à barrette de diodes



L'enregistrement des spectres permet de :

- confirmer l'identification des composés
- découvrir que certains pics correspondent à plusieurs composés

Détecteur par réfractométrie

Variation de l'indice de réfraction / présence de soluté dans le solvant

+ Universel

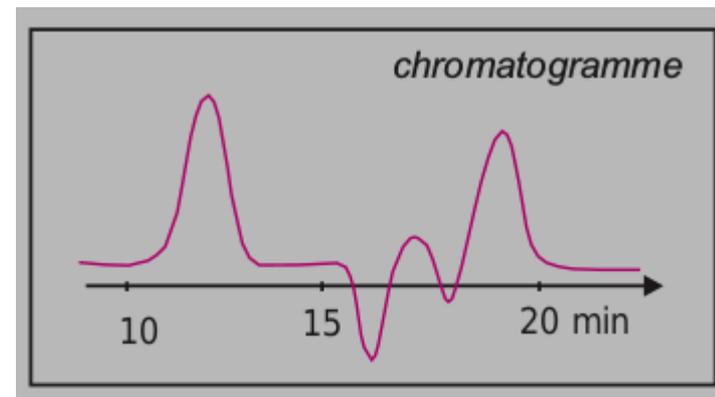
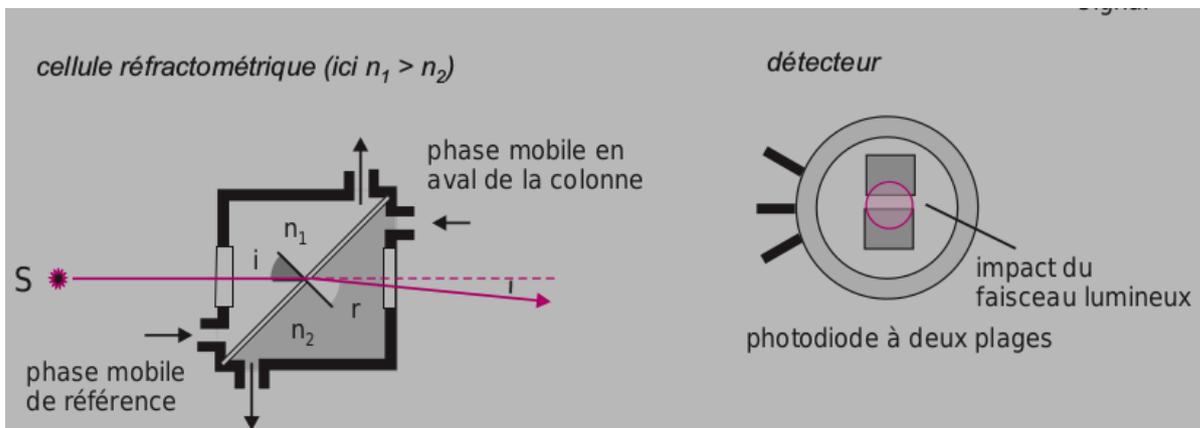
- Peu sensible ($\approx 1 \mu\text{g} / \text{mL}$) et utilisable *seulement en mode isocratique*.

Réfractomètre différentiel : mesure en continu la différence d'indice de réfraction entre la phase mobile seule et l'effluent de la colonne (cellule à deux compartiments)

Un faisceau lumineux passe à travers la cellule à compartiments

Présence d'analyte \rightarrow différence d'indice entre les deux liquides \rightarrow déplacement angulaire du rayon réfracté.

Signal = mesure en continu de la rétroaction qu'il faut fournir à un élément optique pour compenser la déviation du faisceau.



Autres détecteurs :

Fluorimétrie (pour les composés fluorescents, très sensible)

Conductimétrie (cf. chromato. échange d'ions) ; infra-rouge ; diffusion de lumière ;

ampérométrie (réaction d'oxydoréduction) ; spectrométrie de masse

III. Chromatographie en phase gaz

CPG

Soluté



phase stat.

III. 1 Caractéristiques générales

La **chromatographie en phase gaz** (CPG), parfois « ...en phase vapeur » (CPV) est définie par l'utilisation d'une phase mobile gazeuse, appelée *gaz vecteur*.

Phase mobile gazeuse inerte, ne sert qu'à entraîner les molécules de l'analyte.

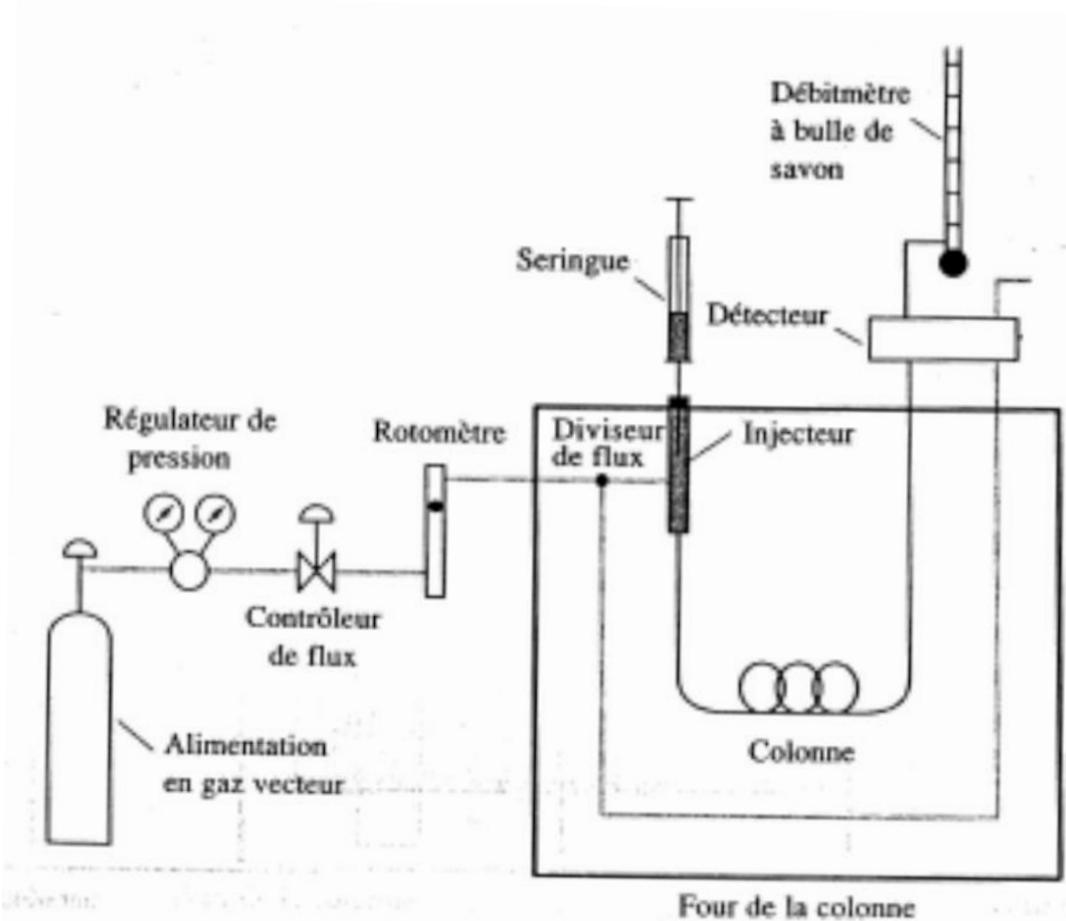
La phase stationnaire est la seule à interagir avec l'analyte (\neq chromatographie liquide).

Composés à analyser : gaz ou liquides vaporisables

CPG : technique analytique très répandue et largement utilisée depuis plus de 50 ans.

RQ : les relations générales vues dans le 1^{er} cours devraient, dans certains cas, être corrigées pour tenir compte du fait que les gaz sont, contrairement aux liquides, compressibles. Ici, on négligera cet aspect.

Instrumentation en CPG



Colonne(s) (une ou deux) dans une enceinte thermostatée (40 à 400 °C).

L'instrumentation permet :

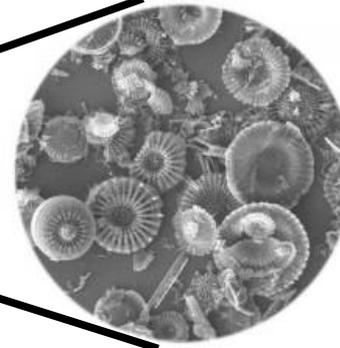
- vaporiser (si besoin) et introduire une quantité définie de l'échantillon
- contrôler le débit de gaz
- contrôler la température de la colonne
- mesurer le débit de gaz
- détecter les analytes en sortie de la colonne

III. Colonnes et phase stationnaire

Colonnes remplies (les plus anciennes)

Tube (acier inox, verre, ou téflon), souvent de 3,18 ou 6,35 mm de diamètre (1/8 ou 1/4 de pouce), rempli d'un support poreux, inerte et stable, finement et uniformément divisé (cf. CPL).

Le support peut être recouvert d'une couche mince de la phase stationnaire liquide. La phase stationnaire est donc imprégnée (taux de 3 à 25%) dans les pores.



Support classique :
Terre de diatomées
(microalgues
fossiles)

Doublement tamisée

Grand choix de phases stationnaires (liquides à haut $T_{éb}^{\circ}$).

Pour éviter la perte de la phase stationnaire :
liquide avec $T_{éb}^{\circ} > T_{colonne} + 100\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Granulométrie :
mesure anglo-saxonne : mesh
(nombre de mailles du tamis par pouce carré)

Pour les colonnes remplies
60-100 mesh

Colonnes capillaires

Invention : 1957, large développement dans les années 1970.

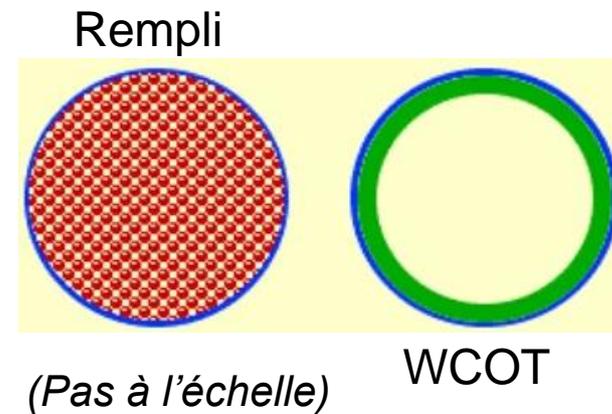
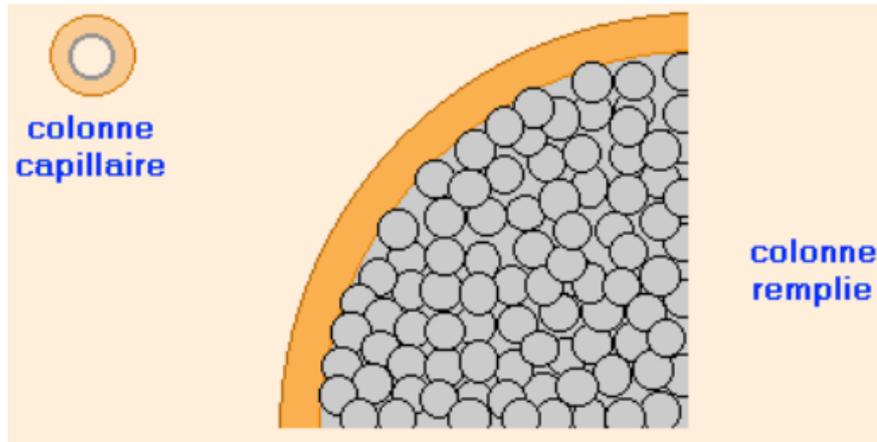
Colonnes tubulaires ouvertes : la phase stationnaire tapisse les parois internes,
- sous forme d'un film (épaisseur $\approx 1 \mu\text{m}$) : WCOT (Wall Coated Open Tubular).

D'abord colonnes en acier, puis en silice fondue (très pure) recouverte d'une gaine extérieure en polymère thermiquement résistant.

Diamètre intérieur de 0,1 à 0,5 mm,

L = 10 à 100 m. Enroulée en spirales

Efficacité : $N \approx 20000-200000$ en fonction de la longueur contre $N = 1000$ pour une colonne remplie).



Pour une WCOT : Soit d_c : diamètre de l'ouverture et d_s : épaisseur de la phase stationnaire.
On montre facilement que :

$$\beta = V_S/V_M \approx 4d_s/d_c$$

Or, pour un analyte A : $k_A = K \times \beta \rightarrow$ plus la phase stationnaire est épaisse, plus k_A est grand



Deux colonnes remplies dans un four



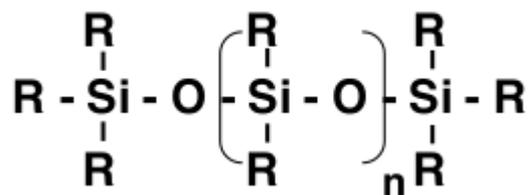
Colonne capillaire

Diamètre intérieur (mm)	Efficacité par unité de longueur : N/L	Efficacité totale pour 30 m : N	Capacité pour chaque analyte (ng)
0.53	1,300	39,000	1000-2000
0.32	2,300	69,000	400-500
0.25	2,925	87,750	50-100
0.20	3,650	109,500	<50
0.18	4,050	121,500	<50
0.10	7,300	219,000	<10

← Utilisable dans les appareils initialement montés avec des colonnes remplies.

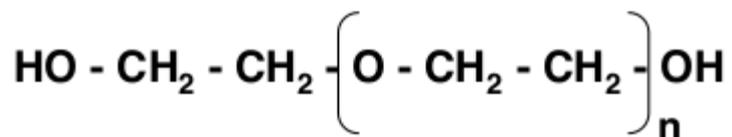
Source : Sigma-Aldrich

La phase stationnaire en CPG capillaire : caractéristiques chimiques



R = CH₃ **polydiméthylsiloxane**

5 à 50 % groupe modificateur à la place des CH₃ pour certaines applications, (polarité, interactions spécifiques.)



Polyéthylène glycol (PEG) : Carbowax®.

Phase plus polaire

Ces polymères peuvent donner lieu à un greffage covalent : pas de lessivage

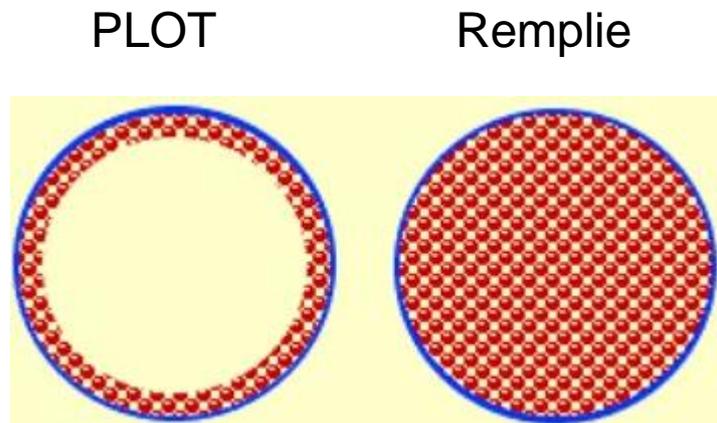
Phase stationnaire	Nom commercial	Température maximale/°C	Utilisations habituelles
Polydiméthyl siloxane	OV-1, SE-30	350	Phase non polaire à usage général ; hydrocarbures ; aromatiques polynucléaires ; médicaments ; stéroïdes ; PCB
5% Phényl-polydiméthyl siloxane	OV-3, SE-52	350	Esters méthyliques d'acides gras ; alcaloïdes ; médicaments ; composés halogénés
50% Phényl-polydiméthyl siloxane	OV-17	250	Médicaments ; stéroïdes ; pesticides ; glycols
50% Trifluoropropyl-polydiméthyl siloxane	OV-210	200	Chloroaromatiques ; nitroaromatiques ; alkylbenzènes substitués
Polyéthylène glycol	Carbowax 20M	250	Acides libres ; alcools ; éthers ; huiles essentielles ; glycols
50% Cyanopropyl-polydiméthyl siloxane	OV-275	240	Acides gras polyinsaturés ; acides de la colophane ; acides libres ; alcools

Chromatographie gazeuse d'adsorption

Gaz et hydrocarbures très volatils uniquement

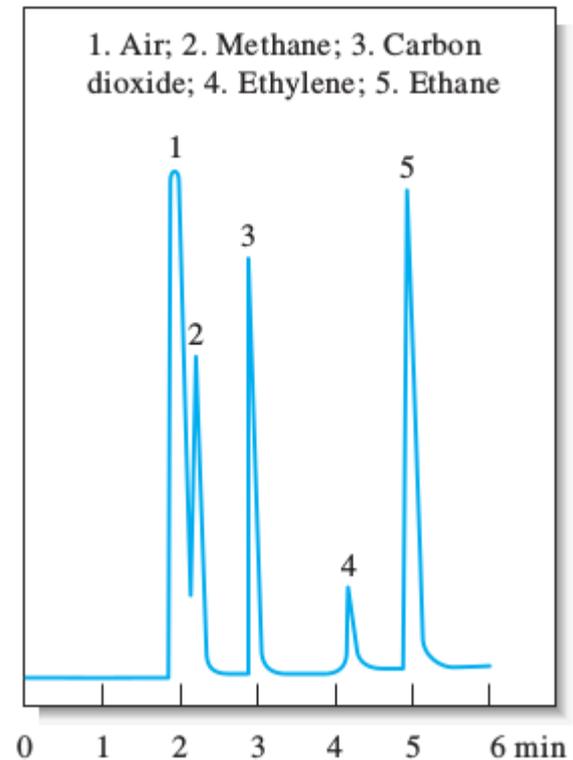
Colonnes PLOT, particules de silice et alumine = phase stationnaire

Pas de phase liquide : chromatographie d'adsorption



PLOT : *Porous Layer Open Tubular* : couche de particules de 5 à 50 μm d'épaisseur

Diamètre interne de la colonne : 0,32-0,53 mm



Séparation de gaz et de vapeurs d'hydrocarbures sur colonne PLOT

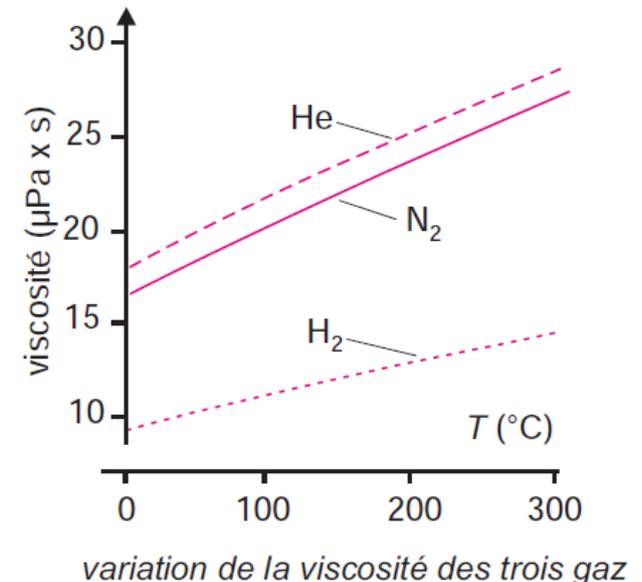
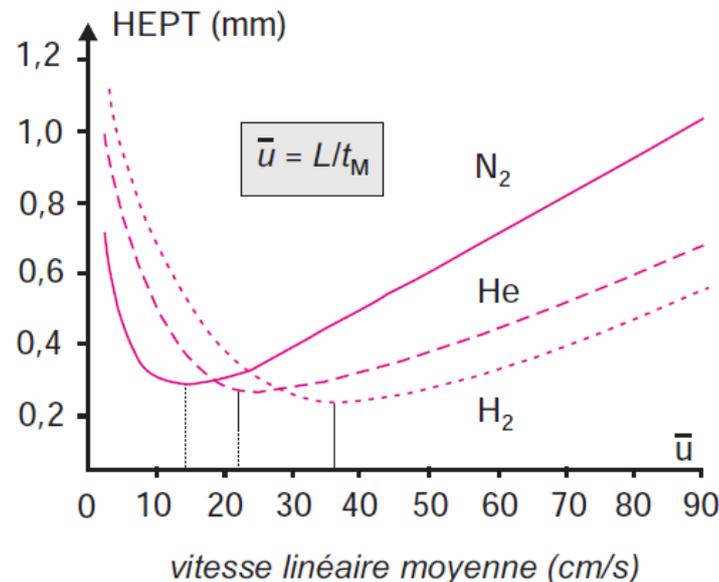
III. 3 Phase mobile : gaz vecteur

Même si les molécules de gaz *n'interagissent pas* avec l'analyte, son choix est important

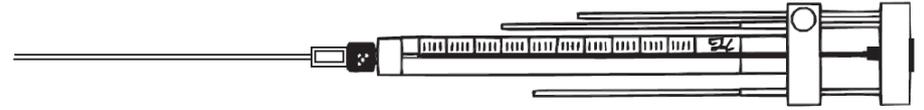
Le gaz utilisé doit être :

- inerte vis-à-vis de l'échantillon et du garnissage de la colonne (phase stationnaire) He, N₂, H₂, Ar ...
- compatible avec le détecteur utilisé
- exempt de traces d'H₂O et O₂ : gaz purs et desséchés.
- Son débit doit être régulé avec précision : l'incertitude relative sur le débit se répercute directement sur les temps de rétention.
- Sa pression doit être constante

Souvent : H₂
(peut être généré par électrolyse de l'eau).



III. 4 Injection de l'échantillon



Injection de liquides volatils

Microseringue (0,1 à 10 μL).

Injection de liquides à travers un septum (élastomère) dans une chambre de vaporisation (injecteur) située à une extrémité de la colonne.

Température de l'injecteur: vaporisation mais pas de décomposition (environ 50°C au-dessus du point d'ébullition du constituant le moins volatil)

Selon le type de colonne :

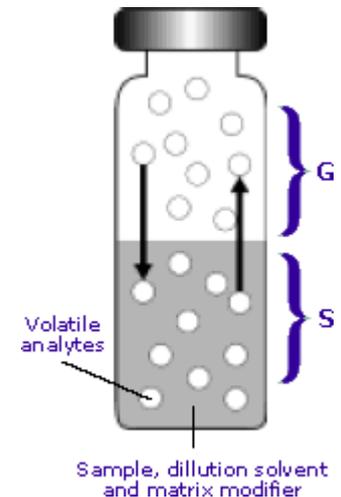
-Colonnes remplies : injection de 0,1 à 0,5 μL de solution de l'échantillon, injecteur "classique", à vaporisation directe.

-Colonnes capillaires : quantités très faibles, difficiles à mesurer

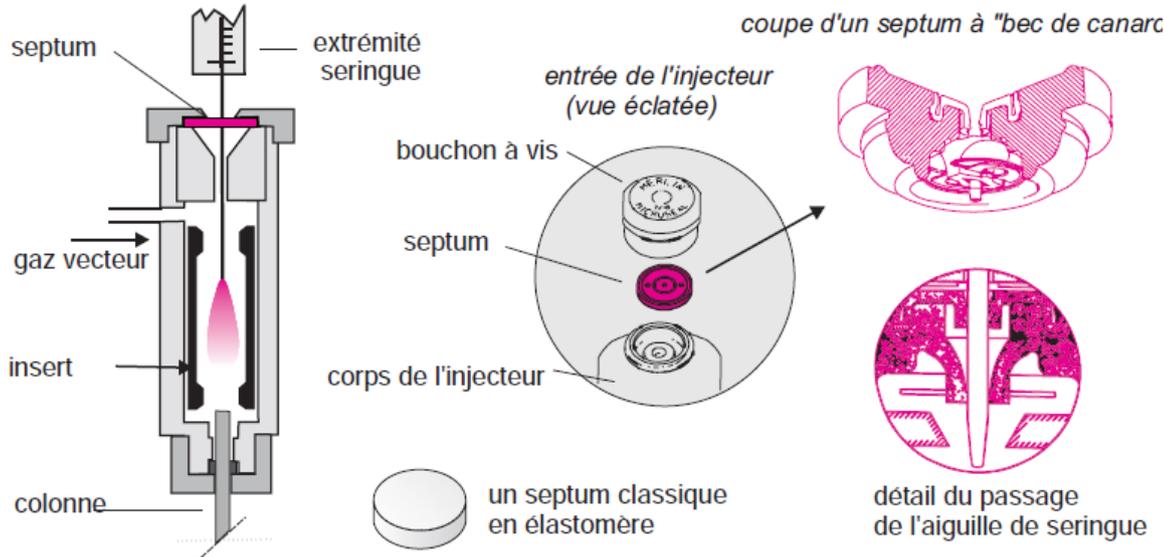
Injection de gaz/de vapeurs

Injection directe de gaz en chromatographie d'adsorption

Analyse « *headspace* » (espace de tête) : injection de vapeurs prélevées dans un flacon fermé contenant des liquides volatils



Injecteur à vaporisation directe

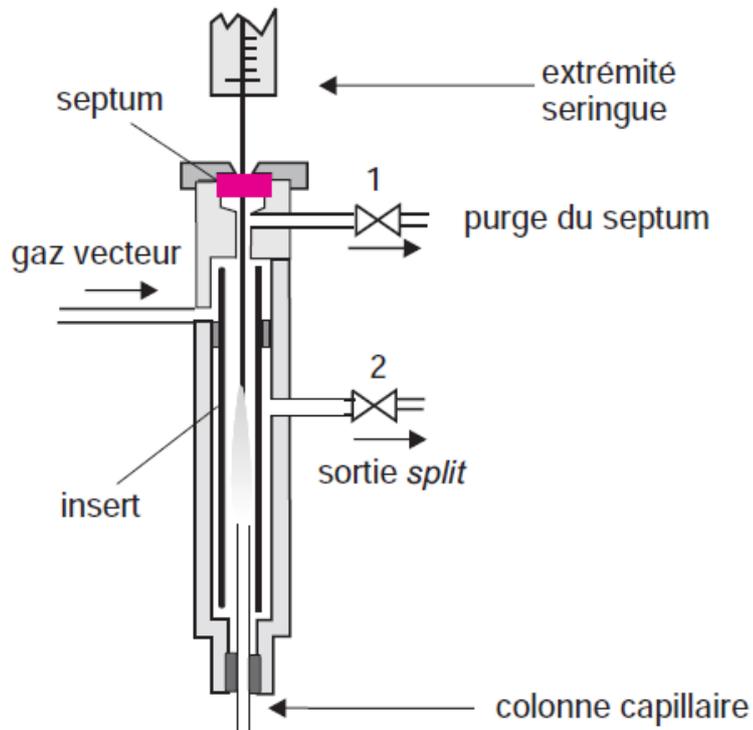


2 types d'injecteurs courants

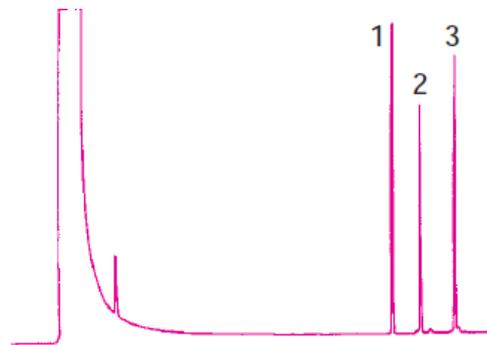
Débit de gaz minimum : $\approx 8 \text{ mL min}^{-1}$
 → grosses colonnes capillaires et colonnes remplies uniquement

Les colonnes capillaires, à faible capacité d'échantillon seraient saturées même avec $0,1 \mu\text{L}$ d'échantillon pur

Injecteur avec ou sans division (*split/splitless*)



Débit élevé du gaz vecteur entrant. Réglage de la vanne de fuite (sortie *split*) → $\sim 1\%$ de l'échantillon pénètre dans la colonne



Mode *splitless* : vanne 2 fermée pendant 30-60s. Tout l'échantillon se concentre dans le début de la colonne
 → analyse de traces = pics très petits à côté de ceux du solvant.

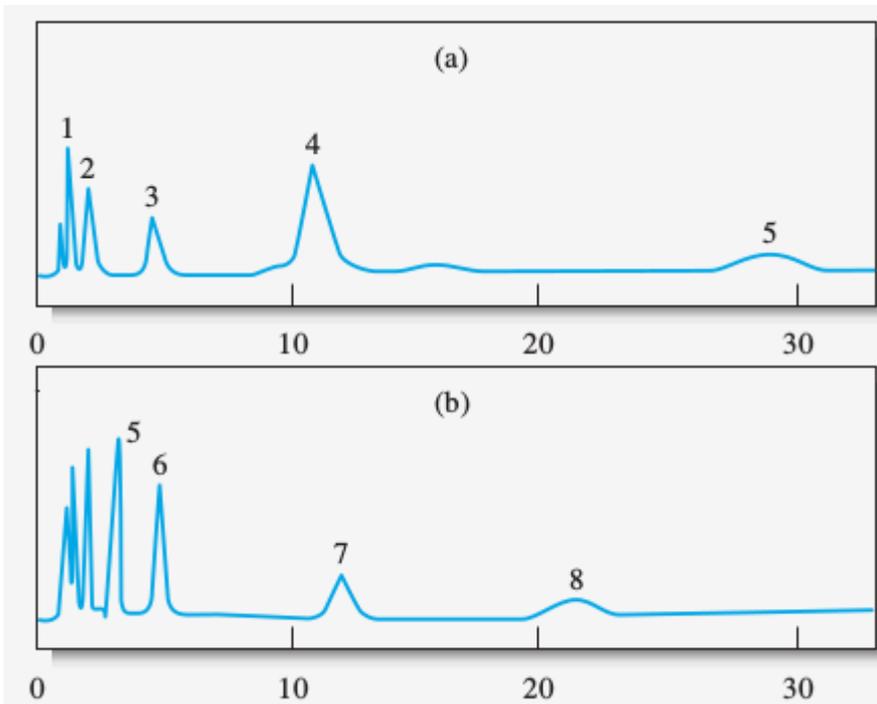
III. 5 Réglage et programmation de la température

En CPG, le réglage et la programmation de la température correspondent à la force de l'éluant et à la mise en place d'un gradient d'éluant en HPLC.

Un analyte est d'autant plus retenu que son point d'ébullition est élevé et que les interactions avec la phase stationnaire sont faibles.

→ à **température constante**, nécessité de maîtriser la température ($\pm 1^\circ\text{C}$)

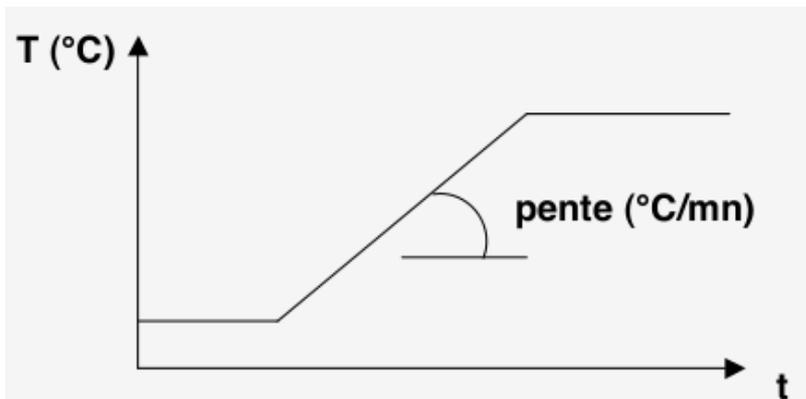
Exemple : mélange de 9 analytes, facteurs de rétention croissants



(a) $T = 45^\circ\text{C}$

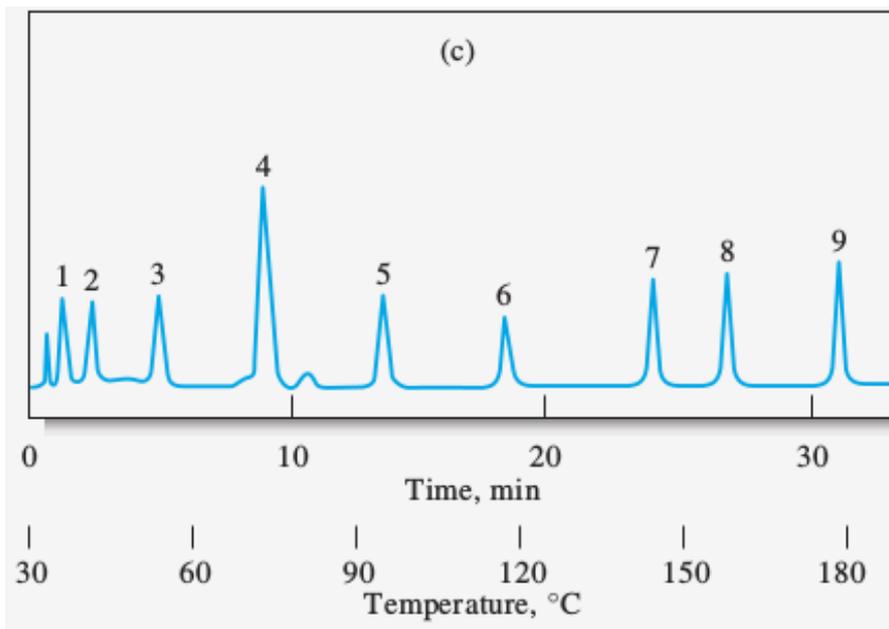
(b) $T = 145^\circ\text{C}$

En mode **programmation de température** → réponse immédiate et augmentation linéaire

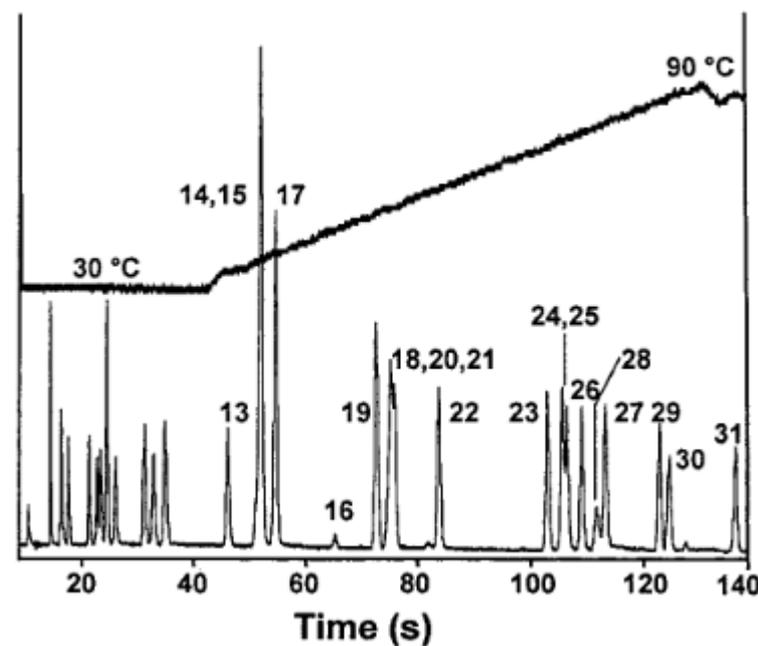


Seule la programmation de température permet à la fois la séparation des analytes peu retenus et la sortie des analytes les plus retenus de la colonne avec un temps et une hauteur de signal raisonnables.

Mélange de 9 analytes, avec programmation de T



Chromatographie ultrarapide (colonnes courtes, débit de gaz élevé)



Séparation de 31 hydrocarbures et composés halogénés numérotés par $T^{\circ}_{\text{éb}}$ croissant. (Sacks et al. *Analytical Chem.*, 1998)

III. 6 Détecteurs en CPG

Le détecteur idéal

- très bonne sensibilité (aujourd'hui 10^{-8} à 10^{-15} g/s selon les détecteurs)
- stable (pendant une analyse) et reproductible (entre analyses)
- réponse linéaire sur plusieurs ordres de grandeurs
- utilisable sur une large gamme de température ($T \rightarrow 400$ °C courant en CPG)
- réponse immédiate
- insensibilité au débit du gaz
- fiable et robuste (résistant aux erreurs de l'opérateur)

Selon le problème analytique à résoudre on préférera

- un **détecteur universel**

ou

- un **détecteur sélectif** par rapport à une classe de composés

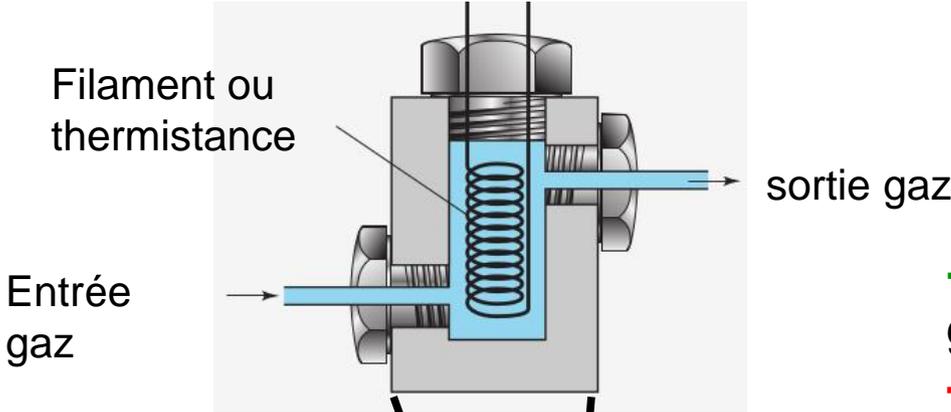
Le détecteur idéal n'existant pas, on choisit le meilleur détecteur pour un problème donné.

III. 6 Détecteurs en CPG

Catharomètre

Principe : mesure de la conductivité thermique du gaz à la sortie de la colonne.

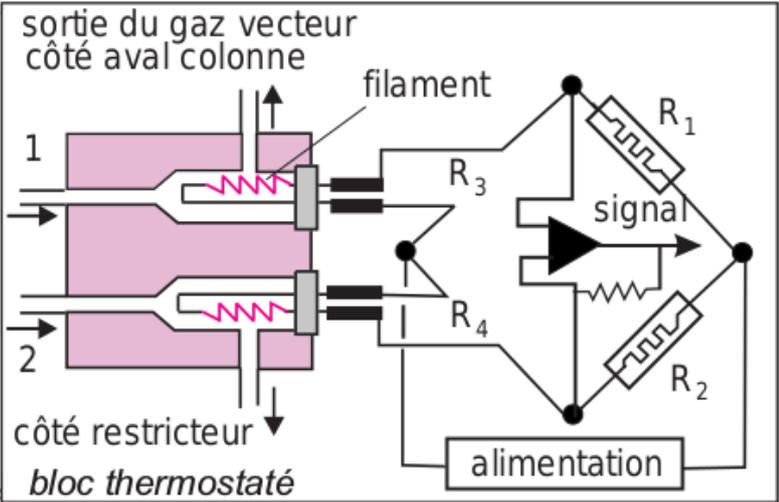
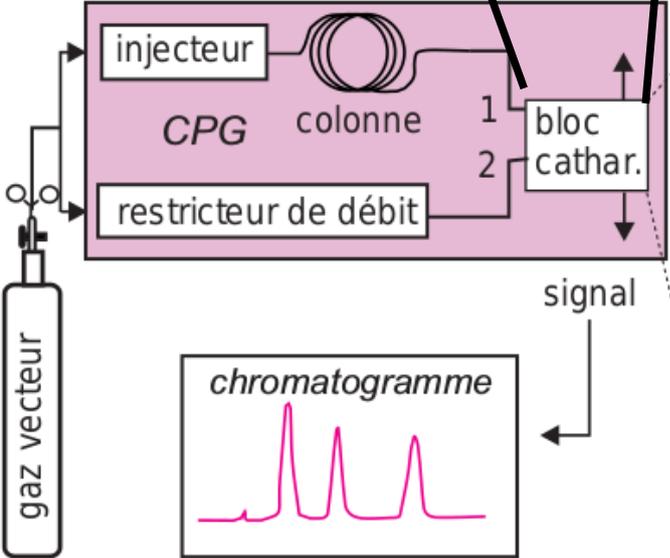
Nécessité d'utiliser He ou H₂ comme gaz vecteurs : ils ont une conductivité thermique un ordre de grandeur plus grande que celle des composés organiques.



La résistance des métaux augmente avec la température. Métaux utilisés : Pt, Au, W.

Présence de molécules : $T \uparrow \rightarrow R \uparrow$

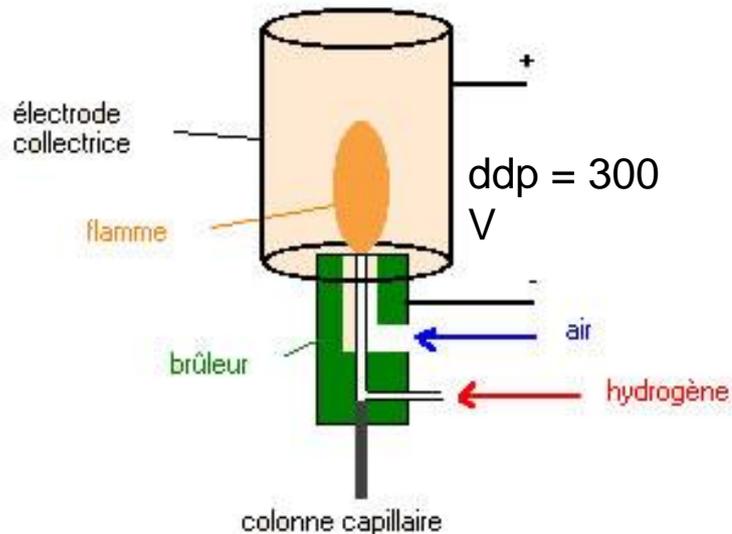
- + Simple, universel, linéaire sur 5 ordres de grandeur, tout type de colonnes, non destructif
- Peu sensible ($\approx 10^{-8}$ g / s)



Détection par comparaison de du gaz vecteur seul et du gaz en sortie de colonne.

catharomètre (branchement)

Détecteur à ionisation de flamme (Flame Ionisation Detector, FID)



Principe de fonctionnement : la plupart des composés organiques produisent des ions et des électrons quand ils sont pyrolysés à la température d'une flamme air-hydrogène (2000°C) → détection d'un courant électrique.

Aire du pic à peu près proportionnelle à la masse du composé organique présent.

Plus exactement au nombre de carbones réduits (C lié à C ou H) présents.

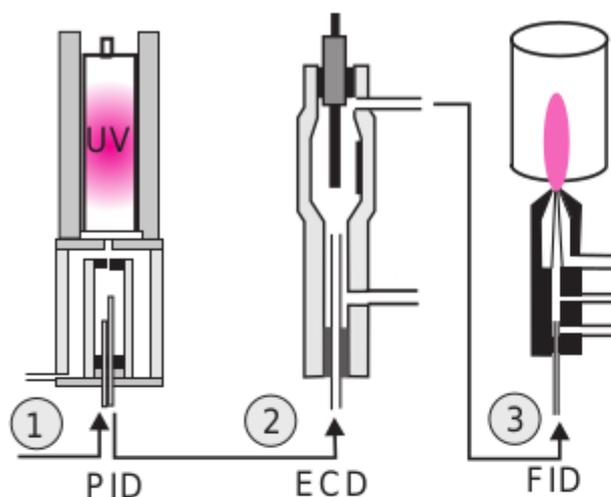
Pas d'ions produits par les composés oxydés H_2O , CO_2 , SO_2 , et NO_x ni par les groupements oxygénés, azotés et halogénés des molécules organiques.

Peu sensible aux variations du débit de la phase mobile.

- + forte sensibilité (10^{-13} g/s), linéarité sur 7-8 ordres de grandeur, quasi universel pour les composés organiques (sauf espèces non combustibles)
- destructif → inutilisable dans des méthodes couplées.

De nombreux autres détecteurs existent

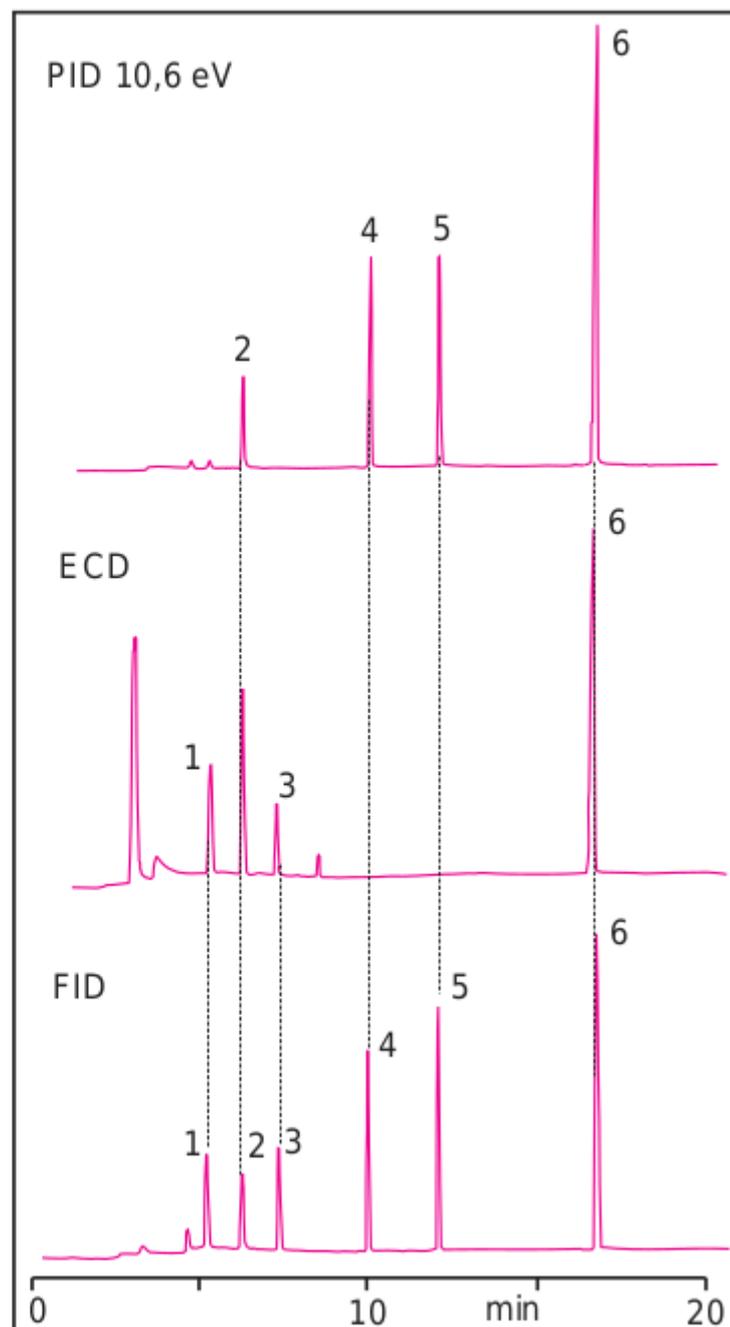
Exemple : utilisation de plusieurs détecteurs en série



Analyse de traces d'hydrocarbures dans une eau naturelle

gaz vecteur : He, 2 mL/min
colonne 30 m x 0,32 mm diam. int
split : 10/1
four 50°C 1 min, puis rampe
de 10°C/min jusqu'à 150°C

- 1 - dichlorométhane
- 2 - butanone
- 3 - 1,2-dichloroéthane
- 4 - toluène
- 5 - *m*-xylène
- 6 - *o*-dichlorobenzène



IV. Conclusion générale

Toutes les techniques chromatographiques, quelles que soient leurs spécificités sont fondées sur des **bases physico-chimiques communes**.

Le chimiste **choisit** une technique adaptée à un problème donné et **optimise** les conditions de sa mise en œuvre. Les problèmes qualitatifs (détection d'une espèce) sont plus simples à résoudre que les problèmes de quantification. Plus l'échantillon est complexe, plus l'analyse sera difficile.

Une analyse est un compromis entre plusieurs paramètres (résolution, temps d'analyse ; universalité ou spécificité du détecteur...).

Les modifications des conditions les plus courantes : **gradient d'élution** en HPLC, **programmation de température** en CPG.

Comme la plupart des détecteurs ne donnent pas d'informations structurales, l'identification est fondée sur les temps de rétention (ou des grandeurs dérivées) il faut toujours veiller à **comparer des données chromatographiques obtenues strictement dans les mêmes conditions**.

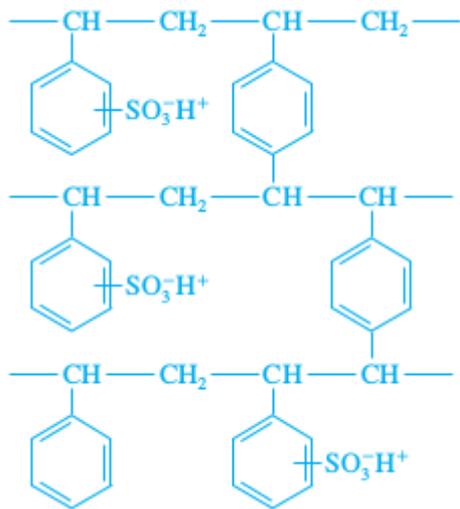
Le **choix des détecteurs** se fait en fonction des analytes, mais il influence également d'autres paramètres de l'expérience, en particulier la composition de la phase mobile.

RQ : comme beaucoup d'autres cours au niveau bac+2, ce cours est une introduction à des approches contemporaines scientifiques et technologiques, il n'est donc pas exhaustif, mais a été conçu pour vous donner des clés pour comprendre les développements les plus récents du domaine.

Complément 1 : introduction à la chromatographie ionique

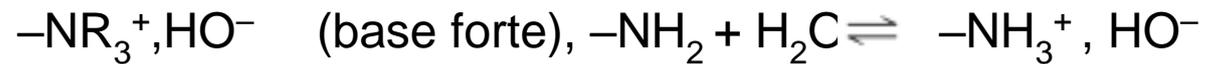
La chromatographie ionique découle du développement des **résines échangeuses d'ions** (~1955). Après le développement de ces résines, les appareils sont apparus une vingtaine d'années plus tard en adaptant l'instrumentation de la chromatographie liquide habituelle.

Les résines les plus fréquentes : polymères réticulés de type polystyrène/divinylbenzène.

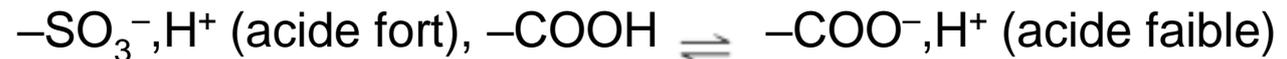


Une certaine partie des noyaux aromatiques sont fonctionnalisés par des groupements chargés :

► cationiques → pouvant échanger des anions



► anioniques → pouvant échanger des cations

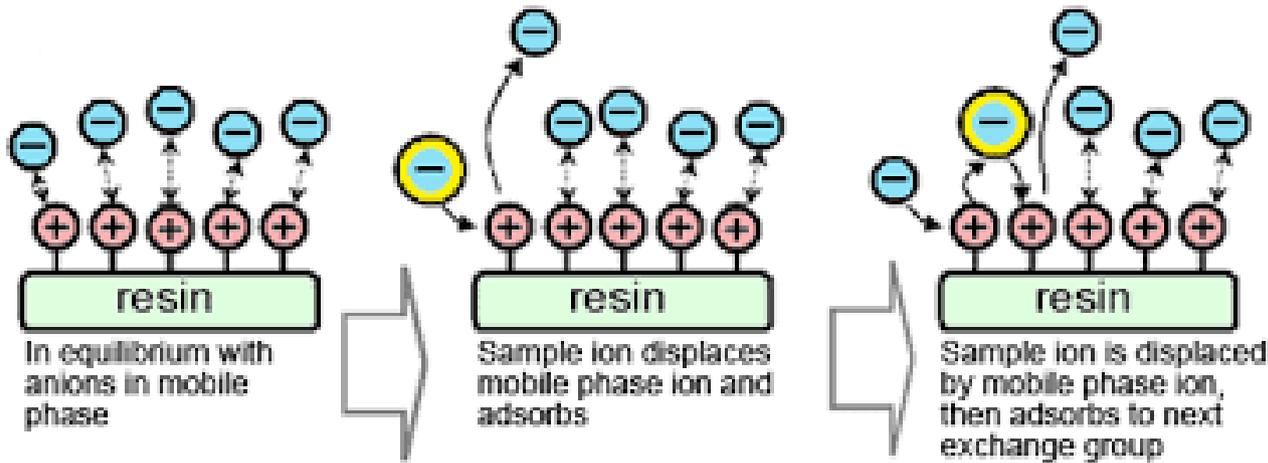


Application non chromatographique de ces résines :

Analyse chimique : remplacer des ions ou mélanges d'ions difficiles à doser par H^+ ou HO^-
enlever certains ions de phases aqueuses : remplacer Ca^{2+} par Na^+ dans les adoucisseurs d'eau

Principe de la séparation en chromatographie ionique (chromatographie d'échange d'ions)

Pour une séparation d'anions



Source : shimadzu.com

La constante d'équilibre fondant la séparation est due à l'interaction électrostatique ion-ion. Elle est fonction de :

- la charge des ions,
- la dimension des ions
- la distribution de la charge dans l'espace.

Phase mobile : eau.

La phase mobile est habituellement tamponnée (important si la résine est un échangeur faible et/ou si les analytes sont des acides ou bases faibles) et elle contient toujours un électrolyte. L'éluant est d'autant plus fort qu'il est chargé en ions.

Phase stationnaire :

polymère : peu résistant à l'écrasement.

→ silice fonctionnalisée par des cations ou anions, résine polymérique à la surface de microbilles de silice

Capacité d'échange de la phase stationnaire en mmol.g^{-1}

Détection

Détecteur universel en chromatographie ionique : détecteur conductimétrique : simple, robuste, facile d'entretien, miniaturisable.

Les autres détecteurs utilisés en chromatographie liquide sont utilisables dans des cas spécifiques (ex : détecteur spectrophotométrique pour des ions absorbant la lumière).

Rappel : loi de Kohlrausch (pour les solutions diluées) : $\sigma = \sum z_i \lambda_i^\circ c_i$

Où σ est la conductivité [S m^{-1}],

Les z_i sont les charges des ions

Les λ_i° sont les conductivités ioniques molaires des ions (exprimées par unité de charge)

Les c_i sont les concentrations molaires des ions

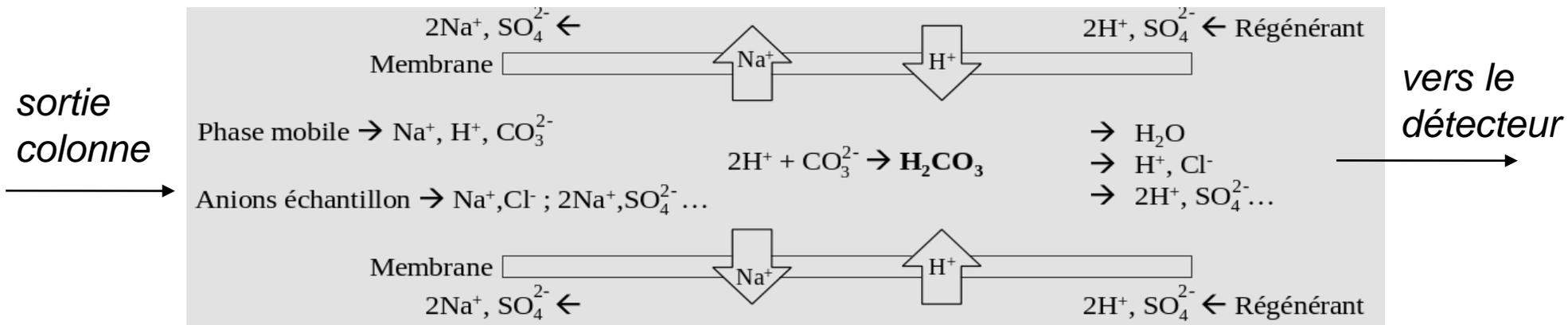
Difficulté : l'éluant contient lui-même un électrolyte beaucoup plus concentré que les analytes.

Un appareil de chromatographie ionique contient donc généralement une deuxième colonne dédiée à la **suppression chimique** = la neutralisation des ions de l'éluant.

De cette manière, seuls des ions d'intérêt analytique arrivent au détecteur.

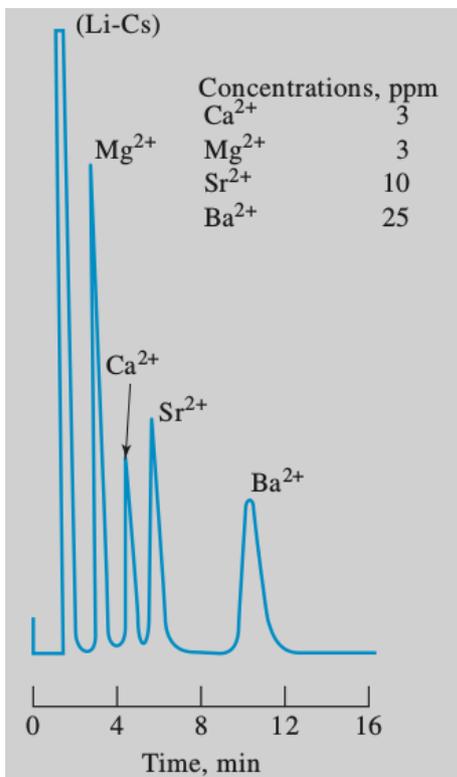
Récemment, des appareils à colonne unique (sans suppresseur) ont été commercialisés, mais ils sont moins sensibles que les appareils avec suppresseur.

Suppression chimique par utilisation des membranes échangeuses d'ions avec la circulation d'une solution régénérante à contre-courant. Ex. pour l'analyse d'anions



→ électrolyte de l'éluant : espèce à conductivité nulle

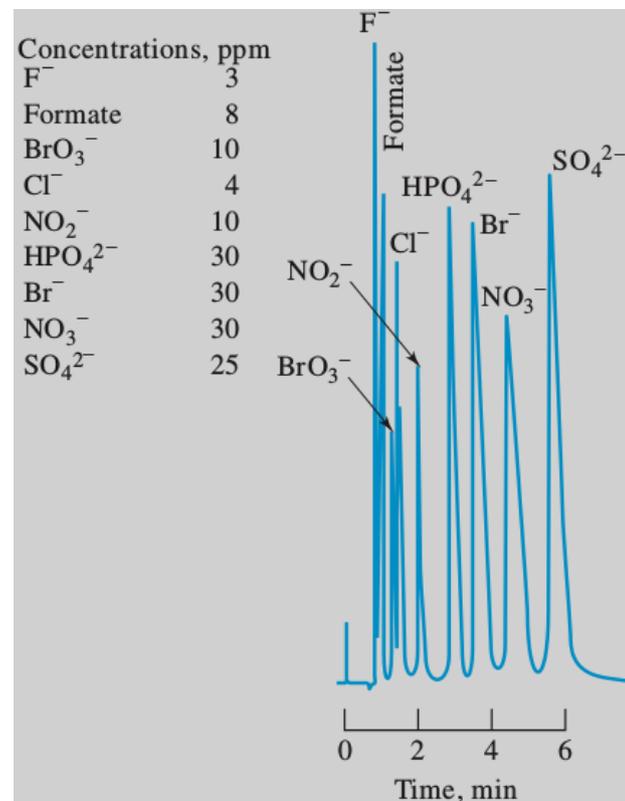
→ analyte : contre-ion Na^+ ($\sigma = 5 \text{ mS.m}^2.\text{mol}^{-1}$) remplacé par H^+ ($\sigma = 35 \text{ mS.m}^2.\text{mol}^{-1}$)



Chromatogramme avec suppression chimique

← Cations
Anions →

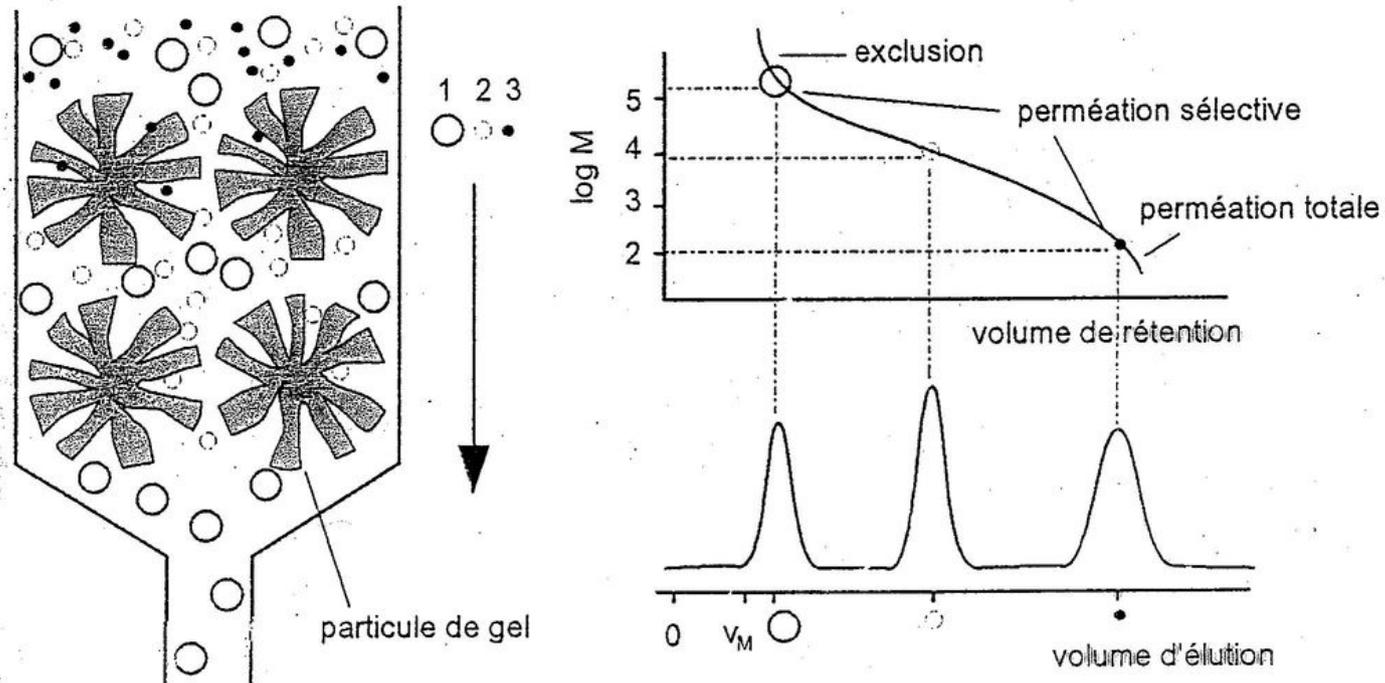
(source www.waters.com)



Complément 2 : introduction à la chromatographie d'exclusion stérique

Applications : analyses de macromolécules biologiques, de polymères

Principe général



Pour les petites molécules = perméation totale, très retenues

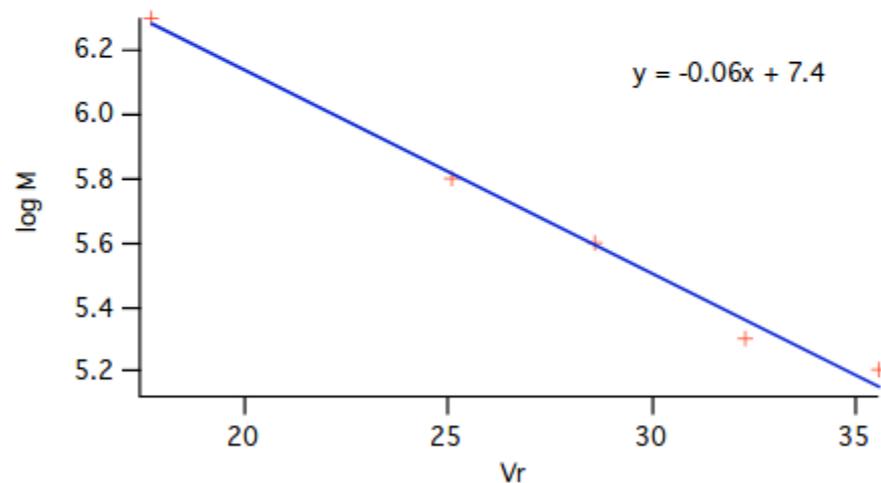
Grosses macromolécules = exclusion totale, pas retenue (élue avec le volume mort)

Cas intermédiaires, perméation sélective t_R ou volume d'élution dépendent de M.
Relation linéaire entre $\log M$ et volume d'élution.

Exemple : détermination de la masse moléculaire d'une protéine inconnue

↳ Représentation $\log M$ en fonction du volume d'élution.

Composés	V_r (mL)	Masse moléculaire (Da)	Log M
Blue Dextran 2000	17.7	2.10^6	6.3
Aldolase	35.6	158000	5.2
Catalase	32.3	210000	5.3
Ferritin	28.6	440000	5.6
Thyroglobulin	25.1	669000	5.8
Inconnu	30.3	?	-



↳ Soluté inconnu: $V_r = 30.3$ mL

$$\log M = -(0.06 \times 30.3) + 7.4 = 5.6$$

$$M \sim 400000 \text{ Da}$$